

# Regulation des bakteriellen Phosphotransferase-Systems durch Mlc und Glucokinase

**Dissertation**

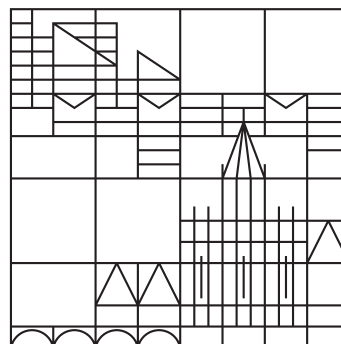
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

David Johannes Witte

an der

Universität  
Konstanz



Mathematisch-naturwissenschaftliche Sektion  
Fachbereich Chemie

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2015

1. Referent: Prof. Dr. Heiko Möller
2. Referent: Prof. Dr. Winfried Boos







„I always thought that inspiration is for amateurs. The rest of us just show up and get to work. You sign onto a process and see where it takes you. You don't have to invent the wheel every day. Today you'll do what you did yesterday and tomorrow you'll do what you did today. Eventually you'll get somewhere. Every great idea I ever had grew out of work itself. If you're going to wait around for the clouds to open up and lightning to strike you in the brain you're not going to make an awful lot of work.“

*Chuck Close*



# Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand von Dezember 2008 bis Juni 2013 in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Heiko Möller an der Universität Konstanz.

An erster Stelle möchte ich Professor Dr. Heiko Möller für die Überlassung des interessanten Themas und die exzellente Betreuung danken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern meines Thesis-Komitees Professor Dr. Winfried Boos und Professor Dr. Valentin Wittmann für die kritische Begleitung meiner Promotion bedanken.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Möller möchte ich für die angenehme und sehr kollegiale Atmosphäre in und außerhalb des Labors meinen Dank aussprechen. Ruslan Nedielkov möchte ich für die gemeinsamen Photo-Touren rund um den Bodensee während dieser Zeit danken. Besonderer Dank gilt Anke Friemel für die Hilfe bei der Planung und Durchführung meiner NMR-spektroskopischen Messungen.

Bei Christina Lengsfeld möchte ich mich für die Vorarbeiten zur Aufklärung der Regulation des bakteriellen Phosphotransferase-Systems durch die Glucokinase Glk und die Einführung in die Proteinexpression bedanken.

In der Anfangszeit der Dissertation wurden alle *S1*-molekularbiologischen Arbeiten in den Räumlichkeiten der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Elke Deuerling durchgeführt. Für diese Möglichkeit und die stete Hilfsbereitschaft möchte ich Professor Dr. Deuerling und ihrer Arbeitsgruppe an dieser Stelle danken. Besonders bei Steffen Preisler möchte ich mich für die Unterstützung bei meinen ersten Gehversuchen in der Molekularbiologie bedanken.

Professor Dr. Bernhard Erni, Universität Basel, möchte ich für die zu Verfügungstellung der Plasmide für IIB<sup>Glc</sup> danken.

Gabi Pszolla und Alexander Brosig möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Expression von Mlc und IIB<sup>Glc</sup> danken. Ohne ihre Hilfe hätte ich den immensen Proteinbedarf meiner Interaktionsstudien nicht decken können.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts meiner Dissertation bedanke ich mich bei Ruslan Nedielkov und Žarko Kulić danken.

Während der gesamten Zeit meiner Dissertation — besonders in den frustrierenden Phasen — habe ich bei meiner Frau Jutta und meinen Kindern Ada und Paul Rückhalt gefunden. Und dafür gebührt euch Dank!



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1. Das Phosphotransferase-System	3
1.2. Der Repressor Mlc	7
1.3. Die Glucokinase Glk	12
<b>2. Methoden</b>	<b>17</b>
2.1. Proteinexpression und Reinigung	17
2.2. NMR-Spektroskopie	19
2.3. Oberflächenplasmonenresonanz	23
2.3.1. Theorie	23
2.3.2. Anwendung	24
2.3.3. Auswertung	25
2.4. Isotherme Titrationskalorimetrie	26
<b>3. Zielsetzung</b>	<b>31</b>
<b>4. Proteinexpressionen</b>	<b>33</b>
4.1. Die Glucokinase Glk	33
4.2. Die lösliche IIB <sup>Glc</sup> -Domäne	37
4.2.1. Expression und Reinigung von H <sub>6</sub> -IIB <sup>Glc</sup>	37
4.2.2. Expression und Reinigung von IIB <sup>Glc</sup> -H <sub>6</sub>	38
4.3. Der Repressor Mlc	38
<b>5. Interaktionsstudien</b>	<b>39</b>
5.1. Die Mlc-IIB <sup>Glc</sup> Interaktion	39
5.1.1. Die Mlc-DNS Interaktion	44
5.1.2. Einfluss von IIB <sup>Glc</sup> auf die DNS Affinität von Mlc	50
5.1.3. Interaktionsstudien mit membrangebundenem IIB <sup>Glc</sup>	54
5.1.4. Zusammenfassung der bestimmten Affinitäten	59
5.1.5. Möglicher Mechanismus des Verlustes der DNS-Affinität von Mlc	59
5.2. Die Glk-IIB <sup>Glc</sup> Interaktion	63
5.2.1. Zuordnung der chemischen Verschiebungen	63
5.2.2. Titration von H <sub>6</sub> -IIB <sup>Glc</sup> mit Glk	64
5.2.3. Titration von isotope markierter Glk mit IIB <sup>Glc</sup>	66
5.2.4. Interaktionsstudien mit Spin-markierter Glk	69

5.2.5.	Untersuchung der Glk-IIB <sup>Glc</sup> Interaktion durch Oberflächenplasmonenresonanz . . . . .	76
5.2.6.	Bestimmung der intrazellulären Glucokinase Konzentration . . . . .	78
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>Experimentelles</b>	<b>93</b>
8.1.	Geräteliste . . . . .	93
8.2.	Verwendete Chemikalien . . . . .	94
8.3.	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme . . . . .	94
8.4.	Verwendete Plasmide . . . . .	95
8.5.	Allgemeine Arbeitsschritte . . . . .	95
8.5.1.	Verwendete Nährmedien . . . . .	95
8.5.2.	Präparation kompetenter Zellen . . . . .	97
8.5.3.	Transformation . . . . .	98
8.5.4.	Plasmidpräparation . . . . .	98
8.6.	Expression und Reinigung der Glucokinase Glk . . . . .	99
8.7.	Bestimmung der intrazellulären Glk Konzentration . . . . .	99
8.8.	Expression und Reinigung der löslichen IIB <sup>Glc</sup> Domäne . . . . .	100
8.8.1.	H <sub>6</sub> -IIB <sup>Glc</sup> . . . . .	100
8.8.2.	IIB <sup>Glc</sup> -H <sub>6</sub> . . . . .	101
8.9.	Expression und Reinigung von Mlc . . . . .	101
8.10.	Expression und Präparation von membrangebundenem gp8-IIB <sup>Glc</sup> . . . . .	102
8.11.	Design von DNS Hairpin Strukturen zur Untersuchung der Mlc-DNS Bindung .	103
8.12.	NMR-Messungen . . . . .	103
8.12.1.	Zuordnung der chemischen Verschiebungen von IIB <sup>Glc</sup> . . . . .	103
8.12.2.	NMR Titration von <sup>15</sup> N markiertem IIB <sup>Glc</sup> mit Glk . . . . .	104
8.12.3.	Titration von <sup>15</sup> N markiertem IIB <sup>Glc</sup> mit paramagnetisch markierter Glk	104
8.12.4.	Titration von <sup>15</sup> N markierter Glk mit IIB <sup>Glc</sup> . . . . .	104
8.13.	Oberflächenplasmonenresonanz . . . . .	105
8.13.1.	Aktivierung der Oberfläche . . . . .	105
8.13.2.	Untersuchung der IIB <sup>Glc</sup> -Glk Interaktion . . . . .	105
8.13.3.	Untersuchung der IIB <sup>Glc</sup> -Mlc Interaktion . . . . .	105
8.13.4.	Untersuchung der Mlc-DNS Interaktionen . . . . .	106
8.14.	Titrationsskalorimetrie . . . . .	106
8.14.1.	Untersuchung der Mlc-DNS Wechselwirkung . . . . .	106
8.14.2.	Titration von Mlc mit dem Hairpin BoxP2 in Anwesenheit von IIB <sup>Glc</sup> .	107
8.14.3.	Untersuchung der Mlc-IIB <sup>Glc</sup> Interaktion . . . . .	107
8.14.4.	Titration von Mlc mit IIB <sup>Glc</sup> in Anwesenheit von dem Hairpin BoxP1 .	107
8.14.5.	Titration von Membranvesikeln mit Mlc . . . . .	107
8.14.6.	Titration von Mlc mit dem Hairpin BoxP2 in Anwesenheit von Membranvesikeln . . . . .	107

8.14.7. Datenauswertung . . . . .	108
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>A. Sequenzierungen</b>	<b>119</b>
A.1. Plasmid p\$1 . . . . .	119
A.2. Plasmid pJBH . . . . .	121
A.3. Plasmid pET28H6IIBGlc401-477 . . . . .	121
A.4. Plasmid pQE60mlc . . . . .	122
<b>B. SPR Sensogramme</b>	<b>125</b>
B.1. Mlc-IIB <sup>Glc</sup> Interaktion . . . . .	125
B.2. Mlc-DNS Interaktion . . . . .	127
B.3. Glk-IIB <sup>Glc</sup> Interaktion . . . . .	128



# Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
C	Cytosin
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESR	Elektronenspinresonanz
G	Guanin
Glc	Glucose
Glk	Glucokinase
GST	Glutathion-S-Transferase
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HTH	Helix-Turn-Helix
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	lysogenic broth [1]
Mlc	<i>makes large colonies</i>
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonsäure
MWCO	Molecular weight cut-off
NHS	N-hydroxysuccinimid
NMR	nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
PRE	<i>paramagnetic relaxation enhancement</i>
PTS	Phosphotransferase System
PtsG	Glucose-spezifisches Phosphotransferase System
RNA, RNS	Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
T	Thymin
TOCSY	<i>TOTal correlation spectroscopy</i>

Tabelle 0.1.: Ein- und Drei-Buchstaben-Abkürzungen der natürlichen Aminosäuren.

<b>Name der Aminosäure</b>	<b>Drei-Buchstaben-Code</b>	<b>Drei-Buchstaben-Code</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Phosphotransferase-System

Ein wichtiges Merkmal lebendiger Organismen ist die Aufnahme von Nährstoffen gegen einen Konzentrationsgradienten. In Prokaryoten dient das Phosphotransferase-System (PTS) zur aktiven Aufnahme von Kohlenhydraten in die Zelle. Dieses System setzt sich aus den Enzymen HPr, EI und dem zuckerspezifischen EII zusammen [2]. Bei dem Enzym II handelt es sich um einen Transportkomplex, der aus drei, in selten Fällen auch aus vier Untereinheiten besteht, welche als IIA, IIB, IIC und IID bezeichnet werden. Bei IIA und IIB handelt es sich um hydrophile Proteine, bei IIC und IID um Membranproteine [3]. Neben dem Transport zählt auch die Phosphorylierung des entsprechenden Kohlenhydrats durch das Kohlenhydrat-spezifische Enzym II zu den Aufgaben des PTS. Die beiden allgemeinen Protein des PTS, HPr und Enzym I, sind für die Phosphorylierung des Transportkomplexes zuständig. Als Phosphatquelle für die Phosphorylierung der Kohlenhydrate dient Phosphoenolpyruvat. Die Phosphorylierung erfolgt über eine Enzymkaskade (Abb.: 1.1). Der Phosphatrest des Phosphoenolpyruvats wird vom HPr über das Enzym I auf das Enzym II übertragen. Hier wird der Phosphatrest zuerst auf die Untereinheit A übertragen, welche den Phosphatrest an die Phosphorylierungsdomäne B des Enzym II weiterleitet. Im Fall von HPr, Enzym I und Enzym IIA erfolgt die Bindung des Phosphatrestes über ein Histidin. Nur im Falle des Enzym IIB erfolgt die Bildung des Phosphatrestes über ein Cystein. Die IIB-Domäne ist für die Phosphorylierung des importierten Kohlenhydrats zuständig.

Im Falle des Glucose-spezifischen PTS (PtsG) des Darmbakteriums *Escherichia coli* besteht das Enzym II aus den hydrophilen Untereinheiten IIA und IIB sowie dem Membranprotein IIC. Hierbei ist der N-Terminus der IIB-Domäne über einen Linker mit dem C-Terminus des Glucosetransporters IIC verbunden. Wird nun Glucose aktiv durch die IIC-Einheit in die Zelle transportiert, erfolgt eine direkte Phosphorylierung zu Glucose-6-Phosphat [3, 4].

Die IIC<sup>Glc</sup>-Domäne des PtsG besteht aus 8 Transmembranhelices, die durch 4 periplasmatische und eine lange sowie 2 kurze cytoplasmatische Loopstrukturen miteinander verbunden sind [5,6] (Abb.: 1.2). In der Membran liegt die IIC<sup>Glc</sup>-Domäne als Homodimer vor [7–10]. Da sowohl die hydrophile IIB<sup>Glc</sup>-Domäne als auch die Transmembrandomäne IIC<sup>Glc</sup> unabhängig voneinander korrekt falten, ist es möglich, diese Domänen als separate Proteine zu exprimieren [11]. Auch

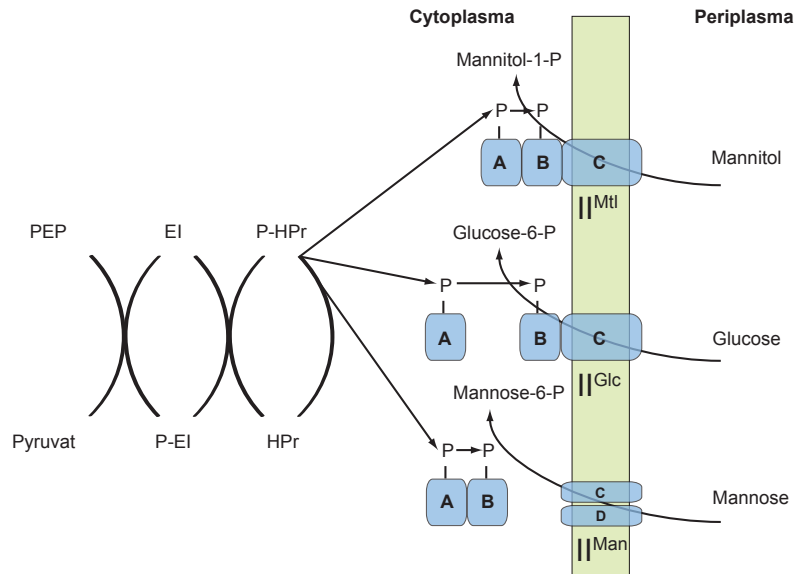


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung des Phosphotransferase-Systems für verschiedene Kohlenhydrate aus dem Darmbakterium *Escherichia coli*.

die getrennten IIB<sup>Glc</sup> und IIC<sup>Glc</sup>-Domänen sind noch in der Lage, Glucose zu transportieren und zu phosphorylieren. Mit NMR-spektroskopischen Methoden konnten die Strukturen von sowohl der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne alleine als auch im Komplex mit IIA<sup>Glc</sup> aufgeklärt werden [12–14]. Aus der Struktur des IIA<sup>Glc</sup>-IIB<sup>Glc</sup> Komplexes ist ersichtlich, dass sich die Aminosäuren, die in den beiden Enzymen für die Bindung des Phosphatrestes zuständig sind (IIA<sup>Glc</sup>: His90, IIB<sup>Glc</sup>: Cys421), in räumlicher Nähe zueinander befinden. Die Übertragung des Phosphatrestes erfolgt dabei durch einen nukleophilen Angriff des Schwefelatoms des Cys421 auf das Phosphoratom des an His90 gebundenen Phosphatrestes. Die NMR-spektroskopische Untersuchung dieses Komplexes zeigte, dass die Bildung des Komplexes zu keiner signifikanten strukturellen Änderung in den beiden Proteinen führt [14].

Trotz signifikanten Aufwandes liegt für die IIC<sup>Glc</sup>-Transmembraneinheit bis heute keine hochaufgelöste Struktur vor. Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie zeigten jedoch, dass IICB<sup>Glc</sup>-Untereinheit vorherrschend in dimerer Form vorliegt [15]. Da die Phosphotransferase-Systeme nur bei bestimmten Nahrungsvorkommen benötigt werden, ist eine Genregulation für eine effiziente Funktionsweise der Bakterien unabdingbar. Die Expression der *pts*-Gene ist abhängig von Faktoren wie Substratvorkommen, Redox-Bedingungen der Zelle und Stressfaktoren. Hauptsächlich wird die Transkription der beiden *pts*-Operons *ptsHICrr* (HPr, EI, IIA<sup>Glc</sup>) und *ptsG* (IICB<sup>Glc</sup>) negativ durch Mlc und positiv durch den cAMP/CAP-Komplex reguliert [17–20].

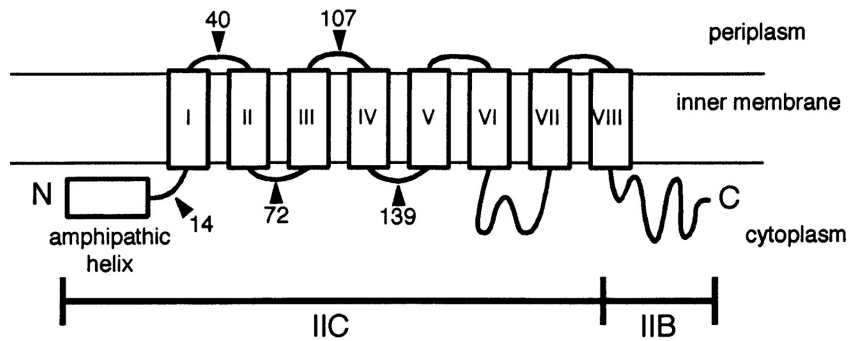


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung des vermuteten Aufbaus von IICB<sup>Glc</sup> des Phosphotransferase-Systems. Quelle: Kawamoto et al. [16]

Jedoch sind die *pts*-Operons in weitere Regulationspfade eingebunden. So führt zum Beispiel unter Hitzeschock-Bedingungen der *Heat Shock* sigma Faktor  $E\sigma^{32}$  zu einer erhöhten Expression der *pts*-Gene [21].

Weiterhin ist die phosphorylierte Form des Repressors ArcA in der Lage an drei Operatorsequenzen vor dem *ptsG*-Gen zu binden und somit die Transkription zu verhindern [22]. Zusammen mit dem Protein ArcB bildet ArcA eine sensorische Einheit für das Redox-Potential in der Zelle [23]. Herrschen reduzierende Bedingungen, phosphoryliert sich die Kinase ArcB erst selbst, um anschließend den Phosphatrest auf ArcA zu übertragen. Die Repression des *ptsG*-Gens durch ArcA ist somit auch abhängig von den Redox-Bedingungen.

Zusätzlich wird die Expression des *ptsG* Gens posttranskriptional durch Beeinflussung der mRNA Stabilität reguliert. Eine Akkumulation von Phosphokohlenhydraten in der Zelle führt zu einem verstärktem Abbau der *ptsG* mRNA durch die RNase E [16, 24]. Durch diesen Schritt wird eine weitere Anreicherung von Phosphokohlenhydraten in der Zelle verhindert.

Durch die Einbindung in diese vielen, verschiedenen Regulationsnetzwerke ist das Bakterium *E. coli* in der Lage, die Expression des *ptsG*-Gens auf externe und interne Bedingungen wie Nährstoffvorkommen, Stressfaktoren oder Redoxpotentiale anzupassen. Die Regulation der Gene erlaubt eine effiziente Funktionsweise des Bakteriums. Ein Merkmal, das das glucosespezifische Phosphotransferase-System von anderen Permeasen unterscheidet, ist, dass die direkte Interaktion von aktivem PtsG mit dem Repressor Mlc einen direkten Einfluss auf sein Expressionsniveau hat.

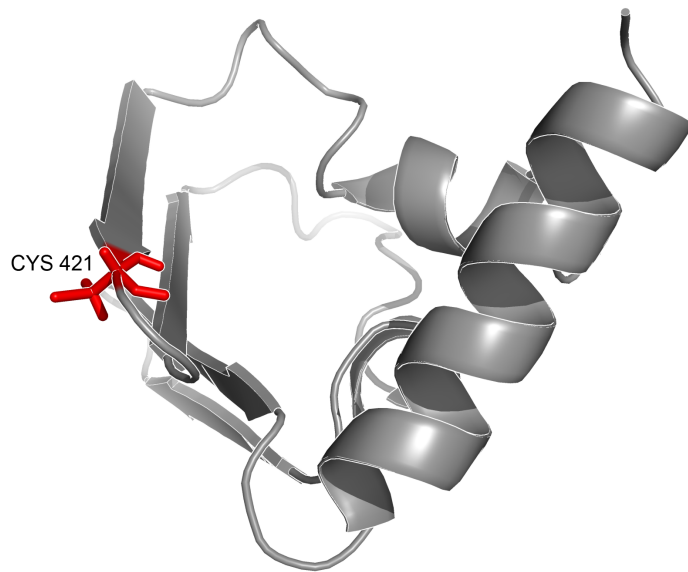


Abbildung 1.3.: NMR-Struktur der löslichen Phosphorylierungsdomäne IIB<sup>Glc</sup>. In rot markiert ist Cys 421, auf das Enzym IIA<sup>Glc</sup> den Phosphatrest überträgt. PDB-Code: 1IBA [12]

## 1.2. Der Repressor Mlc

Durch seinen Einfluss auf den Metabolismus von Kohlenhydraten wurde Mlc (*makes large colonies*) auf verschiedenen Wegen entdeckt. Der Name Mlc rührt daher, dass beobachtet wurde, dass die Überexpression von plasmidkodiertem Mlc zur Bildung von größeren Kolonien im Vergleich zum Wildtyp führt. Der Grund hierfür ist, dass Mlc eine Verlangsamung des Glucose-metabolismus bewirkt und somit eine Akkumulation von Acetat im Medium verhindert [25].

Der globale Repressor Mlc gehört basierend auf seiner Sequenz zu der ROK (repressors, open reading frames, kinases) Protein-Familie [26]. Die Repressoren dieser Proteinfamilie weisen eine Größe im Bereich von 400 Aminosäuren auf und verfügen über ein N-terminales, DNS-bindendes HTH (*helix-turn-helix*) Motiv. Da die Kinasen dieser Familie über keine DNS-Bindestelle verfügen, sind sie um ungefähr 80 Aminosäuren kürzer als die ROK Repressoren und verfügen über eine C-terminales Kohlenhydrat-bindendes Motiv.

Durch verschiedene biochemische Versuche konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Glucose zu einer erhöhten Expressionsrate des Glucose-Transporters IICB<sup>Glc</sup> führt [27–29]. Kimata et al. zeigten, dass eine Mutation im Gen *mlc* zu einer konstitutiven Expression des *ptsG*-Gens (Enzym IICB des glucosespezifischen PTS) führt [20]. Somit konnte Mlc als Repressor für das PtsG identifiziert werden. Für die Expression des Gens *ptsG* sind die beiden Promotoren p1 und p2 verantwortlich. Der Repressor Mlc ist in der Lage, an zwei Operatorsequenzen zu binden, die jeweils mit einem der beiden Promotoren überlappen. Der Repressor Mlc ist neben der Regulation des Gens *ptsG* auch für die negative Regulation der Gene *manXYZ* (Enzym II des Mannose PTS) [30], *malT* (transkriptioneller Aktivator des Maltose Operons), seines eigenen Gens *mlc* [31] sowie des *ptsHIcrr* Operons (HPr, EI, IIA<sup>Glc</sup>) verantwortlich [18, 20, 32]. Neben dem PtsG stellt das im Gen *manXYZ* kodierte Mannose PTS einen weiteren Weg da, auf dem Glucose in die Zelle gelangen kann [33, 34]. Diese eher unspezifische Permease ist in der Lage Glucose, Mannose, Glucosamin (GlcN) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) zu transportieren. Zusätzlich zu den Mlc-Operatorsequenzen befinden sich vor dem Gen *manXYZ* noch zwei Operatorsequenzen für NagC [35]. Der Repressor NagC gehört ebenfalls zur Familie der ROK Proteine und ist ein enges Homolog von Mlc (40 % identisch, 70 % ähnlich) [26]. NagC ist für die Regulation von Genen mit Bezug zum Stoffwechsel von Amino-Zuckern wie GlcNAc und GlcN verantwortlich [36–38]. Weiterhin wird das Gen *malT* für den Aktivator des *mal*-Regulon durch Mlc reguliert. Bei Maltose handelt es sich zwar um keinen PTS Zucker, jedoch führt die intrazelluläre Spaltung von Maltose zur Freisetzung von Glucose und Glucose-6-phosphat. Da somit alle von Mlc regulierten Gene - direkt oder indirekt - Einfluss auf den Glucosehaushalt haben, wird Mlc als Glucose-spezifischer Repressor bezeichnet [39].

Im Gegensatz zu anderen Repressoren wird die Aktivität von Mlc nicht durch Interaktion mit

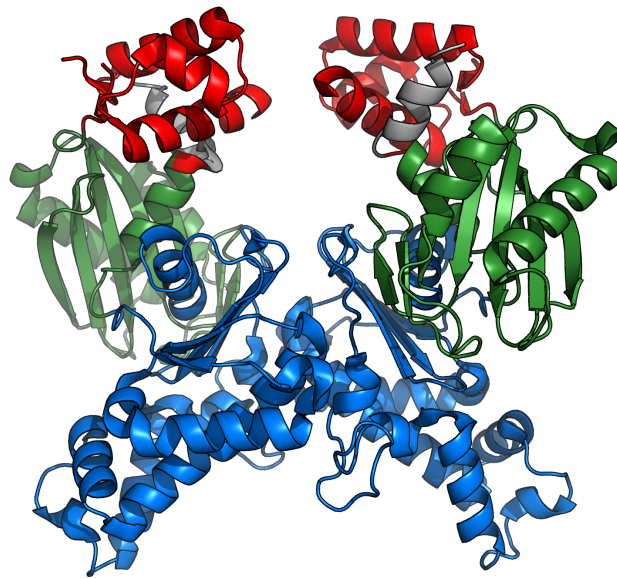


Abbildung 1.4.: Kristallstruktur eines Mlc-Dimers. Mlc besteht aus drei Domänen: der E-Domäne (grün), die mit der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne des PtsG interagiert, der D-Domäne (rot), die aus einem HTH-Motiv besteht und Wechselwirkungen mit den DNS-Operatoren eingeht und der O-Domäne, die für die Ausbildung des Homotetramers zuständig ist. PDB-Code: 1Z6R [45]

einem Metaboliten reguliert, sondern durch eine direkte Protein-Protein Interaktion mit der Glucose-Permease IICB<sup>Glc</sup> [40–42]. Hierbei ist Mlc lediglich in der Lage, an die dephosphorylierte IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu binden. Da die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne nur dephosphoryliert vorliegt, wenn Glucose aktiv in die Zelle transportiert wird, ist die Mlc-Aktivität somit direkt an den Import von Glucose gekoppelt. Die Interaktion mit membrangebundenem IIB<sup>Glc</sup> führt zu einem Verlust der DNS-Affinität. Es spielt hierbei keine Rolle, ob IIB<sup>Glc</sup> durch den natürlichen Anker IIC<sup>Glc</sup> an der Membran verankert ist oder ob ein anderer Membrananker wie gp8 des Bakteriophagen M13 verwendet wird [43, 44]. Zwar ist Mlc auch in der Lage an die lösliche IIB<sup>Glc</sup> zu binden, jedoch führt diese Interaktion nicht zu einem Verlust der DNS-Affinität [40, 41]. Damit ist auszuschließen, dass eine durch die Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion induzierte Konformationsänderung zur Deaktivierung von Mlc führt. Weiterhin zeigt der Vergleich der Kristallstrukturen von Mlc und dem Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-Komplex, dass die Bindung an die lösliche IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu keiner signifikanten Änderung der Struktur führt [45, 46].

Strukturell gliedert sich Mlc in drei Untereinheiten (Abb.: 1.4): Das DNS-bindende HTH-Motiv, das aus den Aminosäuren 1-81 und 395-406 besteht (D-Domäne), einer kleinen  $\alpha/\beta$ -Domäne,

die sich über die Reste 82-194 und 381-394 erstreckt und mit dem IIB<sup>Glc</sup> des PtsG interagiert (E-Domäne), sowie einer großen  $\alpha/\beta$ -Domäne von 195 bis 380, die für die Oligomerisierung zuständig ist (O-Domäne) [45]. Die D-Domäne besteht aus vier  $\alpha$ -Helices, die eine globuläre Faltung annehmen. Für die Bindung der DNS sind hierbei die Helices  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  zuständig, die ein HTH Motiv bilden. In diesem typischen HTH-Motiv bindet die Helix  $\alpha 3$  in ihrer Funktion als Erkennungshelix sequenzspezifisch in der großen Furche der DNS. Da sich die DNS-Bindestelle bei Proteinen dieser Art immer aus zwei spiegelbildlich angeordneten Protein-Monomeren zusammensetzt, verfügt jede Bindestelle somit über zwei Erkennungshelices. Für eine Interaktion dieser Bindestelle müssen beide Helices parallel zueinander angeordnet sein und der Abstand zwischen ihnen dem Abstand der großen Furchen in der DNS von 34 Å entsprechen. Da der Abstand der Erkennungshelices im Fall von Mlc nur 25 Å beträgt und die Helices zudem noch schräg zueinander angeordnet sind, ist für die DNS-Bindung eine Konformationsänderung notwendig [46]. Insgesamt liegen 382 der 406 Aminosäuren von Mlc strukturiert vor, einzig die Reste 1-11 und 64-76 sind unstrukturiert. Der flexible Bereich der DNS-Bindedomäne ist charakteristisch für einen bestimmten Typ von HTH-Motiv. Nach Bindung an die entsprechende DNS Operatorsequenz nehmen diese Aminosäuren eine definierte Struktur an und bilden ein sogenanntes Helix-Scharnier aus [47–49].

Die O-Domäne besteht aus einer viersträngigen  $\beta$ -Faltblattstruktur, welche von insgesamt 9  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Weiterhin beinhaltet Mlc im Bereich der O-Domäne ein Zink-Finger Motiv, das über die Aminosäuren His-247, Cys-257, Cys-259 und Cys-264 in der Lage ist, ein Zink-Ion zu binden. Schiefner et al. konnten mittels Atomabsorptions-, UV- und ESR-Spektroskopie die Anwesenheit von  $0.9 \pm 0.1$  Zinkionen pro Protein nachweisen [45]. Die Bindung eines Zink-Ions in dieser Zinkfinger-Domäne ist Voraussetzung für die korrekte Faltung des Proteins.

Der Repressor Mlc bildet unter physiologischen Bedingungen Homotetramere aus [41, 43]. In den Kristallstrukturen lag Mlc jedoch als Dimer vor, was zu der Vermutung führt, dass ein Gleichgewicht zwischen dimeren und tetrameren Zustand herrscht und die harschen Kristallisationsbedingungen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zum Dimer bewirken [45]. Die Entfernung der 18 C-terminalen Aminosäuren führt zur Ausbildung von Dimeren, was den Verlust sowohl der Fähigkeit zur Bindung an die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne als auch der regulatorischen Eigenschaften von Mlc [43] bewirkt. Aus der Kristallstruktur des Rezeptors [91] ist ersichtlich, dass es sich bei den 18 C-terminalen Aminosäuren um einen  $\alpha$ -helikalen Bereich handelt, der Teil der DNS-bindenden D-Domäne ist und sich in direkter Nachbarschaft zu der E-Domäne befindet. Es ist davon auszugehen, dass das Fehlen der C-terminalen Aminosäuren somit Einfluss auf die Faltung der E-Domäne hat.

Jeweils zwei Monomere bilden gemeinsam eine DNS-Bindestelle aus. Somit verfügt jedes Mlc-Tetramer über zwei DNS und vier IIB<sup>Glc</sup> Bindestellen (Abb.: 1.5). Wie schon zuvor erwähnt, ist

eine Änderung der Orientierung der beiden Erkennungshelices zueinander notwendig, um eine optimale Interaktion mit der DNS-Operatorsequenz zu ermöglichen. Da auch IICB<sup>Glc</sup> als Dimer in der Zellmembran vorliegt, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass alle vier Bindestellen des Mlc Homotetramers eine Interaktion mit einer IIB<sup>Glc</sup>-Domäne eingehen. Wird nun Mlc multivalent auf der Zellmembran immobilisiert, hat dies einen erheblichen Verlust an Flexibilität des Moleküls zur Folge. Dieser Verlust an Flexibilität könnte einen negativen Einfluss auf die Mlc-DNS Interaktion haben, da eine Umorientierung der Helices erschwert ist [46]. Von Nam et al. wurde gezeigt, dass lösliches IIB<sup>Glc</sup>, das über einen Linker dimerisiert wurde, in der Lage ist, die Mlc-DNS Interaktion zu unterbinden. Hierzu wurde ein Fusionsprotein der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne mit GST beziehungsweise GrpE verwendet, bei dem IIB<sup>Glc</sup> am N-Terminus mit dem zweiten Protein verbunden ist. Da sowohl GST als auch GrpE dimerisieren, liegt ein Komplex von zwei Fusionsproteinen vor, der als lösliches Modell für das dimere IICB<sup>Glc</sup> dient. Als Negativkontrolle wurde das monomer vorliegende Fusionsprotein Grx2-IIB<sup>Glc</sup> verwendet. In elektrophoretischen Mobilitäts-Assays (EMSA) konnte gezeigt werden, dass GST-IIB<sup>Glc</sup> und GrpE-IIB<sup>Glc</sup> in der Lage sind, die Bindung von Mlc an die DNS zu verhindern. Wie auch das lösliche IIB<sup>Glc</sup> hat auch das monomere Fusionsprotein Grx2-IIB<sup>Glc</sup> in diesem Versuch keinen erkennbaren Einfluss auf die Mlc-DNS Interaktion. Allerdings ließe sich dieser Befund auch dadurch erklären, dass ein derartiges IIB<sup>Glc</sup> Fusionsprotein einfach die DNS Bindestelle blockiert und nicht ein Verlust an Flexibilität ursächlich für den Verlust der DNS-Affinität ist. Weiterhin konnte *in vivo* kein Effekt von GST-IIB<sup>Glc</sup> oder Grx2-IIB<sup>Glc</sup> auf die *ptsG*-Transkription nachgewiesen werden.

Mehrere Bindestellen vor den jeweils von Mlc regulierten Operons *ptsG*, *malT*, *manXYZ* und *mlc* konnten durch DNase I *footprinting* identifiziert werden [18, 30, 31] (Tab.: 1.1). Im Fall des *ptsG* Operons wurden zwei DNS Sequenzen im Abstand von 169 bp gefunden, an die Mlc binden. Da ein Mlc-Homotetramer zwei DNS Bindestellen ausbildet, legt dieser Befund nahe, dass Mlc durch gleichzeitiges Binden an beide Operatorsequenzen einen DNS Loop erzeugt. Dies konnte jedoch nicht experimentell nachgewiesen werden, da keine hypersensitiven DNase I Spaltungsmuster gefunden wurden [18]. Allerdings würde es sich in diesem Fall um einen großen Loop handeln, bei dem die höhere Flexibilität verhindern könnte, dass die charakteristischen Spaltmuster auftreten.

Die mittels *Gel shift assays* analysierten Verdünnungsreihen zeigen, dass die Affinität  $K_D$  von Mlc zu den Promoter-Bereichen von *ptsG* und *pts* in der Größenordnung von  $\sim 10$  nM liegt [41]. Die Affinität zu dem Promoter-Bereich von *mlc* ist mit einem  $K_D$  Wert von  $\sim 100$  nM um eine Faktor 10 schwächer [41]. Alle gefundenen Mlc bindenden DNS Sequenzen sind homolog und weisen eine Konsenssequenz auf.

Trotz Kenntnis der Kristallstruktur des Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-Komplexes konnte der Mechanismus der

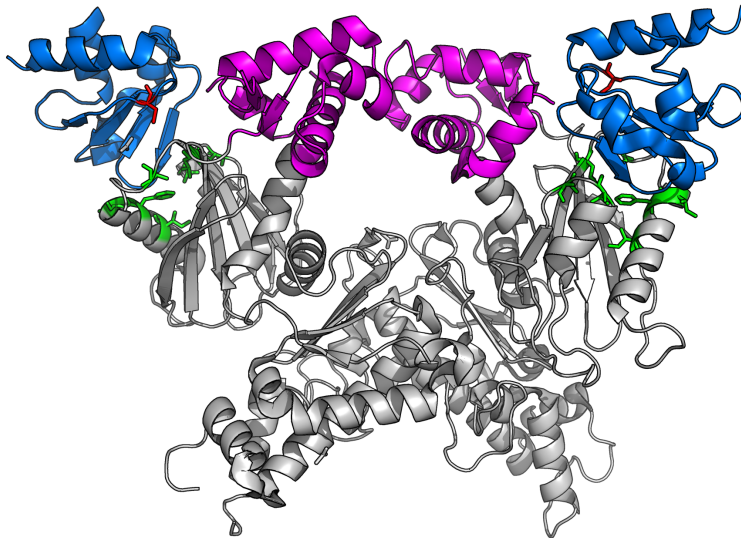


Abbildung 1.5.: Kristallstruktur des Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Komplexes. Dargestellt in grau ist ein Mlc-Dimer, in blau die IIB<sup>Glc</sup>. Mlc ist nur in der Lage, die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu binden, wenn Cys 421 (rot) dephosphoryliert vorliegt. Die Reste I132, F136, I137, L146, T186 und V188 (grün) bilden die IIB<sup>Glc</sup>-Bindetasche. Jeweils zwei Mlc Monomere bilden eine DNS Bindestelle (magenta), bestehend aus zwei HTH-Motiven, aus. PDB-Code: 3BP8 [46]

Tabelle 1.1.: Sequenz der DNS Operatorsequenzen von Mlc [18].

Name	Sequenz
BoxP1	TTATTTTACTCTGTGTAATAAAT
BoxP2	TTTTTTTAAAGCTCGTAATTAAT
BoxT	ATTAATTACGAAGCGCAAAAAAA
BoxM'	TTATTTTATAGATAGCGAAAAAAT
BoxL	ATTATTTTCGGAGCGCGAAAATAT
Konsens	aTtttTTa***gcg*AAaaaAt t*aaa*****ttt*a

Mlc-Inaktivierung bis jetzt nicht endgültig aufgeklärt werden. Wichtige Details der Interaktionen des Repressors sind noch unbekannt. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurden die Affinitäten im ternären Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-DNS Komplex noch nicht ermittelt. Zwar konnte empirisch gezeigt werden, dass multivalente Bindung von verbrücktem IIB<sup>Glc</sup> zum Verlust der DNS-Affinität führt, jedoch konnte der Mechanismus, wie multivalente Bindung zum Verlust der Fähigkeit an die Operatorsequenzen zu binden führt, noch nicht aufgeklärt werden.

### 1.3. Die Glucokinase Glk

Glucose wird in *E. coli*, wie auch in vielen anderen Bakterien, direkt während des Transports in die Zelle durch das PTS zu Glucose-6-phosphat umgesetzt [3]. Aber auch durch die intrazelluläre Spaltung von Disacchariden wie Lactose, Maltose und Trehalose gelangt Glucose in die Zelle. Aufgabe der Glucokinase Glk (Abb.: 1.6) ist es, diese Glucose zu phosphorylieren [50, 51]. Da *E. coli* Stämme, die über keine Glucokinase verfügen, keine verminderte Wachstumsrate mit Disacchariden als einzige Kohlenstoffquelle aufweisen, wurde ihr eine untergeordnete Rolle im Kohlenhydrat-Metabolismus zugeordnet [33]. Dies ist zum einen dadurch möglich, dass Glucose nach der intraellulären Disaccharid-Spaltung sekretiert wird und über das PtsG beim erneuten Transport in die Zelle phosphoryliert werden kann [53]. Zum anderen ist IICB<sup>Glc</sup> in der Lage intrazelluläre Glucose zu phosphorylieren [54]. Erst Mutanten, die weder über ein funktionstüchtiges PTS noch die Glucokinase verfügen, weisen ein vermindertes Wachstum auf [54, 55]. Weiterhin spielt die Glucokinase Glk im komplexen Regulationspfad der *mal*-Gene eine Rolle. Zu den in den *mal*-Genen codierten Proteinen gehören auch die Amylomaltase MalQ und die Maltodextrinphosphorylase MalP. Diese beiden Enzyme sind für den Abbau von Maltose und Maltodextrinen zu Glucose und  $\alpha$ -Glucose-1-Phosphat zuständig. Es wurde gezeigt, dass Glk durch Phosphorylierung von intrazellulärer Glucose Einfluss auf die Aktivität der Amylomaltase MalQ nimmt, da Glucose inhibierend auf MalQ wirkt. Bei verringerter MalQ-Aktivität wird Maltotriose angereichert, welches als *Inducer* für MalT dient [56]. In *E. coli*-Stämmen, die über kein Glycogen und somit über kein Maltodextrin verfügen, hat überexprimierte Glk in Anwesenheit von Amylomaltase MalQ oder Maltodextrinphosphorylase MalP einen negativen Einfluss auf das Expressionsniveau der *mal*-Gene. Das Expressionsniveau sinkt in diesem Fall um einen Faktor von  $\sim \frac{1}{20}$ . Hier wird eine direkte Interaktion von Glk, MalP und MalQ mit MalT vermutet [56].

Auch in Abwesenheit von MalP, MalQ und Glycogen hat Glk einen schwachen Einfluss auf das Expressionsniveau der *mal*-Gene. Es wurde gezeigt, dass für diesen Effekt der globale Repressor Mlc vorhanden sein muss [56]. Der Vergleich der Strukturen von Mlc und Glk zeigt, dass diese Proteine große Ähnlichkeiten aufweisen (Abb.: 1.7A). Gerade im Bereich der Mlc-



Abbildung 1.6.: Kristallstruktur der Glucokinase Glk aus *E. coli*. Dieses 35 kDa große Protein liegt unter physiologischen Bedingungen als Homodimer vor. PDB-Code: 1Q18 [52]

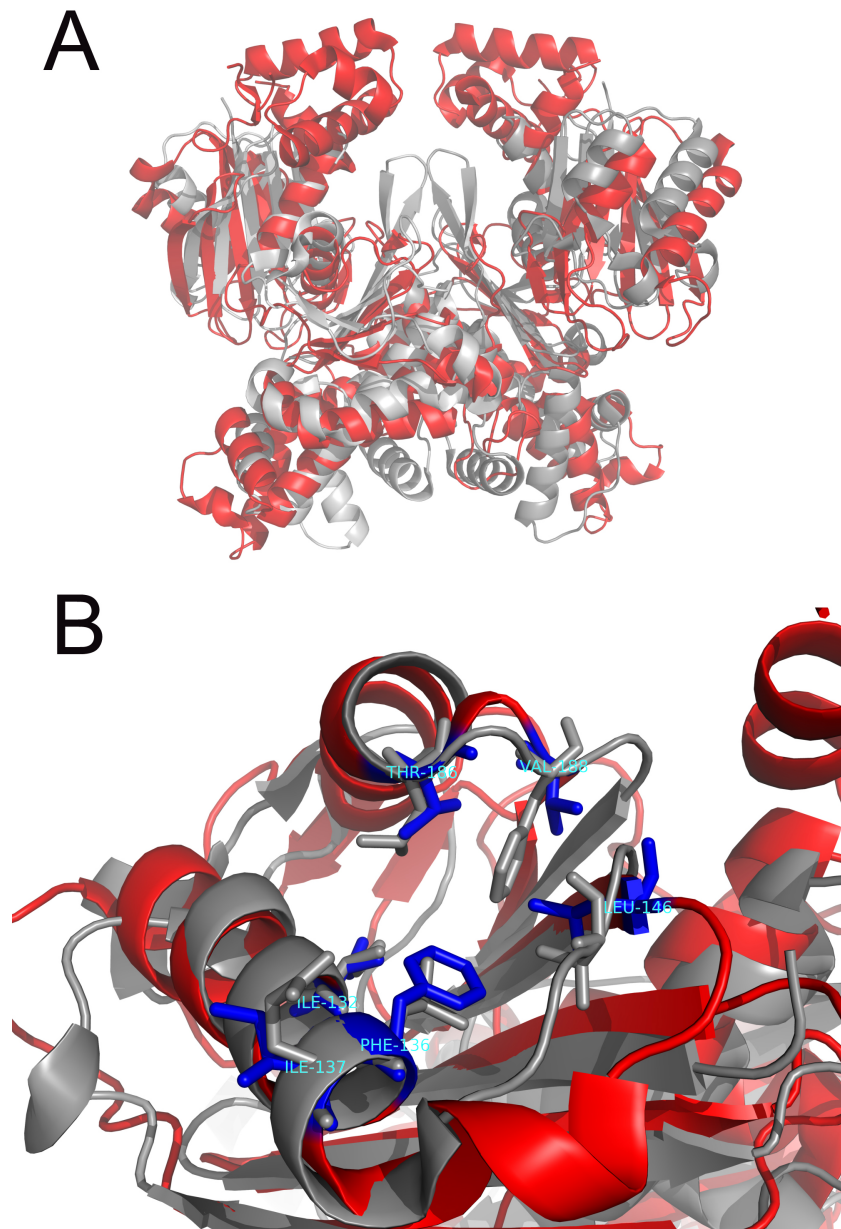


Abbildung 1.7.: Vergleich der Strukturen von Mlc (rot, PDB-Code: 3BP8, [45]) und Glk (grau, PDB-Code: 1Q18, [52]). Die Überlagerung der gesamten Proteine zeigt bereits, dass der Aufbau von Mlc und Glk sehr ähnlich ist. Mit dem Programm *PDB Fold* [57] wurde ein Sequenzalignment durchgeführt. In B wurden die an der Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion beteiligten Reste (blau) mit ihren entsprechenden Gegenstücken in der Glucokinase übereinander gelegt. Der RMSD Wert von 0.49 zeigt, dass Rückgrate der beiden Proteine an dieser Stelle nahezu identisch sind.

IIB<sup>Glc</sup>-Interaktionsfläche ist die Faltung des Proteinrückgrats von Mlc und Glk nahezu identisch (Abb.: 1.7B) . In diesem Bereich liegt die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung bei nur 0.49 Å. Durch Versuche mit membrangebundenem IIB<sup>Glc</sup> konnte gezeigt werden, dass die Glk wie Mlc in der Lage ist, an die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu binden. Somit wäre es möglich, dass Glk in hohen Konzentrationen in der Lage ist, Mlc vom PtsG zu verdrängen, was wiederum zur Repression der durch Mlc regulierten Gene führen können [56, 58].

Neben der Aufgabe, intrazelluläre Glucose zu phosphorylieren, greift die Glucokinase Glk auch in die Regulation verschiedener Gene mit Bezug auf den Kohlenhydratmetabolismus ein. Allerdings sind in diesem Zusammenhang viele Details wie die Natur der Interaktion von Glk mit MalQ und MalP oder eine biophysikalische Charakterisierung der Glk-IIB<sup>Glc</sup> Wechselwirkung noch unbekannt.



## 2. Methoden

### 2.1. Proteinexpression und Reinigung

Eine einfache und effiziente Herstellung von Proteinen kann mit prokaryotischen Expressionssystemen erreicht werden. Hierzu werden Organismen genetisch so verändert, dass unter bestimmten Bedingungen das gewünschte Protein in hohem Maße exprimiert wird. Wegen der einfachen Handhabung und kurzen Generationszeiten wird häufig das Darmbakterium *E. coli* [59] verwendet. Die genetische Information über das gewünschte Protein wird mittels ringförmiger Plasmid-DNS in die Zelle gebracht. Um die Zellmembran durchlässig für Plasmid-DNS zu machen, muss diese perforiert werden. Die Durchlässigkeit für DNS, die sogenannte Kompetenz, kann durch eine Kombination von Behandlung der Zellen mit verschiedenen Salzen ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{RbCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ) und Hitzeschock oder Elektroporation erreicht werden. Die kompetenten Zellen werden mit der Plasmid-DNS inkubiert. Dieser Prozess wird als Transformation bezeichnet.

Neben der genetischen Information des gewünschten Proteins beinhaltet ein Plasmid für gewöhnlich auch einen Selektionsmarker in Form eines Resistenzgens gegen ein oder mehrere Antibiotika, eine induzierbare Promotorsequenz und mehrere Restriktionsstellen. Nach der Transformation werden die Zellen auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Durch diesen Schritt wird sichergestellt, dass nur Zellen, die auch die Plasmid-DNS aufgenommen haben, selektiert werden. Für die Expression des Proteins werden Einzelkolonien von der Agar-Platte verwendet, um die genetische Reinheit der Kultur zu garantieren.

Ein häufig verwendetes Expressionssystem ist der pET-Vektor [60]. Durch Restriktions- und Ligationsenzyme kann die das gewünschte Protein kodierende DNS-Sequenz in den pET-Vektor eingefügt werden. In Richtung 5' von der eingefügten DNS-Sequenz befindet sich häufig der starke T7 Promotor und der *lac*-Operator. Der T7 Promotor wird nicht von den *E. coli*-RNA-Polymerasen erkannt, sondern benötigt die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7. Daher muss der Expressionsstamm über die genetische Information der T7 RNA Polymerase verfügen wie zum Beispiel der BL21(DE3). In diesem Stamm befindet sich das Gen für die T7 Polymerase ebenfalls unter Kontrolle des *lac*-Operators.

Durch Zugabe von IPTG wird die Repression durch den *lac*-Repressor aufgehoben und die Überexpression des gewünschten Proteins induziert. IPTG bewirkt eine Konformationsänderung des

*lac*-Repressors, die zur Inhibition der Bindung an den *lac*-Operator führt. Durch die Aufhebung der Repression wird die T7 Polymerase exprimiert, die den T7 Promotor vor dem Gen des gewünschten Proteins erkennt, was somit zu dessen Überexpression führt. Innerhalb von wenigen Stunden kann durch die starke Überexpression der Anteil des gewünschten Proteins bis zu 50 % der gesamten Proteinmenge in der Zelle ausmachen.

Weiterhin ist es möglich, durch Expression in *E. coli* isotoopenmarkierte Proteine für NMR-spektroskopische Untersuchungen herzustellen. Auf Grund der geringen natürlichen Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  ist es nicht möglich, mit ungelabelten Proteinproben NMR-Experimente durchzuführen, die auf benachbarten  $^{13}\text{C}$  oder  $^{15}\text{N}$  Atomen basieren. *E. coli*-Stämme sind in der Lage auf sogenannten Minimalmedien zu wachsen, die eine sehr definierte Zusammensetzung haben. Durch die Verwendung eines Minimalmediums, das als einzige Kohlenstoffquelle über  $^{13}\text{C}$  Glucose und  $^{15}\text{N}$  Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle verfügt, können Proteinproben mit einem sehr hohen Markierungsgrad an  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  hergestellt werden. Für manche NMR-spektroskopischen Untersuchungen werden perdeuterierte Proteinproben benötigt. Diese Proben können ebenfalls durch Expression in *E. coli* durch die Verwendung von  $\text{D}_2\text{O}$  und perdeuterierter Glucose hergestellt werden.

Das pET-Expressionssystem bietet gegenüber anderen Expressionssystemen den Vorteil, dass die Rate der Überexpression von der IPTG Konzentration abhängt und somit gesteuert werden kann. Dieser Aspekt spielt bei der Optimierung der Expression hinsichtlich der korrekten Faltung des Proteins und der Ausbeute eine große Rolle. Die Verwendung eines Promotors für das gewünschte Protein, der von natürlichen *E. coli* Polymerasen nicht erkannt wird, stellt sicher, dass dieses nur unter Überexpressionsbedingungen exprimiert wird. Daher eignet sich dieses Expressionssystem zur Herstellung von toxischen Proteinen und Proteinen, die eine regulatorische Aktivität haben. Da mit dem T7 Promotor der stärkste bekannte Promotor verwendet wird, garantiert das pET-Expressionssystem für gewöhnlich sehr hohe Expressionsraten.

Ein weiteres, verbreitetes Expressionssystem ist der pQE60 Vektor der Firma Qiagen. In diesem System das gewünschte Protein unter der Kontrolle des *lac*-Operators und des T5 Promotors. Im Gegensatz zum T7 Promotor wird der T5 Promotor von der *E. coli* RNA Polymerase erkannt. Daher muss der Expressionsstamm für dieses System über keine spezielle RNS Polymerase verfügen.

Nach der Überexpression werden die Zellen aufgeschlossen und das gewünschte Protein aus dem Lysat isoliert. Die Isolation des Proteins kann durch Ausfällung des Proteins bei einer definierten Konzentration eines Fällungsmittels, z.B. Ammoniumsulfat, oder durch Affinitätschromatographie über die Ladung des Proteins oder einen speziellen Affinitätstag wie zum Beispiel poly-His erfolgen. Um eventuell verbleibende Verunreinigungen zu entfernen, erfolgt in vielen Fällen in einem zweiten Reinigungsschritt eine Größenausschlusschromatographie.

## 2.2. NMR-Spektroskopie

Seit den 80iger Jahren gehört die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) neben der Röntgenkristallographie zu den Standardmethoden der Strukturaufklärung [61]. Das Messprinzip beruht auf dem Zeeman-Effekt [62, 63]: bei Anwendung eines externen Magnetfeldes  $B_0$  wird die Entartung aller Kernspins mit  $I \neq 0$  aufgehoben. Für einen Nucleus mit  $I = \frac{1}{2}$  wie zum Beispiel das Wasserstoffisotop  $^1\text{H}$  ergeben sich daraus zwei unterschiedliche Energieniveaus mit  $m = \frac{1}{2}$  und  $m = -\frac{1}{2}$ , die parallel beziehungsweise antiparallel in Relation zu dem äußeren Magnetfeld  $B_0$  ausgerichtet sind. Die Energiedifferenz dieser zwei Zustände ist gegeben durch:

$$\Delta E = \hbar \cdot \gamma B_0 = \hbar \cdot \omega_0 \quad (2.1)$$

Wobei  $\hbar = \frac{h}{2\pi}$  das reduzierte Planck'sche Wirkungsquantum,  $\gamma$  das gyromagnetische Verhältnis des Kerns und  $B_0$  die Feldstärke des externen Magnetfeldes ist. Die Larmor-Frequenz  $\omega_0$  von Protonen liegt bei modernen NMR-Spektrometern in Abhängigkeit der Feldstärke des Magneten im Bereich von 300 MHz bis 1 GHz.

Da die Energiedifferenz zwischen den Zuständen auch bei sehr großen Feldstärken des  $B_0$ -Feldes sehr gering ist, ergibt sich im thermischen Gleichgewicht bei Raumtemperatur annähernd Gleichbesetzung für die unterschiedlichen Zustände des Kernspins. Für das Verhältnis der Population von zwei unterschiedlichen Zuständen  $\alpha$  und  $\beta$  gilt gemäß der Boltzmann-Verteilung:

$$\frac{P_\alpha}{P_\beta} = e^{\frac{\Delta E}{k_B \cdot T}} \quad (2.2)$$

Da der energetisch niedriger liegende Zustand  $\alpha$  (parallel zum  $B_0$ -Feld) etwas höher besetzt ist, ergibt sich eine Nettomagnetisierung  $M_0$  in Richtung des  $B_0$ -Feldes (im Folgenden als  $z$ -Richtung bezeichnet). Für eine NMR Messung wird nun ein Puls an elektromagnetischer Strahlung mit der Resonanzfrequenz des entsprechenden Kerns eingestrahlt, durch den die einzelnen Atome so beeinflusst werden, dass der Vektor der Nettomagnetisierung um einen bestimmten Winkel geneigt wird. Der Neigungswinkel der Nettomagnetisierung hängt von Dauer und Intensität des RF-Pulses ab. Nach dem Einstrahlen des Pulses beginnt der Vektor der Nettomagnetisierung um die  $z$ -Achse zu präzidieren, was ein magnetisches Wechselfeld erzeugt. Dieses Wechselfeld wird in Form einer induzierten Spannung als sogenannter *free induction decay* (FID) von einer Spule in  $x$ -Richtung detektiert. Ein maximales NMR-Signal wird durch die Anwendung eines Puls erzielt, der die Nettomagnetisierung der Kerne um  $90^\circ$  neigt und somit in die  $xy$ -Ebene (transversale Ebene) transferiert. Zum Verlust der Nettomagnetisierung in der transversalen Ebene und somit zur Abnahme des FIDs führt das Dephasieren der Spinvektoren durch Relaxationsprozesse, wobei Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und *chemical shift ani-*

*sotropy* (CSA) die dominanten Mechanismen darstellen [64, 65]. Die Zeit, die bis zum Verlust der transversalen Magnetisierung vergeht, wird als  $T_2$ -Relaxationszeit bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt liegt keine Nettomagnetisierung vor, da alle Spinvektoren in der transversalen Ebene dephasiert sind. Erst wenn alle Spinvektoren im thermischen Gleichgewicht vorliegen und somit wieder eine Nettomagnetisierung in z-Richtung vorliegt, kann ein neues Spektrum aufgenommen werden. Die Zeitkonstante, die die exponentielle Wiederherstellung des thermischen Gleichgewichts beschreibt, wird als longitudinale Relaxationszeit  $T_1$  bezeichnet.

Durch Fourier-Transformation werden aus dem FID die Resonanzfrequenzen der beteiligten Kerne erhalten. Die NMR-Spektroskopie bietet ein mächtiges Werkzeug für die Aufklärung von molekularen Strukturen, da die Resonanzfrequenz eines Kerns neben der Feldstärke des  $B_0$ -Feldes auch von der Elektronendichte am Kern abhängt. Somit unterscheidet sich die Resonanzfrequenz eines Kerns je nach seiner elektronischen Umgebung.

Die Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie für ein bestimmtes Element hängt neben dem gyromagnetischen Verhältnis auch von der natürlichen Häufigkeit des NMR-aktiven Isotops ab. Wasserstoff  $^1\text{H}$  ist auf Grund seiner natürlichen Häufigkeit von 99,99 %, seines großen gyromagnetischen Verhältnisses und Vorkommens in organischen Verbindungen prädestiniert für die NMR-Spektroskopie. Die meisten NMR-Experimente sind aus diesem Grund Protonen-basiert. Weiterhin ist Kohlenstoff von sehr großem Interesse bei organischen Verbindungen, doch ist das am häufigsten vorkommende Kohlenstoffisotop  $^{12}\text{C}$  mit einem Kernspin von  $I = 0$  NMR-inaktiv und das NMR-aktive Isotop  $^{13}\text{C}$  nur mit einer Häufigkeit von 1,1 % vertreten. Daher sind für die Aufnahme von Kohlenstoffspektren hohe Probenkonzentrationen und lange Messzeiten notwendig.

Die Differenzierung von verschiedenen Kernen ist idealer Weise durch ihre unterschiedlichen chemischen Verschiebungen in einem NMR Spektrum gegeben. Biomakromoleküle wie Proteine bestehen jedoch oft aus mehreren Tausend Atomen, was zu einem erheblichen Überlapp der Signale führt und eindimensionale Spektren somit in Hinsicht auf eine Zuordnung der Resonanzen unauswertbar macht. Durch die Verwendung multidimensionaler NMR-Experimente kann der spektrale Überlapp erheblich verringert werden, was Voraussetzung für eine Zuordnung der chemischen Verschiebungen ist [66]. Durch die Verwendung einer weiteren Dimension wird nicht nur der Überlapp verringert, sondern auch zwei Resonanzen in einen bestimmten Zusammenhang gesetzt. Ein Standardexperiment in der Protein-NMR-Spektroskopie ist das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC [67]. Da dieses Spektrum auf der Korrelation von Protonen zu Stickstoff beruht, muss die Proteinprobe für dieses Experiment  $^{15}\text{N}$  isopenmarkiert vorliegen. Bei dem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Experiment wird die Polarisation von den Protonen auf den daran gebundenen Stickstoff übertragen. Da das gyromagnetische Verhältnis von Protonen wesentlich größer ist als das von  $^{15}\text{N}$ , wird die Polarisation zur Detektion wieder zurück auf die Protonen transferiert, was zu einer hö-

heren Empfindlichkeit führt. Die heteronukleare  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Kopplung wird durch die Anwendung eines  $180^\circ$   $^1\text{H}$  Pulses nach der Hälfte des Pulsprogramms refokussiert. Standardmäßig wird zur Verhinderung der Ausbildung von J(NH) Multipletts während der Aufnahme des FID auf dem Stickstoffkanal breitbandentkoppelt. Neben der Vereinfachung des Spektrums durch die Verringerung der Anzahl der Signale bewirkt die Entkopplung auf dem Stickstoffkanal einen Zuwachs der Signalintensität um einen Faktor 2.

In dem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum finden sich Kreuzsignale aller Protonen, die direkt an einen Stickstoff gebunden sind. Für ein Protein befinden sich in diesem Spektrum Signale aller Amide des Proteinerückgrates sowie der Seitenkettenamine und -amide. Somit lässt sich an Hand dieses Spektrums sehr leicht ermitteln, ob die Zahl der Signale der Anzahl der Aminosäuren entspricht, und bietet somit einen guten Ausgangspunkt zur Optimierung der Probenbedingungen. An der Dispersion der Signale ist zu erkennen, ob ein Protein gefaltet vorliegt.

Ausgehend vom  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC können die Resonanzen den einzelnen Aminosäuren der Proteinsequenz mit Hilfe von dreidimensionalen Spektren wie HNCO, HNCACO, HNCA und HNCOCA zugeordnet werden.

Im Gegensatz zur Röntgen-Kristallographie bietet die NMR-Spektroskopie die Möglichkeit, Moleküle in Lösung und somit näher an den physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Auch können mit dieser Methode dynamische Prozesse wie Flexibilität des Proteinerückgrats oder Interaktion mit anderen Molekülen beobachtet werden.

Eine Methode zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen, ist *chemical shift perturbation mapping* [68–70]. Wie schon zuvor erwähnt, hängt die Larmor-Frequenz eines Kernspins von seiner unmittelbaren elektronischen Umgebung ab. Erfährt ein Molekül zum Beispiel eine Konformationsänderung, ist dies im Spektrum zu erkennen. Im Falle einer Interaktion ändert sich durch die Bindung zumindest im Bereich der Bindestelle die elektronische Umgebung und somit auch die Larmor-Frequenzen der Kernspins in diesem Bereich. *Chemical shift perturbation mapping* beruht nun darauf, an Hand eines zugeordneten Spektrums zu bestimmen, an welcher Stelle im Molekül durch die Bindung an einen Liganden Änderungen hervorgerufen werden.

Geht man davon aus, dass ein Kernspin im ungebundenen Zustand eine andere Resonanzfrequenz als im gebundenen Zustand hat, hängt die Art, in der sich diese Änderung im Spektrum manifestiert, von der Austauschrate zwischen diesen beiden Zuständen ab. Der Austausch zwischen ungebundenem und gebundenem Zustand ist durch die Assoziationsrate  $k_{on}$  und Dissoziationsrate  $k_{off}$  definiert. Für ein rein diffusionsbasiertes Bindungsmodell liegt die Assoziationsrate  $k_{on}$  für gewöhnlich im Bereich von  $10^9 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  [71]. über die Zusammenhang von  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  und der Dissoziationskonstante  $K_d$  ergibt sich  $k_{off} = 10^9 \cdot K_d$ . Für *chemical shift perturbation mapping* Experimente wird für gewöhnlich schrittweise Ligand zu Isotopen-markierten

Rezeptor titriert und von jedem Titrationsschritt ein HSQC-Spektrum aufgenommen.

Im Fall von langsamen Austausch nimmt mit steigender Ligandzugabe die Signalintensität des ungebundenen Proteins ab während die Signale des gebundenen Proteins erscheinen. Die Intensitäten dieser Signale geben Aufschluss über das Verhältnis von ungebundenem zu gebundenem Zustand. Von langsamen Austausch spricht man, wenn die Dissoziationsrate  $k_{off}$  wesentlich kleiner ist als die Differenz der chemischen Verschiebungen zwischen ungebundenen und gebundenen Zustand.

Ist  $k_{off}$  wesentlich größer als die Differenz der chemischen Verschiebungen, spricht man von schnellem Austausch. In diesem Fall verschieben sich die Signale durch Zugabe des Liganden graduell vom Signal des ungebundenen Zustand hin zum Signal des gebundenen Zustands. In diesem Fall gibt die Position des Signal Auskunft über das Verhältnis von gebundenem zu ungebundenem Zustand. Sind Dissoziationsrate und Differenz der chemischen Verschiebungen ungefähr gleich groß, wird eine Verbreiterung der Signale beobachtet. Die Änderungen in der chemischen Verschiebung, die durch Bindung eines Liganden verursacht werden, liegen typischer Weise im Bereich von 0,5 ppm für  $^1\text{H}$  und 3 ppm für  $^{15}\text{N}$ . An einem 600 MHz Spektrometer beträgt die Differenz also 300 Hz beziehungsweise 180 Hz. Damit nun schneller Austausch vorliegt, müsste  $k_{off}$  mindestens zehnfach größer sein als die Differenz der chemischen Verschiebungen. Unter der Annahme eines diffusionsbasierten Bindungsmodell läge die Grenze für schnellen Austausch somit bei einer Dissoziationskonstante  $K_d = 3 \mu\text{M}$  [70]. Bei der Untersuchung von Wechselwirkungen von Proteinen werden für *chemical shift perturbation mapping* Experimente normalerweise  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren verwendet. Hierzu wird das Protein  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkiert vorgelegt und der Interaktionspartner zutitriert. Eine Identifizierung der Bindestelle durch *chemical shift perturbation mapping* ist nur möglich, wenn das Protein durch die Bindung an den Interaktionspartner keine Konformationsänderung vollzieht. Im Falle einer Konformationsänderung würden auch räumlich weit von der Bindestelle entfernte Reste eine Änderung der Resonanzfrequenz erfahren. Hier kann nun nicht unterschieden werden, welche Änderungen auf die Konformationsänderung und welche auf die Bindung zurückzuführen sind. Eine weitere Methode zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung von Protein-Protein beziehungsweise Protein-Ligand Wechselwirkung stellen *paramagnetic relaxation enhancement* Experimente dar [72]. Dabei wird ausgenutzt, dass die Anwesenheit von ungepaarten Elektronen analog zum Kern-Overhauser-Effekt [73, 74] zu einer abstandsabhängigen Verkürzung der longitudinalen  $T_1$  und transversalen  $T_2$  Relaxationszeiten führt [75]. Der Einfluss eines ungepaarten Elektrons auf die longitudinale  $T_1$  und transversale  $T_2$  Relaxationsraten wird durch die Solomon-Bloembergen Gleichungen [75, 76] gegeben:

$$\Gamma_1 = \frac{2}{5} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_I^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1) J_{SB}(\omega_I) \quad (2.3)$$

$$\Gamma_2 = \frac{1}{15} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_I^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1) \{J_{SB}(0) + 4J_{SB}(\omega_I)\} \quad (2.4)$$

wobei  $g$  der Elektron  $g$ -Faktor ist,  $\gamma_I$  das gyromagnetische Verhältnis des Protons,  $\frac{\omega_I}{2\pi}$  die Larmorfrequenz des Protons und  $J_{SB}(\omega)$  die allgemeine spektrale Dichtefunktion für die reduzierte Korrelationsfunktion:

$$J_{SB}(\omega) = r^{-6} \frac{\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} \quad (2.5)$$

Aus Gleichung 2.5 ist ersichtlich, dass Abstandsabhängigkeit der paramagnetischen Relaxationsbeschleunigung wie der Kern-Overhauser-Effekt durch den Faktor  $r^{-6}$  gegeben ist. Jedoch bedingt durch das wesentlich größere magnetische Moment des Elektrons ist die Reichweite des *PRE* wesentlich größer als die des *NOE*. Die Reichweite eines Nitroxidradikals, das häufig zur paramagnetischen Markierung von Proteinen eingesetzt wird, beträgt typischer Weise 24 - 35 Å. Zur Untersuchung von biomolekularen Wechselwirkungen wird nun eine Interaktionspartner mit einer paramagnetischen Markierung versehen. Findet eine Interaktion statt, weist das NMR Spektrum des anderen Interaktionspartners durch die beschleunigte Relaxation eine verringerte Signalintensität auf. Durch die Abstandabhängigkeit des *PRE* lässt sich an Hand der Abnahme der Signalintensität Rückschlüsse auf den Abstand zur Spinsonde schließen. Somit ist mittels *PRE* nicht nur ein Nachweis einer Wechselwirkung sondern auch eine Identifizierung der Interaktionsfläche möglich.

## 2.3. Oberflächenplasmonenresonanz

### 2.3.1. Theorie

Eine Standardmethode zur Untersuchung von Wechselwirkung zwischen Molekülen stellt die Oberflächenplasmonenresonanz dar [77, 78]. Wenn Licht an der Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices totalreflektiert wird, entsteht ein evaneszentes Feld. Findet die Totalreflektion an einer elektrisch leitenden Oberfläche wie einem Gold-Film statt, kann die p-polarisierte Komponente der evaneszenten Welle in den Metallfilm eindringen und dort elektromagnetische Wellen anregen [79]. Diese Plasmonen genannten Wellen breiten sich nun entlang der leitenden Oberfläche aus. Mit p-polarisiertem Licht ist es möglich, einen Resonanzzustand zu erreichen. Der Impuls-Vektor des einfallenden Lichtes kann als Vektorsumme einer senkrecht und parallel zur Oberfläche stehenden Komponente dargestellt werden. Resonanzbedingungen liegen vor, wenn die parallel zur Oberfläche stehende Komponente des Impulsvektors gleich groß wie der Impuls der Plasmonen ist. Unter Resonanzbedingungen kommt es zu einer Energieübertragung vom eingestrahlt Licht auf die Oberflächenplasmonen. Somit kommt es

zu einer verringerten Intensität im totalreflektierten Licht. Impuls und Energie der Oberflächenplasmonen sind abhängig von dem Brechungsindex auf der anderen Seite der reflektierenden Oberfläche.

Um die Resonanzbedingungen zu erfüllen kann entweder die Wellenlänge oder der Einstrahl-

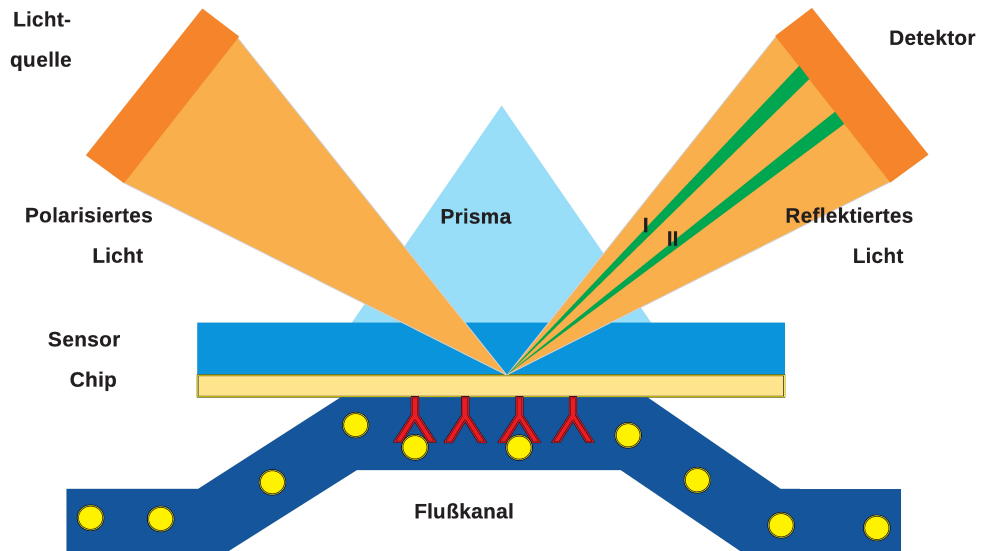


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus eines Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektrometers. Entnommen aus [80]

winkel variiert werden. Wird die Wellenlänge konstant gehalten, so wird ein winkelabhängiges Intensitätsminimum im reflektierten Licht beobachtet. Aus dem Winkel, bei dem das Intensitätsminimum auftritt, können also Rückschlüsse auf den Brechungsindex des Mediums auf der anderen Seite der Goldoberfläche gezogen werden. Hierbei spielt nur der Brechungsindex des Mediums im Abstand von einigen hundert Nanometern von der reflektierenden Oberfläche eine Rolle.

### 2.3.2. Anwendung

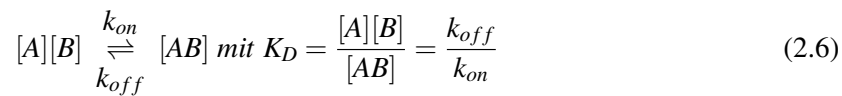
Bei der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie werden nun lokale Änderungen der Brechung an der Oberfläche des Gold-Chips beobachtet (abb. 2.1). Der Brechungsindex ist abhängig von der Massenkonzentration in dem Medium [81]. Um Interaktionsstudien durchzuführen, werden in der Regel Sensor-Chips verwendet, deren Goldoberfläche mit einer funktionalisierten Dextranmatrix beschichtet ist. Diese Dextranmatrix bildet definierte *self assembling monolayer*

Strukturen aus. Für Interaktionsstudien mit Proteinen wird standardmäßig eine mit Carboxyl-Gruppen funktionalisierte Dextranmatrix verwendet [82]. Über Aminkupplung können hier die Seitenkettenamine kovalent mit der Dextranmatrix verknüpft werden. Bei einer Interaktionsstudie wird nun ein konstanter Fluss an Laufpuffer über die Oberfläche geleitet und für einen definierten Zeitraum der zweite Interaktionspartner in Lösung injiziert. In der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie hat sich durchgesetzt, den immobilisierten Interaktionspartner als Liganden und den Interaktionspartner in Lösung als Analyten zu bezeichnen. Wechselwirkt nun der Analyt mit dem Liganden, resultiert dies in einer lokal erhöhten Massenkonzentration des Analyten an der Dextranmatrix. Dadurch wird eine Änderung des Brechungsindex in diesem Bereich hervorgerufen, was wiederum eine Verschiebung des Resonanzwinkels bewirkt. In einem Sensogramm wird die Änderung des Winkels des Intensitätsminimums im zeitlichen Verlauf in *response units* (RU) dargestellt. Eine *response unit* entspricht dabei einer Massenänderung von  $1 \frac{pg}{mm^2}$  auf der Oberfläche des Sensor-Chips.

Mit der Injektion beginnt die Assoziationsphase, in der der Analyt an den immobilisierten Liganden bindet, bis sich Sättigung einstellt. Sättigung beschreibt den Zustand, in dem Assoziation und Dissoziation in gleichem Maße stattfinden und somit die Massenkonzentration an der Oberfläche unverändert bleibt. Nach dem Ende der Injektion beginnt die Dissoziation, da die Oberfläche nun mit Puffer gespült wird und somit immer mehr Analyt dem Gleichgewicht entzogen wird. Um die Dissoziation zu beschleunigen und eine vollständige Dissoziation des Analyten zu garantieren, wird oft eine Regenerationslösung eingesetzt.

### 2.3.3. Auswertung

Für eine Wechselwirkung von Analyt und Ligand mit einer Stöchiometrie von 1:1 gilt:



Daraus ergibt sich für die Bildung des Komplexes [aB]:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{on}[A][B] - k_{off}[AB] = \frac{d[RU]}{dt} \quad (2.7)$$

Das Signal [RU] ist abhängig von der Menge des gebildeten Komplexes [aB]. Das maximale Signal  $R_{max}$  entspricht somit dem Zustand, bei dem alle Bindestellen auf dem Goldchip belegt

sind. Da  $R_{max}$  proportional zur Konzentration des immobilisierten Interaktionspartners [B] kann Gleichung 2.7 folgendermaßen umgeschrieben werden:

$$\frac{dRU}{dt} = k_{on}[A]R_{max} - (k_{on}[A] + k_{off})R \quad (2.8)$$

Durch Integration von Gleichung 2.8 erhält man [83]:

$$RU(t) = \frac{[A]k_{on}R_{max}[1 - e^{-([A]k_{on} + k_{off})t}]}{[A]k_{on} + k_{off}} \quad (2.9)$$

Für die Dissoziation gilt:

$$RU(t) = RU_{eq}e^{-k_{off}t} \quad (2.10)$$

Die Konstante  $RU_{eq}$  beschreibt das Signal der Sättigung vor Beginn der Dissoziationsphase. Durch einen Fit der gemessenen Daten mit den Gleichungen 2.9 und 2.10 können nun die kinetischen Parameter  $k_{off}$  und  $k_{on}$  bestimmt werden.

Eine weitere, sehr robuste Methode zur Auswertung von Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie-Versuchen stellt die *steady state affinity* da. Hierzu wird eine Verdünnungsreihe des Analyten angewendet und das Signal bei Erreichen der Sättigung gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen. Definitionsgemäß entspricht die Dissoziationskonstante  $K_D$  der Konzentration, bei der die Hälfte der Bindestelle, belegt sind. Somit entspricht die Konzentration, bei der das Oberflächenplasmonenresonanz-Signal  $\frac{R_{max}}{2}$  beträgt, der Dissoziationskonstante  $K_D$ . Eine exaktere Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  ist durch Angleichen der Daten mit Gleichung 2.11 möglich:

$$RU_{eq} = \frac{[A] \cdot R_{max}}{K_D + [A]} \quad (2.11)$$

Für eine genaue Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  ist es notwendig, dass die höchste verwendete Konzentration des Analyten mindestens um einen Faktor 2 größer ist als der  $K_D$ -Wert.

## 2.4. Isotherme Titrationskalorimetrie

Bei der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) handelt es sich um eine weitere Methode zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen [84]. Das Messprinzip beruht darauf, dass die Bildung von Komplexen zu einer Änderung der freien Enthalpie  $\Delta H$  führt. Da die Messung unter isobaren Bedingungen stattfindet, ergibt sich aus den Fundamentalgleichungen

der Thermodynamik, dass die Änderung der freien Enthalpie der Wärmemenge  $q$  entspricht. Für ITC-Messungen wird einer der Interaktionspartner in der Messzelle des Gerätes vorgelegt (bei dem ITC200 200  $\mu\text{l}$ ) und der zweite Interaktionspartner in wesentlich höherer Konzentration in kleinen Schritten (typischer Weise  $\sim 2 \mu\text{l}$ ) zutitriert wird. Da mit jeder Injektion auch die Konzentration an freien Bindungsstellen in der Lösung abnimmt, verringert sich auch mit jeder Injektion der Betrag der Wärmemenge. Für eine 1:1 Wechselwirkung von zwei Molekülen ergibt sich für die Wärmemenge pro Injektion  $q_i$  [85]:

$$q_i = V \cdot \Delta H \cdot [A] \cdot \left( \frac{K_A [B]_i}{1 + K_A [B]_i} - \frac{K_A [B]_{i-1}}{1 + K_A [B]_{i-1}} \right) \quad (2.12)$$

Hierbei ist  $V$  das Volumen der Messzelle,  $[A]$  die Konzentration des in der Messzelle vorgelegten Interaktionspartner,  $[B]_i$  die Konzentration des zutitrierten Interaktionspartner nach der  $i$ -ten Injektion, beziehungsweise  $[B]_{i-1}$  nach der  $i-1$ -ten Injektion und  $K_A$  die Bindungskonstante, der Kehrwert des  $K_D$ -Wertes. Durch die Abhängigkeit der Wärmemenge von der Bindungskonstante  $K_A$  ist somit möglich, aus den kalorimetrischen Daten einer Interaktion Rückschlüsse auf die Affinität zu ziehen. Über den Zusammenhang der freien Enthalpie  $\Delta G$  mit der Bindungskonstanten  $K_A$  kann die Entropie  $\Delta S$  für diese Reaktion errechnet werden:

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T \Delta S \quad (2.13)$$

Die Temperaturänderung durch die Zugabe des Liganden wird über eine sogenannte Ausgleichsmessung bestimmt (abb. 2.2). Dazu wird eine Messzelle mit der Probenlösung und eine Referenzzelle mit dem Puffer befüllt. Diese beheizbaren Zellen befinden sich in einem Thermostat, dessen Temperatur geringfügig unter der Temperatur der Zellen liegt. Somit ist es notwendig, permanent eine geringe Heizleistung anzuwenden, um die Temperatur der Zellen konstant zu halten. Wird der Interaktionspartner B zutitriert, führt dies durch die Bildung des Komplexes  $[AB]$  zu einer Wärmeaufnahme oder -abgabe. Um die Temperatur in der Messzelle weiterhin konstant zu halten, wird die Heizleistung kurzfristig angepasst. Gemessen wird die Heizleistung, die benötigt wird, um Mess- und Referenzzelle auf gleicher Temperatur zu halten.

Voraussetzung für diese Messungen ist, dass alle verwendeten Konzentrationen über dem  $K_D$ -Wert liegen. Die Konzentration des vorgelegten Interaktionspartners A sollte mindestens das Zehnfache der Dissoziationskonstante  $K_D$  betragen, die Konzentration des Interaktionspartners B sollte bei einer 1:1 Wechselwirkung das Zehn- bis Fünfzehnfache der Konzentration von A betragen. Bei kleinen Reaktionsenthalpie kann es notwendig sein, weit höhere Konzentrationen zu verwenden, um gut auswertbare Daten zu erhalten. Aufgezeichnet wird die Änderung der Heizleistung im zeitlichen Verlauf. Durch Integration der durch die Injektion des Interaktionspartners

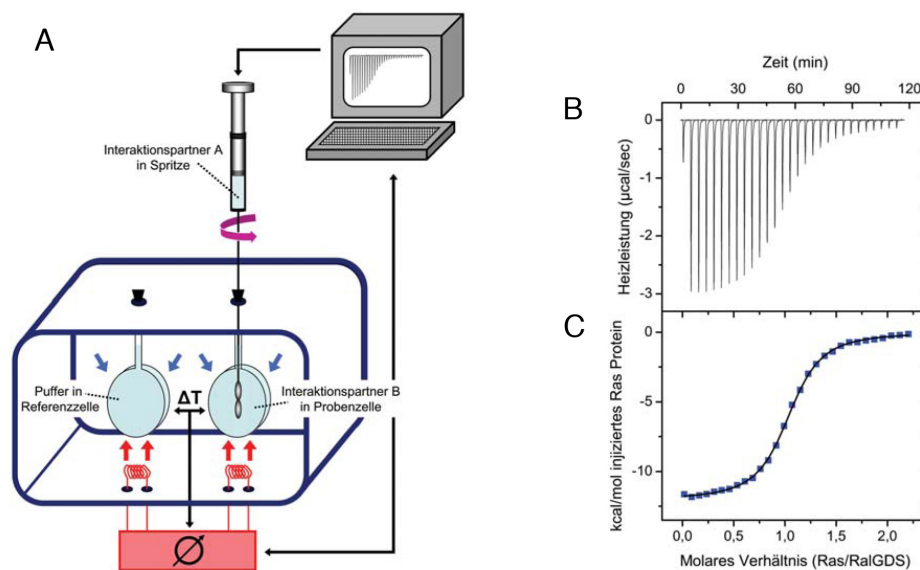


Abbildung 2.2.: **A:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines isothermen Titrationskalorimeters. **B:** Änderung der Heizleistung im zeitlichen Verlauf eines Titrationsexperiment. Da es sich um eine exotherme Reaktion handelt, muss die Heizleistung nach jeder Injektion reduziert werden, um die Temperatur konstant zu halten. **C:** Auftragung der Integrale der Ausschläge aus **B** gegen das molare Verhältnis der Interaktionspartner in der Messzelle. Quelle: Praefcke et al. [86]

verursachten Ausschläge wird die Änderung der Enthalpie pro Injektion bestimmt. Aufgetragen gegen das molare Verhältnis der beiden Interaktionspartner erhält man einen sigmoiden Graph. Aus dem Verlauf des Graphen können wesentliche Parameter der untersuchten Interaktion ermittelt werden: Der y-Achsenabschnitt dieser Auftragung entspricht der Reaktionsenthalpie  $\Delta H$ , das molare Verhältnis bei  $\frac{\Delta H}{2}$  entspricht der Stöchiometrie der Reaktion und aus der Steigung im Bereich des stöchiometrischen Verhältnisses kann die Dissoziationskonstante  $K_D$  errechnet werden. Über den in Gleichung 2.13 dargestellten Zusammenhang ist es möglich, aus  $\Delta H$  und  $K_A$  die freie Enthalpie  $\Delta G$  sowie die Entropie  $\Delta S$  zu berechnen.

Gegenüber der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie bietet die isotherme Titrationskalorimetrie den Vorteil, dass keine Immobilisierung eines Interaktionspartner notwendig ist. Eine kovalente Modifikation birgt immer das Risiko, die Interaktion negativ zu beeinflussen. Durch ITC Messungen ist es also möglich, Wechselwirkungen direkt in Lösung zu beobachten und im Fall von biomolekularen Wechselwirkungen den physiologischen Bedingungen sehr nahe zu kommen. Allerdings ist es mit dieser Methode nicht möglich, die Kinetik einer Interaktion zu untersuchen. Obwohl durch technische Verbesserung der ITC-Geräte das Probenvolumen deutlich

verringert werden konnte, ist der Verbrauch an Probensubstanz immens, was gerade bei schwer zugänglichen Proben wie Proteinen einen großen Nachteil darstellt.

Da die Steigung der sigmoiden Kurve bei sehr großen Affinitäten gegen unendlich konvergiert, ist es nur möglich, Interaktionen mit einer Dissoziationskonstante  $K_D < 10$  nM zu untersuchen. Aus messtechnischen Gründen besteht keine Begrenzung hin zu schwachen Affinitäten, in der Praxis ist hier jedoch die Untersuchung gerade bei biomolekularen Wechselwirkungen durch die geringe Löslichkeit begrenzt. So wäre es zum Beispiel nur in Ausnahmefällen möglich, eine Protein-Protein Wechselwirkung mit einem  $K_D$ -Wert von nur  $100 \mu\text{M}$  mittels ITC zu untersuchen, da hierfür der Interaktionspartner in der Injektionsspritze in einer Konzentration von mindestens 15 mM vorliegen müsste.

Gerade in Kombination mit Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie bietet die isotherme Titrationskalorimetrie einen effektiven Weg, biomolekulare Interaktionen zu charakterisieren. Da zur erfolgreichen Durchführung von ITC-Experimenten zumindest die Kenntnis der Größenordnung des  $K_D$ -Wertes notwendig ist, ist es sinnvoll, zuerst eine Charakterisierung mittels SPR durchzuführen und mit den daraus resultierenden Parametern die optimalen Konzentration für die ITC Messungen zu bestimmen. Durch isotherme Titrationskalorimetrie ist es zum einen möglich, den Einfluss der Immobilisierung auf die Affinität zu untersuchen, zum anderen können die thermodynamischen Parameter  $\Delta H$  und  $\Delta S$  sowie das stöchiometrische Verhältnis bestimmt werden.

Weiterhin ist es im Gegensatz zur Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie auf einfachen Wege möglich, Wechselwirkungen mit mehr als zwei beteiligten Interaktionspartnern zu untersuchen.



### 3. Zielsetzung

Trotz Kenntnis der Kristallstruktur des Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-Komplexes sind wichtige Details der Funktionsweise des glucose-spezifischen Repressors noch nicht vollständig aufgeklärt. So wurde durch Versuche mit löslichem IIB<sup>Glc</sup> gezeigt, dass die Bindung von Mlc an diese Domäne alleine nicht ausreicht, um die Bindung von Mlc an seine DNS Operatoren zu unterbinden. Nam et al. [46] vermuten als Ursache für den Verlust an Flexibilität durch die multivalente Bindung an membrangebundenes IIB<sup>Glc</sup>.

Um die Funktionsweise des Repressors Mlc zu verstehen, ist es unabdingbar die Natur der Wechselwirkungen mit seinen DNS-Operatoren und der löslicher sowie der membrangebundener IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu kennen. Mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) und isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) sollen die Affinitäten des Repressors zur löslichen IIB<sup>Glc</sup>-Domäne und den DNS-Operatoren bestimmt werden. Für die Durchführungen der Bindungsstudien mit den DNS-Operatoren ist es notwendig, basierend auf den identifizierten Operatoresequenzen [18] geeignete Hairpin-Strukturen herzustellen. Durch SPR-Experimente mit löslichen IIB<sup>Glc</sup> und Mlc soll untersucht werden, ob Mlc zu einer multivalenten Bindung in der Lage ist und wie diese sich gegebenenfalls auf die scheinbare Affinität auswirkt.

Der Einfluss der löslichen IIB<sup>Glc</sup>-Domäne auf die Affinität von Mlc zu den DNS-Operatoren ist ein weiterer Aspekt, der in der Aufklärung der Natur des Repressors wichtig ist. Um auszuschließen, dass die Anwesenheit der löslichen IIB<sup>Glc</sup>-Domäne einen schwachen Effekt auf die DNS-Affinität von Mlc hat, sollen Bindungsstudien mittels isothermer Titrationskalorimetrie durchgeführt werden. Weiterhin kann durch diese Versuche gegebenenfalls auf biophysikalischer Ebene bestätigt werden, dass ein ternärer Komplex bestehend aus Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-DNS existiert [40, 46].

Für den Verlust der Fähigkeit zur Bindung an die DNS-Operatoren ist membrangebundenes IIB<sup>Glc</sup> notwendig. Hierbei macht es keinen Unterschied, ob die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne durch den natürlichen Membrananker IIC<sup>Glc</sup> oder einen fremden Membrananker wie zum Beispiel gp8 aus dem Bakteriophagen M13 an der Oberfläche der Membran lokalisiert wird. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen nach dem von Lee et al. [40] veröffentlichten Protokoll IIB<sup>Glc</sup> tragende Membranvesikel hergestellt werden und für Interaktionsstudien mit Mlc verwendet werden.

Durch die eingehende biophysikalische Charakterisierung der Wechselwirkung von Mlc mit der

IIB<sup>Glc</sup> und seinen DNS-Operatoren könnte es möglich sein, den Mechanismus des Verlustes der DNS-Affinität und somit die Funktionsweise des Repressors aufzuklären.

Weiterhin soll im Rahmen dieser Doktorarbeit aufgeklärt werden, welche Rolle die Glucokinase Glk bei der Regulation der *ptsG* spielt. Von Lengsfeld et al. wurde in sogenannten *pull down assays* gezeigt, dass die Glucokinase Glk in der Lage ist, an membrangebundenes IIB<sup>Glc</sup> zu binden [56]. Um in den Regulationspfad eingreifen zu können, müsste die Glucokinase in der Lage sein, den Glucose-spezifischen Repressor Mlc von der von der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu verdrängen. Dies ist nur möglich, wenn die Affinität der Glk zur IIB<sup>Glc</sup>-Domäne in der gleichen Größenordnung wie die des Repressors liegt beziehungsweise die intrazelluläre Konzentration der Glk wesentlich höher ist als die des Repressors. Zur Aufklärung der Rolle der Glucokinase in diesem Regulationspfad ist es notwendig, sowohl die Wechselwirkung von Glk mit der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne biophysikalisch zu charakterisieren als auch die intrazelluläre Konzentration zu bestimmen. Mit Kenntnis dieser Daten kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob und unter welchen Umständen die Glucokinase in der Lage ist, die Expression des *ptsG* zu beeinflussen.

## 4. Proteinexpressionen

### 4.1. Die Glucokinase Glk

Wie bereits in 1.3 erwähnt, wiesen Lengsfeld et al. [56] durch sogenannte 'Pull down assays' eine Bindung von Glk an die IIB<sup>Glc</sup>-Untereinheit des PtsG nach. Die Glucokinase Glk ist für die Phosphorylierung von Glucose zuständig, die in Form eines Polysaccharids in die Zelle transportiert wurde und dort aufgespalten wurde. Wäre die Glucokinase in der Lage, Mlc von der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu verdrängen, würde sie auf diesem Wege in die Regulation des PtsG eingreifen. Eine Beteiligung der Glucokinase Glk an diesem Regulationspfad würde insofern Sinn machen, da Glk und PtsG für unterschiedliche Wege stehen, auf denen Glucose in die Zelle gelangen kann. Ein hohe Glk-Konzentration deutet auf eine hohes, intrazelluläre Glucoseniveau hin. Ist Glucose im großen Maß in Form von Polysacchariden verfügbar, wird der Glucosetransporter PtsG nicht benötigt, um den Glucosebedarf der Zelle zu decken. Eine Repression des Gen *ptsG* wäre sinnvoll.

Durch die biophysikalische Charakterisierung dieser Interaktion soll die Rolle der Glucokinase in der Regulation des PtsG aufgeklärt werden. Basierend auf den Erfahrungen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Boos mit der Expression von Glk wurde das Volllänge-Konstrukt (Plasmid p\$1, Aminosäuren 1-312) [87] ohne Affinitäts-Tag ausgewählt, da dieses die höchsten Expressionsraten gezeigt hatte. Das Plasmid p\$1 basiert auf dem Vektor pCYTEXP1 (Abb.: 4.1) [88], in den das Gen *glk* inseriert wurde. Dieser Vektor verfügt über die Promotoren P<sub>R</sub> und P<sub>L</sub> aus dem Bakteriophage  $\lambda$ , die bei einer Erhöhung der Temperatur auf 42°C die Überexpression der Glk induzieren.

Ein weiterer Vorteil dieses Konstrukt besteht darin, dass es sich um Wildtyp Glk handelt und keine Modifikationen vorliegen, die unter Umständen die Interaktion beeinflussen könnten. Für die homologe Expression wurde der *Escherichia coli*-Stamm SF120 verwendet, in dem das Gen für die Protease III ausgeschaltet wurde [89]. Trotz der durch das Fehlen eines Affinität-Tags erschwerten Reinigung konnten hohe Ausbeuten von 35 mg pro Liter Expressionsmedium an reinem Protein für die Expressionen in Minimalmedium erzielt werden. Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll von Meyer et al. [87] durch Ausfällen des Proteins mit Ammoniumsulfat und anschließende Anionenaustauschchromatographie. Abweichend von dem veröffentlichten

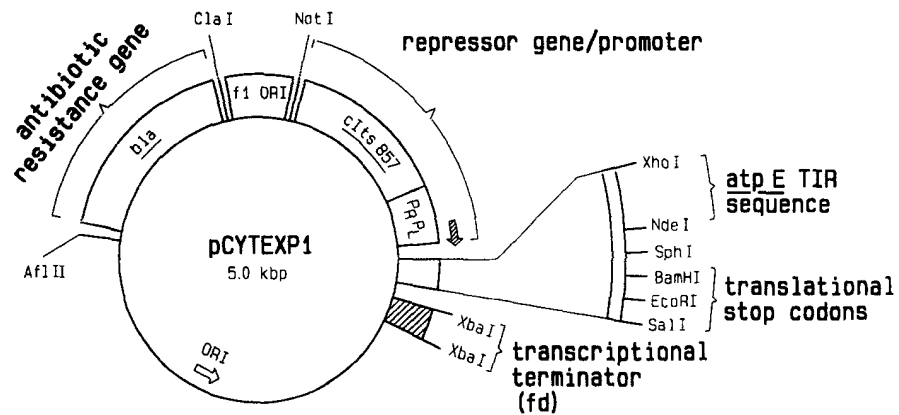


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung des Vektors pCYTEXP1, auf dem das Plasmid p\$1 basiert. Entnommen aus [88]

Protokoll wurde noch ein weiterer Reinigungsschritt durch Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 16/60 Säule durchgeführt. Die Reinheit der Präparationen wurde mittels SDS-PAGE nachgewiesen. Um zu zeigen, dass es sich bei dem gereinigten Protein tatsächlich um die Glucokinase Glk handelt, wurde eine ausgeschnittene Gelbande einem Thrypsin-Verdau unterzogen und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Die Auswertung des Peptid-Fingerprinting beweist zweifelsfrei, dass die Glk überexprimiert und gereinigt wurde.

Eine wichtige Voraussetzung für die Interaktionsstudien ist, dass die beteiligten Proteine korrekt gefaltet vorliegen und funktionsfähig sind. Bei der Glk bietet sich die Möglichkeit über die von ihr katalysierte Reaktion [50, 51], Rückschlüsse auf die korrekte Faltung zu ziehen (Abb.: 4.2). Diese Reaktion kann mittels  $^{31}\text{P}$  NMR beobachtet werden. Dazu wurde eine Serie 1D- $^{31}\text{P}$ -Spektren von einer Probe bestehend aus 30 nM Glk, 20 mM ATP und 40 mM Glucose in Puffer aufgenommen. Die resultierenden Spektren (Abb.: 4.3) zeigen deutlich, dass ATP (Signale bei -5.8 ppm, -10.9 ppm und -19.9 ppm) verbraucht wird und die Konzentration von Glucose-6-phosphat (Doppelsignale bei 3 ppm) und ADP (Signale bei -4 ppm und -10.7 ppm)

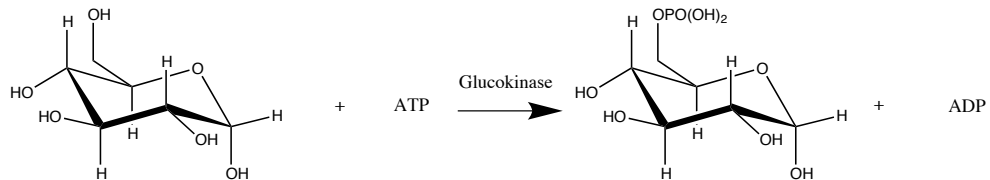


Abbildung 4.2.: Durch die Glucokinase Glk katalysierte Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat

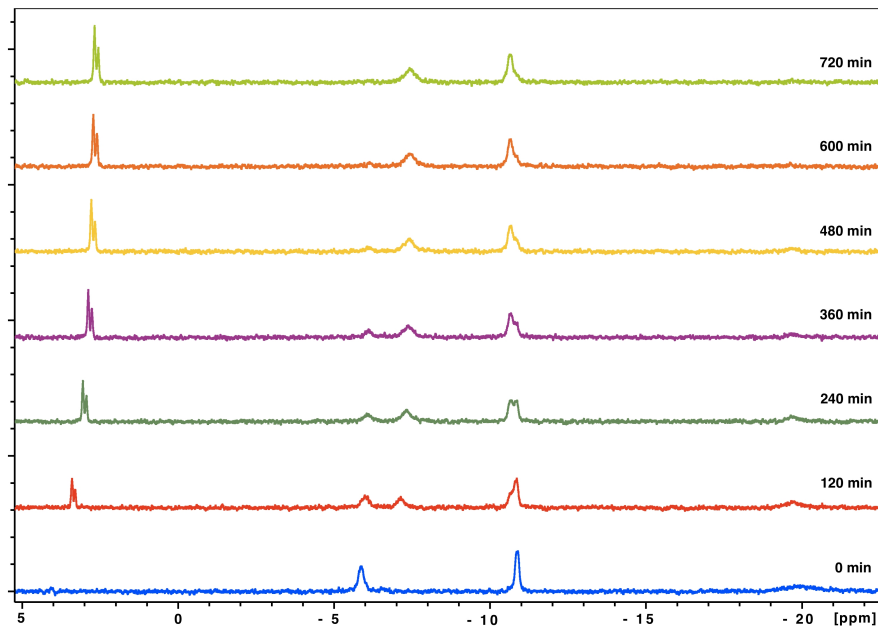


Abbildung 4.3.: Mittels 1D- $^{31}\text{P}$ -Spektren verfolgte Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat.

zunehmen. Damit ist davon auszugehen, dass die Glucokinase Glk korrekt gefaltet und funktionsfähig vorliegt. Dass einige Signale im Laufe der Reaktion eine leichte Veränderung der chemischen Verschiebung erfahren, ist durch eine Änderung des pH-Wertes zu begründen. Da durch die Hydrolyse von ATP zu ADP Protonen freigesetzt werden, führt diese Reaktion zu einer Verringerung des pH-Wertes. Als Negativkontrolle wurde eine Serie von 1D  $^{31}\text{P}$  Spektren einer Probe, die ATP und Glucose in gleicher Konzentration jedoch keine Glk enthielt, aufgenommen. In dieser Probe traten im beobachteten Zeitraum weder Hydrolyse von ATP noch ein Bildung von Glucose-6-phosphat auf.

Aus diesem Aktivitätstest ist es weiterhin möglich, die Wechselzahl der Glucokinase unter diesen Bedingungen zu bestimmen. Dazu wurde durch Integration des Signals des Adenosintriphosphats bei -5.8 ppm auf die Konzentration zurückgeschlossen. Dieses Signal wurde ausgewählt, da es sehr scharf ist und es in diesem Bereich keinen Überlapp mit den Signalen des Adenosindiphosphats gibt. Aus der Steigung der Auftragung der Konzentration gegen die Zeit konnte die Wechselzahl bestimmt werden (Abb.: 4.4). Für diese Auswertung wurden nur die ersten sieben Messpunkte des Versuchs ausgewählt, da hier die Annahme  $c_{\text{ATP}} \gg K_m$  und  $c_{\text{Glucose}} \gg K_m$  gilt. In diesem Bereich wurde eine Wechselzahl von  $60 \text{ s}^{-1}$  beziehungsweise eine Enzymak-

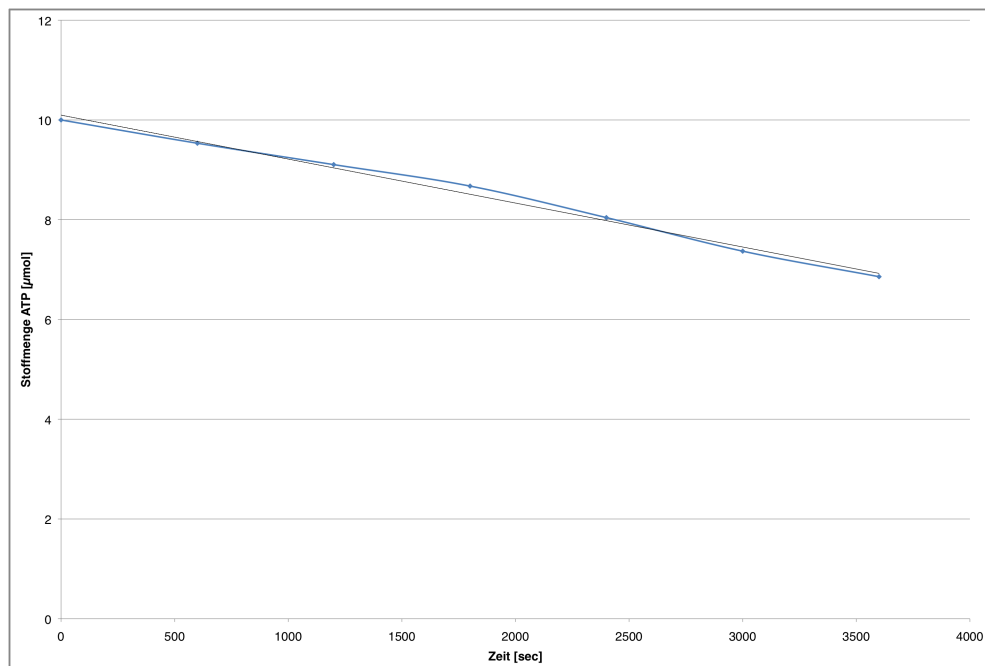


Abbildung 4.4.: Bestimmung des Umsatzes der Glk durch Auftragung der Stoffmenge an ATP gegen die Zeit. Durch lineare Regression wurde für eine Wechselzahl von  $60 \text{ s}^{-1}$  beziehungsweise eine Enzymaktivität von  $81.2 \text{ U/mg Glk}$  bestimmt.

tivität von 81.2 U/mg Glk ( $R^2 = 0,9928$ ) bestimmt. Da unter den getesteten Bedingungen die Michalis-Menten Konstanten  $K_m$  weit überschritten sind, handelt es sich bei der bestimmten Umsatzrate um die Maximalgeschwindigkeit  $V_{max}$ . Der durch Verfolgung der Reaktion mittels 1D- $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren bestimmte  $V_{max}$ -Wert weicht ungefähr den Faktor 2 vom Literaturwert von 158 U/mg Protein [87]. Die Ursache für die Abweichung vom Literaturwert liegt aller Wahrscheinlichkeit nach in den unterschiedlichen Messmethoden. Weiterhin wurde von Meyer et al. Zellextrakt zur Bestimmung der enzymkinetischen Daten verwendet, was eine ungenauere Bestimmung der Glk Konzentration zur Folge haben sollte.

## 4.2. Die lösliche IIB<sup>Glc</sup>-Domäne

In *E. coli* besteht das Enzym II des glucosespezifischen Phosphotransferase-Systems aus zwei separaten Proteinen: dem löslichen IIA<sup>Glc</sup> und dem Transmembranprotein IICB<sup>Glc</sup>. Das Enzym IICB<sup>Glc</sup> ist wiederum in den Transmembranteil IIC<sup>Glc</sup> und die cytosolische Phosphorylierungsdomäne IIB<sup>Glc</sup> unterteilt. Es ist möglich, die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne separat als lösliches Protein zu exprimieren [11].

Für die Interaktionsstudien mit Mlc und Glk wurden zwei verschiedene IIB<sup>Glc</sup> Konstrukte verwendet: H<sub>6</sub>-IIB<sup>Glc</sup>, bestehend aus einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag verbunden durch eine Thrombinschnittstelle mit den Aminosäuren 401-477 des Glucosetransporters IICB<sup>Glc</sup>, und IIB<sup>Glc</sup>-H<sub>6</sub>, bestehend aus den Aminosäuren 388-477 des Glucosetransporters IICB<sup>Glc</sup> mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Die Plasmide für H<sub>6</sub>-IIB<sup>Glc</sup> (pET28H6IIBGlc401-477, nicht publiziert) und IIB<sup>Glc</sup>-H<sub>6</sub> (pJBH, [11]) wurden von Bernhard Erni, Universität Basel, erhalten. Da es sich bei der 13. Aminosäure um ein Prolin handelt, kann durch die Verwendung des gekürzten Konstrukts die cis/trans Isomerie vermieden werden und somit eine Zuordnung der NMR-Signale vereinfacht werden.

### 4.2.1. Expression und Reinigung von H<sub>6</sub>-IIB<sup>Glc</sup>

Für die Expression von H<sub>6</sub>-IIB<sup>Glc</sup> wurde das Plasmid pET28H6IIBGlc401-477 verwendet, das auf dem pET-Expressionssystem basiert [60]. Dieses Plasmid wurde in den *Escherichia coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert. Die Expression der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne erfolgte sowohl in Voll- als auch Minimalmedium. Zur Durchführung NMR-spektroskopischer Versuche wurde die Expression in Minimalmedium mit  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle durchgeführt. Durch die Zugabe von IPTG wurde die Überexpression induziert. Durch die Bindung des His<sub>6</sub>-Affinitätstags an eine Ni-Sepharose-Säule konnte die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne aus dem Lysat isoliert werden. Um verbleibende Unreinheiten zu entfernen, wurde eine Größenausschluss chromatographie durchgeführt. Durch die Kalibrierung der Säule mit Proteinen bekannter Größe konnte

die berechnete Masse von 10.166 kDa bestätigt werden. Mittels SDS-PAGE konnte die Reinheit der Proteinprobe erwiesen werden. Für die Expression in Minimalmedium wurde eine hohe Ausbeute von 10 mg pro Liter Expressionsmedium an reinem IIB<sup>Glc</sup> erzielt, die erwartungsgemäß von der Expression in Vollmedium mit 20 mg pro Liter Expressionsmedium an reinem Protein übertroffen wurde.

#### 4.2.2. Expression und Reinigung von IIB<sup>Glc</sup>-H<sub>6</sub>

Das Plasmid pJBH wurde in den *E. coli*-Stamm W3110 [90] transformiert. Da dieses Konstrukt nur für Interaktionsstudien mittels isothermer Titrationskalorimetrie und Oberflächenplasmonenresonanz verwendet wurde, wurde diese Expression ausschließlich in LB-Vollmedium durchgeführt. Expression und Reinigung von IIB<sup>Glc</sup>-H<sub>6</sub> wurden nach dem von Buhr et al. veröffentlichten Protokoll durchgeführt [11]. Beim Erreichen einer Zelldichte von OD<sub>600</sub>=1 wurde die Überexpression durch Zugabe von IPTG induziert und über Nacht fortgesetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch mehrere Passagen durch eine *French Pressure Cell*. Die Isolation der überexprimierten IIB<sup>Glc</sup>-Domäne aus dem Lysat erfolgte durch Bindung des C-terminalen His<sub>6</sub>-Tags an eine Ni-Sepharose Säule. Allerdings lieferte ein Imidazol-Stufengradient von 50 mM bis 500 mM bessere Ergebnisse als die von Buhr verwendeten Elution über pH-Wertänderungen. Aufgrund der geringen Absorption der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne bei einer Wellenlänge von 280 nm konnte bei der Elution mit einem linearen Imidazol-Gradienten nicht festgestellt werden, in welcher Fraktion sich das gereinigte Protein befindet. Mittels SDS-PAGE wurde festgestellt, in welcher Fraktion sich die IIB<sup>Glc</sup> befand. Verbleibende Verunreinigungen wurden durch Gelfiltration entfernt.

#### 4.3. Der Repressor Mlc

Die Mlc-Reinigung wurde angelehnt an Gerber et al. [91] durchgeführt. Das verwendete Plasmid pQE60mlc [91] basiert auf dem Vektor pQE60 der Firma QIAGEN und verfügt über einen T5-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker. Für die Expression von Mlc wurde das Plasmid pQE60mlc in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) [60] transformiert. Da mit Mlc keine NMR-spektroskopischen Untersuchungen durchgeführt wurden, wurde die Expression ausschließlich in LB-Vollmedium durchgeführt. Die Aufreinigung des Proteins aus dem Lysat erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie mit einer Q-Sepharose Säule und anschließender Gelfiltration. Die Reinheit der Präparation wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Verbleibenden Verunreinigungen wurden durch Anionenaustauschchromatographie mit einer MonoQ Säule entfernt.

## 5. Interaktionsstudien

### 5.1. Die Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion

Trotz Kenntnis der Kristallstruktur des Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-Komplexes sind wichtige Details des Verlustes der DNS-Affinität von Mlc unbekannt. Eine eingehende Charakterisierung der Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Wechselwirkung mit biophysikalischen Methoden ist bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt worden. Da Mlc als Homotetramer vorliegt und somit über vier IIB<sup>Glc</sup> Bindestellen verfügt [46], liegt die Vermutung nahe, dass Mlc zu einer multivalenten Bindung fähig ist. Um diese Vermutung zu beweisen, wurden Interaktion mit isothermer Titrationskalorimetrie und Oberflächenplasmonenresonanz durchgeführt.

Für einen isothermen Titrationsversuch wurde Mlc in einer Monomerenkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  vorgelegt und insgesamt 38  $\mu\text{l}$  IIB<sup>Glc</sup>-H<sub>6</sub> mit einer Konzentration von 296  $\mu\text{M}$  in 19 2- $\mu\text{l}$ -Schritten zugegeben. Durch die Auswertung der Wärmetönung pro Injektion konnten die Dissoziationskonstante  $K_D$ , die Stöchiometrie sowie die Reaktionsenthalpie und -entropie für diese Interaktion bestimmt werden (Abb. 5.1). Dieser Versuch zeigt, dass Mlc und die lösliche IIB<sup>Glc</sup> Domäne in einem molaren Verhältnis von 1:1 im Bezug auf die Mlc Monomerenkonzentration interagieren. Somit ist bewiesen, dass ein Mlc-Tetramer in der Lage ist, vier IIB<sup>Glc</sup>-Einheiten auf einmal zu binden. Weiterhin zeigt die Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $452 \pm 65.7$  nM, dass es sich bei der Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Bindung um eine hochaffine Protein-Protein Wechselwirkung handelt. Bei dem ermittelten  $K_D$ -Wert ist jedoch zu beachten, dass zu membrangebundenem IIB<sup>Glc</sup> eine multivalente Bindung möglich ist und somit durch Aviditätseffekte die scheinbare Mlc-Affinität erhöht wird. Durch isotherme Titrationskalorimetrie können neben der Dissoziationskonstante auch die thermodynamischen Parameter  $\Delta H$  und  $\Delta S$  ermittelt werden. Aus der Gleichung  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  kann man ableiten, dass der enthalpische Beitrag zur Gibb'schen Enthalpie mit  $\Delta H = -33 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  gegenüber dem entropischen Beitrag von  $-T\Delta S = -2.98 \frac{\text{cal}}{\text{mol}}$  überwiegt. Somit kann man von einem enthalpisch getriebenen Prozess sprechen.

Da mittels ITC nur die Affinität von Mlc zu einer IIB<sup>Glc</sup>-Domäne bestimmt werden kann, wurden zur Untersuchung des Einflusses einer möglichen multivalenten Bindung SPR-Versuche durchgeführt. Hierzu wurden entweder IIB<sup>Glc</sup> oder Mlc auf GE Series S CM5 Chips durch Amin-Kupplung immobilisiert und eine Verdünnungsreihe des Interaktionspartner verwendet.

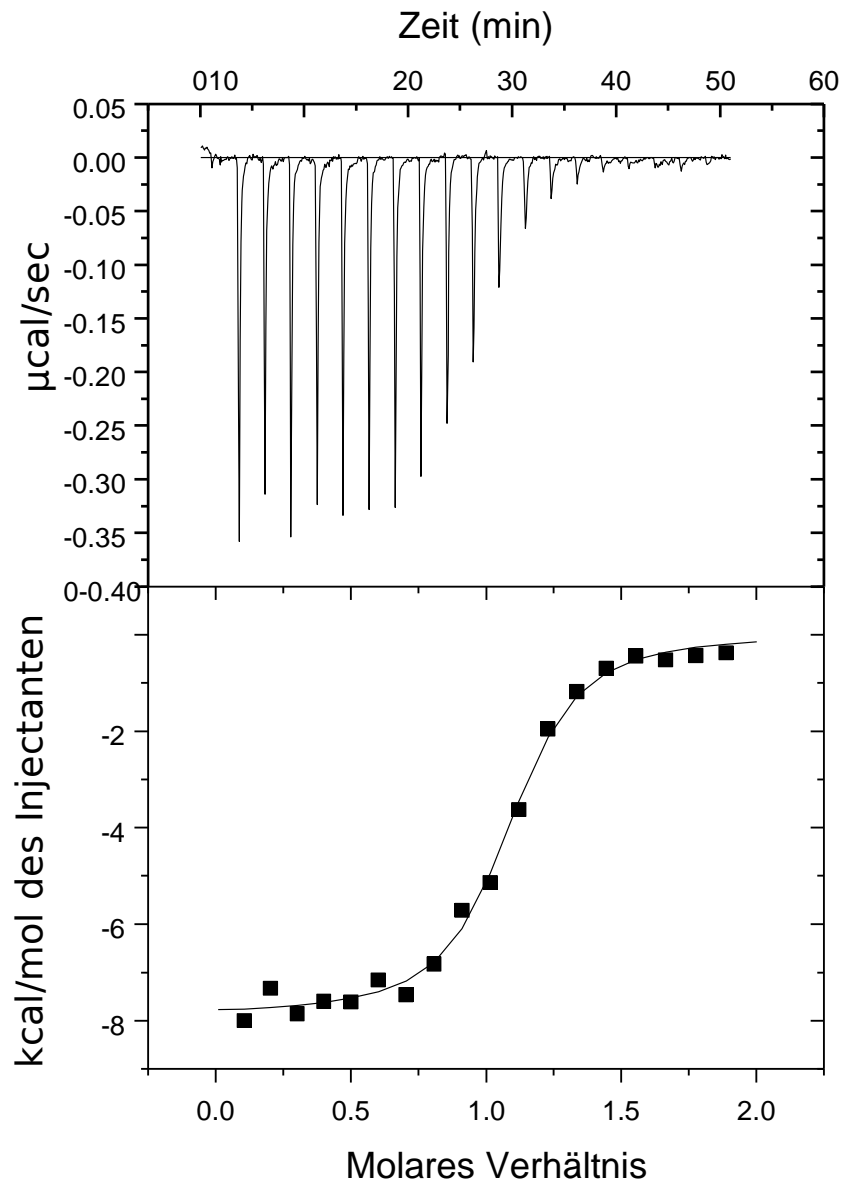


Abbildung 5.1.: Titration von Mlc mit IIB<sup>Glc</sup>-H<sub>6</sub>. Durch die Auswertung dieses ITC-Versuchs konnten folgende Parameter dieser Interaktion ermittelt werden: die Dissoziationskonstante  $K_D = 452 \pm 65 \text{ nM}$ ; die Stöchiometrie  $N = 1.06 \pm 0.01$ ; die Bindungsenthalpie  $\Delta H = -33 \pm 0.44 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  und die Bindungsentropie  $\Delta S = 0.01 \frac{\text{kJ}}{\text{molK}}$ .

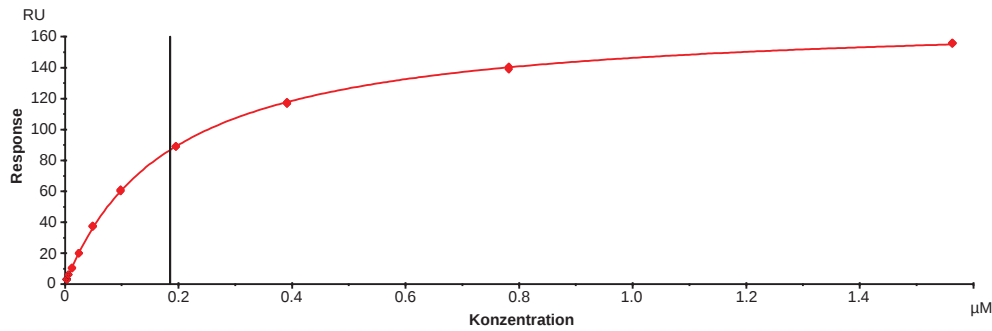


Abbildung 5.2.: *Steady state affinity*-Auswertung einer SPR-Interaktionstudie mit immobilisiertem Mlc. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  wurde ein Verdünnungsreihe von 3 nM bis 1.5  $\mu\text{M}$  angewendet. Die Auswertung ergab eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $185 \pm 2$  nM ( $\chi^2 = 0.481 \text{ RU}^2$  bei  $R_{max} = 173$  RU).

Zur Bestimmung der Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-Affinität ohne Berücksichtigung von Avidität wurde Mlc auch der Oberfläche eines funktionalisierten Goldchips mit einer Dichte von  $1.958 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$  immobilisiert. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde die lösliche IIB<sup>Glc</sup>-Domäne in einer Verdünnungsreihe von 3 nM bis 50  $\mu\text{M}$  angewendet, wovon nur die Messwerte der Konzentrationen bis 1.5  $\mu\text{M}$  für die Auswertung verwendet wurden, da bei höheren Konzentrationen unspezifische Wechselwirkungen mit der Dextranmatrix auftraten. Für den Versuch mit immobilisiertem Mlc wurde ein  $K_D$  Wert von  $185 \pm 2.5$  nM ( $\chi^2 = 0.481 \text{ RU}^2$  bei  $R_{max} = 173.2$  RU) ermittelt. Der geringe Fehler in dem  $K_D$  -Wert und der sehr kleine  $\chi^2$ -Wert zeigen, dass es sich um sehr vertrauenswürdige Daten handelt. Weiterhin ist anzumerken, dass jeder Konzentrations-schritt zweimal aus je einzeln angesetzten Verdünnungsreihen angewendet wurde. Auffällig ist, dass der durch Titrationskalorimetrie bestimmte Wert mit  $452 \pm 65.7$  nM von dem mittels SPR bestimmten Wert abweicht. Der Grund hierfür kann zumindest zu einem gewissen Teil in den Unterschieden in den Messmethoden liegen, da im Fall der Oberflächenplasmonenresonanz ein Interaktionspartner auf der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert wird, hingegen sich bei der isothermen Titrationskalorimetrie sich beide Interaktionspartner in Lösung befinden. Ein weiterer Grund sind Ungenauigkeiten in der Auswertung der ITC Daten. Da zur Bestimmung der Reaktionswärme pro Injektion eine Integration der Ausschläge durchgeführt wird, muss zuerst eine Basislinie bestimmt werden. Da im Falle der untersuchten Protein-Protein sowie Protein-DNS Interaktionen die Temperaturänderungen durch die Bindung sehr gering waren und somit ein schlechtes Signal-zu-Rauschen Verhältnis vorliegt, ist es schwer die korrekte Position der Basislinie exakt zu bestimmen. Auswertungen mit unterschiedlichen Integrationsparametern haben gezeigt, dass schon geringfügige Änderung der Basislinie oder der Integrationsgrenzen zu Änderungen in der Dissoziationskonstante führen können. Kleine Änderungen der Integrations-

parametern von Injektionen, die zur Bestimmung des  $K_D$ -Wertes relevant sind, haben Abweichung bis zu einem Faktor 2 hervorgerufen. Da die Fehlerwerte sich nur aus der Qualität des Fits berechnen, werden hier Fehler in der Integration nicht berücksichtigt. Auf Grund des geringen Fehlers und der hohen Qualität der gemessenen Daten wird der aus den SPR Experimenten bestimmte  $K_D$ -Wert als der genauere erachtet.

In einem weiteren SPR-Versuch wurde IIB<sup>Glc</sup> auf einer mit Carboxyl-Gruppen funktionalisierter Goldoberfläche immobilisiert. Dieser Versuchsaufbau kann als Model für die Interaktion von Mlc mit membrangebundenem IIB<sup>Glc</sup> gesehen werden, da in diesem Fall ebenfalls eine multivalente Bindung von Mlc auf der Oberfläche möglich ist. Da die Effizienz einer multivalenten Bindung von dem Abstand zwischen den Bindestellen abhängt, wurde dieser Versuch mit verschiedenen Beladungsdichten an IIB<sup>Glc</sup> ( $3.2 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$ ,  $0.57 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$  und  $0.1 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$ ) durchgeführt (Abb.: 5.3). Für die maximal erreichbare Beladungsdichte von  $3.2 \text{ ng/mm}^2$  wurde ein  $K_D$ -Wert von  $46 \pm 3.8 \text{ nM}$  durch die Auswertung der *steady state affinity* bestimmt. Diese Dissoziationskonstante ist wesentlich kleiner, als der Wert der in dem SPR-Versuch mit immobilisiertem Mlc ( $K_D = 185 \pm 2.5 \text{ nM}$ ) bestimmt wurde. In Anbetracht der Kristallstruktur des Repressors und der mittels ITC bestimmten Stöchiometrie der Wechselwirkung ist die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Befund, dass Mlc multivalent bindet und Aviditätseffekte zu einer scheinbaren Verringerung der Dissoziationskonstante führen. Mit dem Absenken der Beladungsdichte auf  $0.57 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$  verringerte sich auch die scheinbare Dissoziationskonstante auf  $495 \pm 38 \text{ nM}$ . Im Falle der niedrigsten Beladungsdichte wurde nur noch ein  $K_D$ -Wert von  $1 \pm 0.07 \mu\text{M}$  bestimmt. Dass der  $K_D$ -Wert bei den beiden geringeren Beladungsdichten größer als der mit immobilisiertem Mlc bestimmte  $K_D$ -Wert ist, kann daran liegen, dass in diesen Versuchen der kleinere, monomer vorliegende Interaktionspartner immobilisiert wurde und somit die kovalente Immobilisierung einen größeren negativen Einfluss auf die Affinität haben könnte. Bei einem kleinen Protein wie der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne besteht die Gefahr, dass jede Modifikation einen sterischen und elektrostatischen Einfluss auf seine Wechselwirkungen mit anderen Molekülen hat. Dieser Einfluss kann sich als eine verringerte Affinität niederschlagen.

Wie für eine multivalente Bindung erwartet, zeigt sich eine starke Abhängigkeit der Affinität von der Beladungsdichte. Dieser Befund ist ein starkes Indiz dafür, dass es sich um eine multivalente Interaktion handelt. Weiter gestützt wird diese Vermutung durch den Vergleich der Quotienten aus maximalen Antwort  $R_{max}$  und der Beladungsdichte. Im Fall einer tetravalenten Bindung würden 4 IIB<sup>Glc</sup> Moleküle ein Mlc Molekül binden, im Fall einer monovalenten Bindung würde eine 1:1 Stöchiometrie vorliegen. Für den Grenzfall der monovalenten Bindung würde man also einen vierfach größeren Quotienten aus der maximalen Antwort  $R_{max}$  und der Beladungsdichte erwarten als für den Grenzfall der tetravalenten Bindung. Die Quotienten für diesen Versuch zeigen genau dieses Verhalten ( $3.2 \text{ ng/mm}^2$ : 0.2;  $0.57 \text{ ng/mm}^2$ : 0.3;  $0.1 \text{ ng/mm}^2$ : 0.7). Für den Fall

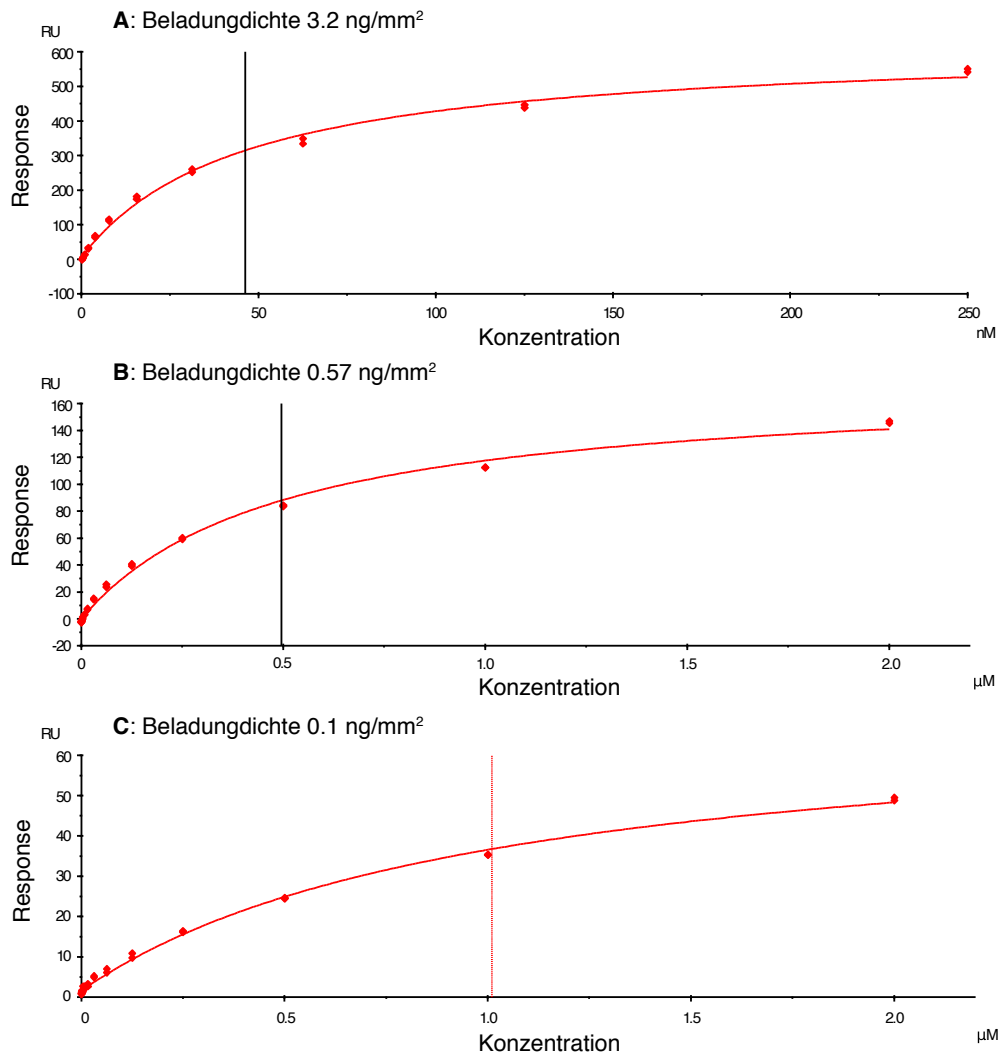


Abbildung 5.3.: Auf einem CM5 Biacore Chip wurden auf drei Flusszellen IIB<sup>Glc</sup> in unterschiedlichen Beladungsdichten (**A**: 3.2  $\frac{ng}{mm^2}$ , **B**: 0.57  $\frac{ng}{mm^2}$ , **C**: 0.1  $\frac{ng}{mm^2}$ ) immobilisiert. Für die Interaktionsstudien wurde für alle Flusszellen die gleiche Konzentrationsreihe verwendet. Die *steady state affinity*-Auswertung dieses Versuchs zeigt, dass der  $K_D$ -Wert mit sinkender Beladungsdichte zunimmt. In den oben gezeigten Graphen ist der  $K_D$ -Wert durch die senkrechte Linie angedeutet. Im Falle **A** wurden die Konzentrationschritte 500 nM, 1  $\mu$ M und 2  $\mu$ M nicht für die Auswertung verwendet, da sich bei höheren Konzentrationen das Gleichgewicht von tetravalenten zu niedriger-valenten Bindungsmodi verschiebt.

der geringsten Beladungsdichte ist der Quotient mit 0.7 3.5-fach so groß wie bei der höchsten Beladungsdichte. Die Abweichung vom erwarteten Verhalten ist dadurch zu erklären, dass trotz hoher Beladungsdichte auch mono-, bi- und trivalente Bindung bei hohen Mlc-Konzentrationen stattfinden kann. Weiterhin kann es auch bei geringer Beladungsdichte in geringen Umfang zu multivalenter Bindung kommen.

Durch isothermer Titrationskalorimetrie konnte gezeigt werden, dass Mlc in der Lage ist, vier lösliche IIB<sup>Glc</sup>-Domänen gleichzeitig zu binden. Die mit SPR durchgeführten Versuche zeigen zum einen, dass die Affinität größer ist, wenn IIB<sup>Glc</sup> immobilisiert vorliegt. Des weiteren konnte bewiesen werden, dass die Affinität stark von der IIB<sup>Glc</sup> Beladungsdichte abhängt. Alle erzielten Ergebnisse lassen eine tetravalente Interaktion von Mlc mit membrangebundenem IIB<sup>Glc</sup> als wahrscheinlich erscheinen.

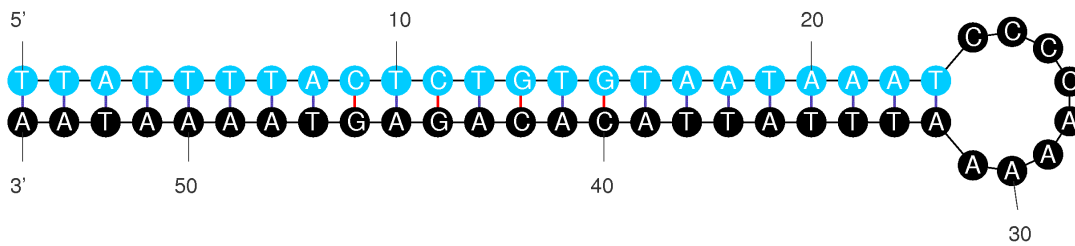
### 5.1.1. Die Mlc-DNS Interaktion

Zur Repression bestimmter Gene ist Mlc in der Lage, an definierte Operatorsequenzen zu binden. Durch Bindung an membrangebundenes IIB<sup>Glc</sup> verliert Mlc die Fähigkeit, an die DNS Operatoren zu binden. Die Bindung von Mlc an die lösliche IIB<sup>Glc</sup> Domäne alleine führt jedoch nicht zu einem Verlust der DNS-Affinität. Um den Mechanismus der Mlc Deaktivierung zu erklären, ist eine genaue Charakterisierung der Mlc-DNS Interaktion unabdingbar.

Von Plumbridge et al. [18] wurden die zwei Mlc-Bindestellen BoxP1 und BoxP2 vor dem ptsG-Gen identifiziert. Basierend auf den Sequenzen der Bindestellen wurden DNS-Hairpin Strukturen entworfen und mit Hilfe von *mfold* [92] optimiert (Abb. 5.4). Im Fall des Hairpins BoxP1 ist die Sequenz der Bindestelle durch einen CCCCAAAA Linker mit der revers-komplementären Sequenz verbunden. Im Gegensatz zur Sequenz mit einem Standard-Tetraloop bildet die verwendete Sequenz laut *mfold* neben einer DNS Hairpin Struktur mit einer Schmelztemperatur von 59.6 °C keine weiteren Strukturen aus. Für den Hairpin basierend auf der BoxP2 Bindestelle wurde ein Linker bestehend aus vier Cytosinen verwendet. Um die Ausbildung unerwünschter Strukturen dieser Sequenz zu verhindern, wurden am Anfang zwei Guanine und am Ende zwei Cytosine hinzugefügt. Mit Hilfe von *mfold* wurde eine Schmelztemperatur von 65.1 °C berechnet. Diese DNS Hairpins wurden für Bindungsstudien mit ITC und SPR verwendet.

Für die Titrationversuche wurde Mlc in der Messzelle des ITC vorgelegt und der DNS-Hairpin in kleinen Injektionen zugeben. Mit dieser Methode wurde für den BoxP1 Hairpin ein  $K_D$  von  $29.8 \pm 6.68$  nM bei einem Stöchiometrischen Verhältnis von  $0.34 \pm 0.003$  bestimmt. Die ermittelte Dissoziationskonstante  $K_D$  stimmt gut mit dem von Nam et al. [41] durch *Gel shift assays* bestimmten Wert von  $\sim 10$  nM überein. Jedoch weicht das stöchiometrische Verhältnis von dem erwarteten Wert ab. Aus den Kristallstrukturen von Mlc [45,46] ist ersichtlich, dass jeweils zwei Mlc-Monomere ein DNS Bindemotiv ausbilden. Somit wird ein stöchiometrisches Verhältnis

## BoxP1



## BoxP2

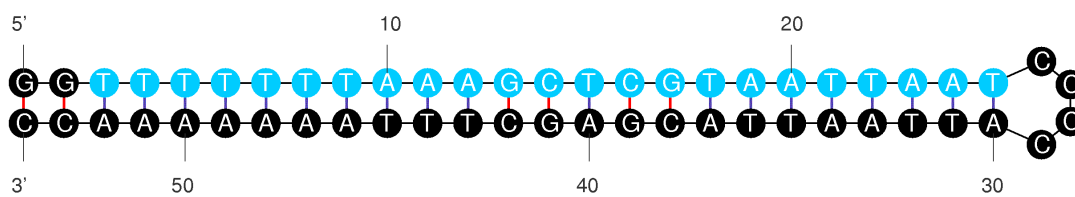


Abbildung 5.4.: Struktur der Hairpins BoxP1 und BoxP2. Diese DNS-Hairpin Strukturen basieren auf den Mlc Bindestellen vor dem Gen *ptsG* [18] und wurden als Modell für die Charakterisierung der Bindung von Mlc an die Operatorsequenzen verwendet. Die identifizierte Sequenz (blau) ist über einen Loop mit der revers-komplementären Sequenz verbunden. Basierend auf den mit *mfold* berechneten Strukturvorhersagen wurden zwei Guanodin-Cytosin Paar am Anfang beziehungsweise Ende der Sequenz hinzugefügt, um die Stabilität des Hairpin BoxP2 zu erhöhen.

von 0.5 in Bezug auf die Mlc Monomerenkonzentration erwartet. Die Abweichung von dem erwarteten Wert ließe sich dadurch Erklären, dass bei dieser Mlc Präparation vermutlich eine stark absorbierende Verunreinigung vorlag, die zu einer fehlerhaften Konzentrationbestimmung durch Absorption des Proteins bei 280 nm führte. Eine Überprüfung der Reinheit der Mlc Präparation mittels SDS-PAGE zeigte jedoch keine Verunreinigung durch andere Proteine. Weiterhin ist es möglich, dass Teile des Proteins nicht korrekt gefaltet waren und somit zu keiner Bindung an den DNS-Hairpin in der Lage waren. Beides hätte zur Folge, dass die Konzentration an aktivem Mlc geringer ist, als durch UV-Absorption bestimmt wurde. Hierdurch könnte eine Verschiebung des stöchiometrischen Verhältnis zu einem kleineren Wert erklärt werden. Neben der Dissoziationskonstante  $K_D$  und dem stöchiometrischen Verhältnis wurden durch die Titration auch noch die thermodynamischen Parameter  $\Delta H$  und  $\Delta S$  bestimmt. Für Bindung von Mlc an den DNS-Operator BoxP1 wurde eine Reaktionsenthalpie  $\Delta H = 47.7 \pm 0.675 \frac{kJ}{mol}$  bestimmt. Die Entropie  $\Delta S$  für diese Reaktion beträgt  $0.3 \frac{kJ}{mol \cdot K}$ . Da es sich bei dieser Reaktion um einen endothermen Prozess handelt, ist die Wechselwirkung von Mlc mit dem Hairpin BoxP1 im Gegensatz zur Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-Interaktion entropisch getrieben. Eine Titration mit gleicher Mlc und gleicher DNS-Konzentration wurde mit dem DNS-Hairpin BoxP2 durchgeführt (Abb. 5.6). Für diese Operatorsequenz wurde eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $433 \pm 100$  nM ermittelt. Somit zeigt der Hairpin BoxP1 eine wesentlich höhere Affinität zum Repressor Mlc als der Hairpin BoxP2. Wie schon im Fall des Hairpins BoxP1 handelt es sich bei dieser Wechselwirkung um eine endotherme und somit entropisch getriebene Reaktion mit einer Enthalpie von  $\Delta H = 43.4 \pm 1.67 \frac{kJ}{mol}$  und einer Entropie  $\Delta S = 0.27 \frac{kJ}{mol \cdot K}$ . Für diesen Versuch wurde eine andere Mlc Präparation verwendet, die mit einer Stöchiometrie von  $0.488 \pm 0.0137$  dem erwarteten Wert liefert. Ein Mlc Homotetramer ist also in der Lage, gleichzeitig an 2 DNS Operatorsequenzen zu binden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Mlc durch die Bindung an zwei Stellen eines DNS-Stranges die Ausbildung einer DNS-Loop Struktur bewirkt.

Weiterhin wurden die Mlc-DNS Bindungsstudien mit Oberflächenplasmonenresonanz erneut durchgeführt 5.7. Für diese Versuche wurde Mlc mittels Amin-Kupplung auf einer funktionalisierten Goldoberfläche mit Beladungsdichten von  $10 \text{ ng/mm}^2$  und  $2.8 \text{ ng/mm}^2$  immobilisiert. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden Verdünnungsreihen von den Hairpins BoxP1 (36 pM bis 150 nM) und BoxP2 (0.7 nM bis 3  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Jede Verdünnungsreihe wurde zweimal unabhängig voneinander angesetzt. Somit können Fehler beim Herstellen der Verdünnungsreihe ausgeschlossen werden und zugleich die hohe Reproduzierbarkeit der Versuche gezeigt werden. Die *steady state* Auswertung ergab für den Hairpin BoxP1 ein  $K_D$  von  $24 \pm 0.8$  nM bei einer Beladungsdichte  $10 \text{ ng/mm}^2$  und  $18.5 \pm 1.3$  nM bei einer Beladungsdichte von  $2.8 \text{ ng/mm}^2$ . Der Vergleich der beiden  $K_D$  zeigt, dass die Beladungsdichte keinen Einfluss auf die Affinität hat. Dabei ist zu beachten, dass der Fit bei der höheren Beladungsdich-

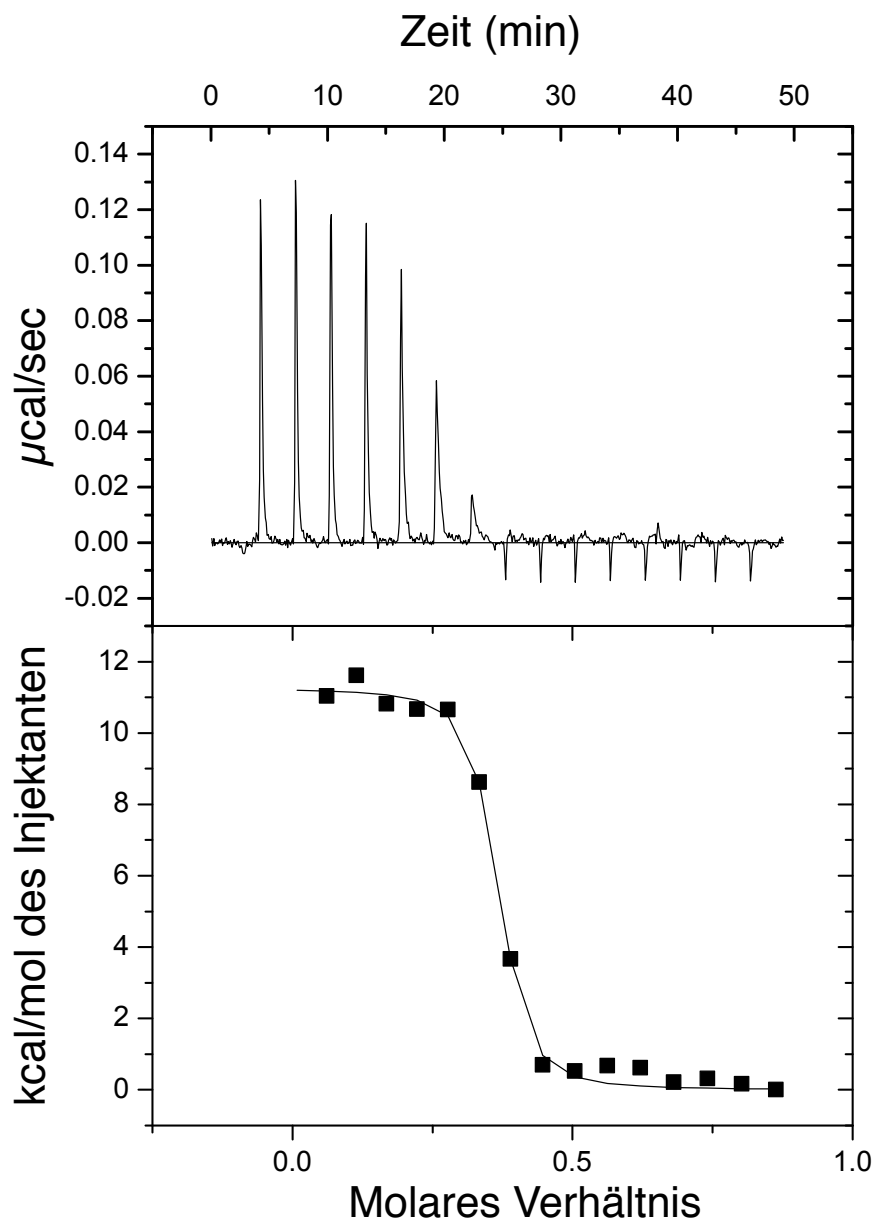


Abbildung 5.5.: Titration von Mlc mit dem Hairpin BoxP1. Zu 200  $\mu\text{l}$  Mlc mit einer Konzentration von 17.4  $\mu\text{M}$  wurden 40  $\mu\text{l}$  des DNS-Hairpins BoxP1 (75  $\mu\text{M}$ ) in 2.5  $\mu\text{l}$  Schritten zutitriert. Die Auswertung der Versuchsdaten ergab eine Dissoziationskonstante  $K_D = 29.8 \pm 6.7$  nM bei einem stöchiometrischen Verhältnis von  $0.335 \pm 0.006$ .

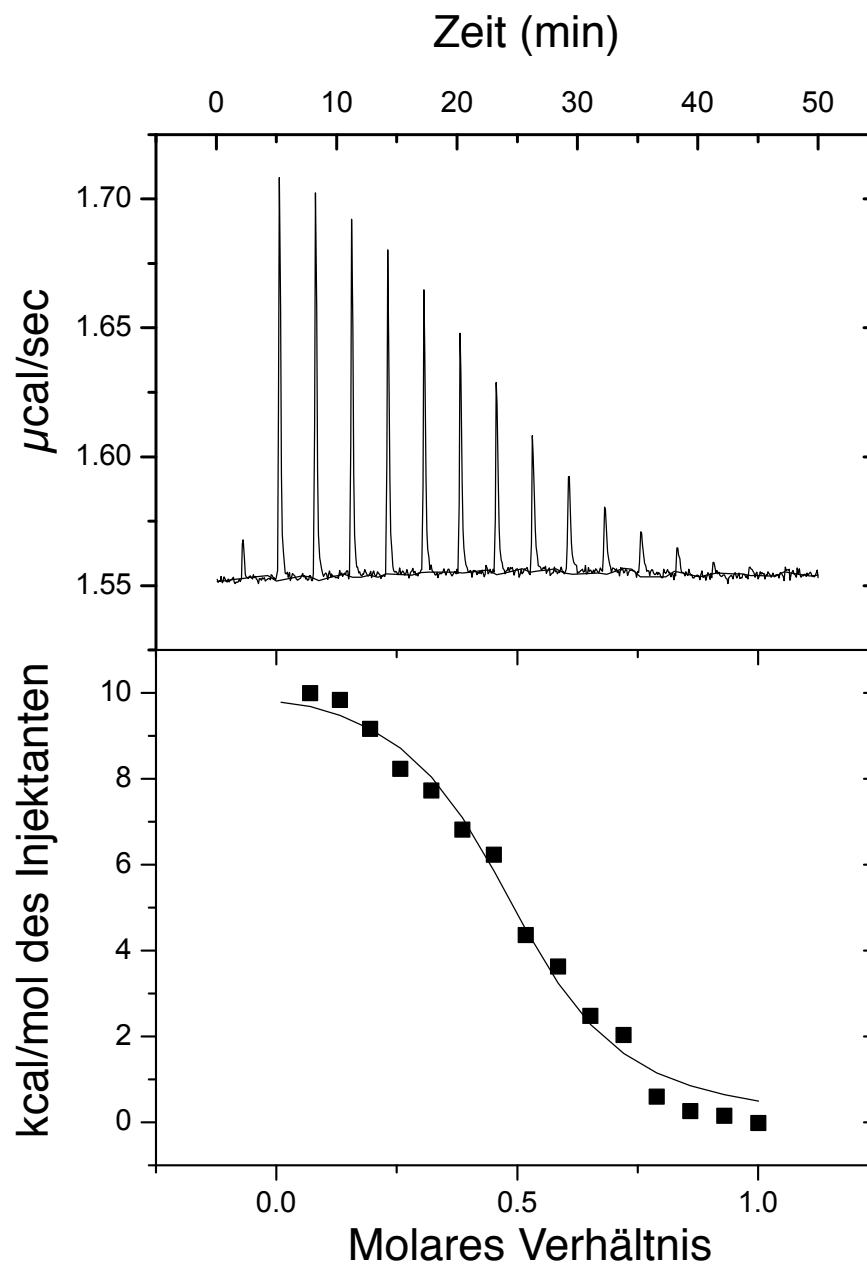


Abbildung 5.6.: Titration von Mlc mit dem Hairpin BoxP2. Zu  $200 \mu\text{l}$  Mlc mit einer Konzentration von  $15 \mu\text{M}$  wurden  $40 \mu\text{l}$  des DNS-Hairpins BoxP2 ( $75 \mu\text{M}$ ) in  $2.5 \mu\text{l}$  Schritten zutitriert. Die Auswertung der Versuchsdaten ergab eine Dissoziationskonstante  $K_D = 433 \pm 100 \text{ nM}$  bei einem stöchiometrischen Verhältnis von  $0.488 \pm 0.014$ .

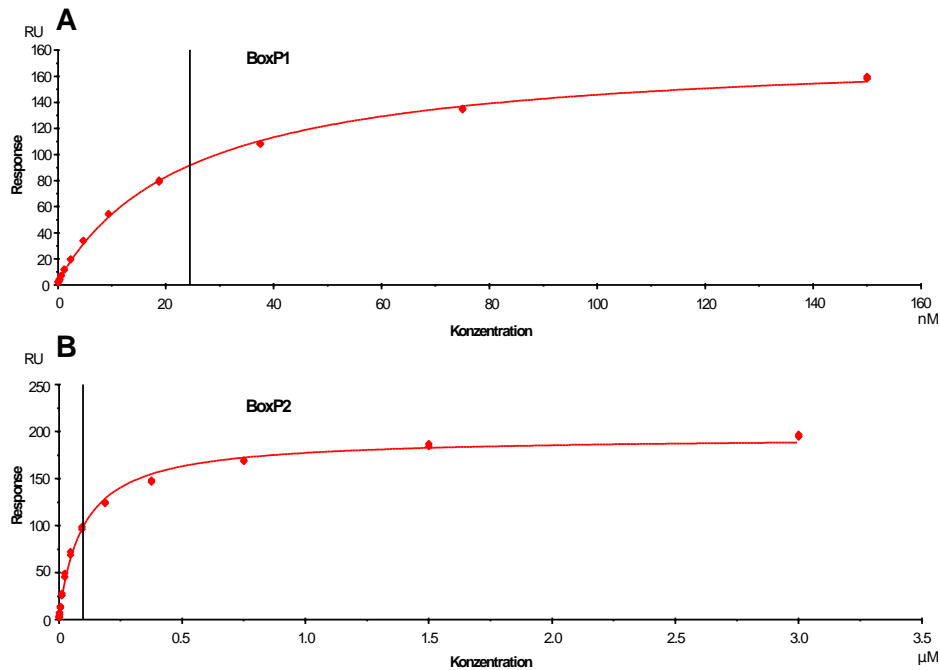


Abbildung 5.7.: Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die Interaktion von Mlc mit den beiden DNS-Hairpins BoxP1 (A) und BoxP2 (B) bei einer Beladungsdichte von  $10 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$ . Für den Hairpin BoxP1 wurde durch die *steady state affinity*-Auswertung der Konzentrationsreihe von 0.7 nM bis  $3 \mu\text{M}$  einen  $K_D$ -Wert von  $24 \pm 0.8 \text{ nM}$  ermittelt. Im Fall des Hairpins BoxP2 wurde eine Konzentrationsreihe von 36 nM bis  $150 \mu\text{M}$  verwendet. Die Auswertung dieses Versuchs ergab einen  $K_D$ -Wert von  $98 \pm 6.1 \text{ nM}$ .

te mit einem Fehler  $\chi^2 = 3.27 \text{ RU}^2$  bei einem  $R_{max} = 177.9$  etwas besser ist als bei der geringeren Beladungsdichte und somit wahrscheinlich den genaueren  $K_D$ -Wert ergibt. Für den gleichen Versuch mit dem Hairpin BoxP2 wurde mit der hohen Beladungsdichte ein  $K_D$  Wert von  $98 \pm 6.1 \text{ nM}$  bestimmt. Mit der niedrigeren Beladungsdichte von  $2.8 \text{ ng/mm}^2$  wurde ein  $K_D$ -Wert von  $138 \pm 14 \text{ nM}$  ermittelt. In diesem Fall ist die Abweichung der Messwerte von der Regression mit einem  $\chi^2 = 0.669 \text{ RU}^2$  bei  $R_{max} = 19.8 \text{ RU}$  für die niedrigere Beladungsdichte und mit einem  $\chi^2 = 23.7 \text{ RU}^2$  bei  $R_{max} = 191.3 \text{ RU}$  für die höhere Beladungsdichte ungefähr vergleichbar. Die mit Oberflächenplasmonenresonanz und isothermer Titrationskalorimetrie bestimmten Dissoziationskonstanten von  $24 \pm 0.8 \text{ nM}$  (SPR) und  $29.8 \pm 6.68 \text{ nM}$  (ITC) stimmen für Hairpin BoxP1 im Rahmen der Fehlergrenzen sehr gut überein. Hierbei ist zu beachten, dass bei der Auswertung der Titrationsdaten die Steigung Auskunft über die Dissoziationskonstante liefert. Da

bei einer sehr hohen Affinität ( $<50$  nM) die Steigung nur durch sehr wenig Messpunkte definiert ist, können hier kleine Messfehler in einzelnen Punkten schon zu starken Abweichungen bei der Berechnung der Dissoziationskonstante führen. Die Affinität von Mlc zum DNS-Hairpin BoxP1 liegt somit außerhalb des optimalen Bereichs für ITC Messungen. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei der mit SPR bestimmten Dissoziationskonstante um den vertrauenswürdigeren Wert handelt.

Im Fall des Hairpins BoxP2 weichen die mittels ITC und SPR bestimmten Werte voneinander ab. Zum einen machen sich auch bei dieser Interaktionsstudie die in 5.1 erläuterten Probleme bei der Auswertung der Titrationsdaten bemerkbar, zum anderen wurden für die Durchführung der ITC und SPR Interaktionsstudien unterschiedliche Puffer verwendet. Wichtigster Unterschied bei der Zusammensetzung der Puffer ist, dass der für die SPR Experimente verwendete Puffer mit Magnesiumchlorid zweiwertige Kationen in einer Konzentration von 1 mM beinhaltet. Diese könnten durch Bindung an die DNS-Hairpin Struktur Einfluss auf die Wechselwirkung mit Mlc haben. Unterschiedliche Puffer wurden verwendet, da bei der Planung der SPR Versuche von den etablierten Pufferbedingungen ausgegangen wurde [46]. Im Falle der ITC-Messungen wurde das Ziel verfolgt, Interaktionsstudien mit membranengebundenem  $IIB^{Glc}$  durchzuführen. Daher wurden alle ITC Messungen in dem Membranvesikel-Puffer [43] durchgeführt.

Diese Versuche zeigen eindeutig, dass die Affinität von Mlc zu seinen DNS-Operatoren höher ist als die Affinität zur löslichen  $IIB^{Glc}$ -Domäne. Erst die multivalente Bindung an membranverankertem  $IIB^{Glc}$  führt zu einer Avidität, die mit der Affinität zu den DNS-Operatorsequenzen vergleichbar ist.

### 5.1.2. Einfluss von $IIB^{Glc}$ auf die DNS Affinität von Mlc

Um den Mechanismus des Verlustes der Fähigkeit, an die DNS-Operatorsequenzen zu binden, aufzuklären, ist es unabdingbar, den Effekt von löslichem  $IIB^{Glc}$  auf die Mlc-DNS Interaktion zu untersuchen. Von Nam et al. [46] wurde bereits mittels *gel shift assays* gezeigt, dass Mlc in der Lage ist gleichzeitig an die Operatorsequenz sowie die lösliche  $IIB^{Glc}$  zu binden. Trotz dieser Ergebnisse bleibt unklar, ob die Bindung von Mlc an die lösliche  $IIB^{Glc}$  zu einer Verringerung der DNS Affinität führt. Um diese Frage zu klären, wurden isotherme Titrationskalorimetrie-Versuche mit diesem ternären Komplex durchgeführt. Dazu wurde Mlc mit einem Überschuss eines Interaktionspartners vorgelegt und der andere Interaktionspartner zutitriert.

Um zu überprüfen, ob die Bindung an die DNS einen Einfluss auf die Affinität oder Stöchiometrie der Mlc- $IIB^{Glc}$  Interaktion hat, wurde Mlc in Anwesenheit eines 5-fachen Überschuss des Hairpins BoxP1 vorgelegt und die lösliche  $IIB^{Glc}$  bis zum Erreichen eines 3-fachen Überschusses in  $2.5 \mu\text{l}$  Schritten zu titriert (Abb.: 5.8). Für diesen Versuch wurde der Hairpin BoxP1 ausgewählt, da seine Affinität deutlich höher ist als die  $IIB^{Glc}$  Affinität. Durch die große Differenz der

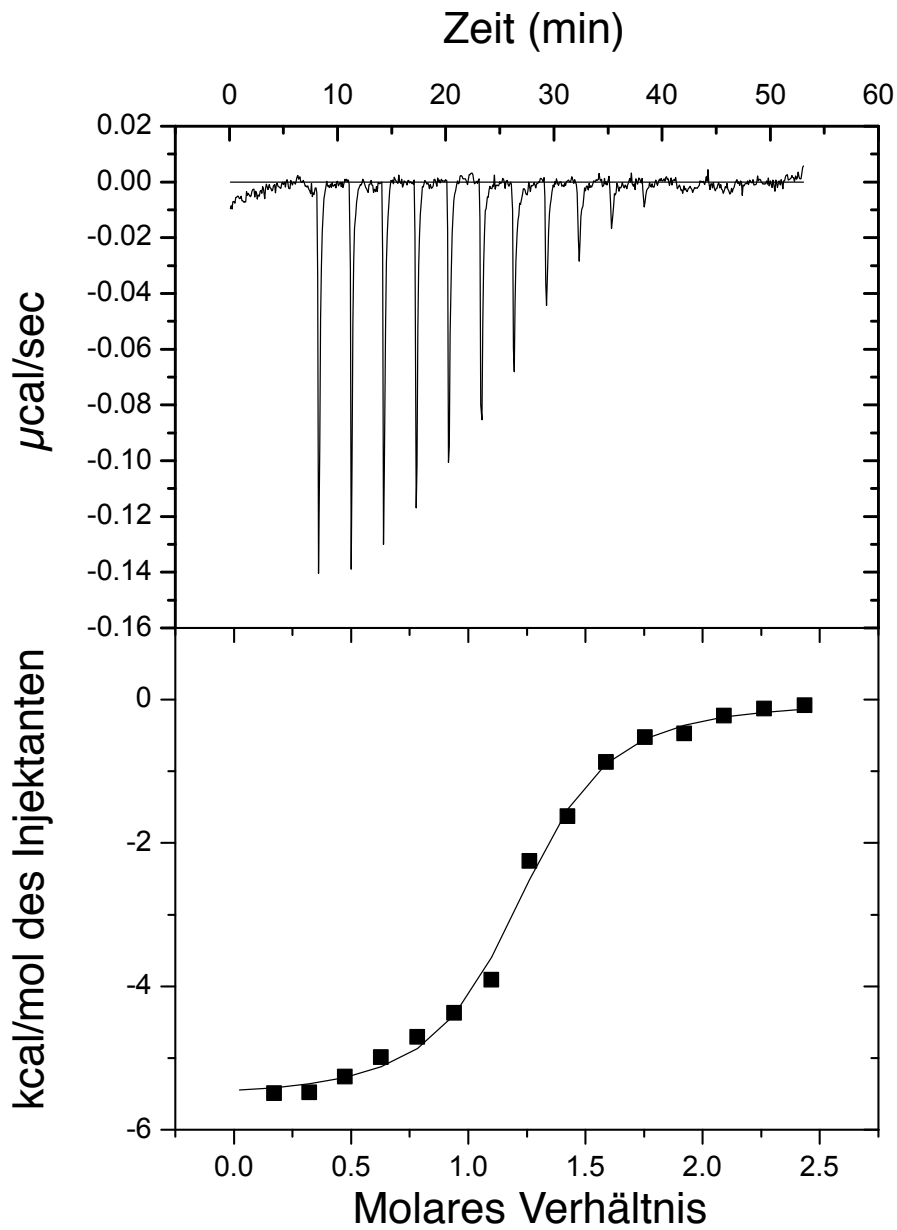


Abbildung 5.8.: Titration von Mlc mit IIB<sup>Glc</sup> in Anwesenheit des DNS Hairpin BoxP1. Die Auswertung der Versuchsdaten ergab eine Dissoziationskonstante  $K_D = 357 \pm 53.1$  nM bei einem stöchiometrischen Verhältnis von  $1.18 \pm 0.01$ . Diese Werte stimmen im Rahmen der Fehlergrenzen mit dem Ergebnis der Titration in Abwesenheit des DNS Hairpins (siehe Abb.: 5.1

Affinitäten soll ausgeschlossen werden, dass die lösliche IIB<sup>Glc</sup>-Domäne den DNS-Hairpin von seiner Bindestelle verdrängen kann. Durch den Überschuss an BoxP1 soll sicher gestellt werden, dass das gesamte Mlc als Mlc-DNS Komplex vorliegt. Aus den Titrationsdaten ist schon direkt ersichtlich, dass Mlc auch in Anwesenheit des DNS Hairpins BoxP1 in der Lage ist, mit der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu interagieren. Die Auswertung dieser Daten ergab eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $357 \pm 53.1$  nM. In dem Titrationsexperiment in Abwesenheit des DNS-Hairpins wurde ein  $K_D$  von  $452 \pm 65.7$  nM bestimmt (Abb.: 5.5). In Anbetracht der Fehler in den beiden  $K_D$  Werten und den in Kap. 5.1 erwähnten Problemen ist davon auszugehen, dass der Mlc-DNS Komplex eine vergleichbare Affinität zur IIB<sup>Glc</sup>-Domäne aufweist wie Mlc allein. Dadurch werden die Ergebnisse von Nam et al. [46] und Lee et al. [40] auf biophysikalischer Ebene bestätigt. Wesentlich deutlicher ist die Abweichung der Reaktionsenthalpien bei der Bindung von IIB<sup>Glc</sup> an Mlc und an den Mlc-DNS Komplex. Für die Bindung der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne an Mlc wurde ein Wert von  $\Delta H = -33 \pm 0.44 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  bestimmt, für die Bindung an den Mlc-DNS Komplex ein Wert von  $\Delta H = -23 \pm 0.40 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  bestimmt. Aus den Kristallstrukturen von Mlc [45, 46] (Abb.: 1.5) ist ersichtlich, dass sich die DNS- und IIB<sup>Glc</sup>-Bindestelle in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander befinden. Da sich die Hydratation von Mlc und dem Mlc-DNS Komplex unterscheiden, könnte dies durch die räumliche Nähe der Bindestellen Einfluss auf die Reaktionsenthalpie der Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion haben. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass lösliches IIB<sup>Glc</sup> wider Erwarten doch in der Lage ist, durch Bindung an Mlc einen Verlust der DNS Affinität hervorzurufen, wurde Mlc in Anwesenheit eines 2.5-fachen Überschusses von IIB<sup>Glc</sup> in der Messzelle vorgelegt und BoxP2 zu titriert. Für diesen Versuch wurde BoxP2 ausgewählt, da die Affinität von Mlc zu diesem Hairpin ungefähr vergleichbar mit der Affinität zu IIB<sup>Glc</sup> ist. Dadurch wäre der Hairpin BoxP2 in dem Falle, dass IIB<sup>Glc</sup> und der Hairpin um die Bindung an Mlc konkurrieren, unter den gewählten Bedingungen nicht in der Lage, die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne von der entsprechenden Bindestelle am Mlc zu verdrängen. Auch in diesem Versuch zeigte sich, dass die Anwesenheit des Interaktionspartners keinen Einfluss auf die Interaktion hat (Abb. 5.9). Die Auswertung der Titrationsdaten ergab eine Dissoziationskonstante von  $373 \pm 78.2$  nM und eine Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  von  $51.5 \pm 1.60 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ . Für den gleichen Versuch in Abwesenheit der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne (Kap. 5.1.1) wurde eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $433 \pm 100$  nM und eine Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  von  $43.4 \pm 1.67 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  ermittelt. Der Vergleich der beiden Dissoziationskonstanten zeigt, dass wie schon im Falle der Titration von Mlc mit IIB<sup>Glc</sup> im Rahmen der Genauigkeit kein Einfluss auf die Affinität durch die Anwesenheit des anderen Interaktionspartners festgestellt werden konnte. Wie schon zuvor für den Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-BoxP1 Komplex beobachtet, wurde in Anwesenheit von IIB<sup>Glc</sup> ein größerer  $\Delta H$  Wert gemessen als in dessen Abwesenheit. Diese Versuche beweisen eindeutig, dass unter den untersuchten Bedingungen ein ternärer Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-DNS Komplex vorliegt, was mit den von Nam et al. [46] publizierten Ergebnissen über-

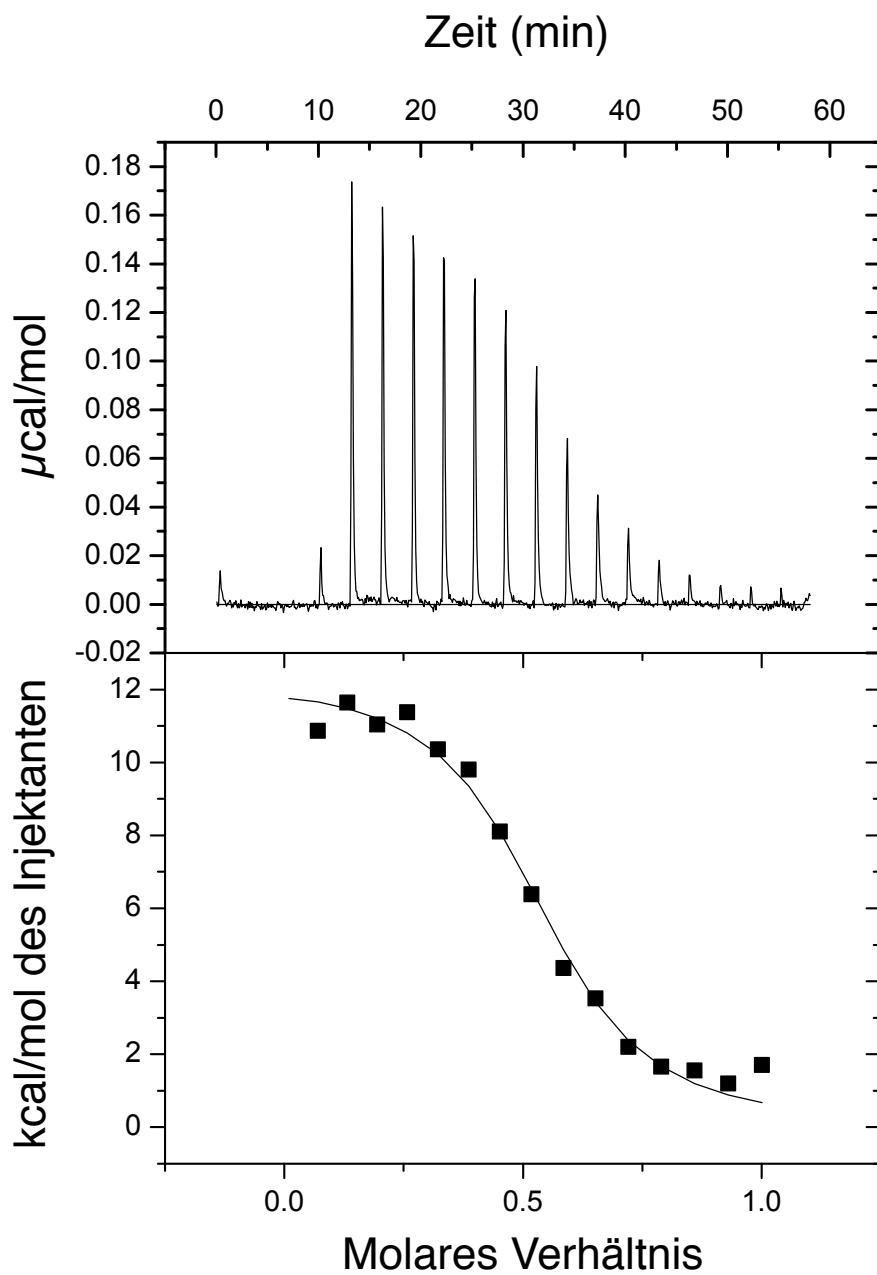


Abbildung 5.9.: Titration von Mlc mit dem DNS Hairpin BoxP2 in Anwesenheit der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne. Die Auswertung der Versuchsdaten ergab eine Dissoziationskonstante  $K_D = 373 \pm 78$  nM bei einem stöchiometrischen Verhältnis von  $0.53 \pm 0.01$ . Diese Werte stimmen im Rahmen der Fehlergrenzen mit dem Ergebnis der Titration in Abwesenheit der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne überein (siehe Abb.: 5.6)

einstimmt. Weiterhin haben diese Versuche gezeigt, dass weder die Anwesenheit der löslichen IIB<sup>Glc</sup>-Domäne noch die des DNS Hairpins einen Einfluss auf die Affinität von Mlc zu dem jeweils anderen Interaktionspartner hat. Somit ist die Anwesenheit der IIB<sup>Glc</sup> nicht nur unzureichend, die Bindung von Mlc an die DNS zu unterbinden, sondern beeinflusst diese Interaktion gar nicht oder nur in einem nicht signifikanten Maß. Seitz et al. [43] haben bereits gezeigt, dass die Lokalisation von Mlc an der Zellmembran durch die Bindung an membranverankertes IIB<sup>Glc</sup> die Voraussetzung für den Verlust der DNS-Affinität ist. Die durchgeführten Bindungsstudien unterstreichen noch einmal, dass ein anderer Effekt als die Bindung an IIB<sup>Glc</sup> für die Inaktivierung von Mlc verantwortlich sein muss. Von Nam et al. [46] wurde gezeigt, dass dimerisiertes IIB<sup>Glc</sup> in der Lage ist, Mlc an der Bindung an die DNS zu hindern, was sie auf die reduzierte Flexibilität von Mlc im Bereich der DNS-Bindetasche zurückführten. Allerdings wäre es durchaus erdenkbar, dass das verbrückte IIB<sup>Glc</sup> aus sterischen Gründen den Zugang zur Bindetasche blockiert.

### 5.1.3. Interaktionsstudien mit membrangebundenem IIB<sup>Glc</sup>

Bereits die Oberflächenplasmonenresonanz-Experimente haben gezeigt, dass die multivalente Bindung von Mlc an IIB<sup>Glc</sup>, das auf der Oberfläche des Chips immobilisiert wurde, zu einer deutlichen Erhöhung der scheinbaren Affinität führt. Jedoch lässt dieser Versuchsaufbau noch die Frage offen, ob die Zellmembran selbst einen Einfluss auf die Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion hat. Weiterhin kann die Immobilisierung der IIB<sup>Glc</sup> Domäne über Seitenketten-Amine zu einer verringerten Affinität führen. Um die Interaktion unter Bedingungen zu untersuchen, die den natürlichen Gegebenheiten ähnlicher sind, wurden membrangebundenes IIB<sup>Glc</sup> verwendet. Da nicht bekannt ist, wie sich die IIB<sup>Glc</sup> mit seinem natürlichen Membrananker IIC<sup>Glc</sup> unter Überexpressionsbedingungen verhält, wurde für diese Versuche der gp8 Membrananker verwendet. Bei gp8 handelt es sich um einen Membrananker aus dem Bakteriophagen M13, der auch unter Überexpression sehr definiert in die Zellmembran integriert wird [93]. Seitz et al. [43] hatten bereits anhand von gp8-IIB<sup>Glc</sup> gezeigt, dass zwar nur die Bindung an membranverankertes IIB<sup>Glc</sup> zu einem Verlust der DNS Affinität von Mlc führt, es aber keine Rolle spielt, ob der natürliche oder ein künstlicher Membrananker verwendet wird.

Für die Präparation der Membranvesikel wurde der *E. coli*-Stamm JM-G77 verwendet, der über kein PtsG und keine Enzyme zur Phosphorylierung von IIB<sup>Glc</sup> verfügt [18]. In diesem Stamm wurde das Fusionsprotein gp8-IIB<sup>Glc</sup> überexprimiert und die Zellmembranen anschließend durch Ultrazentrifugation aus dem Lysat abgetrennt. Aus dem erhaltenen Pellet wurden in einem speziellen Puffer Membranvesikel rekonstituiert. Durch SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass sich das überexprimierte Fusionsprotein ausschließlich in Membranfragmenten und nicht im löslichen Überstand befindet. Ein grundsätzliches Problem bei dem Umgang mit Mem-

branesikeln dieser Art stellt die Konzentrationsbestimmung da. Durch das Vorhandensein der natürlichen Membranproteine wird die photometrische Konzentrationsbestimmung über einen Bradford-Assay oder direkt über die UV Absorption von gp8-IIB<sup>Glc</sup> verfälscht. Zusätzlich tritt bedingt durch die Partikelgröße der Membranvesikel Streulicht auf, was zu weiteren Abweichungen bei der Bestimmung der Konzentration durch UV Absorption führt. Mit den hergestellten Membranvesikeln wurden Interaktionsstudien mittels isothermer Titrationskalorimetrie zur Ermittlung der Affinität von Mlc zu membrangebundenem IIB<sup>Glc</sup> durchgeführt. Hierzu wurden die Membranvesikel in der Messzelle vorgelegt und Mlc in 2.5 µl Schritten zu titriert (Abb. 5.10). Die Daten zeigen, dass die Mlc-Injektion zu Ausschlägen führen, jedoch mit der ersten Injektion das Rauschen sehr stark zunimmt. Die Richtung der Ausschläge zeigt, dass es sich um eine exotherme Reaktion handelt, was zu den Interaktionsstudien mit löslichem IIB<sup>Glc</sup> passt. Die starke Zunahme des Rauschens deutet darauf hin, dass durch die Zugabe von Mlc zu den Membranvesikeln das System aus dem thermischen Gleichgewicht gerät. Grund hierfür könnte ein langsamer Austausch zwischen mono-, bi-, tri- und tetravalenter Bindung an die Membran sein. Auch nach langen Inkubationszeiten (länger als 20 min) wurde das thermische Gleichgewicht nicht wieder erreicht. Bei Versuchen, in denen Mlc und membrangebundenes IIB<sup>Glc</sup> in der Messzelle vorgelegt wurde, trat das gleiche Rauschverhalten bereits in der Äquilibrationsphase vor der ersten Injektion auf und machte das Erreichen einer konstanten Basislinie unmöglich. Dieser Versuch zeigt deutlich, dass Mlc mit den gp8-IIB<sup>Glc</sup>-Vesikeln interagiert. Durch das starke Rauschen ist eine Integration der Ausschläge und somit eine Bestimmung der Dissoziationskonstante nicht möglich, wie in Abb. 5.10 ersichtlich ist.

Weiterhin wurde der Einfluss von membrangebundenem IIB<sup>Glc</sup> auf die Interaktion von Mlc mit den DNS Operatorsequenzen untersucht. Hierzu wurde Mlc zusammen mit einem Überschuss an Membranvesikeln in der Messzelle vorgelegt und der DNS-Hairpin BoxP2 zutitriert. Für diesen Versuch wurden sowohl Membranvesikel mit gp8-IIB<sup>Glc</sup> als auch Membranvesikel ohne das Fusionsprotein für eine Negativkontrolle verwendet. Wie schon im Fall der direkten Titration der gp8-IIB<sup>Glc</sup> Membranvesikel mit Mlc zeigt sich auch in diesem Versuch, dass das Vorhandensein von Mlc und membrangebundenem IIB<sup>Glc</sup> zu einer starken Zunahme des Rauschens führt und eine Auswertung der Messwerte somit erschwert (Abb. 5.12A). Die Integration der Daten deutet daraufhin, dass Bindung zwischen Mlc und Hairpin BoxP2 stattfindet. Jedoch ist durch die große Streuung der Daten kein Fit und somit keine Bestimmung der Dissoziationskonstanten und Stöchiometrie möglich. Ein Grund hierfür könnte sein, dass der Überschuss an gp8-IIB<sup>Glc</sup> nicht ausreichend groß ist, um die Bindung von Mlc an die Operatorsequenz vollständig zu unterdrücken. Als Negativkontrolle wurde dieser Versuch mit Membranvesikeln ohne gp8-IIB<sup>Glc</sup> durchgeführt (Abb. 5.12B). In diesem Fall wurde keine Zunahme des Rauschens beobachtet und eine Auswertung der Messwerte war ohne weiteres möglich. Dieser Versuch

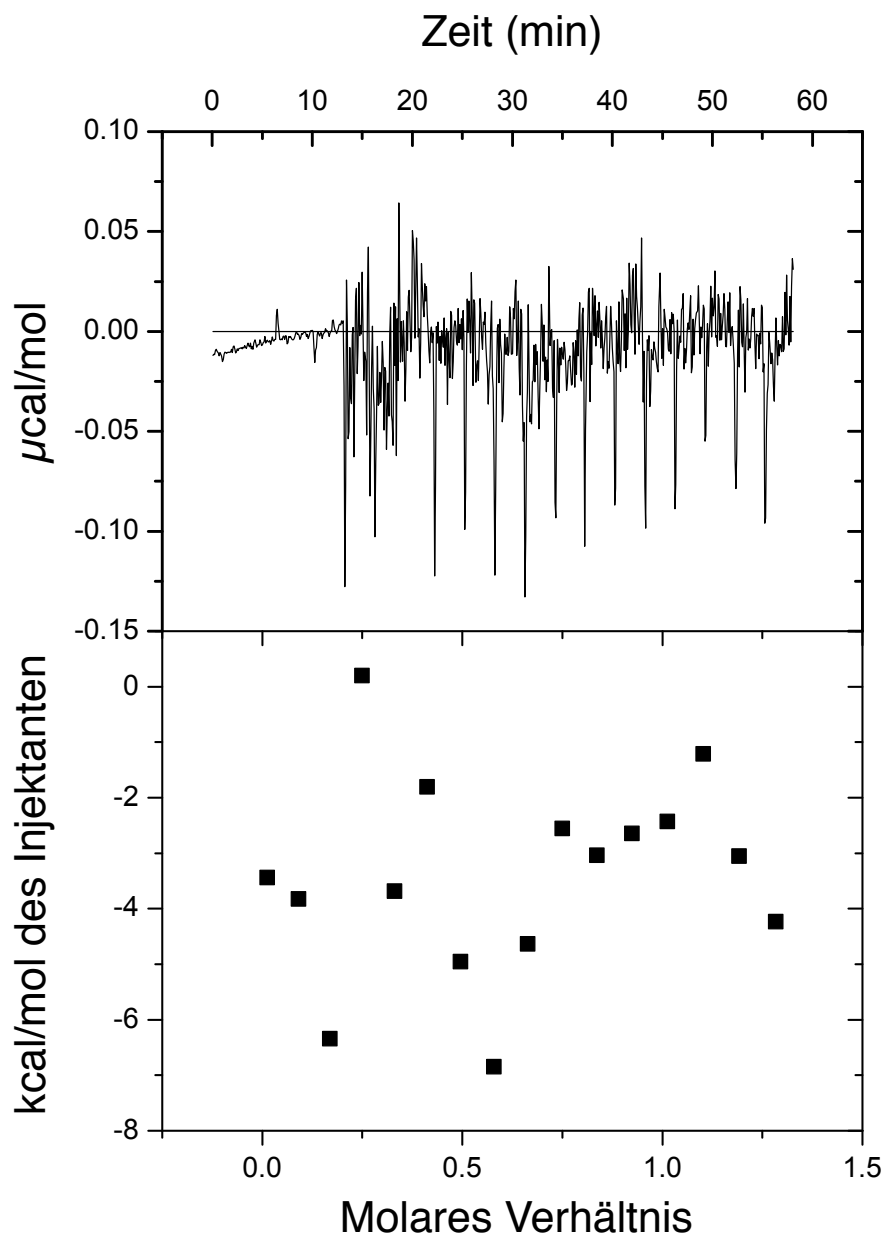


Abbildung 5.10.: Titration von Membranvesikeln, die das Fusionsprotein gp8-IIB<sup>Glc</sup> enthalten, mit Mlc.

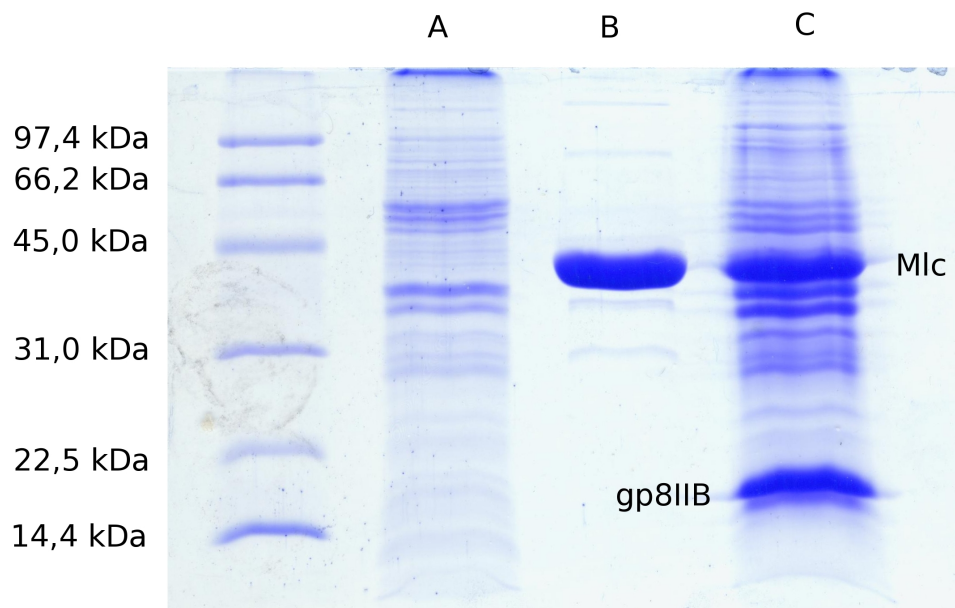


Abbildung 5.11.: SDS PAGE der Vesikelpräparationen. Aufgetragen wurden Marker, eine Präparation der leeren Vesikel (A), Mlc (B) als Referenz und gp8-IIB<sup>Glc</sup>-Vesikeln nach der Titration mit Mlc (C). Aus dem Vergleich der Banden von Mlc und gp8IIB<sup>Glc</sup> in vergleichbaren Konzentrationen vorliegen.

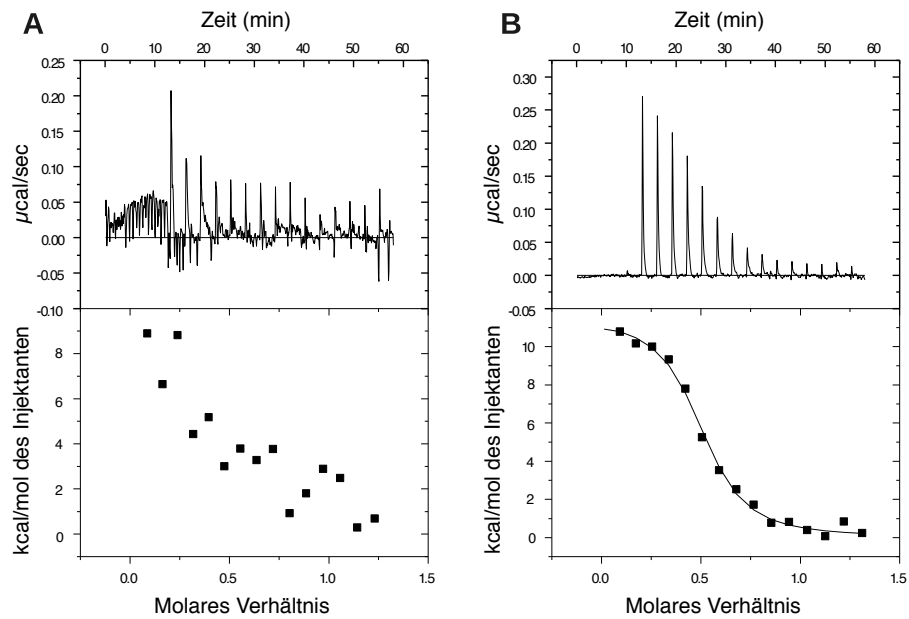


Abbildung 5.12.: Titration von Mlc in Anwesenheit von Membranvesikeln, die das Fusionsprotein gp8-IIB<sup>Glc</sup> (A) enthalten und ohne membrangebundenes IIB<sup>Glc</sup> (B), mit dem Hairpin BoxP2.

zeigt, dass starke Zunahme des Rauschens nicht durch unspezifische Bindung an die Lipiddoppelschicht oder Interaktion mit anderen Membranproteinen sondern durch gp8-IIB<sup>Glc</sup> verursacht wird. Die Auswertung der Daten ergaben einen  $K_D = 599 \pm 89$  nM bei einer Stöchiometrie von  $0.49 \pm 0.01$ . Diese Werte stimmen im Rahmen der Fehlergrenzen sehr gut mit denen überein, die in Abwesenheit der IIB<sup>Glc</sup> bestimmt wurden (Abb.: 5.6). Dieser Versuch zeigt, dass die Anwesenheit von Membranfragmenten allein keinen Einfluss auf die Interaktion von Mlc mit seinen DNS Operatoren hat.

Die Interaktionsstudien mit den Membranvesikeln zeigen deutlich, dass Mlc an membrangebundenes IIB<sup>Glc</sup> bindet, jedoch diese Bindung nicht mit den verwendeten Methoden charakterisiert werden kann. Gerade der Vergleich der Mlc-DNS Interaktion in Anwesenheit von gp8-IIB<sup>Glc</sup>-Vesikeln und leeren Vesikeln beweist, dass die starke Zunahme des Rauschens allein auf die Anwesenheit des Fusionsproteins gp8-IIB<sup>Glc</sup> zurückzuführen ist. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass ein sehr langsamer Austausch zwischen mono-, bi-, tri- und tetra-valenten Bindung zu einer sehr langsamen Einstellung thermischen Gleichgewichts führt. Die ständige Spaltung und Neubildung von Bindungen würde zu einem verstärkten Rauschen führen.

#### 5.1.4. Zusammenfassung der bestimmten Affinitäten

Tabelle 5.1.: Auflistung der Dissoziationskonstanten der verschiedenen Mlc Interaktionen

Interaktion	SPR	ITC
Mlc - BoxP1	24 ± 0.8 nM	29.8 ± 6.7 nM
Mlc - BoxP2	98 ± 6.1 nM	433 ± 100 nM
Mlc - BoxP2 (in Anwesenheit von IIB <sup>Glc</sup> )	-	373 ± 78.2 nM
Mlc - IB <sup>Glc</sup>	185 ± 3 nM <sup>1</sup> 46 ± 4 nM <sup>2</sup> 495 ± 38 nM <sup>3</sup> 1000 ± 70 nM <sup>4</sup>	452 ± 66 nM
Mlc - IB <sup>Glc</sup> (in Anwesenheit von BoxP1)	-	357 ± 53 nM

<sup>1</sup> immobilisiertes Mlc

<sup>2</sup> immobilisiertes IB<sup>Glc</sup>; Beladungsdichte 3.2  $\frac{ng}{mm^2}$

<sup>3</sup> immobilisiertes IB<sup>Glc</sup>; Beladungsdichte 0.57  $\frac{ng}{mm^2}$

<sup>4</sup> immobilisiertes IB<sup>Glc</sup>; Beladungsdichte 0.1  $\frac{ng}{mm^2}$

#### 5.1.5. Möglicher Mechanismus des Verlustes der DNS-Affinität von Mlc

Wie bereits in Kap. 1.2 erwähnt, machen Nam et al. für die Deaktivierung von Mlc einen Verlust von Flexibilität durch die Bindung an das membranverankerte IICB<sup>Glc</sup> verantwortlich [46]. Da sich die D-Domäne von Mlc für eine Bindung an die DNS-Operatorsequenz einer Umorientierung der Erkennungshelices unterziehen muss, ist ein gewisses Maß an Flexibilität eine Voraussetzung für diese Interaktion. Nam et al. zeigten in elektrophoretischen Mobilitäts Assays, dass die chimären Fusionsproteine GST-IIB<sup>Glc</sup> und GrpE-IIB<sup>Glc</sup> in der Lage sind, die Mlc-DNS Interaktion zu unterbinden. Wie IIC<sup>Glc</sup> bilden auch GST und GrpE stabile Dimere, im Gegensatz zu IIC<sup>Glc</sup> sind diese jedoch löslich. Über das Fusionsprotein GST beziehungsweise GrpE wird also eine IIB<sup>Glc</sup>-Domäne mit einer weiteren IIB<sup>Glc</sup>-Domäne verlinkt. Der Verlust der DNS-Affinität wurde auf die verringerte Flexibilität durch die Bindung an das chimäre IIB<sup>Glc</sup> zurückgeführt [46]. Ein Einfluss von chimären IIB<sup>Glc</sup> auf die Transkription des *ptsG* konnte *in vivo* nicht nachgewiesen werden.

Trotz der zwölf N-terminalen, unstrukturiert vorliegenden Aminosäuren des IIB<sup>Glc</sup>, die im Fusionsprotein als flexibler Linker zwischen dem globulären Teil der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne und der Dimerisierungsdomäne (GST oder GrpE) dienen, besteht die Möglichkeit, dass das chimäre IIB<sup>Glc</sup>-Fusionsprotein die D-Domäne von Mlc blockiert. Durch die Verbrückung von zwei IIB<sup>Glc</sup>-Domäne könnte der Zugang zur D-Domäne, die zwischen zwei E-Domänen liegt, für die DNS versperrt werden. In diesem Szenario wären nicht die verringerte Flexibilität sondern sterische

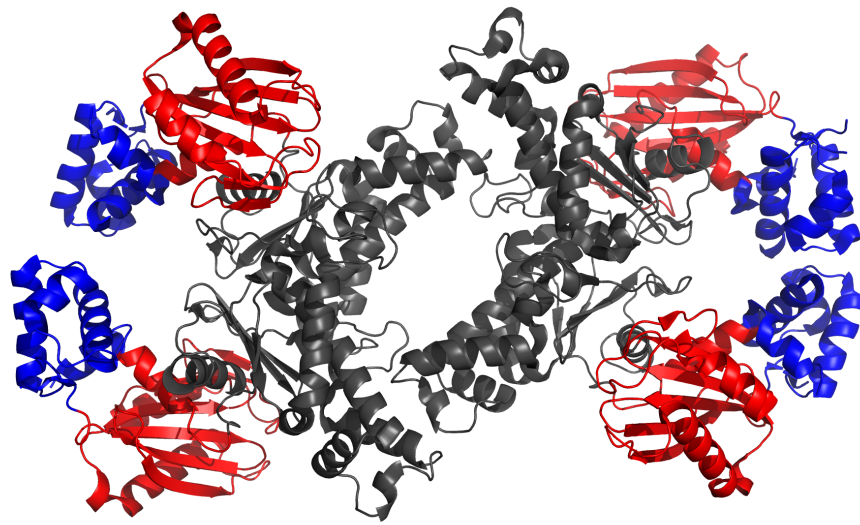


Abbildung 5.13.: Bei Mlc-Tetramer handelt es sich um ein nahezu planares Molekül. Dargestellt in rot ist die IIB<sup>Glc</sup>-Bindedomäne, in blau die DNS-Bindedomäne. Bindet das Mlc-Tetramer nun tetravalent an membrangebundenes IIB<sup>Glc</sup>, richtet sich das Molekül parallel zur Membran aus.

Gründe ursächlich für den Verlust der DNS-Affinität. Da die DNS-bindende Domäne genau zwischen zwei IIB<sup>Glc</sup>-Bindedomäne liegt, würden sich bei einer Bindung von verbrücktem IIB<sup>Glc</sup> sich die Dimerisierungsdomänen GST oder GrpE genau über der DNS-Bindedomäne befinden. Dieser erhöhte, sterische Anspruch kann die Affinität der DNS-Bindung bis hin zur Unterdrückung der Interaktion beeinflussen.

Eine mögliche Ursache für den Verlust der DNS-Affinität könnte auch in der Geometrie des Mlc-IICB<sup>Glc</sup> Komplexes liegen. Der Transmembranteil der IIC<sup>Glc</sup>-Domäne erstreckt sich bis Rest 336, der strukturiert vorliegende Teil der IIB<sup>Glc</sup> beginnt erst mit dem Rest 399. Da keine hochaufgelöste Struktur der IIC<sup>Glc</sup>-Domäne vorliegt, kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie der Bereich von 337-385 vorliegt. Zwischen der Oberfläche der Zellmembran und dem strukturierten Teil der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne befinden sich somit 63 Aminosäuren, deren strukturelle Beschaffenheit unbekannt ist. Nimmt man den maximalen Abstand von zwei in der Sequenz benachbarten C<sup>α</sup>-Atome von 3.8 Å, ergibt sich ein maximaler Abstand der IIB<sup>Glc</sup> zur Oberfläche der Zellmembran von 239.4 Å. Hierbei ist zu beachten, dass es sich bei diesem Abstand,

um einen theoretischen Maximalabstand handelt. In Realität wird der Abstand kürzer sein als 239.4 Å. Sollte ein Teil der Aminosäuren im Bereich von 337-385 strukturiert vorliegen, könnte der Abstand sogar erheblich kürzer sein. Nimmt mal an, dass dieser Bereich  $\alpha$ -helikal vorliegt, würde der Abstand zwischen Mlc und der Zellmembran lediglich 73.5 Å betragen. Durch die tetravalente Bindung von Mlc an IICB<sup>Glc</sup> ist die Molekülebene parallel zur Zellmembran ausgerichtet. Die DNS-Bindestelle von Mlc ist so angeordnet, dass die DNS senkrecht zur Molekülebene gebunden wird. Da der maximale Abstand zwischen der IIB<sup>Glc</sup> und der Zellmembran - und somit auch der Abstand von dem immobilisierten Mlc zur Zellmembran - ist mit 239.4 Å wesentlich kürzer als die Persistenzlänge der doppelsträngigen DNS von 350 Å [94]. Um eine Bindung der DNS-Operatorsequenzen an membrangebundenes Mlc zu ermöglichen, müsste eine starke Biegung der DNS stattfinden. Diese Biegung der DNS wäre energetisch ungünstig und hätte einen negativen Effekt auf die Affinität von Mlc zur DNS. Da sowohl die DNS als auch die Zellmembran negativ geladen sind, kann auch elektrostatische Abstoßung zu einer weiteren Verringerung der Affinität beitragen. Auf Grund der elektrostatischen Abstoßung muss die Biegung der DNS in einer Art vollzogen werden, die nicht nur einen Kontakt von DNS und Zellmembran verhindert, sondern einen größtmöglichen Abstand erzeugt. Wie stark der Effekt der Biegung der DNS als auch die elektrostatische Abstoßung von DNS und Zellmembran auf die Affinität ist, hängt vom Abstand zwischen Mlc und der Zellmembran ab. Da jedoch keine hochaufgelöste Struktur des cytosolischen Teils der IIC<sup>Glc</sup> vorliegt, kann der Abstand nur an Hand der Anzahl der Aminosäuren des Linkers abgeschätzt werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass das sich bei dem Linker zwischen dem Transmembranteil des IIC<sup>Glc</sup> und der IIB<sup>Glc</sup> nicht um ein lineares Proteinrückgrat mit einem maximalen  $C_i^\alpha - C_{i+1}^\alpha$  Abstand handelt. Daher ist der Wert von 239.4 Å als Maximalwert anzusehen, der einer DNS-Bindung möglichst wenig entgegenstehen sollte. In Realität ist ein wesentlich geringerer Abstand zu erwarten.

Weiterhin wird in anderen Literaturquellen mit 500 Å ein wesentlich höherer Wert für die Persistenzlänge der DNS angegeben [95]. Da die Persistenzlänge stark von der Sequenz abhängt, wurde hier eine minimale Abschätzung gewählt.

Nach dem momentanen Kenntnisstand kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der geringe Abstand von Mlc zur Zellmembran alleine zu einem Verlust der DNS-Affinität führen kann. Es ist jedoch davon auszugehen, dass diese Effekte zu einer verringerten DNS Affinität führen. Die Anwesenheit der zwei DNS Sequenzen im Bereich des *ptsG* Operons, die Mlc binden, und die zwei DNS-Bindedomänen des Mlc-Tetramers deuten darauf hin, dass Mlc zu einer bivalenten Bindung an die DNS fähig ist. Wie auch im Fall des *lac*-Repressors [96] würde eine bivalente Bindung auch im Fall der Mlc-DNS Bindung zur Ausbildung eines Loops führen, der die Transkription verhindert. Wie auch schon im Fall der monovalenten Mlc-DNS Interaktion würde bei membrangebundenem Repressor der erhöhte sterische Anspruch und die elektrosta-

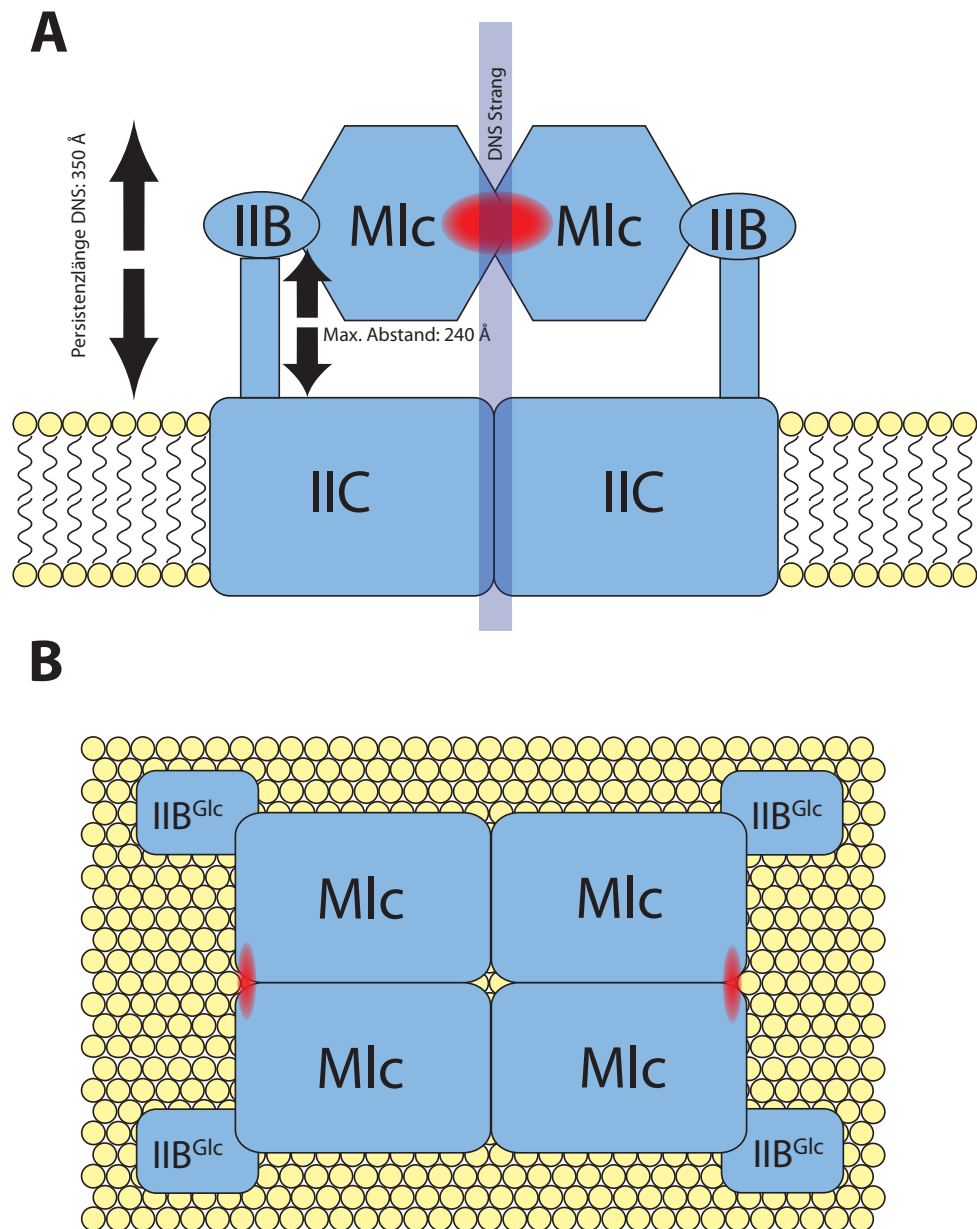


Abbildung 5.14.: Schematische Darstellung des Mlc-IICB<sup>Glc</sup>-Komplexes aus unterschiedlichen Perspektiven. Die Position, der von zwei Mlc Monomeren gebildeten DNS-Bindestelle, ist rot markiert. Aus dem in Teil A schematisch eingezeichneten DNS Strang ist ersichtlich, die Bindung von DNS an Membran-gebundenes Mlc aus sterischen Gründen erschwert ist.

tische Abstoßung zwischen Membran und DNS zu einer drastischen Verringerung der Affinität führen.

## 5.2. Die Glk-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion

Von Lengsfeld et al. [56, 58] wurde eine Bindung von Glk an die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne des Phosphotransferase Systems nachgewiesen. Die strukturelle Ähnlichkeit der Glk zu dem globalen Repressor Mlc (Abb.: 1.7) und die Beteiligung der Glk am Glucosemetabolismus legen die Vermutung nahe, dass die Glk neben der Phosphorylierung von Glucose auch eine Rolle in der Regulation der Gene der im Glucose-Metabolismus beteiligten Enzyme spielt. Die Bindung von Glk an die membrangebundene IIB<sup>Glc</sup>-Domäne wurde qualitativ durch sogenannte *pull down assays* nachgewiesen. Der eigentliche Nachweis des Glk-IIB<sup>Glc</sup> Komplexes erfolgte durch einen Western-Blot mit einem Anti-His Antikörper [56, 58]. Da diese Methode sehr empfindlich ist, kann an Hand dieser Ergebnisse keine Aussage über die Affinität dieser Interaktion getroffen werden. Voraussetzung für eine Rolle der Glucokinase in der Regulation des PtsG ist, dass die Glk in der Lage ist, mit dem globalen Repressor Mlc um die Bindung an die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu konkurrieren. Hierfür muss die Dissoziationskonstante IIB<sup>Glc</sup>-Glk Wechselwirkung im Bereich der intrazellulären Glk Konzentration liegen.

Aus der Kristallstruktur des Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Komplexes geht hervor, dass weder Mlc noch die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne durch die Bindung eine Änderung der Konformation erfahren. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit von Mlc und Glk, ist davon auszugehen, dass auch bei einer Glk-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion sich die Struktur der beteiligten Proteine nicht maßgeblich ändert. Diese Interaktion ist ein geeigneter Kandidat für die Untersuchung durch *chemical shift perturbation mapping*, da nur im Bereich der Bindestelle Änderung der chemischen Verschiebung oder Signalintensität erwartet werden. Neben der Identifizierung der Bindestelle wäre auch eine Abschätzung der Dissoziationskonstante  $K_D$  möglich.

### 5.2.1. Zuordnung der chemischen Verschiebungen

Um mittels *chemical shift perturbation mapping* eine Bindestelle zu lokalisieren, ist es notwendig, dass eine Zuordnung der chemischen Verschiebung des Isotopen-markierten Proteins vorliegt. Die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne wurde bereits von mehreren Gruppen NMR-spektroskopisch untersucht und daher liegen die chemischen Verschiebungen verschiedener Bedingungen vor [12, 14]. Es ist ohne größeren Aufwand möglich, die bekannten chemischen Verschiebungen auf die eigenen Spektren zu übertragen.

Mit einer <sup>15</sup>N-isotopenmarkierten IIB<sup>Glc</sup> Präparation wurden ein 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC Spektrum aufgenommen. Die von Cai et al. veröffentlichten chemischen Verschiebungen [14] wurden für

die Zuordnung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Kreuzsignale in diesem Spektrum verwendet. Obwohl Cai et al. ein noch weiter verkürztes Konstrukt für die Zuordnung verwendeten, weist der das Spektrum des gekürzten Konstrukt nur kleine Änderungen der chemischen Verschiebungen auf. Um die weiteren Abweichungen so gering wie möglich zu halten, wurden die Messungen bei den gleichen Probenbedingungen bezüglich Puffer und Temperatur durchgeführt. Einzig die chemischen Verschiebungen der Aminosäuren A14, I25, E82, I84 und R85 weichen von den veröffentlichten Werten ab. Um die Zuordnung der chemischen Verschiebungen zu bestätigen, wurde ein 3D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC TOCSY und ein 3D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NOESY aufgenommen. Durch den Vergleich der chemischen Verschiebungen der Seitenketten-Protonen in dem TOCSY-Spektrum mit Literaturwerten konnte die Identität aller Reste bestätigt werden. Mit Hilfe des NOESY-Spektrums und der veröffentlichten Struktur konnten über die NOE-Signale in uneindeutigen Fällen die korrekte Zuordnung überprüft werden. Insgesamt konnten 95 % der Rückgrat-Amid-Signale so zugeordnet werden (Abb.5.15). Für die Seitenketten-Carboxamid- und aromatischen-NH-Gruppen lagen praktisch keine Referenzwerte vor.

### 5.2.2. Titration von $\text{H}_6\text{-IIB}^{\text{Glc}}$ mit Glk

Zur Untersuchung der Bindung von Glk an die  $\text{IIB}^{\text{Glc}}$ -Domäne wurden  $100 \mu\text{M}$   $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$   $\text{IIB}^{\text{Glc}}$  vorgelegt und unmarkierte Glk in 33 mol% Schritten bis zu einer Konzentration von  $166 \mu\text{M}$  Glk zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde ein 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Spektrum aufgenommen. In einem letzten Titrationsschritt wurde die Glk-Konzentration auf  $333 \mu\text{M}$  erhöht. Überraschender Weise zeigte der Vergleich der Spektren, dass die Zugabe von Glk weder zur Verschiebung von Resonanzen noch zu signifikant veränderter Signalintensität führt. Aus der Kristallstruktur des  $\text{Mlc-IIB}^{\text{Glc}}$ -Komplexes [46] ist ersichtlich, dass sich die Struktur der  $\text{IIB}^{\text{Glc}}$ -Domäne durch die Bindung an Mlc nicht ändert. Im Falle einer Interaktion zwischen der Glucokinase Glk und der  $\text{IIB}^{\text{Glc}}$ -Domäne ist zu erwarten, dass die Signale der Aminosäuren im Bereich der Bindestelle verschwinden oder für diese Aminosäuren je ein Signalsatz für den gebundenen und ungebundenen Zustand vorhanden sind. Welche Situation vorliegt, hängt von der Austauschrate zwischen gebundenen und ungebundenen Zustand ab. Bei einer Wechselwirkung mit einer hohen Affinität und einer geringen Austauschrate ist es auch möglich, dass die Intensität aller Signale stark abnimmt, da bedingt durch die wesentlich größeren Masse des Proteinkomplex die Relaxationsrate  $R_2$  zunimmt.

Das Ergebnis dieses Titrationsversuch legt somit nahe, dass unter den getesteten Bedingungen keine Interaktion stattfindet, beziehungsweise die Dissoziationskonstante  $K_D$  größer ist als die verwendeten Konzentrationen und somit der Großteil des Proteins ungebunden vorliegt. Eine Erklärung für diesen Befund wäre, dass eins oder beide Proteine ungefaltet vorliegen. Im Falle der  $\text{IIB}^{\text{Glc}}$ -Domäne lässt sich eine Fehlfaltung direkt an Hand des 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Spek-

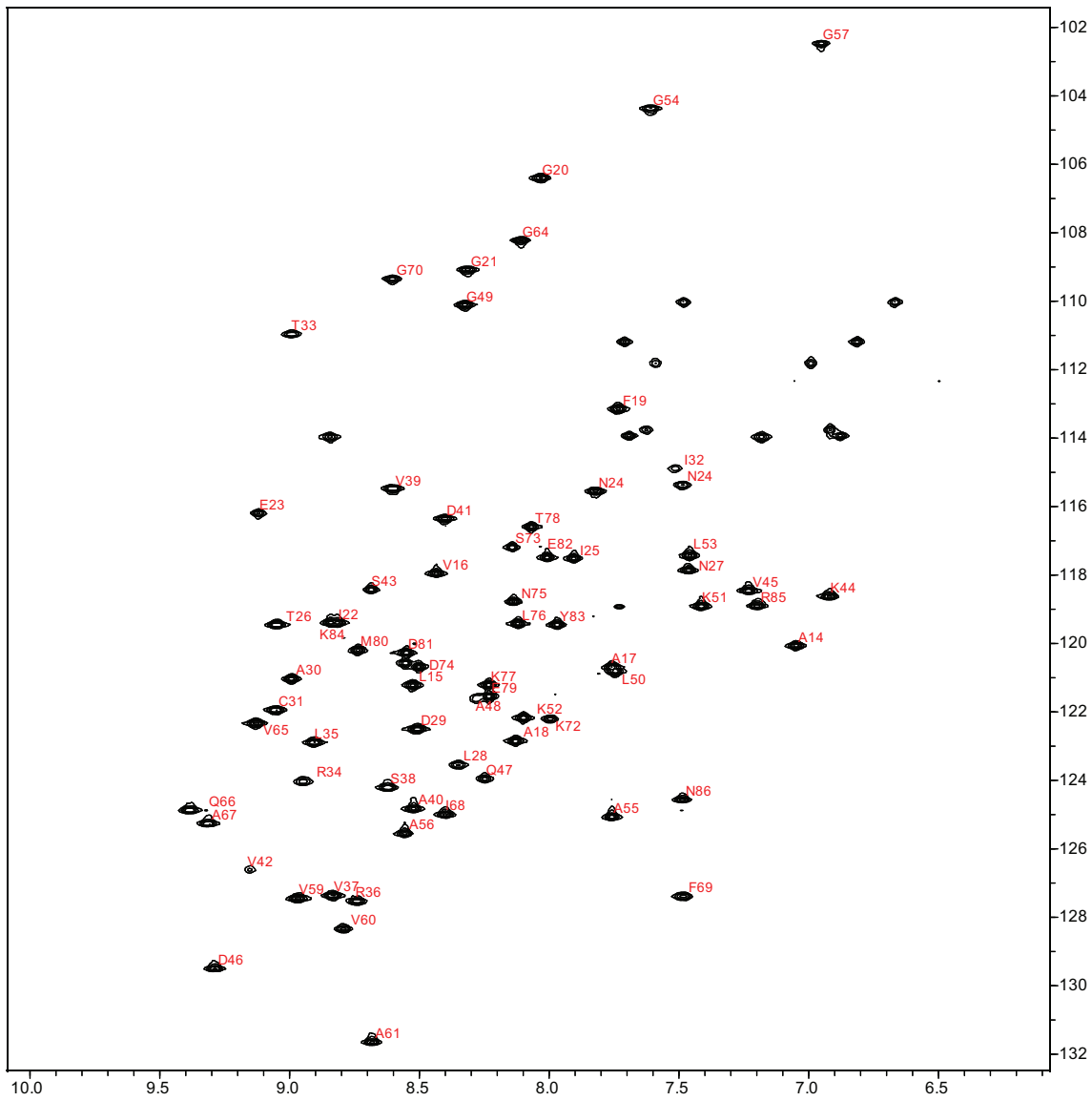


Abbildung 5.15.: Zugeordnetes  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der  $\text{H}_6\text{IIB}^{\text{Glc}}$ -Domäne. Die unzugeordneten Signale im Bereich von 110-112 ppm und 6.8-7.5 ppm stammen von den Seitenketten-Amiden.

trums ausschließen. Für die Glucokinase ist eine Fehlfaltung ebenfalls unwahrscheinlich, da NMR-spektroskopische Versuche mit  $^{15}\text{N}$  Glk zeigten, dass dieses Protein gefaltet vorliegt und sehr stabil ist. Weiterhin wurde in einem enzymatischen Aktivitätsassay gezeigt, dass aufgereinigte Glk in der Lage ist, Glucose zu phosphorylieren (Abb. 4.2). Von Mlc ist bekannt, dass es nur in der Lage ist, mit der dephosphorylierten IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu interagieren [41]. Um auszuschließen, dass eine Interaktion mit Glk durch eine Phosphorylierung der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne unterbunden wird, wurde ein 1D- $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum aufgenommen. Durch dieses Spektrum konnte gezeigt werden, dass die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne dephosphoryliert vorliegt. Dieser Befund wird weiterhin dadurch unterstützt, dass die Phosphorylierung mit einer Halbwertszeit von 40 h eine geringe Stabilität aufweist [11] und somit im Zuge der Reinigung schon zu großen Teilen hydrolysiert sein sollte. Für diesen Versuch wurde eine IIB<sup>Glc</sup>-Präparation ohne His<sub>6</sub>-Tag verwendet, die durch Abspaltung des His<sub>6</sub>-Tag von H<sub>6</sub>-IIB<sup>Glc</sup> mit dem Enzym Thrombin hergestellt wurde. Somit konnte durch diese Titration auch gezeigt werden, dass das Ausbleiben der Änderung nicht durch die Position des His<sub>6</sub>-Tag bedingt ist.

### 5.2.3. Titration von isotopenmarkierter Glk mit IIB<sup>Glc</sup>

Da die Titration von  $^{15}\text{N}$  IIB<sup>Glc</sup> mit unmarkierter Glucokinase keine signifikanten Änderungen im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Spektrum hervorrief, wurde dieser Versuch mit umgekehrter Isotopenmarkierung, das heißt mit  $^{15}\text{N}$  Glk und unmarkierten IIB<sup>Glc</sup>, wiederholt. Hierdurch soll ausgeschlossen werden, dass die IIB<sup>Glc</sup> Domäne einen Sonderfall darstellt, bei dem durch die Bindung an die Glk zu keinen signifikanten Änderungen in den Spektren führt.

### NMR-spektroskopische Voruntersuchungen

Da die Glucokinase zuvor noch nicht NMR-spektroskopisch untersucht wurde, mussten in einem ersten Schritt die optimalen Bedingungen für NMR-spektroskopische Versuche herausgefunden werden. Mit einer 0.5 mM  $^{15}\text{N}$  isotopenmarkierten Glk wurde eine Serie von  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren [97] bei verschiedenen pH-Werten, Natriumchloridkonzentrationen und Temperaturen durchgeführt mit dem Ziel, geeignete Probenbedingungen zu finden. Die besten Ergebnisse wurden in einem Puffer bestehend aus 50 mM Tris pH 7.6, 50 mM NaCl, 4 mM NaN<sub>3</sub>, 2 mM DTT, 5 % D<sub>2</sub>O bei 308 K erzielt (Abb.: 5.16). Aus der Dispersion der Signale ist eindeutig zu erkennen, dass das Protein unter diesen Bedingungen gefaltet vorliegt. Obwohl das Protein nicht perdeutert vorliegt, weist das Spektrum für ein Makromolekül mit Größe von 70 kDa relativ scharfe Signale auf. Damit ist die Glucokinase Glk ein idealer Kandidat für NMR-spektroskopische Untersuchungen.

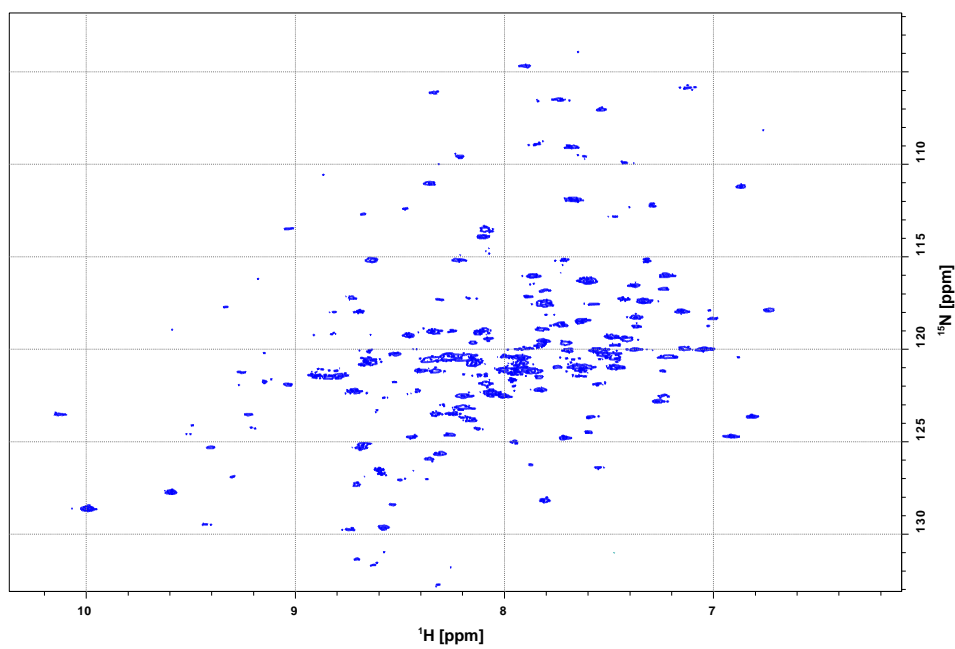


Abbildung 5.16.:  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum einer 0.5 mM  $^{15}\text{N}$  isotopenmarkierter Glk Probe in 50 mM Tris pH 7.6, 50 mM NaCl, 4 mM  $\text{NaN}_3$ , 2 mM DTT, 5 %  $\text{D}_2\text{O}$ .

## Titrationsexperimente

Um auf biophysikalischer Ebene zu bestätigen, dass die Bindung der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne an die Glucokinase stattfindet, wurden *chemical shift perturbation*-Titrations durchgeführt. Die Titration von 200  $\mu\text{M}$  <sup>15</sup>N Glk mit löslicher, unmarkierter IIB<sup>Glc</sup>-Domäne bis zu einem 1.5-fachen Überschuss zeigt, dass in Anwesenheit von IIB<sup>Glc</sup> einige, wenige Resonanzen der Glk im 2D-<sup>1</sup>H <sup>15</sup>N TROSY HSQC verschwinden. Insgesamt blieb jedoch die Intensität des Großteils der Signale in diesem Spektrum unverändert. Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, deutet die Verbreiterung beziehungsweise das Verschwinden von Signalen auf eine mittlere Austauschrate im Bereich der Differenz der chemischen Verschiebungen zwischen ungebundenem und gebundenem Zustand. Im Allgemeinen würde man bei diesem Befund von einer mittleren bis niedrigen Affinität der Interaktion ( $K_d > 3 \mu\text{M}$ ) zwischen Glk und IIB<sup>Glc</sup> ausgehen.

Bedingt durch die Größe der Glucokinase, die fehlende Perdeuterierung und die relativ niedrige Konzentration an <sup>15</sup>N-markiertem Protein ist die Signalintensität im 2D-<sup>1</sup>H <sup>15</sup>N TROSY HSQC gering und die Intensität der schwachen Signale liegt nur wenig über dem Niveau des Rauschens. Durch die geringe Signalintensität wird die Auswertung des *chemical shift perturbation* Experiments deutlich erschwert und eine eindeutige Aussage darüber, ob eine Interaktion zwischen der Glucokinase und der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne stattfindet, ist einzig an Hand der NMR Daten nicht möglich.

Da keine Zuordnung der chemischen Verschiebung vorliegt, ist es nicht möglich, die Ergebnisse des Titrationsexperiment an Hand der Struktur zu validieren. Weil die Anwesenheit der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne die meisten Signale unbeeinflusst lässt und sich nur die Intensität einiger, weniger Signale ändert, ist davon auszugehen, dass die Bindung zu keiner Änderung der Konformation der Glk führt, sondern nur lokale Änderungen im Bereich der Bindestelle hervorruft (Abb. 5.17). Für die betroffenen Signale würde man erwarten, dass sie zu Aminosäuren gehören, die sich in räumlicher Nähe befinden. Weiterhin kann durch die Ähnlichkeit von Mlc und Glk aus dem Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-Komplex abgeleitet werden, welche Reste der Glucokinase wahrscheinlich an der Interaktion mit der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne beteiligt sind. Somit könnte durch eine Zuordnung der chemischen Verschiebungen das Ergebnis des *chemical shift perturbation mappings* sehr leicht validiert werden. Jedoch ist eine Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Glucokinase Glk bei einem Protein dieser Größe sehr kompliziert und würde mehrere Monate in Anspruch nehmen. Zu einer Verbesserung der Signalintensität wäre die Verwendung einer perdeuterierten Proteinprobe notwendig, jedoch würden sich die Kosten für eine solche Probe auf mindestens 1000 Euro belaufen. Da die Ergebnisse der Titrationsversuche mehrdeutig sind, ist der Aufwand der Zuordnung der chemischen Verschiebungen nicht gerechtfertigt, zumal eine biophysikalische Charakterisierung durch isotherme Titrationskalorimetrie und Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie einfacher und schneller durchgeführt werden kann. Weiterhin kann mit diesen Methoden ermittelt

werden, ob sich die IIB<sup>Glc</sup>-Interaktion überhaupt für eine NMR-spektroskopische Untersuchung eignet.

Da die Signalintensität der aufgenommenen 2D-<sup>1</sup>H <sup>15</sup>N TROSY HSQC sehr gering ist, ist die Information über die Interaktion zwischen IIB<sup>Glc</sup> und Glk somit zweideutig. Zum einen ist die Konzentration der Glucokinase für NMR-spektroskopische Untersuchungen von einem Protein dieser Größe gering, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Sättigungskonzentrationen nicht erreicht wurde und somit nur ein Teil der Glk im Komplex vorliegt. Durch die Verwendung höherer Protein-Konzentrationen sollte es theoretisch möglich sein, eindeutige Ergebnisse zu erzielen. In Langzeitversuchen erwiesen sich Proben der einzelnen Proteine mit einer Konzentration von 1.7 mM für die lösliche IIB<sup>Glc</sup> und 0.5 mM für die Glucokinase Glk als stabil. Um zu untersuchen, ob die Verwendung von höheren Proteinkonzentrationen in eindeutigeren Ergebnissen resultiert, wurde ein erneutes *chemical shift perturbation mapping*-Experiment mit einer Glk-Konzentration von 0.5 mM und einer IIB<sup>Glc</sup>-Konzentration von 1.7 mM durchgeführt. Die Aufnahme eines 2D-<sup>1</sup>H <sup>15</sup>N TROSY HSQC Referenzspektrums einer 0.5 mM Glk-Probe erfolgte ohne Probleme und mit einem sehr guten Resultat. Eine Probe mit 0.5 mM Glk und 1.7 mM IIB<sup>Glc</sup> wurde hergestellt, jedoch fiel ein Großteil der Proteinprobe während der Aufnahme des NMR-Spektrums aus. Möglicherweise bewirkt die Interaktion mit IIB<sup>Glc</sup> bei hohen Konzentrationen die Präzipitation des Komplexes. Wie im Fall des Experiments mit den geringeren Proteinkonzentrationen sind die Signalintensität in dem resultierenden Spektrum sehr gering. Somit ist auch durch diesen Versuch eine eindeutige Auswertung der Spektren nicht möglich.

Bei der Titration von <sup>15</sup>N IIB<sup>Glc</sup> mit der Glucokinase konnten keine Änderung in den Spektren durch die Zugabe von Glk festgestellt werden, was ein Hinweis darauf sein kann, dass die verwendeten Konzentrationen unter der Dissoziationskonstante  $K_D$  dieser Interaktion liegt und somit nur ein geringer Anteil in Form des IIB<sup>Glc</sup>-Glk Komplex vorliegt. Für die Titration von isotoopenmarkierten Glk wurden doppelt so hohe Konzentrationen gewählt. Bei den verwendeten Konzentration konnte ein Effekt auf die Spektren durch die Zugaben der IIB<sup>Glc</sup> nachgewiesen werden. Dieser Befund deutet daraufhin, dass bei diesen Konzentrationen bereits ein Teil als IIB<sup>Glc</sup>-Glk Komplex vorliegt, der NMR-spektroskopische Untersuchungen zulässt.

#### 5.2.4. Interaktionsstudien mit Spin-markierter Glk

Die Markierung eines Interaktionspartners mit einem radikalischen Spinlabel ist eine weitere Methode zum Nachweis schwacher Wechselwirkung zwischen Proteinen. Die Wechselwirkung mit dem ungepaarten Elektronenspin führt zu einer schnellen Relaxation der Kernspins in der näheren Umgebung und somit zu einem Verlust an Signalintensität. Bindet nun das spinmarkierte Protein an seinen Interaktionspartner, sollte dies auch dort zu einem starken Verlust an Signalintensität der Aminosäuren in der Bindestelle führen. Für diesen Versuch wurde die Glu-

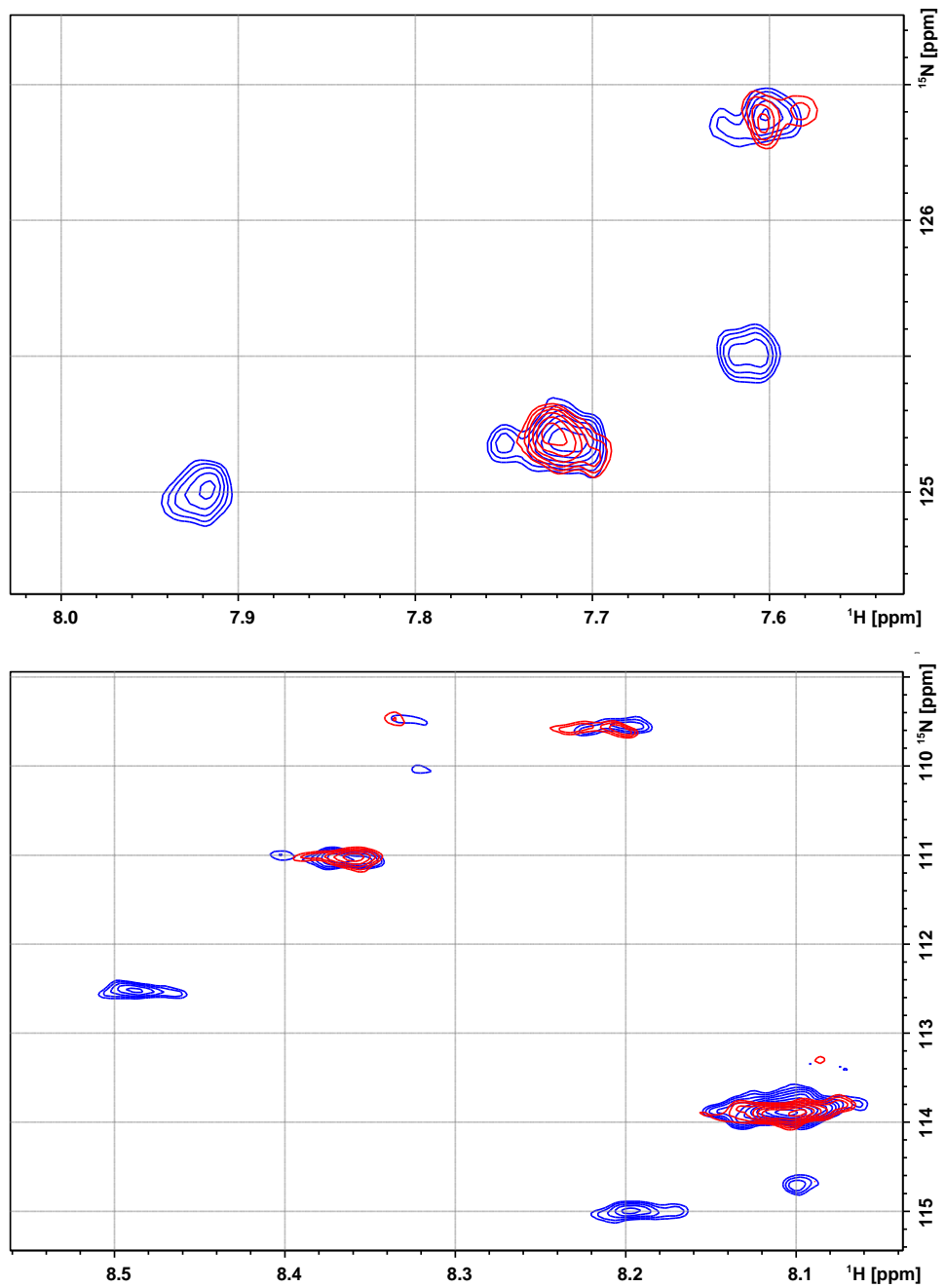


Abbildung 5.17.: Zwei Ausschnitte der Überlagerung der  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von Glk in Ab- (blau) und Anwesenheit (rot) der löslichen  $\text{IIB}^{\text{Glc}}$ . Aus dem Vergleich der beiden Spektren ist ersichtlich, dass die Intensität eines Teils der Signale unverändert bleibt, die Intensität andere Signale jedoch stark abnimmt. Dieser Befund deutet auf eine Interaktion der Glucokinase mit der  $\text{IIB}^{\text{Glc}}$ -Domäne hin.

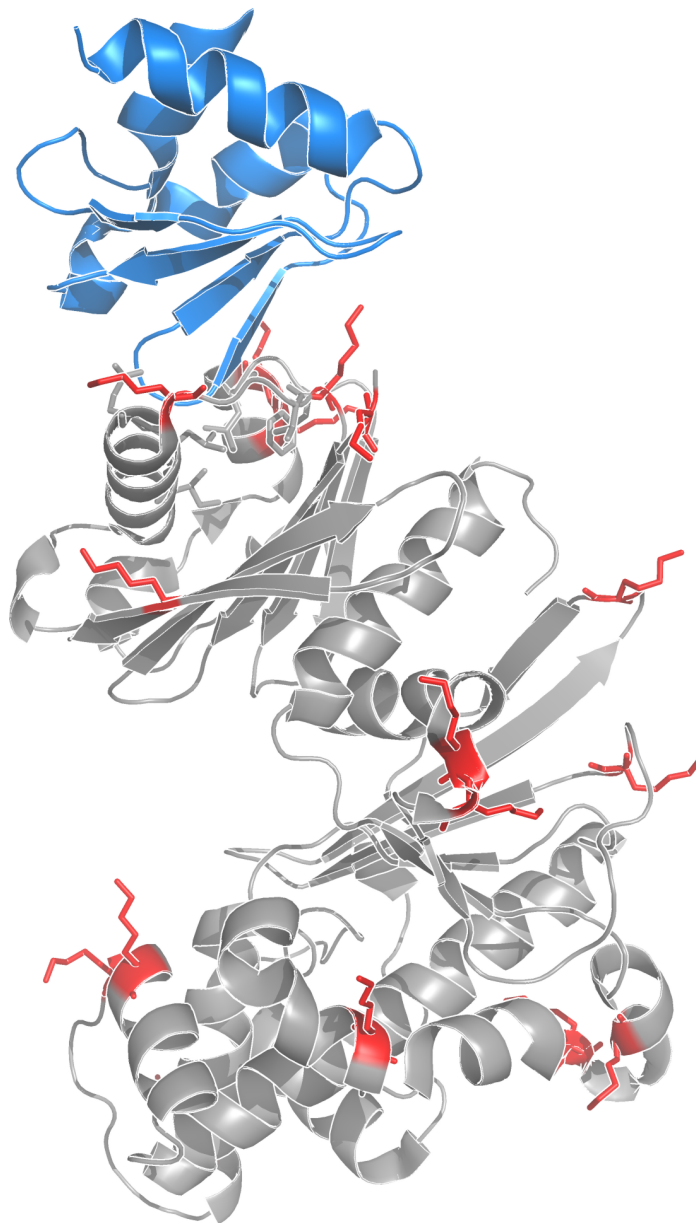


Abbildung 5.18.: Kristallstruktur der Glucokinase Glk. In dieser Darstellung sind alle Lysine eines Glk-Dimers rot markiert. An Hand der Struktur des Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-Komplexes, wurde eine mögliche Positionierung der IB<sup>Glc</sup>-Domäne (blau) im vermuteten Glk-IB<sup>Glc</sup>-Komplex ermittelt. Mit dem verwendeten Aktivester ist es möglich, das paramagnetische Spinlabel an die Aminogruppen der Lysine zu kuppeln. Da diese Ligation statistisch abläuft, besteht die Möglichkeit, dass das Spinlabel einen negativen Effekt auf die Interaktion mit der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne hat.

cokinase mit 1-Oxyl-2,2,5,5-Tetramethylpyrolin-3-Carbonsäure markiert. Das Spinlabel wurde über Aminkupplung mittels 1-Oxyl-2,2,5,5-Tetramethylpyrolin-3-carboxylat-N-hydroxysuccinimidester an die Amine der Lysinseitenketten der Glk gebunden. Für das Labeling wurde ein 6-facher Überschuss an Labelingreagenz eingesetzt. Da jedoch die Glucokinase über 16 Lysine verfügt, lägen auch bei quantitativem Ablauf der Reaktion weniger als die Hälfte der Lysine mit einem Spinlabel markiert vor. Dieser Ansatz wurde bewusst so gewählt, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch Lysine an die Interaktion beteiligt sind und somit ein vollständiges Labeling unter Umständen eine Bindung der Glk an die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne unterbinden würde. Da die Verteilung der radikalischen Spinlabel unter den gewählten Bedingungen statistisch stattfindet, wird davon ausgegangen, dass ein Teil der Glucokinase so markiert ist, dass die Bindung nicht negativ beeinflusst wird, aber dennoch die Signalintensität der IIB<sup>Glc</sup> durch den Effekt des radikalischen Spinlabels im Bereich der Bindestelle abnimmt. Der in Abb. 5.18 dargestellte, hypothetische Glk-IIB<sup>Glc</sup> Komplex wurde verwendet, um mit Hilfe des Programms *MacPymol 1.3* [98–100] die Distanzen der einzelnen Lysine zur IIB<sup>Glc</sup>-Domäne abzuschätzen (Tab.: 5.2). Es wurden jeweils der Abstand der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins zum nächstgelegenen Amidstickstoff im Rückgrat der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne ermittelt. Aus dem Modell des Glk-IIB<sup>Glc</sup> Komplexes ist zu erkennen, dass sich die Lysine 53, 57 und 88 direkt in der vermeintlichen Bindestelle befinden. Die Kupplung der Spinsonde in diesen Positionen wird mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Beeinträchtigung wenn nicht sogar zur Unterbindung der Interaktion führen. Da organische Nitroxidradikale für gewöhnlich eine Reichweite von 15–24 Å haben, lässt sich mit Sicherheit sagen, dass eine Kupplung der Sonde in den Positionen 87, 3 und 31 im Falle einer Interaktion zwischen der Glucokinase und der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne einen deutlichen Effekt auf die Spektren der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne haben wird. Für die Lysine 149, 112 und 216 wurden Abstände zwischen 29 und 34 Å zu dem nächstgelegenen Amidstickstoff der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne bestimmt. Bei den angegebenen Abständen ist zu beachten, dass es sich lediglich um eine Abschätzung handelt. Somit ist es möglich, dass im Fall der Lysine 149, 112 und 216 in Realität der Abstand zwischen dem Zentrum des Nitroxidradikals und dem nächstgelegenen Atomen der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne weniger als 24 Å beträgt.

Da für die Lysine 128, 113, 214, 284, 204 und 208 der minimale Abstand zur IIB<sup>Glc</sup>-Domäne deutlich über 24 Å liegt, ist es unwahrscheinlich, dass eine Markierung in diesen Positionen einen Effekt auf die HSQC-Spektren IIB<sup>Glc</sup>-Domäne hat.

Von der spinmarkierten Glk Probe wurde ein EPR-Spektrum aufgenommen, um sicher zu stellen, dass kein freies Spinlabel vorliegt. An dem unsymmetrischen EPR Signal der Nitroxidsonde lässt sich erkennen, dass ein stark anisotroper Rotationstensor vorliegt. Da die Rotation des freien Labels isotrop ist, kann man davon ausgehen, dass nur an Glk gebundenes Spinlabel vorliegt.

Tabelle 5.2.: Die Abstände zwischen den  $\epsilon$ -Aminogruppen der Glk und dem nächstgelegenen Rückgrat-Amidstickstoff an Hand eines Modells des Glk-IIB<sup>Glc</sup> Komplexes (Abb.: 5.18) mit dem Programm *MacPymol 1.3* abgeschätzt.

Lysin Glk	Nächste Aminosäure in IIB <sup>Glc</sup>	Distanz
Lys 87	Gly 447	12 Å
Lys 3	Cys 421	13 Å
Lys 31	Gly 452	14.9 Å
Lys 149	Thr 423	29 Å
Lys 112	Ile 422	29.1 Å
Lys 216	Gly 452	34 Å
Lys 128	Ile 422	36.4 Å
Lys 113	Ile 422	38.8 Å
Lys 214	Gly 452	40.7 Å
Lys 284	Gly 452	49 Å
Lys 204	Gly 452	53 Å
Lys 288	Gly 452	56.2 Å

Mit der Glk wurde eine NMR-Titration von <sup>15</sup>N IIB<sup>Glc</sup> durchgeführt. Dazu wurde eine 500  $\mu$ l NMR-Probe 100  $\mu$ M IIB<sup>Glc</sup> vorgelegt und 350  $\mu$ M Glk in 25  $\mu$ l Schritten bis zu einer Endkonzentration von 90  $\mu$ M Glk zugegeben. Durch die Verdünnung der Probe durch die Glk Zugabe betrug die Konzentration der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne am Ende der Titration nur noch 78  $\mu$ M. Um die Effekte der Verdünnung vernachlässigen zu können, wurde parallel eine <sup>15</sup>N IIB<sup>Glc</sup>-Probe gleicher Konzentration und Volumens mit Puffer titriert. Die Zugabe der radikal-markierten Glucokinase führte nicht wie erwartet zu dem Verschwinden einzelner Signale. Erst die Integration der Signalintensitäten zeigte, dass einige Signale durch die Zugabe der Glk an Intensität verlieren (Abb.: 5.19). Die Zuordnung der Intensitätsänderungen zu den Aminosäuren der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zeigt jedoch, dass die Abnahme der Intensitäten nicht wie erwartet an einer definierten Bindestelle lokalisiert sind, sondern über die ganze Proteinsequenz verteilt sind (Abb.: 5.20). Des weiteren wurde neben der Abnahme von Signalintensität in einigen Fällen eine Zunahme im Vergleich mit der durch Puffer verdünnten Probe festgestellt. Ein Problem bei der Auswertung stellt die geringe <sup>15</sup>N IIB<sup>Glc</sup>-Konzentration von 78  $\mu$ M, die zu einem Signal-zu-Rausch Verhältnis und somit zu Fehlern in der Integration der Signale führt. Da die Auswirkungen der spinmarkierten Glucokinase nur sehr klein sind, lässt sich nicht ermitteln, welche Effekte durch paramagnetisches Bleichen und welche durch Integrationsfehler entstanden sind. In diesem Versuch wurde keine Auslöschung von Signalen beobachtet, was darauf schließen lässt, dass die verwendeten Konzentrationen unterhalb der Dissoziationskonstante liegen.

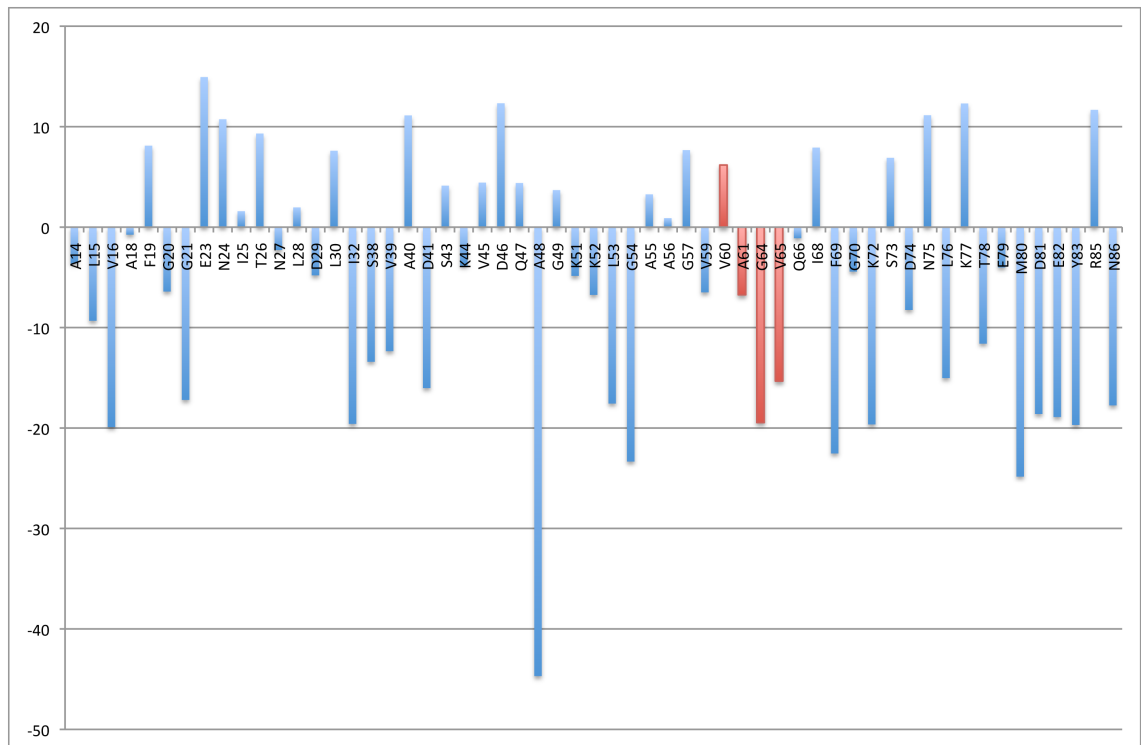


Abbildung 5.19.: Durch die Zugabe von paramagnetisch markierter Glk wurde die Intensität einiger Signale im  $^1\text{H } ^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum der  $\text{IIB}^{\text{Glc}}$ -Domäne verändert. Diese Abbildung zeigt die prozentuale Änderung der Signalintensität aufgetragen gegen die Sequenz von  $\text{IIB}^{\text{Glc}}$ . Ursächlich für die vermeintliche Zunahme der Intensität einiger Signale sind vermutlich Integrationsfehler. Die Aminosäuren, die bei der Bindung an Mlc die Bindestelle darstellen, sind in rot markiert.

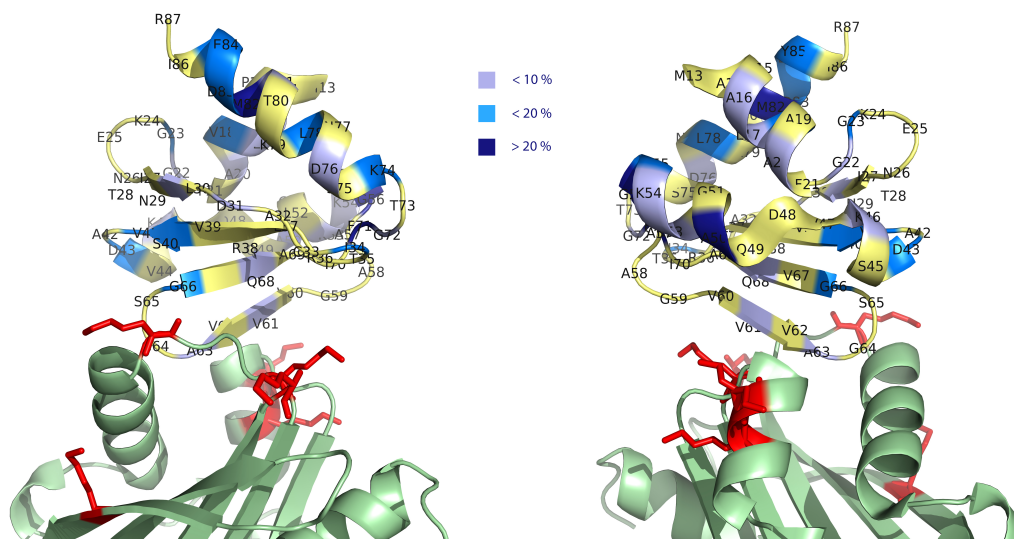


Abbildung 5.20.: Dargestellt ist ein Homologiemodell Glk-IIB<sup>Glc</sup> Komplex (Glk: grün, IIB<sup>Glc</sup>: gelb) jeweils um 180° gedreht. Die Reste, die durch die Zugabe von Glk eine Abschwächung der Signalintensität erfahren haben, sind in Blautönen markiert. In rot sind die Lysin-Reste als mögliche Anknüpfungspunkte für das Label markiert. Das Modell der Glk-IIB<sup>Glc</sup> Komplexstruktur wurde durch Überlagerung von Glk mit der Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Kristallstruktur erstellt.

Um zu überprüfen, ob bei höheren Konzentrationen deutlichere Effekte auftreten, wurde die Probe von spingelabelter Glk und  $^{15}\text{N}$  IIB<sup>Glc</sup> auf 200  $\mu\text{l}$  eingengt, was rechnerisch einer Konzentration von 263  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$  IIB<sup>Glc</sup> und 310  $\mu\text{M}$  Glk entspricht. Auch bei diesen Konzentrationen wurde keine Auslöschung von Signalen beobachtet.

Insgesamt deutet die Titration von  $^{15}\text{N}$  IIB<sup>Glc</sup> mit spinmarkierter Glk darauf hin, dass es sich bei der IIB<sup>Glc</sup>-Glk Interaktion um eine Wechselwirkung von niedrig-affiner Natur handelt. Da bei einer Glk-Konzentration von 310  $\mu\text{M}$  keine eindeutigen Effekte festgestellt wurden, ist davon auszugehen, dass die Sättigungskonzentration wesentlich höher liegt.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die kovalente Modifikation der Glucokinase mit dem Spinlabel zur Verringerung oder Verlust der IIB<sup>Glc</sup>-Affinität führen kann. Aus Abb. 5.18 wird ersichtlich, dass sich im Bereich der vermuteten Bindestelle einige Lysine befinden. Würde die Modifikation in diesem Bereich bevorzugt stattfinden, könnte dies einen erheblichen Einfluss auf die Interaktion haben.

### 5.2.5. Untersuchung der Glk-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion durch Oberflächenplasmonenresonanz

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden Oberflächenplasmonenresonanz-Experimente (SPR) mit Glk und His<sub>6</sub>-IIB<sup>Glc</sup> durchgeführt. Hierzu wurde Glk mittels Standard-Amin-Kupplung auf einem CM5 Chip immobilisiert und eine IIB<sup>Glc</sup> Verdünnungsreihe (12.8 nM - 839  $\mu\text{M}$ ) angewendet. Schon aus dem Sensogramm (Abb. 5.21) wird ersichtlich, dass unspezifische Wechselwirkungen eine große Rolle spielen, da sich auch nach langen Kontaktzeiten kein Gleichgewichtszustand einstellt. Der Anteil an unspezifischer Wechselwirkung nimmt mit steigender IIB<sup>Glc</sup>-Konzentration zu. Gerade bei der höchsten Konzentration ist deutlich zu sehen, dass auch nach einer Kontaktzeit von 200 Sekunden immer noch IIB<sup>Glc</sup> an die Oberfläche des Chips bindet. Die *steady state affinity* Auswertung (Abb. 5.21) zeigt, dass mit der höchsten angewendeten Konzentration von 839  $\mu\text{M}$  IIB<sup>Glc</sup> noch keine Sättigung erreicht wurde. Somit ist eine genaue Bestimmung des  $K_D$ -Wertes mit den verwendeten Konzentrationen nicht möglich. Jedoch zeigt dieser Versuch, dass die Dissoziationskonstante  $K_D$  wahrscheinlich im dreistellig mikromolaren Bereich liegen sollte. Bei einer so geringen Affinität scheint eine physiologische Relevanz dieser Interaktion unwahrscheinlich. Dieser Befund ist sehr zunächst überraschend, da die globale Ähnlichkeit von Mlc und Glc frappierend ist (RMSD der Proteinerückgrats im Bereich vermeintlichen Bindestelle: 0.49). Für die Einschätzung der Stärke der Interaktion ist jedoch ein detaillierter Vergleich in der Bindestelle erforderlich. Um festzustellen, ob eventuell kleine strukturelle Unterschiede die große Differenz zwischen den Affinitäten von Mlc und Glk zur IIB<sup>Glc</sup> erklären können, wurde mit dem Programm *PDBe Fold* [57] die in der PDB hinterlegten Strukturen von Glk (PDB Code: 1Q18) und Mlc (1Z6R) übereinander gelegt. Aus

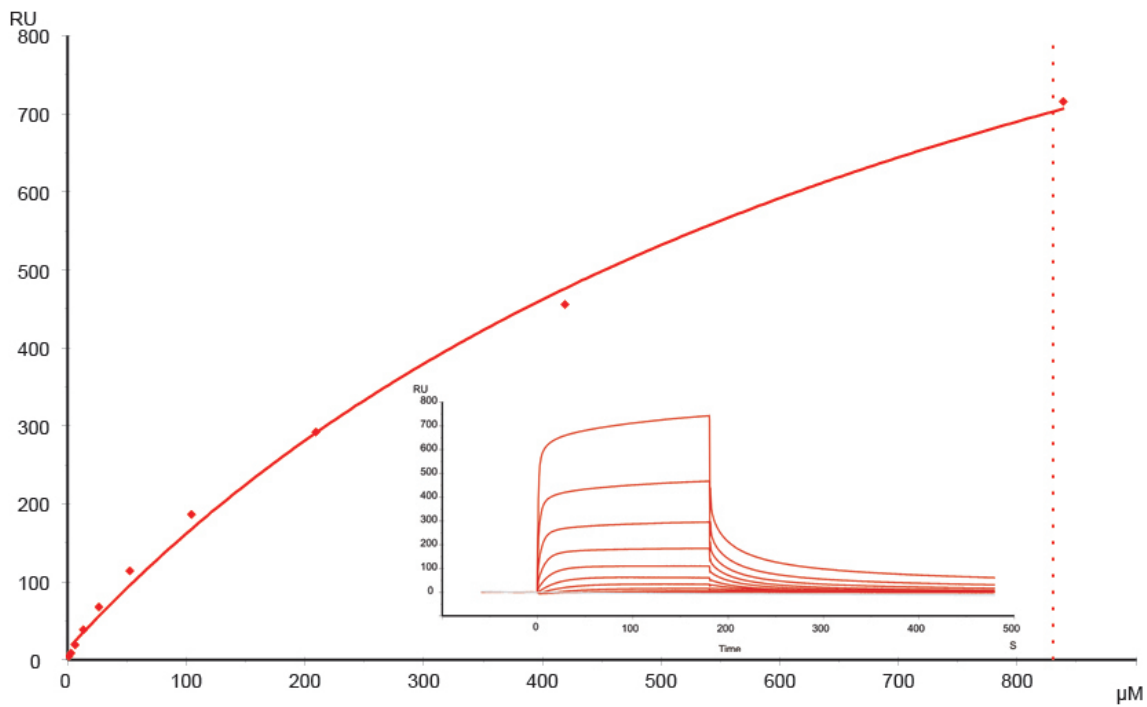


Abbildung 5.21.: SPR-Messungen mit immobilisierter Glk. Verwendet wurde eine IIB<sup>GlC</sup>-Konzentrationsreihe von 12.8 nM bis 839 μM. Besonders bei den IIB<sup>GlC</sup>-Konzentrationen von 419 μM und 839 μM auch nach langer Kontaktzeit keine Sättigung erreicht wird. Diese Beobachtung ist ein starkes Indiz dafür, dass unspezifische Bindung der IIB<sup>GlC</sup>-Domäne an die Oberfläche des Chips stattfindet.

der Kristallstruktur des Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-Komplexes ist bekannt, dass die Aminosäuren I132, F136, I137, L146, T186 und V188 die Bindetasche bilden [46]. Mit Ausnahme von T186 besteht die Bindetasche nur aus hydrophoben Resten. Laut Nam et al. könnte T186 in der Lage sein, eine polare Interaktion mit den Rückgratatomen von V450 der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne einzugehen. Durch die Überlagerungen der Strukturen konnten die entsprechenden Aminosäuren in der Glucokinase identifiziert werden (Tabelle 5.3). Der auffälligste Unterschied ist hier, dass sich an der Position des I137 im Mlc in der Glk eine Glutaminsäure befindet. Somit befindet sich an dieser Stelle statt einer ungeladenen, hydrophoben Aminosäure eine geladene, hydrophile, was eine signifikante Änderung der Beschaffenheit der Bindetasche bedeutet. Ein weiterer Unterschied ist, dass sich an der Position der einzigen polaren Aminosäure der Bindetasche des Mlc, T186, sich in der Glk mit L90 eine unpolare Aminosäure befindet. Auch im Bereich des Loops H139-L146 (Mlc) beziehungsweise K53-N58 (Glk) unterscheiden sich die Strukturen deutlich. In Fall der Glk ist dieser Loop wesentlich enger, was zu einer verkleinerten Bindetasche und einer veränderten Position von V56 im Bezug auf die entsprechenden Aminosäure L146 des Repressors führt. Trotz der insgesamt großen, strukturellen Ähnlichkeit von Mlc und Glk weist die Bindetasche im Detail einige, signifikante Unterschiede auf. Die veränderte Verteilung der Ladungen und der unterschiedliche sterische Anspruch können die Ursache für die im Vergleich zu Mlc schwache Affinität von Glk zur löslichen IIB<sup>Glc</sup>-Domäne sein.

Tabelle 5.3.: Die IIB<sup>Glc</sup> Bindestelle des Repressors Mlc und die entsprechenden Aminosäuren der Glucokinase Glk

Mlc	I132...F136	I137...L146...	T186...V188
Glk	I045...L049	D050...V056...	L090...F092

### 5.2.6. Bestimmung der intrazellulären Glucokinase Konzentration

Schon alleine der Vergleich der Affinitäten von Mlc und Glk zu der IIB<sup>Glc</sup> Domäne weist darauf hin, dass die Glk wahrscheinlich nicht durch Interaktion mit dieser Domäne in die Regulation des PtsG eingreift. Ob eine solche Interaktion *in vivo* stattfindet, hängt jedoch einzig davon ab, in welchen Konzentrationen Glk in der Zelle unter natürlichen Bedingungen vorliegt. Eine definitive Aussage über die Rolle der Glucokinase in diesem Regulationspfad kann somit nur getroffen werden, wenn neben der Dissoziationskonstante auch die Konzentration des Proteins in der Zelle bekannt ist.

Um eine klare Aussage darüber zu treffen, ob Glk in der Lage ist, Mlc von der IIB<sup>Glc</sup> Domäne zu verdrängen, wurde die intrazelluläre Glk Konzentration unter verschiedenen Bedingungen

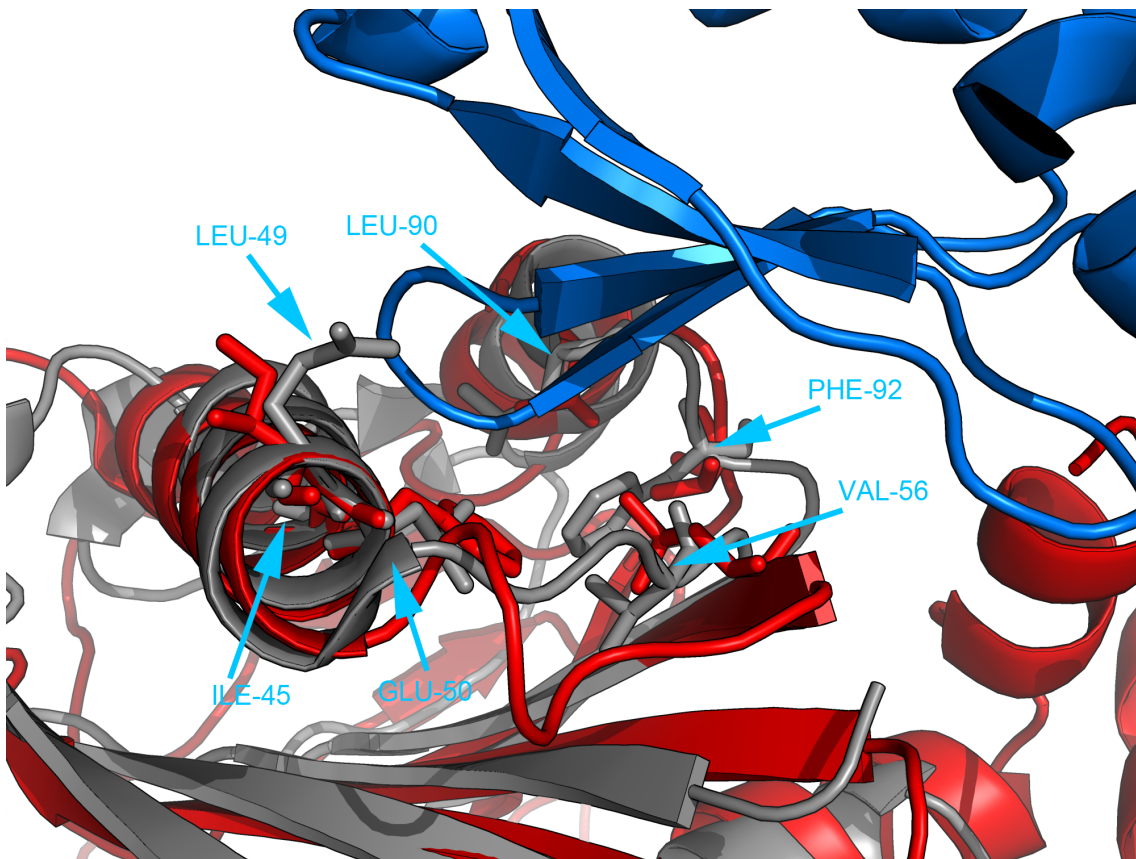


Abbildung 5.22.: Überlagerung der Struktur von Glk mit dem Mlc-IIB<sup>Glc</sup>-Komplex im Bereich der Bindestelle. Trotz der Ähnlichkeiten in diesem Bereich von Glk (grau) und Mlc (rot) ist die Wechselwirkung der Glk mit IIB<sup>Glc</sup> (blau) nur schwach. Ein wichtiger Unterschied ist, dass sich im Fall der Glk an der Stelle, an der sich bei Mlc ein Isoleucin befindet, eine Glutaminsäure befindet.

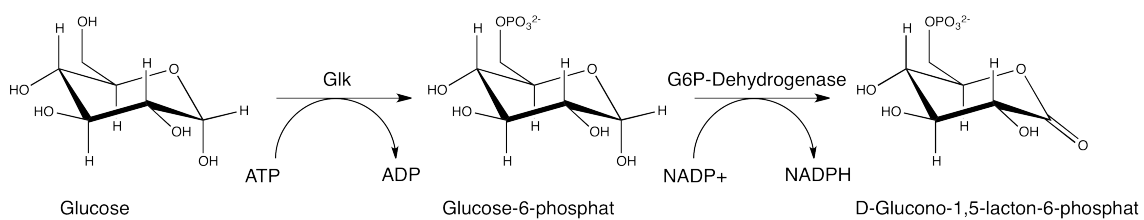


Abbildung 5.23.: Gleichung der zur Glk-Konzentrationsbestimmung genutzten Reaktion. Durch die charakteristische UV-Absorption bei 340 nm kann die Zunahme von NADPH UV-spektroskopisch beobachtet werden. Da alle Komponenten bis auf Glk in Konzentrationen deutlich oberhalb der Michaelis-Konstante vorliegen, hängt die Reaktionsgeschwindigkeit einzig von der Glk ab.

bestimmt (Abb.: 5.24). Die Glucokinase ist für die Phosphorylierung von Glucose, die durch die intrazelluläre Spaltung von Disacchariden freigesetzt wurde, zuständig. Somit ist davon auszugehen, dass die höchste, natürliche Expressionsrate erreicht wird, wenn ein Glucose enthaltendes Disaccharid wie Lactose, Maltose oder Saccharose als Kohlenstoffquelle vorhanden ist. Für Konzentrationsbestimmung wurde dieser Zustand erreicht, indem Wildtyp K-12 *E. coli* Zellen in M9-Minimalmedium mit Maltose als Kohlenstoffquelle aufgezogen wurden.

Ein minimales Glk Expressionsniveau sollte erreicht werden, wenn statt Maltose Glucose vorhanden ist. Da Glucose direkt bei dem Transport in die Zelle durch das PtsG phosphoryliert wird, wird für den Glucose-Metabolismus die Glucokinase nicht benötigt, was zu einer verringerten Expressionsrate führt.

Um zu zeigen, welche maximalen intrazellulären Glk Konzentrationen möglich sind, wurde eine Überexpression in dem mit dem Plasmid p\$1 [87] transformierten *E. coli*-Stamm SF120 durchgeführt und zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Zusätzlich wurde die Glk-Konzentration in nicht induzierten SF120p\$1 Zellen bestimmt.

Zur Untersuchung der Aktivität von Glk wurde das entsprechende Lysat zu Puffer mit Glucose, ATP, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und NADP<sup>+</sup> gegeben [101]. Durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wird das durch die Glk gebildete Glucose-6-Phosphat unter NADP<sup>+</sup> Verbrauch zum D-Glucono-1,5-lacton-6-phosphat umgesetzt (Abb.: 5.23). Die Zunahme von NADPH wurde mittels UV-Absorption bei 340 nm beobachtet. Aus der Steigung im Bereich der linearen Zunahme wurde die Enzymaktivität des Lysats bestimmt. Da alle Substratkonzentrationen in allen Messungen gleich sind, hängt die enzymatische Aktivität einzig von der Glk-Konzentration ab.

Als Referenz wurde die gleiche Messung mit aufgereinigter Glk durchgeführt. Da in diesem Fall die Glk-Konzentration bekannt ist, kann aus der Enzymaktivität die Wechselzahl berechnet werden. Aus den gemessenen Daten ergibt sich für die Glucokinase eine Wechselzahl von  $215.6 \pm 20.2 \text{ s}^{-1}$ .

Über die Wechselzahl kann aus der Enzymaktivität die Glk-Konzentration im Lysat bestimmt werden. Unter den Annahmen, dass eine optische Dichte von 1 bei 600 nm einer Zellzahl von  $8 \cdot 10^{13}$  pro Liter entspricht und das Volumen einer *E. coli* Zelle  $0.6 \mu\text{m}^3$  beträgt, wurde die intrazelluläre Glk-Konzentration berechnet. Für die K-12 *E. coli*-Zellen, die in M9-Medium mit Maltose gewachsen sind, beträgt die intrazelluläre Konzentration der Glucokinase  $4.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ . Diese Konzentration sollte der maximalen, intrazellulären Glk-Konzentration entsprechen, die unter natürlichen Bedingungen erreicht wird. Im Vergleich hierzu ist die Glk-Konzentration von Zellen, die in einem Glucose-haltigen Medium gewachsen sind, mit  $2,33 \mu\text{M}$  nur halb so groß (Abb. 5.25). Insgesamt handelt es sich bei den intrazellulären Glk-Konzentrationen um Abschätzungen, da die Berechnung auf Annahmen für das durchschnittliche Volumen von *E. coli*-Zellen

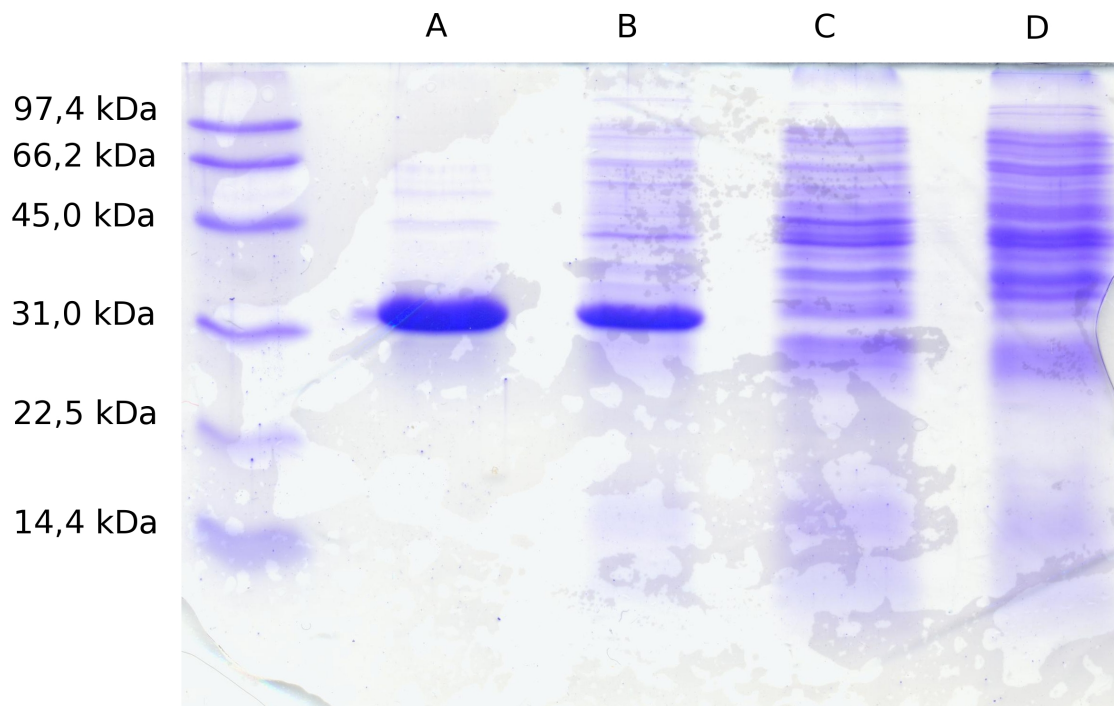


Abbildung 5.24.: SDS-PAGE der für die Bestimmung der intrazellulären Glk-Konzentration verwendeten Proben. A: Gereinigte Glk; B: Lysat der induzierten SF120p1; C: Lysat der nicht-induzierten SF120p1; D: Lysat des Wildtyps K-12 (Glucosemedium)

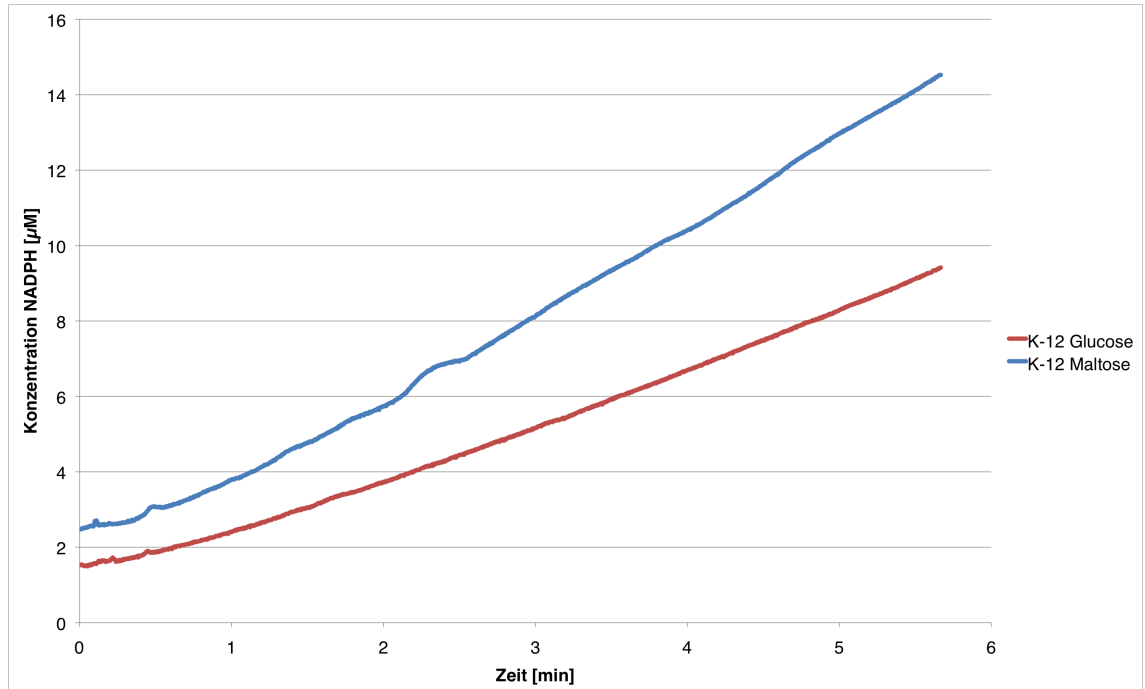


Abbildung 5.25.: Untersuchung des Einflusses der Kohlenstoffquelle auf die enzymatische Aktivität des Lysats von *E. coli* K-12. Verglichen wird Fähigkeit, Glucose zu phosphorylieren, von zwei K-12 *E. coli*-Stämmen, die in einem Minimalmedium mit Glucose (rot) beziehungsweise Maltose (blau) angewachsen sind. Durch die Zunahme der NADPH-Konzentration (Abb. 5.23), welche mittels Absorptionsspektroskopie während der enzymatischen Reaktion gemessen wird, können direkte Rückschlüsse auf die Enzymaktivität gezogen werden. Da unter den getesteten Bedingungen nur die Glucokinase in der Lage ist, Glucose zu phosphorylieren, zeigt dieser Versuch deutlich, dass die Anwesenheit von Maltose zu einem höheren Glk Expressionsniveau führt. Für die Bestimmung der Glk Konzentration in einem Maltose enthaltenden Medium wurden drei biologische Replikate verwendet, für den Fall des Glucose enthaltenden Mediums zwei biologische Replikate.

und für den Zusammenhang der optischen Dichte bei 600 nm mit der Zellzahl beruht. Weiterhin können ein unvollständiger Aufschluss sowie Verluste in der French Pressure Cell zu einer leicht verringerten Konzentration führen. An Hand dieser Experimente ist es jedoch möglich, zu bestimmen in welcher Größenordnung sich die intrazelluläre Glk Konzentration bei unterschiedlichen Nährstoffvorkommen bewegt.

Da die Affinität von Glk zur IIB<sup>Glc</sup>-Domäne im Bereich von 500  $\mu\text{M}$  liegt, ist ein Einfluss von Glk auf die Regulation des Phosphotransferase-System bei intrazellulären Konzentrationen von 4,3  $\mu\text{M}$  auszuschließen. Die Affinität von Mlc zur IIB<sup>Glc</sup>-Domäne ist ohne die Berücksichtigung von Aviditätseffekte mit  $185 \text{ nM} \pm 2,5 \text{ nM}$  (Kap.: 5.1) um einen Faktor  $>1000$  größer. Somit erscheint es unmöglich, dass Glk auch bei einem hohen Expressionsniveau in der Lage ist, Mlc von der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu verdrängen.

Für die Überexpression mit dem Plasmid p\$1 wurde eine intrazelluläre Glk Konzentration von  $867 \pm 22,7 \mu\text{M}$  ermittelt. Bei diesem Expressionsniveau liegt die Glk Konzentration im Bereich der Affinität. Unter diesen Bedingungen könnte die Glucokinase Einfluss auf die Regulation des PtsG nehmen. Weiterhin wurde auch die Konzentration intrazellulärer Glk in SF120p\$1 Zellen, in den die Überexpression nicht induziert wurde, bestimmt. Interessanter Weise liegt die Glk-Konzentration in diesen Zellen mit  $39,2 \pm 1,76 \mu\text{M}$  über der Konzentration der Zellen, die in einem Maltose-haltigem Minimalmedium gewachsen sind. Da die Überexpression durch eine Erhöhung der Temperatur auf  $42^\circ\text{C}$  induziert wird und die SF120p\$1 Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  gewachsen sind, liegt der Verdacht nahe, dass auf Grund der geringen Differenz zur Induktionstemperatur schon eine leichte Überexpression stattgefunden hat.

Von Meyer et al. wurde eine maximale Umsatzgeschwindigkeit von 158 U pro Milligramm Protein in Versuchen mit Zellextrakt ermittelt [87]. Da in dieser Studie gereinigte Glk verwendet wurde, ist die bestimmte Umsatzgeschwindigkeit in diesem Fall mit  $291 \pm 27,3$  U pro Milligramm Glk ungefähr doppelt so hoch.



## 6. Zusammenfassung

Ein wichtiges Merkmal lebendiger Organismen ist die Aufnahme von Nährstoffen gegen einen Konzentrationsgradienten. In Prokaryoten dient das Phosphotransferase System (PTS) zur aktiven Aufnahme von Kohlenhydraten in die Zelle. Um eine effiziente Funktionsweise des Organismus zu garantieren, ist die Expression der Gene der verschiedenen Stoffwechselzyklen an das Vorhandensein des entsprechenden Nährstoffs gekoppelt. Die Expression eines Gens wird normalerweise durch einen Repressor kontrolliert, dessen Aktivität von Metaboliten aus dem entsprechenden Nährstoffzyklus abhängt. Ein prominentes Beispiel ist hier der *lac*-Repressor, welcher die Expression der Gene des Lactose Metabolismus reguliert. Durch Bindung an einen Metaboliten aus dem Lactose-Zyklus - Allolactose - verliert der Repressor die Fähigkeit an die DNS-Operatorsequenz zu binden.

Eine Ausnahme bildet hier der Repressor Mlc (**m**akes **l**arge **c**olonies) aus dem Organismus *Escherichia coli*, der für die Regulation der in den Glucose-Metabolismus involvierten Gene zuständig ist. Im Gegensatz zu anderen Repressoren wird die Aktivität von Mlc nicht durch Bindung an einen Metaboliten aus dem Glucose-Stoffwechselzyklus reguliert. Die Aktivität des Repressors Mlc ist direkt an die Aktivität des Enzyms IICB<sup>Glc</sup> des glucosespezifischen Phosphotransferase Systems (PtsG), das Glucose aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten in die Zelle transportiert, gekoppelt. Durch Bindung an die aktive Form der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne des Enzyms IICB<sup>Glc</sup> verliert Mlc die Fähigkeit zur Bindung an die Operatorsequenzen und somit ist die Repression der betroffenen Gene aufgehoben.

Trotz Kenntnis der Kristallstruktur ist der Funktionsmechanismus des Repressors auf molekularer Ebene noch nicht beschrieben. Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, wie die Bindung an die membrangebundene IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zum Verlust der Affinität zu den Operatorsequenzen führt.

Mit dem Ziel der Aufklärung des Funktionsmechanismus wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine biophysikalische Charakterisierung der Interaktionen des Repressors mit der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne sowie den DNS-Operatorsequenzen durchgeführt (Tab.: 6.1). Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Experimente mit unterschiedlichen Beladungsdichten an immobilisierter IIB<sup>Glc</sup>-Domäne auf der Oberfläche des Sensorchips zeigten, dass eine höhere Beladungsdichte auch zu einer höheren Affinität von Mlc zur IIB<sup>Glc</sup>-Domäne führt ( $3.2 \frac{ng}{mm^2}$ :  $K_D = 46 \pm 3.8$  nM,

Tabelle 6.1.: Auflistung der Dissoziationskonstanten der verschiedenen Mlc Interaktionen

Interaktion	SPR	ITC
Mlc - BoxP1	24 ± 0.8 nM	29.8 ± 6.7 nM
Mlc - BoxP2	98 ± 6.1 nM	433 ± 100 nM
Mlc - BoxP2 (in Anwesenheit von IIB <sup>Glc</sup> )	-	373 ± 78.2 nM
Mlc - IB <sup>Glc</sup>	185 ± 3 nM <sup>1</sup> 46 ± 4 nM <sup>2</sup> 495 ± 38 nM <sup>3</sup> 1000 ± 70 nM <sup>4</sup>	452 ± 66 nM
Mlc - IB <sup>Glc</sup> (in Anwesenheit von BoxP1)	-	357 ± 53 nM

<sup>1</sup> immobilisiertes Mlc

<sup>2</sup> immobilisiertes IB<sup>Glc</sup>; Beladungsdichte 3.2  $\frac{ng}{mm^2}$

<sup>3</sup> immobilisiertes IB<sup>Glc</sup>; Beladungsdichte 0.57  $\frac{ng}{mm^2}$

<sup>4</sup> immobilisiertes IB<sup>Glc</sup>; Beladungsdichte 0.1  $\frac{ng}{mm^2}$

0.57  $\frac{ng}{mm^2}$ :  $K_D = 495 \pm 3.8$  nM, 0.1  $\frac{ng}{mm^2}$ :  $K_D = 1 \pm 0.07$   $\mu$ M). In Zusammenhang mit der Tatsache, dass Mlc als Homotetramer vorliegt, deutet dieser Befund sehr stark auf eine multivalente Natur der Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion hin. Da mit geringerem Abstand zwischen immobilisierten IIB<sup>Glc</sup>-Domänen auf der Oberfläche des Sensorchips die Wahrscheinlichkeit einer multivalenten Interaktion steigt, führt eine höhere Beladungsdichte durch Avidität zu einer Erhöhung der scheinbaren Affinität. Mittels Titrationskalorimetrie-Messungen konnte gezeigt werden, dass homotetrameres Mlc in der Lage ist, vier IIB<sup>Glc</sup>-Domänen zu binden.

Bereits von Lee et al. und Nam et al. [40, 41] wurde auf qualitative Weise gezeigt, dass die Bindung von löslichem IIB<sup>Glc</sup> an Mlc nicht zu einer Aufhebung der Repression führt. Um zu untersuchen, inwiefern die Anwesenheit der löslichen IIB<sup>Glc</sup>-Domäne Einfluss auf die DNS-Affinität des Repressors hat, wurden basierend auf den beiden Operatorsequenzen des *ptsg*-Operons BoxP1 und BoxP2 DNS-Hairpinstrukturen als Modellsystem erstellt. Die Charakterisierung der Mlc-DNS Interaktion in An- und Abwesenheit der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zeigt, dass lösliches IIB<sup>Glc</sup> keinen Einfluss auf die DNS-Affinität hat (Tab.: 6.1). Auch wurde gezeigt, dass der Mlc-DNS Komplex eine vergleichbare Affinität zu löslichem IIB<sup>Glc</sup> hat wie das freie Mlc. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Erkenntnissen von Nam et al. [46].

Basierend auf den Ergebnissen der biophysikalischen Charakterisierung der Mlc-Interaktionen, postuliere ich ein Modell, in dem sterische Hinderung und elektrostatische Abstoßung verantwortlich für den Verlust der DNS-Affinität sind. Da sich vor dem *ptsg*-Operons zwei Operatorsequenzen befinden und homotetrameres Mlc über zwei DNS-Bindestellen verfügt, liegt die Vermutung nah, dass Mlc ähnlich wie der *lac*-Repressor beide Operatoren gleichzeitig bindet, was zu der Ausbildung einer DNS-Loop-Struktur führt. An Hand der Kristallstruktur des Mlc-

IIB<sup>Glc</sup> Komplexes und der Sequenz der IIC<sup>Glc</sup> wurde ein Modell für das membrangebundene Mlc erstellt (Abb.: 6.1). Durch die tetravalente Bindung von Mlc an IICB<sup>Glc</sup> ist die Molekülebene parallel zur Zellmembran ausgerichtet. Die DNS-Bindestelle von Mlc ist so angeordnet, dass die DNS senkrecht zur Molekülebene gebunden wird. Aus der strukturellen Analyse des Modells des Mlc-IICB<sup>Glc</sup>-Komplexes ist ersichtlich, dass der maximale Abstand zwischen DNS-Bindestelle und Membran 240 Å beträgt und somit deutlich unterhalb der Persistenzlänge von DNS liegt. Da die Bindung der DNS senkrecht zur Molekülebene stattfindet, wird die durch die Membran bedingte Biegung der DNS und elektrostatische Abstoßung zu einer deutlichen Verringerung der Affinität führen.

Ein weiterer ungeklärter Aspekt in dem Regulationspfad des *ptsG*-Operons ist die Rolle der Glucokinase Glk. Von Lengsfeld et al. [56] wurde durch *pull down assays* gezeigt, dass die Glucokinase ebenfalls in der Lage ist, an die IIB<sup>Glc</sup>-Domäne des PtsGs zu binden. Der Vergleich von Mlc und Glk ergibt, dass beide Proteine strukturell sehr ähnlich sind. Eine biophysikalische Charakterisierung der Glk-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie ergab eine Dissoziationskonstante  $K_D > 100 \mu\text{M}$ . Um zu ermitteln, ob diese Interaktion unter physiologischen Bedingungen relevant ist, wurde die intrazelluläre Glucokinase-Konzentration bei verschiedenen Nährstoffquellen (Glucose und Maltose) über die Enzymaktivität ermittelt. Für die in Glucose-haltigem Medium kultivierten *E. coli* K-12 Stämme ergab sich eine intrazelluläre Glk Konzentration von  $2.33 \mu\text{M}$ , im Falle des Maltose-haltigen Mediums  $4.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ . Weiterhin wurde an Hand des p\$1-Plasmids die Glk-Konzentration ermittelt, die durch Überexpression erreicht werden kann ( $867 \pm 23 \mu\text{M}$ ).

Die ermittelten Konzentrationen zeigen deutlich, dass diese bei basaler Expression deutlich unterhalb der Dissoziationskonstante liegen und die Glucokinase Glk somit unter diesen Bedingungen nicht in der Lage ist, den Repressor Mlc von der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne zu verdrängen. Einzig unter Überexpression werden Glk-Konzentrationen erreicht, in denen die Glucokinase Einfluss auf die Regulation des PtsG nehmen könnte.

Somit ist gezeigt, dass die Glk-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion unter physiologischen Bedingungen keine Relevanz für die Regulation des bakteriellen Phosphotransferase System hat.

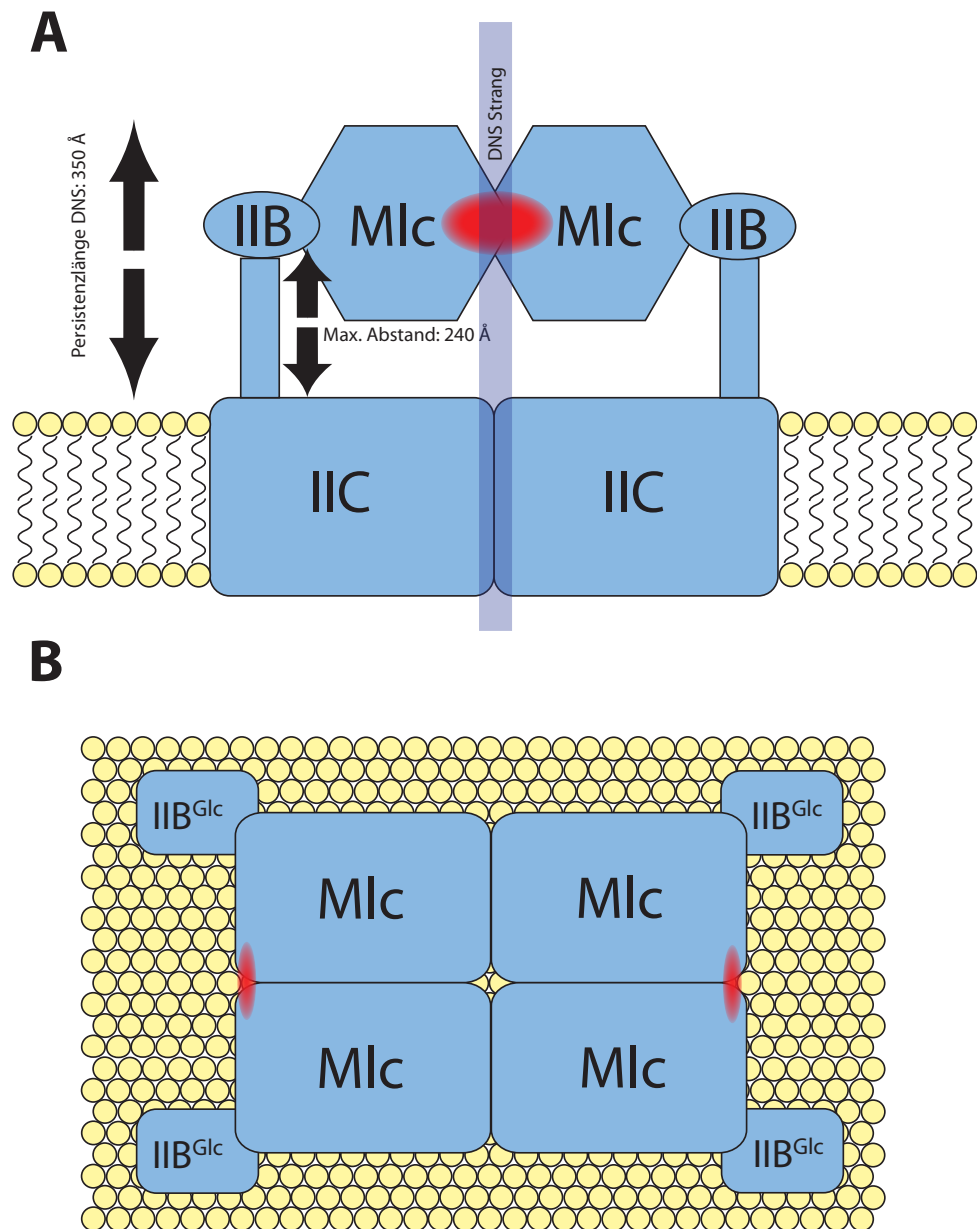


Abbildung 6.1.: Schematische Darstellung des Mlc-IICB<sup>Glc</sup>-Komplexes aus unterschiedlichen Perspektiven. Die Position, der von zwei Mlc Monomeren gebildeten DNS-Bindestelle, ist rot markiert. Aus dem in Teil A schematisch eingezeichneten DNS Strang ist ersichtlich, die Bindung von DNS an Membran-gebundenes Mlc aus sterischen Gründen erschwert ist.

## 7. Summary

An important characteristic of living organisms is the incorporation of nutrients against a concentration gradient. In procaryotes the phosphotransferase system is used to actively transport carbohydrates into the cell. In order to operate in an efficient manner the expression of genes involved in the different metabolic pathways are coupled to the abundance of the respective nutrient. In most cases gene expression is regulated by a repressor whose activity is depending on metabolites from the respective metabolic pathway. A well investigated example of such a repressor is the *lac*-repressor which regulates expression of genes involved in lactose metabolism. Upon binding to allolactose, a metabolite of lactose, the *lac*-repressor loses its DNA affinity and thus *lac*-genes are expressed. This way, the abundance of lactose has a direct effect on the expression level of the genes of the lactose metabolism.

In this regard the repressor Mlc (**m**akes **l**arge **c**olonies) is exceptional. Mlc regulates the expression of genes involved in the glucose metabolism such as *ptsG*, *manXYZ*, *maltT*, *ptsHIcrr* and *mlc*. In contrast to other repressors Mlc's activity isn't regulated by an interaction with a metabolite but it is directly depended on the activity of the glucose transporter IICB<sup>Glc</sup> of the glucose specific phosphotransferase system (PtsG). By binding to the active form of the IIB<sup>Glc</sup> subunit of IICB<sup>Glc</sup> the repressor Mlc loses its affinity to the DNA operator sequences and thus the repression is repealed.

Despite the crystal structure of the Mlc-IIB<sup>Glc</sup> been known detailed of the mode of action of the repressor are unclear. The most important question in this context is how Mlc loses its DNA affinity upon interaction with membrane bound IIB<sup>Glc</sup>.

In order to elucidate the mode of action of the repressor a detailed analysis of Mlc's interactions with the soluble IIB<sup>Glc</sup> as well as its DNS operator sequences was performed in the course of the PhD thesis. Surface plasmon resonance experiments with different densities of immobilized IIB<sup>Glc</sup> on the surface of the sensor chip revealed that with increasing IIB<sup>Glc</sup> density Mlc's affinity drastically increases ( $3.2 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$ :  $K_D = 46 \pm 3.8 \text{ nM}$ ,  $0.57 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$ :  $K_D = 495 \pm 3.8 \text{ nM}$ ,  $0.1 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$ :  $K_D = 1 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ). This finding combined with the fact that the repressor forms homotetramers proves that Mlc is binding in a multivalent manner. Because a smaller distance between the immobilized IIB<sup>Glc</sup> domains on the surface of the sensor chip makes a multivalent interaction more likely, a higher protein density will cause a higher apparent affinity due to avidity.

Tabelle 7.1.: Dissociation constants of the different Mlc interaktionen

Interaktion	SPR	ITC
Mlc - BoxP1	24 ± 0.8 nM	29.8 ± 6.7 nM
Mlc - BoxP2	98 ± 6.1 nM	433 ± 100 nM
Mlc - BoxP2 (in presence IIB <sup>Glc</sup> )	-	373 ± 78.2 nM
Mlc - IB <sup>Glc</sup>	185 ± 3 nM <sup>1</sup> 46 ± 4 nM <sup>2</sup> 495 ± 38 nM <sup>3</sup> 1000 ± 70 nM <sup>4</sup>	452 ± 66 nM
Mlc - IB <sup>Glc</sup> (in presence von BoxP1)	-	357 ± 53 nM

<sup>1</sup> immobilized Mlc

<sup>2</sup> immobilized IB<sup>Glc</sup>; protein density 3.2  $\frac{ng}{mm^2}$

<sup>3</sup> immobilized IB<sup>Glc</sup>; protein density 0.57  $\frac{ng}{mm^2}$

<sup>4</sup> immobilized IB<sup>Glc</sup>; protein density 0.1  $\frac{ng}{mm^2}$

Furthermore, isothermal titration calorimetry experiments revealed that one Mlc homotetramer is capable of binding four IIB<sup>Glc</sup> domains.

Lee et al. and Nam et al. [40, 41] already showed in a qualitative manner that the interaction of Mlc with soluble IIB<sup>Glc</sup> isn't sufficient to repeal repression. To investigate if IIB<sup>Glc</sup> has an effect on Mlc's DNA affinity hairpin structures based on the operator sequences of the *ptsG* operon BoxP1 and BoxP2 were used as a model system. The characterization of the Mlc-DNA interactions in absence and presence of IIB<sup>Glc</sup> showed, that soluble IIB<sup>Glc</sup> doesn't influence Mlc's DNA affinity (Tab. 7.1). Furthermore, the vice versa experiment showed that the Mlc-DNA complex has a similar affinity to the IIB<sup>Glc</sup> domaine as free Mlc. These results are consistent the findings of Nam et al. [46].

Based on the results of the biophysical characterization of the Mlc interactions I postulate a model for the deactivation of Mlc in which steric hindrance and electrostatic repulsion are responsible for Mlc's loss of DNA affinity upon binding to membrane bound IIB<sup>Glc</sup>. As there are two operator sequences upstream of the *ptsG* operon and Mlc has two DNA binding sites it is safe to assume that Mlc is capable of binding both sequences simultaneously. Like in the case of the *lac* repressor this behavior will lead to the formation of a DNA loop structure.

Based on the crystal structure of the Mlc-IIB<sup>Glc</sup> and the sequence of the IIC<sup>Glc</sup> a model of membrane bound Mlc was proposed (Fig. 7.1). Due to the tetravalent interaction with IICB<sup>Glc</sup> Mlc is oriented in parallel in regard to the membrane. The structural analysis of this model of the Mlc-IICB<sup>Glc</sup> complex reveals that maximum distance between DNA binding site and membrane is with 240 Å shorter that the persistence length of DNA (350 Å). With the binding of DNA being perpendicular to the plane of the repressor the presence of the membrane in the IICB<sup>Glc</sup>

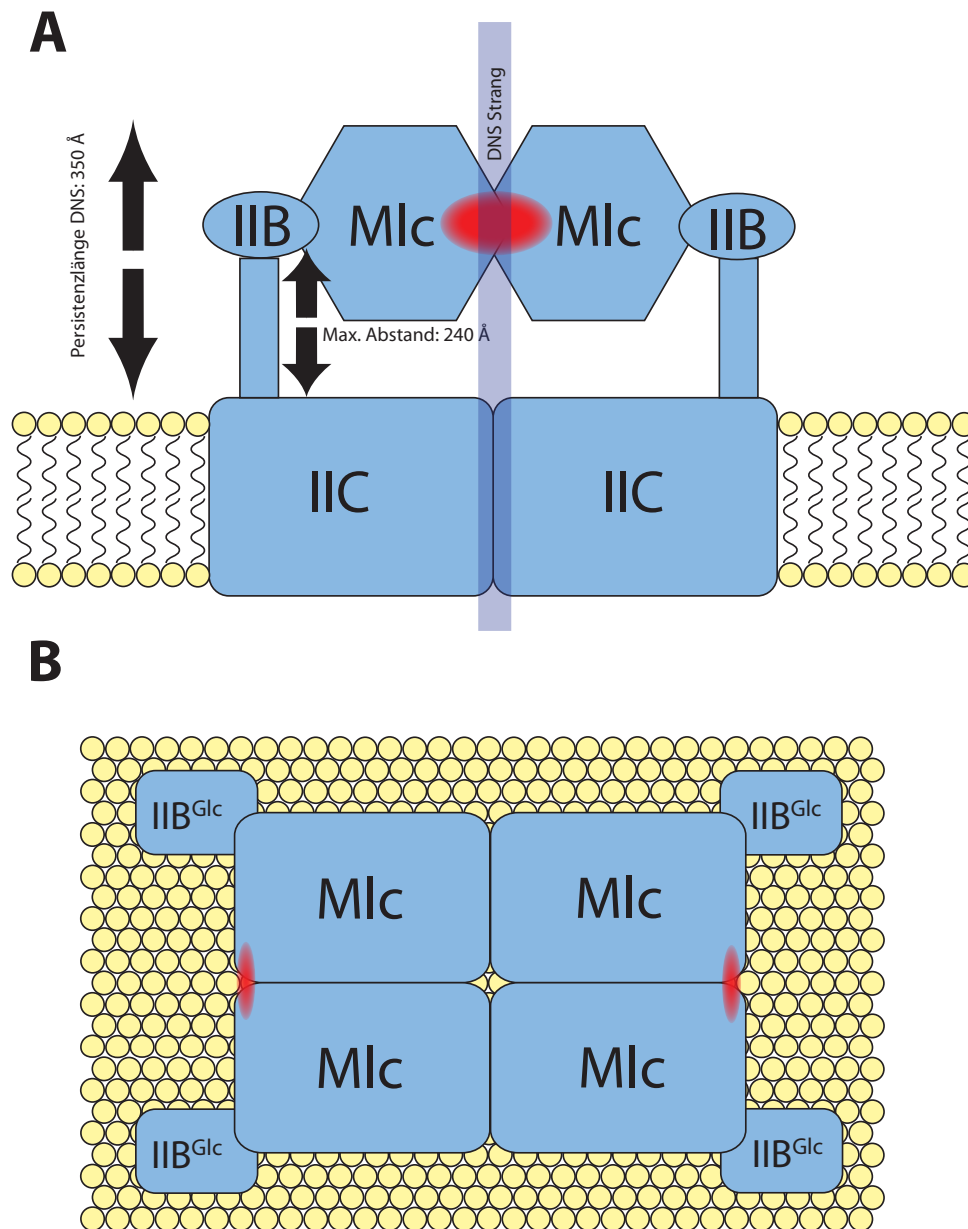


Abbildung 7.1.: Model Mlc-IICB<sup>Glc</sup>-complex. The position of the DNA binding site is marked in red.

complex is likely to lead to steric hinderance and electrostatic repulsion. These effects are likely to cause a significant decrease in Mlc's DNA affinity.

Another unanswered question in the regulation of the *ptsG* operon is the role of the glucokinase Glk. In a previous study Lengsfeld et al. [56] showed by pull-down assay that the IIB<sup>Glk</sup> of PtsG is capable of recruiting the glucokinase Glk. Comparison of Mlc and Glk reveal that both proteins are structurally very similar. In order to elucidate the role of Glk in regulation *ptsG* expression and to clarify if Glk is capable of displacing Mlc from the IIB<sup>Glk</sup> domaine, the IIB<sup>Glk</sup> interaction was characterized by surface plasmon resonance spectroscopy yielding in a dissociation constant  $K_D > 100 \mu\text{M}$ . As the affinity significantly differs from the Mlc-IIB<sup>Glk</sup> affinity it is important to know if intracellular Glk concentrations can be reached that would lead to a substantial amount of Glk in the bound state. Therefore, intracellular Glk concentrations of *E. coli* strain K-12 were determined under different nutritional conditions (Maltose or Glucose as sole carbon source). In case of maltose a intracellular Glk concentration of  $4.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$  was determined, in case of Maltose  $2.33 \mu\text{M}$ . With the Glk concentrations being far below the dissociation constant of the Glk-IIB<sup>Glk</sup> interaction it is impossible that a significant amount of Glk-IIB<sup>Glk</sup> complex is formed under these conditions. Therefore, it is unlikely that the Glk-IIB<sup>Glk</sup> interaction plays a role in regulating expression of *ptsG*.

Furthermore, a strain overexpressing Glk (SF120p\$1) was used to determine the maximum intracellular concentration. Under these condition a intracellular Glk concentration of  $867 \pm 23 \mu\text{M}$  was reached, which is in the range of the dissociation constant of the Glk-IIB<sup>Glk</sup> interaction and thus Glk would be capable of displacing Mlc from the binding site.

The evaluation of the Glk-IIB<sup>Glk</sup> interaction clearly reveals that this interaction does not affect the expression of the genes regulated by Mlc under physiological conditions.

## 8. Experimentelles

### 8.1. Geräteliste

- GE Biacore T100
- Microcal iTC200
- Bruker Avance III 600 Mhz Spektrometer mit inversem cryogenen T/C/I-Tripleresonanz-Probenkopf
- Varian Cary 50
- GE Äkta Prime
- GE Äkta Purifier
- GE Superdex 7516/60
- GE Superdex 200 16/60
- GE Q Sepharose FF
- Qiagen Ni NTA Superflow Cartridges

## 8.2. Verwendete Chemikalien

Tabelle 8.1.: Verwendete Chemikalien

Hersteller	Chemikalien
Applichem	SDS, Agar, Hefeextrakt
Biorad	SDS-PAGE Standards
Eurisotop	Celtone, D <sub>2</sub> O (99,9 % D)
Fischer Scientific	Coomassie Brilliant Blue G-250
Fluka	Dinatriumhydrogenphosphat · 12 H <sub>2</sub> O, Natriumdihydrogenphosphat · H <sub>2</sub> O
CIL	<sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid
Merck	D-(+)-Glucose-Monohydrat, Kaliumchlorid, Natriumchlorid, NADP+, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Metabion	alle verwendeten Oligonukleotide
Riedel-deHaen	Kaliumdihydrogenphosphat, Di-Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumchlorid · 10 H <sub>2</sub> O, Natriumazid
Roche	DNase I, Proteaseinhibitor-Tabletten
Roth	IPTG, Tween20, DTT, Trypton, HEPES, NaCl, Ampicillin, Kanamycin
Sigma	BME-Vitamine, Ethanolamin, NHS, EDC, Trizma Hydrochlorid, Trizma Base
TRC Inc.	1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrroline-3-carboxylate N-Hydroxysuccinimide Ester
VWR	Natriumchlorid

## 8.3. Verwendete *E. coli* Stämme

Tabelle 8.2.: Liste der verwendeten *E. coli* Stämme

Stamm	Verwendung	Literatur
JM109	Plasmidpräparation	[102]
SF120	Glk-Expression	[89]
K12	Referenzmessungen Glk	
BL21(DE3)	H <sub>6</sub> IIB <sup>Glc</sup> /Mlc Expression	[60]
W3110	IIB <sup>Glc</sup> -H <sub>6</sub> -Expression	[90]
JM-G77	Membranvesikelpräparation	[18]

## 8.4. Verwendete Plasmide

Tabelle 8.3.: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Protein	Referenz oder Herkunft
p\$1	Glk	[87]
pQE60mlc	Mlc	[91]
pJBH	IIB <sup>Glc</sup> -H <sub>6</sub>	[11]
pET28H6IIBGlc	H <sub>6</sub> IIB <sup>Glc</sup> /	nicht publiziert; Bernhard Erni (Uni Basel)
pTZgp8IIB	IIB <sup>Glc</sup> mit gp8-Membrananker	[43]

## 8.5. Allgemeine Arbeitsschritte

### 8.5.1. Verwendete Nährmedien

Alle Nährmedien wurden bei 120°C für 20 min autoklaviert. Im Fall von hitzeinstabilen Substanzen wurden Stammlösungen angesetzt und mit einem 0.22 µm Filter sterilfiltriert.

Zur Herstellung von LB-Platten wurde vor dem Autoklavieren ein Rührfisch zugegeben, um nach dem Abkühlen auf 40°C eine gleichmäßige Verteilung der hitzeempfindlichen Antibiotika zu gewährleisten.

Tabelle 8.4.: Verwendete Nährmedien

<b>LB-Medium</b> [103]	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 1 l H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>
<b>M9-Medium</b>	17.2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O 3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5 g NaCl 1 g NH <sub>4</sub> Cl 1 l H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>
Zugaben nach dem Autoklavieren	2 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> 100 µl 10 M CaCl <sub>2</sub> 20 ml 20 % (w/v) Glucose 100 mg Celtone
<b>MMA-Medium</b>	10.5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4.5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5 g NaCl 1 g NH <sub>4</sub> Cl 1 l H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>
Zugaben nach dem Autoklavieren	10 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> 10 ml 40 % (v/v) Glycerin
<b>LB-Platten</b>	2.5 g Trypton 1.25 g Hefeextrakt 1.25 g NaCl 0.25 l H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Widerstand  $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$

### 8.5.2. Präparation kompetenter Zellen

Die Präparation (Puffer- und Medienzusammensetzung siehe Tab. 8.4 und 8.5) kompetenter Zellen erfolgte nach dem Protokoll des QIAexpressionist [104]:

1. Eine LB-Vorkultur wird mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.
2. Mit 1 ml der Vorkultur werden 100 ml LB Medium angeimpft und bis zum Erreichen des  $OD_{600}=0.5$  bei 37°C wachsen gelassen.
3. Zellkultur für 5 min auf Eis abkühlen
4. Zellen durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit ernten (5 min, 4000 x g, 4°C)
5. Überstand dekantieren
6. Pellet vorsichtig in 4°C kaltem TFB1 (3 ml pro 10 ml Zellkultur) resuspendieren und für 90 min auf Eis stellen
7. Zellen durch Zentrifugation abtrennen (5 min, 4000 x g, 4°C)
8. Überstand dekantieren
9. Pellet vorsichtig in eiskaltem TFB2 (0.4 ml pro 10 ml Zellkultur) resuspendieren
10. Zellsuspension in 100 µl Aliquote aufteilen und in flüssigem N<sub>2</sub> einfrieren
11. Aliquote bei -70°C lagern

Tabelle 8.5.: Für die die Präparation kompetenter Zellen benötigte Puffer

Name	Zusammensetzung
TFB1	100 mM RbCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 30 mM KOAc, 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % (v/v) Glycerin, pH 5.8, steril filtriert
TFB2	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl <sub>2</sub> , 15 % (v/v) Glycerin, mit KOH auf pH 6.8 eingestellt

### 8.5.3. Transformation

Die Transformation kompetenter Zellen erfolgte nach dem Protokoll des QIAexpressionist [104]:

1. 1  $\mu\text{l}$  Plasmid-Lösung in einem sterilen Eppendorf-Röhrchen vorlegen und auf Eis stellen
2. Ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis auftauen
3. 100  $\mu\text{l}$  der kompetenten Zellen zu dem Plasmid geben und 20 min auf Eis stellen
4. Für 90 sec in einem Wasserbad auf 42 °C
5. 500  $\mu\text{l}$  LB Medium zugeben
6. Im Fall einer Ampicilin-Resistenz: 50, 100 und 200  $\mu\text{l}$  auf LB-Amp<sup>100</sup>-Agar-Platten ausstreichen.
7. Alle anderen Selektionsmarker: 90 min bei 37 °C inkubieren
8. 50, 100 und 200  $\mu\text{l}$  auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausstreichen.
9. Bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Mit einer Einzelkolonie wurden 5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika als Selektionsmarker angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Diese Flüssigkultur wurde in 1 ml Aliquote aufgeteilt und 8 % (v/v) DMSO zugegeben. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

### 8.5.4. Plasmidpräparation

Zur Amplifizierung wurde das entsprechende Plasmid in den *E. coli*-Stamm JM109 [102] transformiert. Mit einer Einzelkolonie des transformierten Stamms wurden 10 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Von der Kultur wurde 1 ml abgenommen und die Zellen abzentrifugiert. Aus dem verbleibenden Pellet wurde mit Hilfe eines Qiagen Mini-Prep-Kit die Plasmid-DNS gemäß dem beiliegenden Handbuch [105] aufgereinigt. Die Konzentration der Plasmid-DNS wurde mittels UV-Absorption bestimmt. Um Mutationen ausschließen zu können, wurde eine Probe des Plasmid zusammen mit dem entsprechenden Primer an die Firma GATC (Konstanz) zur Sequenzierung gesendet.

## 8.6. Expression und Reinigung der Glucokinase Glk

Die Expression und Reinigung der Glucokinase Glk wurde angelehnt an das Protokoll von Meyer et al. [87] durchgeführt. Mit dem Plasmid p\$1 transformierte *E. coli* SF120 wurden über Nacht in 5 ml LB Medium mit  $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Ampicilin angewachsen gelassen. Als Vorkultur wurden 100 ml nicht isopenangereichertes M9 Medium ( $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Ampicilin und  $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Celtone) 1:100 mit der Übernachtskultur angeimpft und bei  $30^\circ\text{C}$  für 24 h kultiviert. Die Hauptkultur (1 l isopenangereichertes M9 Medium,  $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Ampicilin,  $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Celtone) wurde im Verhältnis 1:50 angeimpft und bei  $30^\circ\text{C}$  heftig geschüttelt bis ein  $\text{OD}_{600}$  von 0.6 erreicht wurde. Die Überexpression wurde durch eine Temperaturerhöhung auf  $42^\circ\text{C}$  induziert. Nach 3 h wurde die Überexpression gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde in 10 ml Puffer A (50 mM Tris pH 7.6, 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ) resuspendiert, mit einer Proteaseinhibitortablette versehen und mittels French Press aufgeschlossen. Membranfragmente und unaufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (40 min bei  $27000 \times g$ ,  $4 \times 100^\circ\text{C}$ ) abgetrennt. Durch die Zugabe von 2 % (w/v) Streptomycinsulfat wurde die Fällung der DNS erreicht. Die Proteine des Lysats wurden durch Zugabe von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bis zu einem Sättigungsgrad von 55 % ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation abgetrennt und das Pellet in zu 40 % mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gesättigtem Puffer A gelöst. Eine erneute Proteinfällung wurde durch Erhöhung der  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung auf 55 % erreicht. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer B (50 mM Tris pH 8, 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ) gelöst und gegen 5 l Puffer B dialysiert.

Weiter Proteinreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie. Dazu wurde die Proteinlösung in 2 ml Aliquoten auf 3.5 ml Q Sepharose FF Säule aufgetragen und mit einem Gradienten von 0 bis 400 mM NaCl eluiert. Die Glucokinase eluierte bei einer NaCl-Konzentration von ungefähr 200 mM.

Um verbleibende Verunreinigungen zu entfernen, wurde eine Größenausschluss chromatographie durchgeführt (Laufpuffer: Puffer B mit 200 mM NaCl). Die Reinheit der Glk enthaltenden Fraktionen wurde durch SDS-PAGE überprüft. Für die Konzentrationsbestimmung wurde ein Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280} = 28420 \frac{1}{\text{M} \cdot \text{cm}}$  anhand der Sequenz mit dem Programm ProtParam (ExpASy Server) [106].

## 8.7. Bestimmung der intrazellulären Glk Konzentration

Kulturen von den *E. coli* Stämmen SF120p\$1 und K12 wurden in LB-Vollmedium (SF120p\$1) und M9-Minimalmedium mit Glucose oder Maltose als Kohlenstoffquelle (K-12) bei  $37^\circ\text{C}$  angezogen. Bei einem Teil der SF120p\$1-Kultur wurde nach dem Erreichen einer optischen Dichte von 0.6 die Überexpression von Glk durch Erhöhung der Temperatur auf  $42^\circ\text{C}$  induziert und für

3 h fortgesetzt. Alle anderen Kulturen wurden über Nacht wachsen gelassen. Vor dem Abzentrifugieren der Zellen wurde die optische Dichte der Kultur bestimmt. Das Zellpellets wurden in 10 ml 50 mM Tris pH 7.65 10 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert, mit einer Proteaseinhibitortablette versetzt und durch mehrere Passagen durch eine *French Pressure Cell* aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat mit 0.2 mM NADP<sup>+</sup> inkubiert und Fragmente der Zellmembran durch Zentrifugation entfernt.

Die intrazelluläre Glk-Konzentration wurde über die Messung der Enzymaktivität nach Fraenkel et al. [101] bestimmt. Durch Messungen mit isolierter Glk bekannter Konzentration wurde die Wechselzahl für diese enzymatische Reaktion bestimmt. Für die Beobachtung der Bildung von NADPH durch UV Absorption mit einem Varian Cary 50 Photospektrometer bei 340 nM wurde eine geeignete Menge Lysat (0.1-10  $\mu$ l) mit 50 mM Tris pH 7.65, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 2 mM Glucose, 10 mM ATP auf 1 ml Endvolumen verdünnt. Die Menge an Lysat wurde so ausgewählt, dass die Zunahme an NADPH im beobachteten Zeitraum von 20 min annähernd linear ist.

## 8.8. Expression und Reinigung der löslichen IIB<sup>Glc</sup> Domäne

### 8.8.1. H<sub>6</sub>-IIB<sup>Glc</sup>

Das Plasmid pET28H6IIBGlc 401-407 (erhalten von Bernhard Erni, Uni Basel) umfasst die Aminosäuren 401-477 des Glucosetransporters IICB<sup>Glc</sup> (IIB<sup>Glc</sup> ohne die ersten 13 Aminosäuren) mit einem N-terminalem His<sub>6</sub>, der durch eine Thrombinschnittstelle mit dem Protein verbunden ist.

Für die Expression wurde 11 M9 Medium (100  $\frac{\mu$ g}{ml} Ampicilin und 100  $\frac{\mu$ g}{ml} Celtone) mit BL21-(DE3)pET28H6IIBGlc401-407 angeimpft. Nach dem Erreichen von OD<sub>600</sub> = 0.8 wurde die Überexpression durch die Zugabe von 1  $\frac{\mu$ l}{ml} IPTG induziert und über Nacht bei 30°C vorge-setzt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und das Pellet in 20 ml Lysepuffer (50 mM NaP<sub>i</sub> pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) pro Liter Expressionsmedium resuspendiert. Vor der Lyse wurde eine Spatelspitze DNase I und eine Proteaseinhibitortablette zugegeben. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch mehrere Passagen durch eine French Pressure Cell. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (10000 x g, 4°C, 20 min) abgetrennt.

Zur Reinigung des Lysat mittels Affinitätschromatographie wurde eine 1 ml Ni NTA Säule (QIAGEN) verwendet. Unspezifisch gebundene Verunreinigungen wurden durch Waschen der Säule mit 100 mM Imidazol enthaltenden Lysepuffer entfernt. Die IIB<sup>Glc</sup> Domäne wurde durch Waschen mit 300 mM Imidazol eluiert. Für die anschließende Gelfiltration wurden die IIB<sup>Glc</sup>

enthaltenden Fraktionen vereinigt und mit einem Amicon Zentrifugenfilter MWCO 3 kDa konzentriert. Für die Größenausschluss chromatographie mit einer GE Superdex 75 16/60 Säule wurde ein Laufpuffer mit 50 mM NaP<sub>i</sub> pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA , 0.5 mM DTT verwendet. Die Reinheit der Proteinpräparation wurde mittels SDS-PAGE [107] überprüft.

### 8.8.2. IIB<sup>Glc</sup>-H<sub>6</sub>

Die Expression von IIB<sup>Glc</sup> mit C-terminalem His<sub>6</sub> (Plasmid pJBH) wurde angelehnt an das publizierte Protokoll [11] durchgeführt. Für die Expression von H<sub>6</sub>-IIB<sup>Glc</sup> wurde 1 l LB Medium (100  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Ampicilin) mit dem Plasmid pJBH transformierte *E. coli* W3110 Zellen inokuliert und unter Schütteln bei 37°C wachsen gelassen. Nach dem Erreichen von OD<sub>600</sub> = 1 wurde die Überexpression durch die Zugabe von IPTG (finale Konzentration 100  $\mu\text{M}$ ) gestartet und über Nacht fortgesetzt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und das Pellet in 20 ml Lysepuffer (50 mM NaP<sub>i</sub> pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) pro Liter Expressionsmedium resuspendiert. Vor der Lyse wurde eine Spatelspitze DNase I und eine Proteaseinhibitortablette zugegeben. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch mehrere Passagen durch eine French Pressure Cell. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (10000 x g, 4°C, 20 min) abgetrennt.

Zur Isolation des IIB<sup>Glc</sup>-H<sub>6</sub> mittels Affinitätschromatographie wurde eine 10 ml Ni NTA Säule (QIAGEN) verwendet. Abweichend von dem veröffentlichten Protokoll wurde die Elution mit einem Imidazol-Stufengradienten in den Schritten 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM und 500 mM in 50 mM NaP<sub>i</sub> pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol mit jeweils 2 Säulenvolumen erreicht. Mittels SDS-PAGE wurde festgestellt, welche Fraktionen IIB<sup>Glc</sup>-H<sub>6</sub> enthalten und die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Verbleibende Verunreinigungen wurden durch Gelfiltration (GE Superdex 75 16/60, Laufpuffer: 20 mM NaP<sub>i</sub> pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT) entfernt. Erneut wurde durch SDS-PAGE festgestellt, welche Fraktionen IIB<sup>Glc</sup>-H<sub>6</sub> enthalten, die entsprechenden Fraktionen vereinigt und mit einem Amicon Zentrifugenfilter MWCO 3 kDa konzentriert. Die Proteinkonzentration wurde durch UV Absorption bei 280 nm mit dem publizierten Extinktionskoeffizienten von 1280  $\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$  bestimmt.

## 8.9. Expression und Reinigung von Mlc

Die Expression und Reinigung von Mlc wurden an die Veröffentlichung von Gerber et al. [91] angelehnt.

BI21(DE3) *E. coli* Zellen wurden mit dem Plasmid pQE60mlc transformiert und auf einer

100  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Ampicilin enthaltende LB Agarplatte kultiviert. Mit einer Einzelkolonie wurden 5 ml 100  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Ampicilin enthaltendes LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Mit der Vorkultur wurde eine 1 l 100  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Ampicilin enthaltende LB Hauptkultur inokuliert. Bei Erreichen einer Zelldichte von  $\text{OD}_{600}=0.6$  wurde durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 250  $\mu\text{M}$ ) die Überexpression induziert und über Nacht fortgesetzt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde in Puffer (10 mM Glycin pH 9.5, 50 mM NaCl) resuspendiert und die Zellen durch drei Passagen durch eine French Pressure Cell aufgeschlossen. Unaufgeschlossene Zellen und Membranfragmente wurden in zwei Zentrifugationsschritten entfernt (1. Schritt: 10000 x g, 4°C, 20 min, 2. Schritt: 125.000 x g, 30 min, 4°C). Um Mlc von den restlichen Proteinen zu trennen, wurde das Lysat mit einer GE Äkta Prime durch Anionenaustauschchromatographie (3.5 ml Q-Sepharose FF; Puffer A: 10 mM Glycin pH 9.5; Puffer B: 10 mM Glycin pH 9.5, 1 M NaCl; Stufengradient mit je 20 ml 10%, 15%, 20%, 25%, 35%, 50%, 100% Puffer B) gereinigt. Mittels SDS-PAGE [107] wurde überprüft, in welchen sich Mlc befand. Die Mlc enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mittels Größenausschluss chromatographie (GE Superdex 200 16/60, Puffer: 10 mM Glycin pH 9.5, 300 mM NaCl) weiter aufgereinigt.

## 8.10. Expression und Präparation von membrangebundenem

### gp8-IIB<sup>Glc</sup>

50 ml 100  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Ampicilin und 50  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Kanamycin enthaltendes MMA Medium wurde als Vorkultur mit einer Einzelkolonie JM-G77pTZgp8IIB<sup>Glc</sup> [43] angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit der Vorkultur wurde eine 1 l 100  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Ampicilin und 50  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Kanamycin enthaltende MMA Hauptkultur 1:20 angeimpft und 37°C inkubiert. Um eine gute Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten, wurde die Kultur heftig geschüttelt. Bei dem Erreichen der Zelldichte von  $\text{OD}_{600}=0.6$  wurde durch die Zugabe von 250  $\mu\text{M}$  IPTG die Überexpression induziert. Nach 12 h wurde die Überexpression durch das Ernten der Zellen mittels Zentrifugation beendet. Das Zellpellet einmal mit 0.9 % NaCl-Lösung und zweimal mit Puffer (20 mM HEPES pH 7, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM NaN<sub>3</sub>) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in dem selben Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch mehrere Passagen durch eine French Press aufgeschlossen und unaufgeschlossene Zellen durch Zentrifugation (5000 x g, 4°C, 20 min) abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die Membranfragmente durch Ultrazentrifugation (125.000 x g, 30 min, 4°C) abgetrennt. Das Pellet wurde erneut in Puffer resuspendiert und auf Eis gerührt, bis eine homogene Suspension entstand. Mittels SDS-PAGE wurde bestätigt, dass die Membranpreparation gp8-IIB<sup>Glc</sup> enthält. Weiterhin wurde anhand der SDS-PAGE die Konzentration von gp8-IIB<sup>Glc</sup> abgeschätzt.

## 8.11. Design von DNS Hairpin Strukturen zur Untersuchung der Mlc-DNS Bindung

Basierend auf der von Plumbridge et al. [18] identifizierten Bindestellen BoxP1 und BoxP2 wurden zwei DNS Hairpin Strukturen entworfen. Mit Hilfe des Programms Mfold [92] wurden die Sequenzen in Hinsicht auf mögliche Fehlpaarungen und alternative Strukturen optimiert. Im Fall des BoxP2-Hairpins wurden zur Erhöhung der Stabilität zusätzlich zwei Guanine am Anfang beziehungsweise zwei Cytosine am Ende der Sequenz hinzugefügt.

Tabelle 8.6.: Sequenz der DNS Hairpin. In hervorgehobenen Buchstaben sind die von Plumbridge et al. [18] identifizierten Mlc-Bindestellen dargestellt.

Name	Sequenz
BoxP1-Hairpin	5' <b>TTA TTT TAC TCT GTG TAA TAA ATC</b> CCC AAA AAT TTA TTA CAC AGA GTA AAA TAA 3'
BoxP2-Hairpin	5' GGT <b>TTT TTT AAA GCT CGT AAT TAA TCC</b> CCA TTA ATT ACG AGC TTT AAA AAA ACC 3'

## 8.12. NMR-Messungen

Alle NMR-Messungen wurden auf einem Bruker Avance III 600 Mhz Spektrometer ausgestattet mit einem cryogenen, inversen TCI-H/C/N-Tripleresonanz-Probenkopf durchgeführt. Zur Aufnahme und Auswertung der Spektren wurde die Software Bruker Topspin in den Versionen 2.1 - 3.1 verwendet. Alle in dem Abschnitt **NMR-Messungen** erwähnten wässrigen Puffer enthielten 5 % (v/v) D<sub>2</sub>O, um die *field lock* Funktion nutzen zu können. Für alle durchgeführten NMR Experimente wurde die Temperatur an Hand einer Methanol-Referenzprobe auf 300 K eingestellt. Die Länge des <sup>1</sup>H – 90°-Pulses wurde für jede Probe bestimmt. Im Fall des <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC (Bruker-Pulsprogramm: *hsqcetf3gp* wurde die *excitation sculpting* zur Unterdrückung des Wassersignals eingesetzt. Im Fall des <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N TROSY HSQC (Bruker-Pulsprogramm: *troisyf3gppl9* wurde die *watergate*-Pulssequenz zur Wasserunterdrückung eingesetzt.

### 8.12.1. Zuordnung der chemischen Verschiebungen von IIB<sup>Glc</sup>

Für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen wurden <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC, 3D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC TOCSY und 3D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC NOESY Spektren aufgenommen. Mit Hilfe dieser Spektren

konnten die freundlicher Weise von Cai et al. zur Verfügung gestellten chemischen Verschiebungen übertragen werden.

### 8.12.2. NMR Titration von $^{15}\text{N}$ markiertem IIB<sup>Glc</sup> mit Glk

Für die Titration von isotopenmarkiertem IIB<sup>Glc</sup> mit unmarkierter Glucokinase wurde eine 500  $\mu\text{l}$  IIB<sup>Glc</sup> Probe (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM NaN<sub>4</sub>) mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  vorgelegt und mit einer 1.5 mM Glk Lösung titriert. Glk wurde in 11  $\mu\text{l}$  Schritten bis zum Erreichen einer Konzentration von 166  $\mu\text{M}$  zugegeben. In einem letzten Titrationsschritt wurde die Glk Konzentration auf 333  $\mu\text{M}$  erhöht. Von jedem Schritt der Titration wurde ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Spektrum [108] aufgenommen.

### 8.12.3. Titration von $^{15}\text{N}$ markiertem IIB<sup>Glc</sup> mit paramagnetisch markierter Glk

#### Kupplung des Spinlabels an die Glucokinase

Zu einer 60  $\mu\text{M}$  Glk-Probe in Phosphatpuffer (50 mM NaP<sub>i</sub> pH 7.5, 50 mM NaCl) wurde ein 7-facher Überschuss des Radikals 1-Oxyl-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolin-3-Carboxylat-N-Hydroxy-succinimidester zugegeben. Anschließend wurde die Lösung 2h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nicht an Protein gekuppelte Markierungsreagenz wurde durch einen Pufferwechsel mit Hilfe eines Zentrifugenfilters (MWCO 3kDa) entfernt. Durch ESR-Spektroskopie wurde bestätigt, dass in der Probe nur gebundenes Spinlabel vorliegt.

#### Durchführung der Titration

In einem 5 mm NMR Röhrchen wurden 500  $\mu\text{l}$   $^{15}\text{N}$ -IIB<sup>Glc</sup> mit einer Konzentration in Tris-Puffer (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM NaN<sub>4</sub>) vorgelegt. Die paramagnetisch markierte Glucokinase wurde in 25  $\mu\text{l}$  Schritten in einer Konzentration von 350  $\mu\text{M}$  im gleichen Puffer zugegeben, bis eine Endkonzentration von 90  $\mu\text{M}$  Glk vorlag. Bedingt durch die Verdünnung betrug die Konzentration der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne nach der letzten Zugabe nur noch 78  $\mu\text{M}$ . Nach jedem Titrationsschritt wurden ein 1D  $^1\text{H}$  Spektrum und ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum aufgenommen. Um die Effekte der Verdünnung in der Auswertung berücksichtigen zu können, wurde zu einer identischen IIB<sup>Glc</sup> Probe in gleichen Schritten Puffer zugegeben und jeweils NMR-Spektren aufgenommen.

### 8.12.4. Titration von $^{15}\text{N}$ markierter Glk mit IIB<sup>Glc</sup>

Zu einer 200  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$  Glk Probe (500  $\mu\text{l}$ , 50 mM Tris pH 7.6, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 4 mM NaN<sub>3</sub>) wurde in 25  $\mu\text{l}$  Schritten 2 mM IIB<sup>Glc</sup> Stammlösung zugegeben, bis die Endkonzentration

on von 300 mM IIB<sup>Glc</sup> erreicht wurde. Nach jedem Titrationsschritt wurde ein <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N TROSY HSQC Spektrum [97] mit 40 Scans aufgenommen.

### 8.13. Oberflächenplasmonenresonanz

Alle Oberflächenplasmonenresonanz-Experimente wurden auf einem GE Biacore T100 bei 25 °C mit GE S Series CM5 Sensorchips durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die *Steady state affinity*-Methode unter Annahme eines 1:1 Bindungsmodells mit der GE BIAevaluation Software Version 1.1. Der Auswertung lag folgende Gleichung zu Grunde:

$$RU_{eq} = \frac{[A] \cdot R_{max}}{K_D + [A]} \quad (8.1)$$

#### 8.13.1. Aktivierung der Oberfläche

Zur Aktivierung der Oberfläche des CM5 Sensorchips wurde dieser für 60 sec mit 0.2 M EDC und 0.05 M NHS bei einer Flußrate von 10  $\frac{\mu l}{min}$  inkubiert.

#### 8.13.2. Untersuchung der IIB<sup>Glc</sup>-Glc Interaktion

1  $\mu$ M Glc Lösung in 10 mM Acetat-Puffer pH 4.5 wurde durch Standard Aminkupplung bis zu einer Beladungsdichte von 7.7  $\frac{ng}{mm^2}$  auf einem GE Series S CM5 Chip immobilisiert. Um nicht kovalent gebundene Glc von der Chipoberfläche zu entfernen, wurde ein geringer Fluss angelegt, bis kein Massenverlust mehr beobachtet werden konnte. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde IIB<sup>Glc</sup> mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in einer Konzentrationsreihe von 12.8  $\mu$ M bis 839  $\mu$  in Laufpuffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM DTT) mit einer Flußrate von 10  $\frac{\mu l}{min}$  verwendet. Zur Regeneration der Chipoberfläche wurde 2 M NaCl verwendet.

#### 8.13.3. Untersuchung der IIB<sup>Glc</sup>-Mlc Interaktion

Als Laufpuffer für diese Interaktionsstudien wurde 10 mM HEPES pH 7.2, 150 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.005 % (v/v) Tween 20 mit einer Flußrate von 10  $\frac{\mu l}{min}$  verwendet.

#### Immobilisiertes Mlc

Zur Immobilisierung mittels Aminkupplung auf einem GE Series S CM5 Chip wurde eine 2  $\mu$ M Mlc Lösung in 10 mM Acetat-Puffer bei pH 5 verwendet. Für die Untersuchung der Affinität zu der IIB<sup>Glc</sup>-Domäne wurde auf einer Flußzelle des Biacore Chips Mlc mit einer Beladungsdichte

von  $1.9 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$  immobilisiert. Die Dissoziationskonstanten für diese Wechselwirkung mit IIB<sup>Glc</sup> mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag wurden durch zwei unabhängige Verdünnungsreihen von 3 nM bis 50  $\mu\text{M}$  bestimmt.

#### **Immobilisiertes IIB<sup>Glc</sup>**

Zur Untersuchung der Aviditätseffekte wurde die lösliche IIB<sup>Glc</sup>-Domäne mittels Aminkupplung auf einem GE Series S CM5 Chip immobilisiert. Dazu wurde 5.7  $\mu\text{M}$  IIB<sup>Glc</sup> in 10 mM Acetatpuffer pH 4.5 über die aktivierte Oberfläche des Biacore Chips geleitet. Für diesen Versuch wurde IIB<sup>Glc</sup> in drei unterschiedlichen Beladungsdichten ( $3.1 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$ ,  $0.57 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$  und  $0.1 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$ ) immobilisiert. Für diesen SPR-Versuch wurde eine Verdünnungsreihe von 244 pM bis 2  $\mu\text{M}$  Mlc verwendet. Die Dissoziationskonstante dieser Interaktion wurde mit Hilfe der *Steady state affinity*-Methode im GE BIAevaluation Programm bestimmt.

#### **8.13.4. Untersuchung der Mlc-DNS Interaktionen**

Zur Immobilisierung mittels Aminkupplung auf einem GE Series S CM5 Chip wurde eine 2  $\mu\text{M}$  Mlc Lösung in 10 mM Acetat-Puffer bei pH 5 verwendet. Für die Untersuchung der Affinität von Mlc zu den DNS-Hairpins BoxP1 und BoxP2 wurde auf zwei Flußzellen eines Biacore Chips wurde Mlc mit unterschiedlichen Beladungsdichten ( $10 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$  und  $2.9 \frac{\text{ng}}{\text{mm}^2}$ ) immobilisiert. Die Dissoziationskonstanten für diese Wechselwirkung wurden durch eine Konzentrationsreihe von 37 pM bis 150 nM für BoxP1 beziehungsweise 0.7 nM bis 3  $\mu\text{M}$  für BoxP2 bestimmt. Um Fehler auszuschließen wurde die Konzentrationsreihen je zweimal separat angesetzt und zur Bestimmung der Dissoziationskonstante verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die *Steady state affinity*-Methode mit der GE BIAevaluation Software.

### **8.14. Titrationskalorimetrie**

Für alle Titrationsversuche wurde der gleiche Puffer (20 mM HEPES pH 7.2, 137 mM NaCl, 0.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM KCl, 4 mM NaN<sub>4</sub>) verwendet. Alle Versuche wurden an einem MicroCal iTC200 Gerät bei 25 °C und unter konstantem Rühren (1000 rpm) durchgeführt.

#### **8.14.1. Untersuchung der Mlc-DNS Wechselwirkung**

Um zu verhindern, dass andere Formen neben der erwünschten Hairpin-Struktur vorliegen, wurde die DNS-Probe vor jedem Versuch im Wasserbad für 5 min auf 80 °C erhitzt und anschließend auf Eis gegeben. Für die Titration von Mlc mit dem Hairpin BoxP1 wurden 200  $\mu\text{l}$  Mlc-Lösung

mit einer Konzentration von  $17.5 \mu\text{M}$  vorgelegt und  $40 \mu\text{l}$  BoxP1 Lösung ( $200 \mu\text{M}$ ) in 16 Injektionsschritten zugegeben (1. Injektion:  $0.2 \mu\text{l}$  in 0.4 sec, 2.-16. Injektion:  $2.5 \mu\text{l}$  in 5 sec). Für die Interaktionsstudie mit dem Hairpin BoxP2 wurde Mlc in einer Konzentration von  $15 \mu\text{M}$  vorgelegt und mit dem Hairpin BoxP2 ( $200 \mu\text{M}$ , 16 Injektionen, 1. Injektion:  $0.2 \mu\text{l}$  in 0.4 sec, 2.-16. Injektion:  $2.5 \mu\text{l}$  in 5 sec).

#### **8.14.2. Titration von Mlc mit dem Hairpin BoxP2 in Anwesenheit von IIB<sup>Glc</sup>**

Die Mlc-BoxP2 Interaktion wurde unter identischen Bedingungen (Kap. 8.14.1) in Anwesenheit eines 2.5-fachen Überschuss an IIB<sup>Glc</sup> ( $37.5 \mu\text{M}$ ) in der Messzelle wiederholt.

#### **8.14.3. Untersuchung der Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion**

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion in Lösung wurde  $30 \mu\text{M}$  Mlc in der Messzelle des Microcal iTC 200 vorgelegt. Zu der Mlc Lösung wurden in 20 Injektion (1. Injektion:  $0.2 \mu\text{l}$  in 0.4 sec, 2.-20. Injektion:  $2 \mu\text{l}$  in 4 sec) unter Rühren (1000 rpm)  $296 \mu\text{M}$  IIB<sup>Glc</sup> zugegeben. Um die Vergleichbarkeit zu der Interaktionsstudien mit Oberflächenplasmonenresonanz zu gewährleisten, wurde dieser Versuch ebenfalls bei  $25^\circ\text{C}$  durchgeführt.

#### **8.14.4. Titration von Mlc mit IIB<sup>Glc</sup> in Anwesenheit von dem Hairpin BoxP1**

Die Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion wurde unter identischen Bedingungen (Kap. 8.14.3) in Anwesenheit eines 5-fachen Überschuss an IIB<sup>Glc</sup> ( $150 \mu\text{M}$ ) in der Messzelle wiederholt.

#### **8.14.5. Titration von Membranvesikeln mit Mlc**

In der Messzelle des iTC200 wurden JM-G77 Membranvesikel-präparationen mit überexprimiertem gp8-IIB<sup>Glc</sup> in verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:3, 1:15, 1:30) vorgelegt und mit  $20 \mu\text{l}$  Mlc ( $175 \mu\text{M}$ ) titriert (1. Injektion:  $0.2 \mu\text{l}$  in 0.4 sec, 2.-16. Injektion:  $2.5 \mu\text{l}$  in 5 sec). Als Negativkontrolle wurde eine Membranvesikelpräparation eines JM-G77 Stammes verwendet, der nicht über das pTZgp8IIB-Plasmid verfügt.

#### **8.14.6. Titration von Mlc mit dem Hairpin BoxP2 in Anwesenheit von Membranvesikeln**

Zur Untersuchung des Einflusses der gp8-IIB<sup>Glc</sup> enthaltende Membranvesikel auf die Mlc-DNS Interaktion wurde eine 1:1 Verdünnung der Membranvesikel-Präparation, die Mlc in einer Konzentration von  $23.5 \mu\text{M}$  enthalten, vorgelegt und wurde mit  $40 \mu\text{l}$  des Hairpins BoxP2 ( $150 \mu\text{M}$ )

in 16 Schritten (1. Injektion: 0.2  $\mu\text{l}$  in 0.4 sec, 2.-16. Injektion: 2.5  $\mu\text{l}$  in 5 sec) zutitriert. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Versuch mit JM-G77 Membranvesikeln ohne überexprimiertem gp8-IIB<sup>Glc</sup> durchgeführt.

#### 8.14.7. Datenauswertung

Alle Daten wurden mit der von Microcal modifizierten Version des Programms *Origin* unter Annahme eines *single set of identical binding sites* Modells ausgewertet. Die Ermittlung der Parameter  $\Delta H$ ,  $n$  und  $K_a$  erfolgte iterativ mit Hilfe folgender Zusammenhänge:

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[ \frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (8.2)$$

Mit:

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[ 1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left( 1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (8.3)$$

## Literaturverzeichnis

- [1] G. Bertani, Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems., *J Bacteriol* **2004**(Feb), 186(3), 595–600.
- [2] W. Kundig, S. Ghosh, S. Roseman, Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase-system, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1964**(Oct), 52, 1067–1074.
- [3] P. W. Postma, J. W. Lengeler, G. R. Jacobson, Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria., *Microbiol Rev* **1993**(Sep), 57(3), 543–594.
- [4] A. Reizer, G. M. Pao, M. Saier, Jr Evolutionary relationships among the permease proteins of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. Construction of phylogenetic trees and possible relatedness to proteins of eukaryotic mitochondria., *J Mol Evol* **1991**(Aug), 33(2), 179–193.
- [5] R. Beutler, M. Kaufmann, F. Ruggiero, B. Erni, The glucose transporter of the Escherichia coli phosphotransferase system: linker insertion mutants and split variants., *Biochemistry* **2000**(Apr), 39(13), 3745–3750.
- [6] A. Buhr, B. Erni, Membrane topology of the glucose transporter of Escherichia coli., *J Biol Chem* **1993**(Juni), 268(16), 11599–11603.
- [7] B. Erni, Glucose-specific permease of the bacterial phosphotransferase system: phosphorylation and oligomeric structure of the glucose-specific IIGlc-IIIIGlc complex of Salmonella typhimurium, *Biochemistry* **1986**, 25(2), 305-312.
- [8] R. Lanz, B. Erni, The Glucose Transporter of the *Escherichia coli* Phosphotransferase System: mutant analysis of the invariant arginines, histidines, and domain linker, *J Biol Chem* **1998**, 273(20), 12239–12243.
- [9] M. Meins, B. Zanolari, J. Rosenbusch, B. Erni, Glucose permease of *Escherichia coli*. Purification of the IIGlc subunit and functional characterization of its oligomeric forms., *J Biol Chem* **1988**, 263(26), 12986–12993.

- [10] U. Waeber, A. Buhr, T. Schunk, B. Erni, The glucose transporter of *Escherichia coli*: Purification and characterization by Ni<sup>+</sup> chelate affinity chromatography of the IIBC<sup>Glc</sup> subunit, *FEBS letters* **1993**, 324(1), 109–112.
- [11] A. Buhr, K. Flükiger, B. Erni, The glucose transporter of *Escherichia coli*. Overexpression, purification, and characterization of functional domains, *J Biol Chem* **1994**(Sept.), 269(38), 23437–23443.
- [12] M. Eberstadt, S. G. Grdadolnik, G. Gemmecker, H. Kessler, A. Buhr, B. Erni, Solution structure of the IIB domain of the glucose transporter of *Escherichia coli*, *Biochemistry* **1996**(Sept.), 35(35), 11286–11292.
- [13] G. Gemmecker, M. Eberstadt, A. Buhr, R. Lanz, S. G. Grdadolnik, H. Kessler, B. Erni, Glucose transporter of *Escherichia coli*: NMR characterization of the phosphocysteine form of the IIB<sup>Glc</sup> domain and its binding interface with the IIA<sup>Glc</sup> subunit, *Biochemistry* **1997**(Juni), 36(24), 7408–7417.
- [14] M. Cai, J. Williams, G. Wang, B. R. Lee, A. Peterkofsky, G. M. Clore, Solution structure of the phosphoryl transfer complex between the signal-transducing protein IIA<sup>Glc</sup> and the cytoplasmic domain of the glucose transporter IICB<sup>Glc</sup> of the *Escherichia coli* glucose phosphotransferase system, *J Biol Chem* **2003**(Juli), 278(27), 25191–25206.
- [15] J. Zhuang, R. Gutknecht, K. Flükiger, L. Hasler, B. Erni, A. Engel, Purification and electron microscopic characterization of the membrane subunit (IICB<sup>Glc</sup>) of the *Escherichia coli* glucose transporter, *Arch Biochem Biophys* **1999**(Dez.), 372(1), 89–96.
- [16] H. Kawamoto, T. Morita, A. Shimizu, T. Inada, H. Aiba, Implication of membrane localization of target mRNA in the action of a small RNA: mechanism of post-transcriptional regulation of glucose transporter in *Escherichia coli*., *Genes Dev* **2005**(Feb), 19(3), 328–338.
- [17] J. Plumbridge, Expression of the phosphotransferase system both mediates and is mediated by Mlc regulation in *Escherichia coli*., *Mol Microbiol* **1999**(Jul), 33(2), 260–273.
- [18] J. Plumbridge, Expression of ptsG, the gene for the major glucose PTS transporter in *Escherichia coli*, is repressed by Mlc and induced by growth on glucose, *Mol Microbiol* **1998**(Aug.), 29(4), 1053–1063.
- [19] K. Kimata, H. Takahashi, T. Inada, P. Postma, H. Aiba, cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*., *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**(Nov), 94(24), 12914–12919.

- [20] K. Kimata, T. Inada, H. Tagami, H. Aiba, A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the ptsG gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli.*, *Mol Microbiol* **1998**(Sept.), 29(6), 1509–1519.
- [21] D. Shin, S. Lim, Y. J. Seok, S. Ryu, Heat shock RNA polymerase (E  $\sigma^{32}$ ) is involved in the transcription of mlc and crucial for induction of the Mlc regulon by glucose in *Escherichia coli.*, *J Biol Chem* **2001**(Jul), 276(28), 25871–25875.
- [22] J.-Y. Jeong, Y.-J. Kim, N. Cho, D. Shin, T.-W. Nam, S. Ryu, Y.-J. Seok, Expression of ptsG encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli.*, *J Biol Chem* **2004**(Sep), 279(37), 38513–38518.
- [23] D. Georgellis, O. Kwon, E. C. Lin, Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria., *Science* **2001**(Jun), 292(5525), 2314–2316.
- [24] K. Kimata, Y. Tanaka, T. Inada, H. Aiba, Expression of the glucose transporter gene, ptsG, is regulated at the mRNA degradation step in response to glycolytic flux in *Escherichia coli*, *EMBO J* **2001**(Juli), 20(13), 3587–3595.
- [25] K. Hosono, H. Kakuda, S. Ichihara, Decreasing accumulation of acetate in a rich medium by *Escherichia coli* on introduction of genes on a multicopy plasmid., *Biosci Biotechnol Biochem* **1995**(Feb), 59(2), 256–261.
- [26] F. Titgemeyer, J. Reizer, A. Reizer, M. Saier, Jr Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria., *Microbiology* **1994**(Sep), 140 (Pt 9), 2349–2354.
- [27] H. L. Kornberg, R. E. Reeves, Inducible phosphoenolpyruvate-dependent hexose phosphotransferase activities in *Escherichia coli.*, *Biochem J* **1972**(Aug), 128(5), 1339–1344.
- [28] M. Saier, Jr B. U. Feucht, L. J. Hofstadter, Regulation of carbohydrate uptake and adenylate cyclase activity mediated by the enzymes II of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in *Escherichia coli.*, *J Biol Chem* **1976**(Feb), 251(3), 883–892.
- [29] B. Erni, B. Zanolari, Glucose-permease of the bacterial phosphotransferase system. Gene cloning, overproduction, and amino acid sequence of enzyme II<sup>Glc</sup>., *J Biol Chem* **1986**(Dec), 261(35), 16398–16403.
- [30] J. Plumbridge, Control of the expression of the manXYZ operon in *Escherichia coli*: Mlc is a negative regulator of the mannose PTS, *Mol Microbiol* **1998**(Jan.), 27(2), 369–380.

- [31] K. Decker, J. Plumbridge, W. Boos, Negative transcriptional regulation of a positive regulator: the expression of malT, encoding the transcriptional activator of the maltose regulon of *Escherichia coli*, is negatively controlled by Mlc, *Mol Microbiol* **1998**(Jan.), 27(2), 381–390.
- [32] S. Y. Kim, T. W. Nam, D. Shin, B. M. Koo, Y. J. Seok, S. Ryu, Purification of Mlc and analysis of its effects on the pts expression in *Escherichia coli*, *J Biol Chem* **1999**(Sept.), 274(36), 25398–25402.
- [33] S. J. Curtis, W. Epstein, Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase., *J Bacteriol* **1975**(Juni), 122(3), 1189–1199.
- [34] H. L. Kornberg, M. C. Jones-Mortimer, PtsX: a gene involved in the uptake of glucose and fructose by *Escherichia coli*., *FEBS Lett* **1975**(Mar), 51(1), 1–4.
- [35] J. Plumbridge, A. Kolb, CAP and Nag repressor binding to the regulatory regions of the nagE-B and manX genes of *Escherichia coli*., *J Mol Biol* **1991**(Feb), 217(4), 661–679.
- [36] J. A. Plumbridge, Sequence of the nagBACD operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the nag regulon., *Mol Microbiol* **1989**(Apr), 3(4), 505–515.
- [37] A. P. Vogler, J. W. Lengeler, Comparison of the sequences of the nagE operons from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K12: enhanced variability of the enzyme IIN-acetylglucosamine in regions connecting functional domains., *Mol Gen Genet* **1991**(Nov), 230(1-2), 270–276.
- [38] K. G. Peri, H. Goldie, E. B. Waygood, Cloning and characterization of the N-acetylglucosamine operon of *Escherichia coli*, *Biochem Cell Biol* **1990**, 68(1), 123–137.
- [39] J. Plumbridge, Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc, *Curr Opin Microbiol* **2002**(Apr.), 5(2), 187–193.
- [40] S. J. Lee, W. Boos, J. P. Bouché, J. Plumbridge, Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*, *EMBO J* **2000**(Okt.), 19(20), 5353–5361.
- [41] T. W. Nam, S. H. Cho, D. Shin, J. H. Kim, J. Y. Jeong, J. H. Lee, J. H. Roe, A. Peterkofsky, S. O. Kang, S. Ryu, Y. J. Seok, The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB<sup>Glc</sup> recruits the global repressor Mlc, *EMBO J* **2001**(Feb.), 20(3), 491–498.

- [42] Y. Tanaka, K. Kimata, H. Aiba, A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc, *EMBO J* **2000**(Okt.), 19(20), 5344–5352.
- [43] S. Seitz, S.-J. Lee, C. Pennetier, W. Boos, J. Plumbridge, Analysis of the interaction between the global regulator Mlc and EIIB<sup>Glc</sup> of the glucose-specific phosphotransferase system in *Escherichia coli*., *J Biol Chem* **2003**(Mar), 278(12), 10744–10751.
- [44] S. Seitz, *Analyse der transportgesteuerten Genregulation anhand des Mlc-PtsG-Systems von Escherichia coli*, **2005**.
- [45] A. Schiefner, K. Gerber, S. Seitz, W. Welte, K. Diederichs, W. Boos, The crystal structure of Mlc, a global regulator of sugar metabolism in *Escherichia coli*., *J Biol Chem* **2005**(Aug.), 280(32), 29073–29079.
- [46] T.-W. Nam, H. I. Jung, Y. J. An, Y.-H. Park, S. H. Lee, Y.-J. Seok, S.-S. Cha, Analyses of Mlc-IIB<sup>Glc</sup> interaction and a plausible molecular mechanism of Mlc inactivation by membrane sequestration., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**(mar), 105(10), 3751–3756.
- [47] M. Lewis, G. Chang, N. C. Horton, M. A. Kercher, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan, P. Lu, Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer., *Science* **1996**(Mar), 271(5253), 1247–1254.
- [48] C. A. Spronk, M. Slijper, J. H. van Boom, R. Kaptein, R. Boelens, Formation of the hinge helix in the lac repressor is induced upon binding to the lac operator., *Nat Struct Biol* **1996**(Nov), 3(11), 916–919.
- [49] C. G. Kalodimos, A. M. J. J. Bonvin, R. K. Salinas, R. Wechselberger, R. Boelens, R. Kaptein, Plasticity in protein-DNA recognition: lac repressor interacts with its natural operator O1 through alternative conformations of its DNA-binding domain., *EMBO J* **2002**(Jun), 21(12), 2866–2876.
- [50] S. S. Cohen, Gluconokinase and the oxidative path of glucose-6-phosphate utilization., *J Biol Chem* **1951**(Apr), 189(2), 617–628.
- [51] S. S. Cohen, S. S. D. B. M. Scott, Gluconokinase and the oxidative path for glucose-6-phosphate utilization., *Nature* **1950**(Nov), 166(4227), 781–782.
- [52] V. V. Lunin, Y. Li, J. D. Schrag, P. Iannuzzi, M. Cygler, A. Matte, Crystal structures of *Escherichia coli* ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose., *J Bacteriol* **2004**(Okt.), 186(20), 6915–6927.

- [53] R. E. Huber, J. Lytton, E. B. Fung, Efflux of beta-galactosidase products from *Escherichia coli.*, *J Bacteriol* **1980**(Feb), 141(2), 528–533.
- [54] A. Buhr, G. A. Daniels, B. Erni, The glucose transporter of *Escherichia coli*. Mutants with impaired translocation activity that retain phosphorylation activity, *J Biol Chem* **1992**(Feb.), 267(6), 3847–3851.
- [55] M. Rimmele, W. Boos, Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli.*, *J Bacteriol* **1994**(Sep), 176(18), 5654–5664.
- [56] C. Lengsfeld, S. Schönert, R. Dippel, W. Boos, Glucose- and glucokinase-controlled mal gene expression in *Escherichia coli.*, *J Bacteriol* **2009**(Feb.), 191(3), 701–712.
- [57] E. Krissinel, K. Henrick, Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**(Dec), 60(Pt 12 Pt 1), 2256–2268.
- [58] C. Lengsfeld, Regulation von ABC-Transportern in *Escherichia coli* und *Thermus thermophilus*, **2009**, 1–193.
- [59] T. Escherich, *Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung*, von Dr Theodor Escherich, F. Enke: **1886**.
- [60] F. W. Studier, B. A. Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes., *J Mol Biol* **1986**(May), 189(1), 113–130.
- [61] P. R. L. Markwick, T. Malliavin, M. Nilges, Structural Biology by NMR: Structure, Dynamics, and Interactions, *PLoS Comput Biol* **2008**(09), 4(9), e1000168.
- [62] P. Zeeman, The Effect of Magnetisation on the Nature of Light Emitted by a Substance, *Nature* **1897**(Feb.), 55, 347.
- [63] P. Zeeman, VII. Doublets and triplets in the spectrum produced by external magnetic forces, *Phil M* **1897**, 44(266), 55-60.
- [64] R. L. Vold, R. R. Vold, Nuclear magnetic relaxation in coupled spin systems, *Prog Nucl Mag Res Sp* **1978**, 12(2), 79 - 133.
- [65] M. Gueron, J. L. Leroy, R. H. Griffey, Proton nuclear magnetic relaxation of nitrogen-15-labeled nucleic acids via dipolar coupling and chemical shift anisotropy, *J Am Chem Soc* **1983**, 105(25), 7262-7266.

- [66] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229-2246.
- [67] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy, *Chemical Physics Letters* **1980**, *69*(1), 185 - 189.
- [68] M. Pellecchia, D. L. Montgomery, S. Y. Stevens, C. W. Vander Kooi, H. P. Feng, L. M. Gierasch, E. R. Zuiderweg, Structural insights into substrate binding by the molecular chaperone DnaK., *Nat Struct Biol* **2000**(Apr), *7*(4), 298–303.
- [69] E. R. P. Zuiderweg, Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy., *Biochemistry* **2002**(Jan), *41*(1), 1–7.
- [70] M. P. Williamson, Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding, *Prog Nucl Mag Res Sp* **2013**(Aug), *73*, 1-16.
- [71] A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W. H. Freeman and Company: **1998**.
- [72] W. Jahnke, Spin labels as a tool to identify and characterize protein–ligand interactions by NMR spectroscopy, *ChemBioChem* **2002**, *3*(2-3), 167–173.
- [73] A. W. Overhauser, Polarization of nuclei in metals, *Phys Rev* **1953**, *92*(2), 411.
- [74] F. Anet, A. Bourn, Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects, *J Am Chem Soc* **1965**, *87*(22), 5250–5251.
- [75] I. Solomon, Relaxation processes in a system of two spins, *Phys Rev* **1955**, *99*(2), 559.
- [76] N. Bloembergen, L. Morgan, Proton relaxation times in paramagnetic solutions. Effects of electron spin relaxation, *J Chem Phys* **1961**, *34*(3), 842–850.
- [77] X. D. Hoa, A. G. Kirk, M. Tabrizian, Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress, *Biosens Bioelectron* **2007**(Sep), *23*(2), 151-60.
- [78] D. G. Myszka, M. D. Jonsen, B. J. Graves, Equilibrium analysis of high affinity interactions using BIACORE, *Anal Biochem* **1998**(Dec), *265*(2), 326-30.
- [79] T. Turbadar, Complete Absorption of Light by Thin Metal Films, *Proc Phys Soc* **1959**, *73*(1), 40.
- [80] H. Meyer, Surface Plasmon Resonance, *BIOspektrum* **2002**, *8*, 532–535.

- [81] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins, *J Colloid Interface Sci* **1991**, 143(2), 513 - 526.
- [82] B. Johnsson, S. Löfås, G. Lindquist, Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors., *Anal Biochem* **1991**(Nov), 198(2), 268–277.
- [83] D. J. O’Shannessy, M. Brigham-Burke, K. K. Sonesson, P. Hensley, I. Brooks, Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods., *Anal Biochem* **1993**(Aug), 212(2), 457–468.
- [84] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L. N. Lin, Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter., *Anal Biochem* **1989**(May), 179(1), 131–137.
- [85] S. Leavitt, E. Freire, Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry., *Curr Opin Struct Biol* **2001**(Oct), 11(5), 560–566.
- [86] G. Praefcke, C. Herrmann, Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen, *BIOspektrum* **2005**, 11(1), 44–47.
- [87] D. Meyer, C. Schneider-Fresenius, R. Horlacher, R. Peist, W. Boos, Molecular characterization of glucokinase from *Escherichia coli* K-12, *J Bacteriol* **1997**(Feb.), 179(4), 1298–1306.
- [88] T. N. Belev, M. Singh, J. E. G. McCarthy, A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*, *Plasmid* **1991**, 26(2), 147–150.
- [89] F. Baneyx, G. Georgiou, Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates in vivo., *J Bacteriol* **1991**(Apr), 173(8), 2696–2703.
- [90] B. J. Bachmann, Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12., *Bacteriol Rev* **1972**(Dec), 36(4), 525–557 W3110 Referenz.
- [91] K. Gerber, W. Boos, W. Welte, A. Schiefner, Crystallization and preliminary X-ray analysis of Mlc from *Escherichia coli*., *Acta Cryst* **2005**(Feb.), 61(Pt 2), 183–185.
- [92] M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction., *Nucleic Acids Res* **2003**(Jul), 31(13), 3406–3415.

- [93] B. Görke, B. Rak, Efficient transcriptional antitermination from the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane., *J Mol Biol* **2001**(Apr), 308(2), 131–145.
- [94] S. Brinkers, H. R. C. Dietrich, F. H. de Groote, I. T. Young, B. Rieger, The persistence length of double stranded DNA determined using dark field tethered particle motion., *J Chem Phys* **2009**(Jun), 130(21), 215105.
- [95] J. F. Marko, S. Cocco, The micromechanics of DNA, *Phys. World* **2003**, 16, 37–41.
- [96] S. Oehler, E. R. Eismann, H. Krämer, B. Müller-Hill, The three operators of the lac operon cooperate in repression, *EMBO J* **1990**(Apr), 9(4), 973-9.
- [97] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**(Nov.), 94(23), 12366–12371.
- [98] Schrödinger, LLC, Unpublished data.
- [99] Schrödinger, LLC, Unpublished data.
- [100] Schrödinger, LLC, Unpublished data.
- [101] D. Fraenkel, B. Horecker, Pathways of D-glucose metabolism in *Salmonella typhimurium*, *J Biol Chem* **1964**, 239(9), 2765–2771.
- [102] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, J. Messing, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors., *Gene* **1985**, 33(1), 103–119.
- [103] G. Bertani, Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*., *J Bacteriol* **1951**(Sep), 62(3), 293–300.
- [104] “The QIAexpressionist - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins”, 2003.
- [105] “QIAprep Miniprep Handbook”, 2006.
- [106] M. R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, D. F. Hochstrasser, Protein identification and analysis tools in the ExPASy server., *Methods Mol Biol* **1999**, 112, 531–552.

- [107] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature* **1970**(Aug), 227(5259), 680–685.
- [108] A. L. Davis, J. Keeler, E. D. Laue, D. Moskau, Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients, *J Mag Res* (1969) **1992**, 98(1), 207 - 216.

# A. Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden von GATC, Konstanz, durchgeführt. In rot unterlegt sind die Bereiche der Sequenzierung, die mit dem entsprechenden Gen übereinstimmen. Unter „Bestätigte Proteinsequenz“ sind die Bereiche grün unterlegt, die durch die Sequenzierung einwandfrei bestätigt wurden. Blau markiert sind die Bereiche, die durch Primer abgedeckt werden.

## A.1. Plasmid p\$1

**Forward-Primer:** ATGACAAAGTATGCATTAGTCG

**Sequenz:**

```
1  NGGGGGGCAG CCGTCTTGCT CGTGTGAATM GCCAGTGGTG AAATCTCGCA
51  GGCTAAGACC TATTCAGGGC TTGATTACCC CAGCCTCGAA GCGGTCATTC
101 GCGTTTATCT TGAAGAACAAT AAGGTCGAGG TGAAAGACGG CTGTATTGCC
151 ATCGCTTGCC CAATTACCGG TGACTGGGTG GCGATGACCA ACCATACCTG
201 GGCCTTCTCA ATTGCCGAAA TGAAAAAGAA TCTCGGTTTT AGCCATCTGC
251 AAATTATTAA CGATTTTACC GCTGTATCGA TGGCGATCCC GATGCTGAAA
301 AAAGAGCATC TGATTACAGT TGGTGGCGCA GAACCGGTCC AAGGTAAGCC
351 TATTGCGGT TACGGTGCCG GAACGGGGCT TGGGGTTGCC CATCTGGTCC
401 ATGTCGATAA GCGTTGGGTA AGCTTGCCAC GCGAAGGCGC TCACGTTGAT
451 TTGCGCCGA ATAGTGAAGA AGAGGCCATT ATCCTCGAAA TATTGCGTGC
501 GGAAATTGGT CATGTTTCGG CGGAGCGCGT GCTTTCIGGC CCTGGGCTGG
551 TGAATTTGTA TCGCGCAAT TGTAAAAGCT ACAACCGCCT GCCAGAAAAI
601 CTCAAGCCAA AAGATATTAC CGAACGCGCC CTGGCTGACA GCTGCACCGA
651 TTGCCGCCGC GCATTGTCGC TGTTTTGCGT CATTATGGGC CGTTTTGGCC
701 GCAATCTGGC GCTCAATCTC GGGACATTTG GCGGCGTGT TATTGCGGGC
751 GGTATCGTGC CGCGCTTCCT TGAGTTCTTC AAAGCCTCCG GTTTCGGTGC
801 CGCATTTGAA GATAAAGGGC GCTTTAAAGA ATATGTCCAT GATATTCCGC
851 TGTATCTCAT CGTCCATGAC AATCCGGGCC TTCTCGGTTG CGGTGCACAT
901 TTACGCCAGA CCTTAGGTCA CATTCTGTAA ATCCTTCCTT TTATATCGGG
```

951 AGGTAACTCT CCGATAATC TTTTAAATCA TACAGTTTAT TCAATTTTTTC  
 1001 TTTGTGTCCC CTCACAAGGT CGACAATCGC GTCTAGAGCC CGACGCGCTG  
 1051 GGCTACGTCT TGCTGGCGTT CGCTAAACAA CTTTCAACAG TTTTACGCGGA  
 1101 ATAGATATAG AAAGGGAACA CTTAAAGGAA TTGGCAATAA TAATTTTTT

**Reverse-Primer:** TTACAGAATGTGACCTAAGG

**Sequenz:**

1 NGGGAGGCTT TGCCACCAT GAATGTGACG CTTTTAAAAA TTAAGCCCTG  
 51 AAGAAGTGCT AGCATTCAAA GCAGAAGGCT TTGGGGTGTG TGATACGAAA  
 101 CGAAGCATTG GCGCCTCGAG TAATTTACCA AACTACTAC GTTTTAACTG  
 151 AAACAACTG GAGACTCATA TGACAAAGTA TGCATTAGTC GGTGATGTGG  
 201 GCGGCACCAA CGCAAGTCTT GCTCTGTGTG ATATTGCCAG TGGTGAAAATC  
 251 TCGCAGGCTA AGACCTATTC AGGGCTTGAT TACCCAGCC TCGAAGCGGT  
 301 CATTGCGCTT TATCTTGAAG AACATAAGGT CGAGGTGAAA GACGGCTGTA  
 351 TTGCCATCGC TTGCCCAATT ACCGGTGACT GGGTGGCGAT GACCAACCAT  
 401 ACCTGGGCGT TCTCAATTGC CGAAATGAAA AAGAATCTCG GTTTTAGCCA  
 451 TCTGGAAATT ATTAACGATT TTACCGCTGT ATCGATGGCC ATCCCGATGC  
 501 TGAATAAAGA GCATCTGATT CAGTTTGGTG GCGCAGAACC GGTGGAAGGT  
 551 AAGCCTATTG CGGTTTACGG TGCCGGAACC GGGCTTGGGG TTGCGCATCT  
 601 GGTCCATGTC GATAAGCGTT GGGTAAGCTT GCCAGGCGAA GGCGGTCACC  
 651 TTGATTTTGC GCCGAATAGT GAAGAAGAGC CCATTATCCT CGAAATATTG  
 701 CGTGCGGAAA TTGGTCATGT TTCGGCGGAG CGCGTGCTTT CTGGCCCTGG  
 751 GCTGGTGAAI TTGTATCGCG CAATTGTGAA AGCTGACAAO CGCCTGCCAG  
 801 AAAATCTCAA GCCAAAAGAT ATTACCGAAC GCGCGCTGGC TGACAGCTGC  
 851 ACCGATTGCC GCCGCGCATT GTCGCTGTTT TCGGTCATTA TGGGCCGTTT  
 901 TGGCGGCAAT CTGGCGCTCA ATCTCGGGAC ATTTGGCGGC GTGTTTATTC  
 951 CGGGCGGTAT CGTGCCGCGC TTCCTTGAGT TCTTCAAAGC CTCCGGTTTC  
 1001 CGTGCCGCAI TTGAAGATAA AGGGCGCTTT AAAGAATATC TCCATGATAI  
 1051 TCCGGTGATC TCATCGTCCA GACAATCCGG CCTCTCGTCC GGCCTGC

**Bestätigte Proteinsequenz:**

1 MTKYALVGDV GGTNARLALC DIASGEISQA KTYSGLDYPS LEAVIRVYLE  
 51 EHKVEVKDGC LAIACPIITGD WVAMTNHTWA FSI AEMKKNL GFSHLEIIND  
 101 FTAVSMAIPM LKKEHLIQFG GAEPVEGKPI AVYGAGTGLG VAHLVHVDKR

151 **WVSLPGEEGH VDFAPNSEEH ATILEILRAE IGHVSAERV I SGPGLVNL YR**  
 201 **AIVKADNRLP ENLKPKDITE RALADSC TDC RRALSIFCV I MGRFEGGNLA I**  
 251 **NLGTEGGVF I AGGIVPRFLE FFKASGFRAA FEDKGRFKEY VHDIPVYLIV**  
 301 **HDNPGLTGSG AHLRQTLGHI I**

## A.2. Plasmid pJBH

**Primer:** CGGATAACAATTTACACAG

### Sequenz:

1 AATCGGGCTC GGTACCCGCG TGAGACGTAA AAAAAGCACC CATACTCAGG  
 51 AGCACTCTCA ATTGTG **TTA AGAATGAAGA TGCAAAAAGCG ACAGGTACCA**  
 101 **GCGAAATGGC ACCGGCTCTG GTTGCTGCAI TTGGTGGTAA AGAAAAACAT I**  
 151 **ACTAACCTCG ACGCATGTAT TACCCGCTCG CGCGTCAGCC TTGCTGATGI**  
 201 **GTCTAAAGTC GATCAGGCCG GCCTGAAGAA ACTGGGCGCA GCGGGCGTAC**  
 251 **TGGTTGCTGG TTCTGGTGT I** GAGGAAATAT TCGGTATTTA ATTGGATAAC  
 301 TTGATGCCCG ATACAGCTGA TGACATGTAG ATGTTCCGAT CCAGATCTCC  
 351 AACTTTTAC ACAATTTTAC CCTGGTGTTT TAGGACACCC ACCCTGACCT  
 401 TCGAGCTATT TGCAGGGCTG TCACTCTTTC CGGGGAGTTT TTCTCTGTGA  
 451 ACATCTTAAA AAAAAATCAA AGCCTCCTGA TGTTTCGTTT CCTCGCGCGC  
 501 ACTTTATACC TAT

### Bestätigte Proteinsequenz:

1 M **EKNEDAKAT GTSEMAPALV AAFGGKEN I NLDACLTRLR VSVADVSKVD**  
 51 **QAGLKKLGAA S VVVAGSGV Q** AIFGTKSDNL KTEMDEYIRN FGSRSHHHHH  
 101 H

## A.3. Plasmid pET28H6IIBGlc401-477

**Forward-Primer:** TAATACGACTCACTATAGGG

### Sequenz:

1 NTGACGAATT CCCTCAGAAT ATTTTGTTTA CTTTAAGAAG GAGATATAACC  
 51 ATGGGCAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC AGCAGCGGCC TGGTGCCGCG  
 101 CGGCAGCCA ATGGCACCGC CTCTGGTTGC TGCATTTGGT GGTAAAGAAA  
 151 ACATTACTAA CCTCGACGCA TGTATTACCC GTCTGCGCGT CAGCGTTGCT  
 201 GATGTGTCTA AAGTGGATCA GGCCGGCCTG AAGAAACTGG GCGCAGCGGG  
 251 CGTAGTGGT GCTGGTTCTG GTGTTCAGGC GATTTTCGGT ACTAAATCCC  
 301 ATAACCTGAA AACCGAGATC GATGAGTACA TCCGTAACCA TTAAGGATCC  
 351 GAATTCGAGC TCCGTCGACA AGCTTGCGGC CGCACTCGAG CACCACCACC  
 401 ACCACCACTG AGATCCGGCT GCTAACAAAG CCCGAAAGGA AGCTGAGTTG  
 451 GCTGCTGCCA CCGCTGAGCA ATAACTAGCA TAACCCCTTG GGGCCTCTAA  
 501 ACGGGTCTTG AGGGGTTTTT TGCTGAAAGG AGGAACTATA TCCGGATTGG  
 551 CGAATGGGAC GCGCCCTGTA GCGGCGCATT AAGCGCGGCG GGTGTGGTGG  
 601 TTACGCGCAG CGTGACCGCT AACTTTGCCA GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT  
 651 TTCGCTTTCT TCCCTTCCTT TCTCGCCACG TTCGCCGCTT TTCCCCGTCA  
 701 AGCTCTAAAT CGGGGGCTCC CTTTAGGGTT CCGATTTAGT GCTTTACGGC  
 751 ACCTCGACCC CAAAAAATT GATTAGGGTG ATGGTTCACG TAGTGGGCCA  
 801 TCGCCCTGAT AGACGGTTTT TCGCCCTTTG ACGATGGAGT CCACGTTCTT  
 851 TAATAGTGGA CTCTTGTTCC AACTTGAAC AACACTCAAC CCTATCTCGG  
 901 TCTATTCTTT TGATTTATAA GGTATTTTGC CGATTTTCGGA CTATTGGCTA  
 951 AAAAATGAGC TGATTTAGCA GACATTTAAC GCCGAATTTT ACTAGATATT  
 1001 AACTCTTTAT AATTTATGTG GCTTTTGG

**Bestätigte Proteinsequenz:**

1 M GSSHHHHHH SSGLVPRGSH MAPALVAAFC GKENTNLDA CITRLRVSVA  
 51 DVSKVDQAGI KKLGAAGVVV AGSGVQATFC TKSDNLKTEM DEYIRNH

**A.4. Plasmid pQE60mlc**

**Forward-Primer:** TAATACGACTCACTATAGGG

**Sequenz:**

1 GACACTATAT TCTGACTTAA CCTATAAAAT AGGGCGTATC ACGAGGCCCT  
 51 TTCGTCTTCA CCTCGAGAAA TCCTAAAAAA TTTATTTGCT TTGTGAGCGG  
 101 ATAACAATTA TAATAGATTC AATTGTGAGC GGATAACAAT TTCACACAGA

151 ATTCATTA AAA GAGGAGAAA T TAACC **ATGGT** **TGCTGAAAA** **CAGCCTGGGC**  
 201 **ACATTGATCA** **AATAAAGCAG** **ACCAACGCGG** **GCGGGTTTA** **TCGCCTGATT**  
 251 **GATCAGCTTG** **GTCCAGTCTC** **GCGTATCGAT** **CTTTCCCGTC** **TGGCGCAACT**  
 301 **GGCTCCTGCC** **AGTATCACTA** **AAATTGTCCG** **TGAGATGCTC** **GAAGCACACC**  
 351 **TGGTGCAAGA** **GCTGGAAATC** **AAAGAAGCGG** **GGAACCGTGG** **CCGTCCGGGC**  
 401 **GTGGGGCTGG** **TGTTTGAAAC** **TGAAGCCTGG** **CACTATCTTT** **CTCTGCGCAT**  
 451 **TAGTCGCGGC** **GAGATTTTCC** **TTGCTCTGCC** **CGATCTGAGC** **AGCAAACCTGG**  
 501 **TGGTGGAAGA** **GTCGCAGGAA** **CTGGCGTTAA** **AAGATGACTT** **GCCATTGCTG**  
 551 **GATCGTATTA** **TTTCCCATA** **CGATCAGTTT** **TTTATCCGCC** **ACCAGAAAAA**  
 601 **ACTTGAGCGT** **CTAACTTCGA** **TTGCCATAAC** **CTTGCCGGGA** **ATTATTGATA**  
 651 **CGGAAAATGC** **TATTGTACA** **CGCATGCCGT** **TCTACGAGGA** **TGTAAAAGAC**  
 701 **ATGCCGCTCG** **GCGAGGCGCT** **GGAGCAGCAT** **ACCGGCGTTC** **CGGTTTATA**  
 751 **TCAGCATGAT** **ATCAGCGCAT** **GGACGATGGC** **AGAGGCCTTG** **TTTGGTGCCT**  
 801 **CACGCGGGGC** **GCGCGATGT** GATTCAGGTG GGTATCCGA TCACAACGTG  
 851 GGGGGCGGGG CGTCATTACC CGATGGGTCA ACCTGCTAAC ACGCAGGGCA  
 901 GCCAGTTAGT CTTCGGTGGG AAATAGGGCC AACACCACAG GGTCCGACCC  
 951 CGTTATGGGG AAAAACGCTT GGTTTATTTG CGGGGAAATC AACGGGCTTG  
 1001 CCCTCCGAAA ACCATTCCGC CAAGCGGTGG GAACAGGTAT TCCTTTGAAG  
 1051 CTGGGCACA AGCCTGGCGT TCTTTAAATC CAATT

**Reverse-Primer:** tta acc ctg caa cag acg aat c

**Sequenz:**

1 ACTAAAGAAT ATACCCACTA TGCAGCTTGA CCAGAGCTAA ATCTATATAA  
 51 CTACGCGAAT AAACGAGATA ATGTGATAAT AACTATAGG CTGTTTTTAC  
 101 GGAGCGATGT AAAAAGATGA ACCCGTCTAG GACAAGGAGG CTCGGATCAG  
 151 CATACTGCTGA TCTTCTGGTT TTGAGTTAGC AAGGAATCAG CCGCATGGAC  
 201 GATGACAGAG AGCCTTGCTCT GGTGCATCAC GCGGGGCGAG CGATGTGATT  
 251 CAGGTGGTTA TCGATCACAA **G****TGGGGGGC** **GGCGTCATTA** **CCGATGGTCA**  
 301 **TCTGCTACAC** **GCAGGCAGCA** **GTAGTCTCGT** **GGAAATAGGC** **CACACACAGC**  
 351 **TCGACCCGTA** **TGGGAAACGC** **TGTTATTGCC** **GGAATCACGG** **CTGCCTCGAA**  
 401 **ACCATCGCCA** **GCGTGGACAG** **TATTCTTGAG** **CTGGCACAGC** **TGCGTCTTAA**  
 451 **TCAATCCATG** **AGCTCGATGT** **TACATGGACA** **ACCGTTAACC** **GTGGACTCAT**  
 501 **TGTGTCAGGC** **GGCATTGCGC** **GGCGATCTAC** **TGGCAAAAAGA** **CATCATTACC**  
 551 **GGGGTGGGGC** **CGCATGTCCG** **GCGCATCTCT** **GCCATCATGG** **TGAATTTATT**  
 601 **TAACCCACAA** **AAAATACTGA** **TTGGCTCACC** **GTTAAGTAAA** **GCGGCAGATA**

651 **TCCTCTTCCC** **GGTCATCTCA** **GACAGCATCC** **GTCAGCAGGC** **CCTTCCTGCC**  
701 **TATAGTCAGC** **ACATCAGCGT** **TGAGAGTACT** **CAGTTTTCTA** **AACCAGGGCA**  
751 **CGATGGCAGC** **CGCTGCACCT** **GGTAAAAGA** **ACGCGAGTAA** **AACGTTTC**

**Bestätigte Proteinsequenz:**

1 M**VAENQPGHI** **DQIKQTNAGA** **VYRLIDQLGP** **VSRLDLSRLA** **QLAPASITKI**  
51 **VREMLEAHLV** **QELEIKEAGN** **RGRPAVGLVV** **ETEAWHYLSI** **RISRGEIFLA**  
101 **LRDLSSKLVV** **EESQELALKD** **DLPLLDRIIS** **HIDQFFIRHQ** **KKLERLTSIA**  
151 **ITLPGIIDTE** **NGIVHRMPFY** **EDVKEMPLGE** **ALEQHTGVPV** **YIQHDISAWI**  
201 **MAEALFGASR** **GARDVIQVVI** **DHNVGAGVIT** **DGHELLHAGSS** **SLVEIGHTQV**  
251 **DPYGKRCYCG** **NHCLETIAS** **VDSILELAQL** **RLNQSMSSML** **HGQPLTVDSL**  
301 **CQAALRGDLI** **AKDIITGVGA** **HVGRILAIMV** **NLFNPQKILI** **GSPLSKAADI**  
351 **LEPVISDSIR** **QQALPAYSQH** **ISVESTQFSN** **QGTMAGAALV** **KDAMYNGSLI**  
401 **IRTIQG**

## B. SPR Sensogramme

### B.1. Mlc-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion

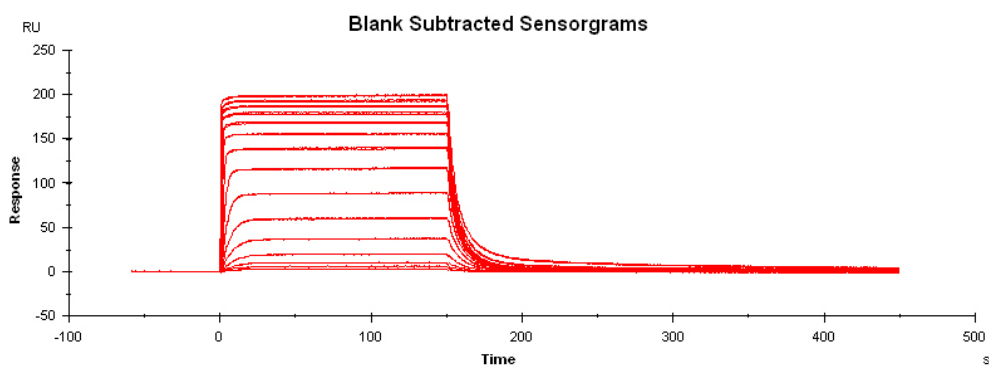


Abbildung B.1.: Sensogramm der Interaktionsstudie von immobilisiertem Mlc mit löslichem IIB<sup>Glc</sup>

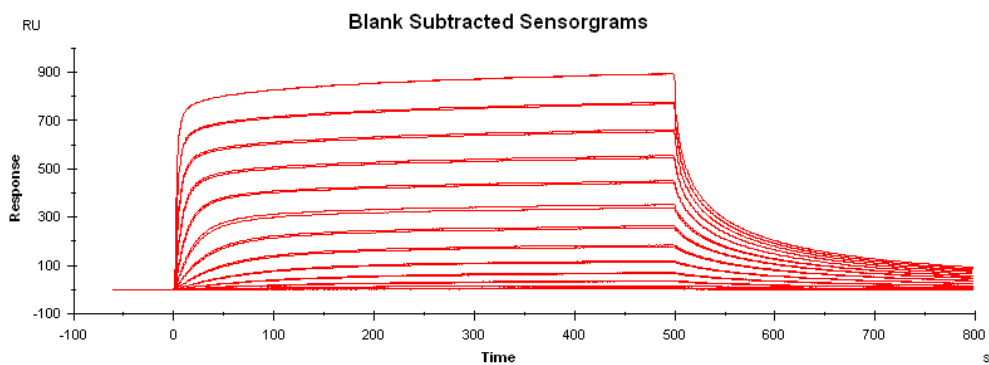


Abbildung B.2.: Sensogramm der Interaktionsstudie von immobilisiertem IIB<sup>Glc</sup> mit löslichem Mlc. Beladungsdichte:  $3.1 \frac{ng}{mm^2}$ .

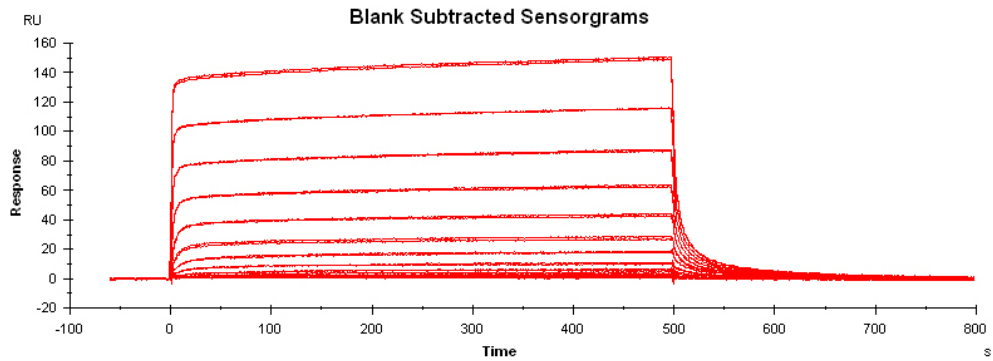


Abbildung B.3.: Sensorgramm der Interaktionsstudie von immobilisiertem IIB<sup>Glc</sup> mit löslichem Mlc. Beladungsdichte:  $0.6 \frac{ng}{mm^2}$ .

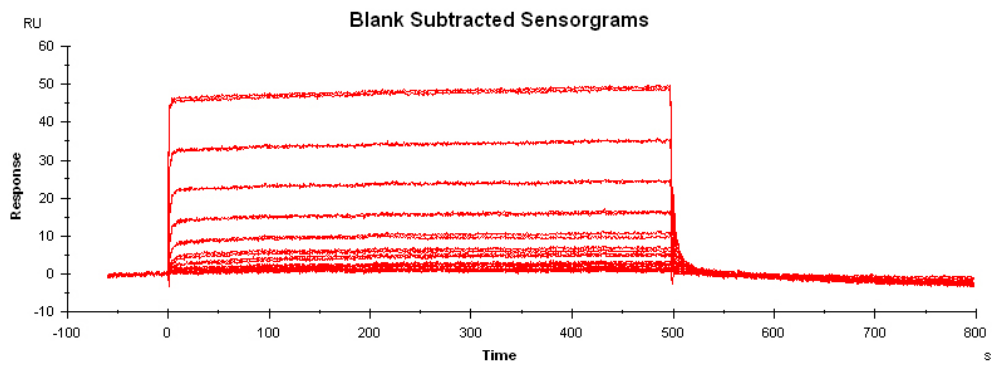


Abbildung B.4.: Sensorgramm der Interaktionsstudie von immobilisiertem IIB<sup>Glc</sup> mit löslichem Mlc. Beladungsdichte:  $0.1 \frac{ng}{mm^2}$ .

## B.2. Mlc-DNS Interaktion

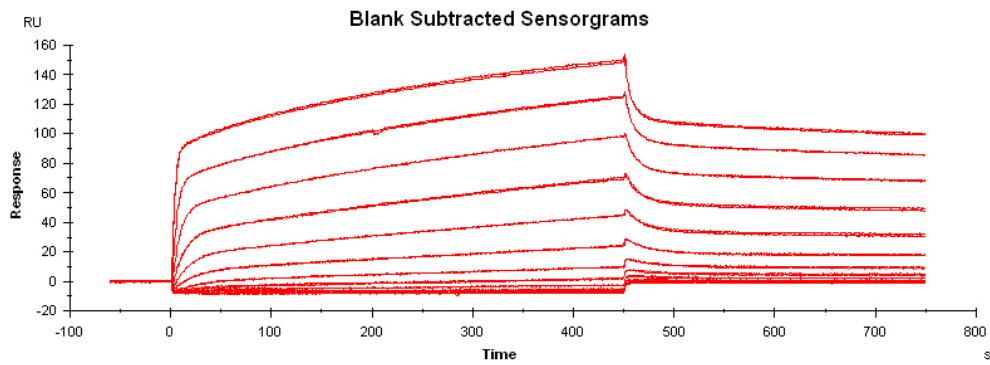


Abbildung B.5.: Sensogramm der Interaktionsstudie von immobilisiertem Mlc mit löslichem Hairpin BoxP1

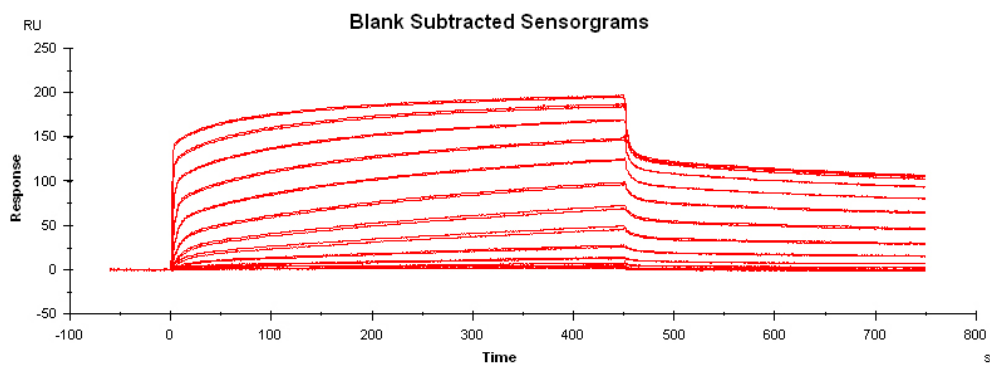


Abbildung B.6.: Sensogramm der Interaktionsstudie von immobilisiertem Mlc mit löslichem Hairpin BoxP2

### B.3. Glk-IIB<sup>Glc</sup> Interaktion

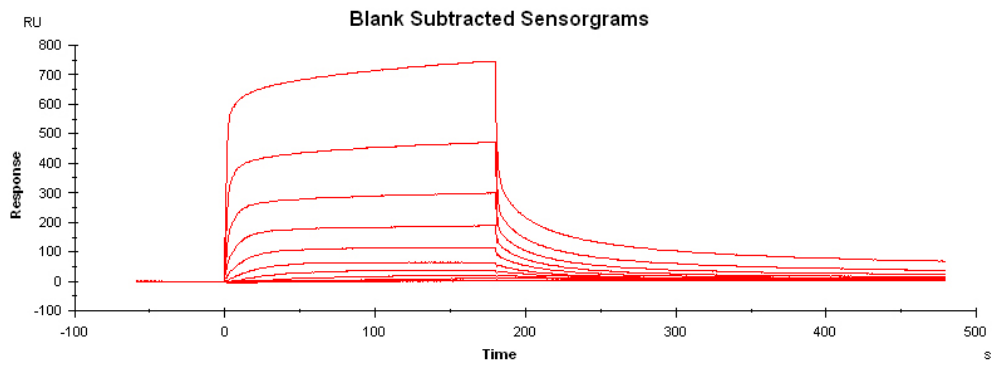


Abbildung B.7.: Sensogramm der Interaktionsstudie von immobilisiertem Glk mit löslichem IIB<sup>Glc</sup>