

# NMR-spektroskopische Charakterisierung des Responsregulators CheY2 aus *Sinorhizobium meliloti*.

DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER  
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III -  
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt  
von Diplom Physiker  
Hubert Riepl aus Seubersdorf  
im Dezember 2002

Promotionsgesuch eingereicht am: 10.12.2002  
Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer und  
Prof. Dr. R. Schmitt

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. A. Kurtz  
1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer  
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Schmitt  
3. Prüfer: Prof. Dr. E. Brunner

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Proteinstrukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie . . . . .	1
1.2 Automatisierte Auswertung von NMR-Spektren . . . . .	2
1.3 Bakterielle Chemotaxis . . . . .	3
1.3.1 Das sensorische System von <i>E. coli</i> . . . . .	3
1.3.2 Das sensorische System von <i>S. meliloti</i> . . . . .	7
1.4 Zielsetzungen der Arbeit . . . . .	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Automatisierte Verarbeitung von NMR-Spektren . . . . .	13
2.2 Proteinanalyse . . . . .	13
2.2.1 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese . . . . .	13
2.2.2 <i>Western Blotting</i> . . . . .	14
2.2.3 Proteinn Mengenbestimmung nach Bradford . . . . .	14
2.3 Expression und Reinigung von CheY2 . . . . .	14
2.3.1 Zellanzucht und Expression von CheY2 . . . . .	14
2.3.2 Zellaufschluß und Reinigung von CheY2 . . . . .	15
2.4 Phosphorylierung und Berylliofluoridierung von Responsregulatoren . . . . .	16
2.5 Herstellung von CheY2-BeF <sub>3</sub> . . . . .	17
2.6 CheY1, CheA <sub>174–316</sub> (P2), MotD . . . . .	18
2.7 NMR-Proben, Messbedingungen . . . . .	18
2.8 NMR-Experimente . . . . .	19
2.8.1 Tripelresonanz-Experimente . . . . .	19
2.8.2 Zuordnung der Hauptkette . . . . .	20
2.8.3 Zuordnung der Seitenketten . . . . .	20
2.8.4 NOESY-Spektren . . . . .	21
2.8.5 Wasserstoffbrücken . . . . .	22
2.8.6 Protein-Protein-Wechselwirkungen . . . . .	23
2.8.7 <sup>31</sup> P-Messungen . . . . .	24
2.9 Chemische Verschiebung . . . . .	26
2.10 Kombinierte chemische Verschiebungsänderung . . . . .	27

2.11 NOE-Zuordnung . . . . .	27
2.12 Molekulardynamik . . . . .	28
2.13 Strukturrechnung . . . . .	30
2.14 Strukturanalyse und Strukturbewertung . . . . .	31
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1 Automatisierte Vorverarbeitung von NMR-Spektren . . . . .	33
3.1.1 Lokales und Globales Rauschniveau in NMR-Spektren . . . . .	33
3.1.2 Niveau für die automatische Signalsuche . . . . .	34
3.1.3 Signalklassifizierung . . . . .	35
3.2 Automatisierte Spektrenverarbeitung am Beispiel des $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrums von CheY2 . . . . .	36
3.3 Biochemie . . . . .	36
3.3.1 Expressionsprotokoll für $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Markierung . . . . .	36
3.3.2 Reinigung von CheY2 . . . . .	38
3.4 Strukturbestimmung . . . . .	38
3.4.1 Das CheY2-P-Analogon CheY2-BeF <sub>3</sub> . . . . .	38
3.4.2 Sequentielle Zuordnung von CheY2 und CheY2-BeF <sub>3</sub> . . . . .	39
3.4.3 Sekundärstrukturvorhersage . . . . .	42
3.4.4 Dihedrale Winkel . . . . .	44
3.4.5 Wasserstoffbrücken . . . . .	44
3.4.6 NOESY-Spektren . . . . .	45
3.4.7 Tertiärstrukturen von CheY2 und CheY2-BeF <sub>3</sub> . . . . .	46
3.4.8 Strukturvergleich von CheY2 mit CheY2-BeF <sub>3</sub> . . . . .	51
3.5 Protein-Protein-Wechselwirkungen . . . . .	56
3.5.1 Wechselwirkung von CheY2 mit der P2-Domäne von CheA . . . . .	56
3.5.2 Wechselwirkung von CheY2-BeF <sub>3</sub> mit der P2-Domäne von CheA .	59
3.5.3 Wechselwirkung von CheY2 mit CheY1 und MotD . . . . .	61
3.6 Charakterisierung von CheY2 Mutanten . . . . .	62
3.6.1 CheY2-V107W . . . . .	63
3.6.2 CheY2-D14K . . . . .	64
3.6.3 CheY2-N60R . . . . .	65
3.7 Phosphorylierungskinetik . . . . .	67
<b>4 Diskussion</b>	<b>72</b>
4.1 Automatisierung der Spektrenbearbeitung . . . . .	72
4.2 Struktur und Aktivierung von CheY2 . . . . .	73
4.3 Wechselwirkung mit der P2-Domäne von CheA . . . . .	76
4.4 Mutantenproteine CheY2-D14K, CheY2-N60R und CheY2-V107W . . . . .	77
4.5 Phosphorylierungskinetik von CheY2 . . . . .	79

<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>85</b>
<b>Literatur</b>	<b>87</b>
<b>Anhang A: Chemische Verschiebungen von CheY2</b>	<b>100</b>
<b>Anhang B: Chemische Verschiebungen von CheY2BeF<sub>3</sub></b>	<b>108</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Proteinstrukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie

Die erstaunliche Vielfalt in Struktur und Funktion von Proteinen, den Lebensbausteinen, ist im Wesentlichen in der vergleichsweise geringen Zahl von 22 Aminosäuren codiert. Noch bemerkenswerter ist jedoch die Tatsache, daß die komplette Information allen Lebens unter Verwendung von nur vier Grundbausteinen, den Basen (A, T, C, G) im universellen Code [1] der DNA [2,3] gespeichert ist. Die Kenntnis der DNA-Basensequenz eines Organismus ist somit ein Schlüssel zu dessen Organisation und Funktionsweise. Aus diesem Grund liegt das Forschungsinteresse in der ständigen Weiterentwicklung der Sequenzier- und Datenverarbeitungsmethoden um immer größere Genomsequenzen entschlüsseln zu können. Ein Beispiel hierfür ist das menschliche Genomprojekt [4], mit dem Ziel der Totalsequenzierung der menschlichen DNA mit etwa  $3 \times 10^9$  Basenpaaren. Die Kenntnis des Informationsträgers DNA liefert zusammen mit dem genetischen Code die Primärsequenz der Proteine. Ein detaillierter Einblick in die Funktionsweisen von Proteinen erfordert die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur auf atomarer Ebene. Da die Methoden der biomolekularen Strukturbestimmung im Vergleich zur Sequenzierung sehr (zeit-)aufwendig sind, stellen die enorm steigende Zahl neuer Sequenzen und die damit verbundenen Fragestellungen eine große Herausforderung für die Strukturbioologie dar.

Seit der Veröffentlichung der ersten vollständigen Proteinstruktur in Lösung [5] hat sich die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) durch enormen technologischen Fortschritt zu einer Standardmethode entwickelt [6]. Der größte Teil der bekannten makromolekularen Strukturen mit atomarer Auflösung wurde mittels Röntgendiffraktion an Einkristallen bestimmt. Etwa 15 % der momentan in der Protein Datenbank (PDB) enthaltenen 11.000 Strukturen gehen aus NMR-spektoskopischen Untersuchungen hervor. In Anbetracht der Tatsache, daß die erste NMR-Struktur etwa

25 Jahre nach der ersten Protein-Kristallstruktur gelöst wurde, ist dies dennoch eine beträchtliche Zahl. Die Größenlimitierung für NMR-spektroskopisch zugängliche makromolekulare Systeme ist physikalisch bedingt. Durch die Entwicklung der TROSY-[7] und CRINEPT-Techniken [8] wurde die Größe der zugänglichen makromolekularen Systeme von etwa 30- 40 kDa in den Bereich um 900 kDa [9] verschoben. Die NMR-Spektroskopie bietet über die Strukturbestimmung hinaus attraktive Möglichkeiten [10, 11]. Bei guter Protein-Löslichkeit wären dies Aussagen über globale und lokale Faltung, Dynamik und Wechselwirkung von Proteinen. Zudem ist die Strukturbestimmung in Lösung, unter annähernd physiologischen Bedingungen und ohne Einfluß von Kristallpackungskräften möglich. Im Hinblick auf die potentiellen Möglichkeiten von Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie sind beide Methoden als gleichwertig und sich ergänzend anzusehen.

Für gut lösliche Proteine bis zu einer Molekülmasse von 25- 30 kDa [12] ist die NMR-Spektroskopie eine effiziente Methode für die Strukturbestimmung und Charakterisierung von Dynamik und Protein-Wechselwirkungen. Heteronukleare Tripelresonanzexperimente [13–15] erfordern eine Isotopenmarkierung der Proteine mit  $^{15}\text{N}$  und/oder  $^{13}\text{C}$ . Durch Ausnutzung der skalaren [16] und dipolaren [12, 17] Kopplung kann eine eindeutige sequentielle und partielle Zuordnung erreicht werden. Für die Strukturbestimmung [18] können Abstandsinformationen aus NOE (*nuclear overhauser enhancement*)-Daten [19–21], Einschränkungen für dihedrale Winkel [18, 22–26], Wasserstoffbrücken [27, 28] und residuale dipolare Kopplungen [29, 30] verwendet werden. Die Bestimmung der 3D Strukturen aus den experimentellen Daten erfolgt unter Beachtung geometrischer (*distance geometry*) [31,32] Gegebenheiten und/oder durch Molekulardynamik [18, 33, 34] in Verbindung mit dem *Simulated-Annealing*-Verfahren [35, 36].

## 1.2 Automatisierte Auswertung von NMR-Spektren

Im Rahmen der verschiedenen Genomprojekte ist die NMR-Spektroskopie für kleine und mittelgroße, gut lösliche Proteine die Methode der Wahl [37]. Die durch technologische Weiterentwicklung erhöhte Sensitivität führt zu einer Reduktion der für die Datenaufnahme benötigten Zeit, proportional dem Quadrat des Sensitivitätsgewinns. Der bisher erreichte Zeitgewinn liegt bei einem Faktor von etwa 10 [38,39]. Im Vergleich zur NMR-Datenaufnahme ist die Reduktion der NMR-Daten, im Wesentlichen durch Resonanzlinienzuordnung und Strukturrechnung ein bis dato arbeits- und zeitintensiver Prozeß. Dieser kann nur durch weitgehende Automatisierung und Archivierung der steigenden Datenmenge effektiv reduziert werden. Intelligente Routinen zur Signalsuche und Signalklassifizierung [40,41] sind entscheidend für den Einstieg in eine automatische Strukturbestimmung. Die automatisierte Zuordnung der chemischen Verschiebungen konnte

bisher nur für die Hauptkettenatome erreicht werden [42–45]. Die Automation der Seitenkettenzuordnung steckt noch in den Anfängen, jedoch mit bereits vielversprechenden Ansätzen [41]. Eine möglichst vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebungen ist Grundvoraussetzung für die Zuordnung der NOESY-Spektren, die den Großteil der zur Strukturbestimmung benötigten Informationen liefern. Für die automatische Zuordnung von NOESY-Spektren mit anschließender Strukturrechnung existieren bereits einige Programme (AUREMOL [41], ARIA [46] AUTOASSIGN bzw. AUTOSTRUCTURE [42, 47], NOAH/DIAMOD [45]). Die Qualitätskontrolle der automatisch bestimmten Strukturen kann in Analogie zur Röntgenkristallographie erfolgen [48]. Nicht zuletzt kann die Effektivität einer automatischen Strukturbestimmung durch Verwendung von sinnvoll archivierten (NMR-) Daten erhöht werden (z.B. [41, 49]). Die bereits bestehenden Datenbanken, die BMR- [50] und PDB-Datenbank [51], stellen eine Fülle an experimentellen Parametern und Strukturen zur Verfügung. Eine Katalogisierung der NMR- und Kristallographiedaten, speziell im Hinblick auf die Genomprojekte und den erhöhten Durchsatz an Proteinstrukturen, ist von zentraler Bedeutung für die Strukturbioologie [11, 52].

## 1.3 Bakterielle Chemotaxis

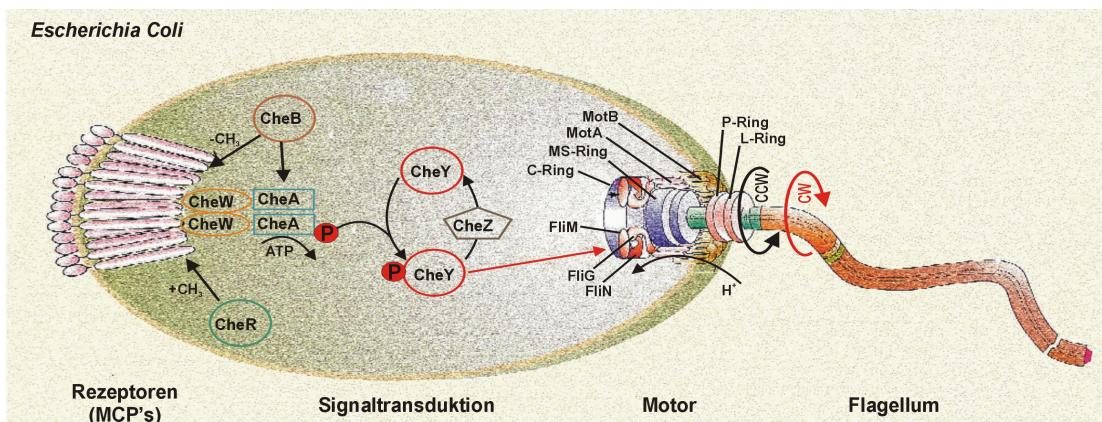
### 1.3.1 Das sensorische System von *E. coli*

Die meisten Bakterienarten besitzen die Fähigkeit zu gerichteter Bewegung in ihrem Lebensraum. Sie sind in der Lage, Umwelteinflüsse wahrzunehmen und auf diese gezielt zu reagieren. Die gerichtete Reaktion auf chemische Stoffe wird als Chemotaxis bezeichnet. Die Erforschung der Chemotaxis begann 1880, als Engelmann und Pfeffer [53] die gezielte Reaktion von Bakterien auf Änderungen in der chemischen Umgebung entdeckten. 120 Jahre später, können einige, bei weitem jedoch noch nicht alle beteiligten Mechanismen auf molekularer Basis erklärt werden [54, 55]. Bei *Escherichia coli*, ein der  $\gamma$ -Untergruppe der Proteobakterien zugehöriges Enterobakterium, ist das chemotaktische System eingehend untersucht worden. Die Fortbewegung erfolgt mittels extrazellulärer, an der Zelloberfläche peritrich inserierter, linkshändiger Geißeln [56] (20 nm dick, bis zu 10  $\mu\text{m}$  lang [57]). Sie sind durch einen Haken am Basalapparat des in der Cytoplasma-membran lokalisierten Motors verankert (Abb. 1.1). Bei gleichsinniger, entgegen dem Uhrzeigersinn (CCW) erfolgender Rotation, bildet sich ein Geißelbündel mit sinusförmiger Gestalt aus, das die Zelle geradlinig vorantreibt. Durch Rotationsumkehr einzelner Motoren (im Uhrzeigersinn, CW) zerfällt das Bündel, wodurch die gerichtete Bewegung durch eine kurze ungerichtete Taumelbewegung unterbrochen wird. Dies führt zu einer statistisch variierten Änderung der Fortbewegungsrichtung. Die Taumelfrequenz ist abhängig von extrazellulären Stimuli und ist im Falle von Lockstoffen reduziert [58]. Der Basalkörper des Motors kann funktionell in Stator und Rotor eingeteilt werden.

Der Rotor besteht aus einem zentralen Schaft und vier Ringen (L, P, M/S und C), die in verschiedenen Zellschichten lokalisiert sind. Der cytoplasmatisch gelegene C-Ring ist aus Vielfachen der Proteine FliM, FliN und FliG aufgebaut und bildet den sogenannten Schaltkomplex. FliG ist primär für die Wechselwirkung mit Stator zuständig. Der Stator ist aus den Proteinen MotA und MotB aufgebaut und bildet den Protonenkanal-Komplex. Durch die protonenmotorische Kraft an der Membran wird die Drehung des C- und M-Ringes angetrieben.

Die Prozessierung der (extrazellulären) Reize erfolgt durch (transmembrane) Rezeptorkomplexe in Kombination mit Zwei-Komponenten Signaltransduktionssystemen [59]. Letztere bestehen aus einer Histidin Autokinase und einem (z.B. *E. coli*) oder mehreren (z.B. *S. meliloti*) Responsregulatoren (Abb. 1.1).

Signaltransduktion über die Histidin-Autokinasekette ist weit verbreitet und findet sich in Bakterien, Archaea [60] und Eukaryoten [61]. Bei *Escherichia coli* erfolgt die Aktivierung der Kinase CheA durch Chemorezeptoren (MCP's, methylierbare Chemotaxisproteine), die chemische Reize der unmittelbaren Umgebung abtasten. Die cytosolischen Domänen der MCP's sind an der Adaptation des sensorischen Systems und der Signalweiterleitung beteiligt. Extrazelluläre Reize bewirken eine durch die Methyltransferase CheR vermittelte Methylierung an einigen Glutamat- und Glutaminresten. Die Rücksetzung des Signals, d.h. die Aufrechterhaltung der Sensitivität des Systems, erfolgt über Demethylierung durch die Methylesterase CheB [62]. Ein Rezeptor-Trimer ist über ein CheW-Dimer an ein CheA-Dimer [63] gekoppelt. Nicht aktivierte, demethylierte Rezeptoren bewirken eine Stimulation der ATP-abhängigen Autophosphorylierung von CheA an einem konservierten Histidinrest. Durch Phosphotransfer zum Responsregulator CheY steigt die intrazelluläre CheY-P Konzentration. Diese Art der Signaltransduktion vom Rezeptor- zum Flagellenkomplex ist in Abb. 1.1 schematisch dargestellt.



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der Signaltransduktion bei *E. coli* (modifiziert, nach Bren et al. 2000, [64]).

In der phosphorylierten, aktivierten Konformation von CheY steigt die Affinität zum Schaltkomplex des Motors (FliM). Durch Bindung ausreichend vieler CheY-P Moleküle, als Effektoren der taktischen Reaktion, an die insgesamt ca. 34 FliM-Bindungsstellen pro Motor [65] wird eine Änderung der Motordrehung von CCW nach CW induziert [66–68] (Abb. 1.1). Dies wiederum führt zu einer Taumelbewegung des Bakteriums [59, 64, 69–71] und zu einer Änderung der Fortbewegungsrichtung. Diese Tatsache wurde bereits vor etwa 30 Jahren von Berg und Brown entdeckt [58].

Die schnelle Regulation der CheY-P Konzentration kann nicht durch dessen intrinsische Autoposphataseaktivität erklärt werden ( $T_{1/2} = 10,5$  s). Eine effektive Dephosphorylierung von CheY-P wird durch die Phosphatase CheZ (Abb. 1.1) um das Zehnfache beschleunigt [72]. Die Vorzugsrichtung der Motorrotation wird im Wesentlichen durch die Konzentration an CheY-P bestimmt. Diese wiederum durch die Aktivität der Histidinkinase CheA [73–75], die Phosphatase CheZ [76] und die Autophosphataseaktivität von CheY [77].

Mit steigender Lockstoffkonzentration wird die Autokinaseaktivität von CheA gehemmt, was zur Reduktion der CheY-P Menge führt. Die schnelle Hydrolyse des an CheY gebundenen Phosphats wird bei Enterobakterien hauptsächlich durch die Phosphatase CheZ erreicht. Dies ist entscheidend für eine minimale, zeitliche Verzögerung der Regulation der Motorrotation. Da mit sinkender CheY-P-Konzentration die Besetzung der Motorbindungsstellen abnimmt, liegt der Schwerpunkt der Motorrotation bei CCW. Hierdurch wird eine geradlinig gerichtete Fortbewegung der Zelle hin zur optimalen Konzentration der Reizquelle erreicht.

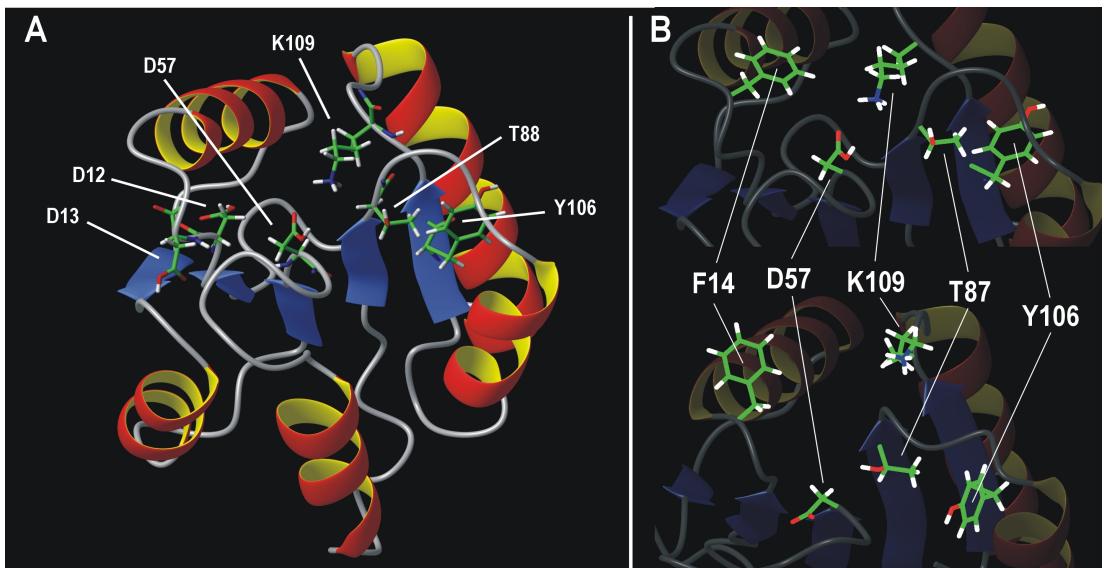
Die Sensitivität des chemotaktischen Systems, das primär auf Änderungen der Schreck- bzw. Lockstoffkonzentration reagiert, ist beachtlich. Die Bakterien sind in der Lage, einen Unterschied von ein bis zwei gebundenen Molekülen zu detektieren, eine Rezeptorbesetzung von kleiner 1 % in ein signifikantes Signal umzuwandeln, was einem Verstärkungsfaktor von 30- 60-fach entspricht [78, 79].

Innerhalb der Chemotaxis-Reaktionskaskade ist die Phosphorylierung von CheA der langsamste Schritt. Alle nachfolgenden Reaktionen sind wesentlich schneller. Die CheY-P Konzentration sinkt und fällt mit der Änderung der Rezeptorbesetzung, wobei die Zellantwort innerhalb einer zehntel Sekunde erfolgt. Mittels FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) gelang es Sourjik und Berg [80] die Konzentrationsänderungen von CheY-P und der CheZ-Phosphatase *in vivo*, zu bestimmen. Die schnelle Antwort auf Konzentrationsänderungen des Lockstoffs Aspartat konnte mit Konzentrationsänderungen von CheY-P, erzeugt am CheA-Rezeptor-Komplex, quantitativ korreliert werden. Die Adaptation des Systems, das sensitiv für Lock- bzw. Schreckstoffkonzentrationen vom nanomolaren bis hin zum millimolaren Bereich ist, wird nahezu unabhängig von der Phosphatase CheZ erreicht und durch CheR und CheB beeinflusst [62]. Allerdings kann die Empfindlichkeit des Systems nicht ausschließlich durch Methylierungsprozesse

erklärt werden. Deswegen wird eine gegenseitige Kopplung der Rezeptoren und eine über die Demethylierung hinausgehende Wechselwirkung von CheB mit dem Gitter der Rezeptorcluster diskutiert [79,81,82]. Als Verstärkungsmechanismus wird auch ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen Bindung von CheY-P an den Motor und Änderung der Rotationsbewegung diskutiert [79].

Aufgrund vieler genetischer und biochemischer Daten und der Charakterisierung der Strukturen der beteiligten Proteine samt ihrer Wechselwirkungen ist das chemotaktische System von *E. coli* auf molekularer Ebene sehr gut verstanden. Wie bereits angeprochen, kann aus diesen Daten nicht automatisch das Funktionsnetz der Signalkette abgeleitet werden. Kybernetische Modelle in Kombination mit *in vivo* Messungen könnten hier zum Ziel führen.

Die 3D-Struktur von CheY besitzt die für Responsregulatoren typische, offene  $\alpha/\beta$ -Konformation (Abb. 1.2 (A)).



**Abb. 1.2:** (A) Schleifendarstellung von CheY aus *E. coli*. Bedeutende Reste im aktiven Zentrum und für die Y-T-Kopplung sind benannt. (B) Lage der für die Aktivierung von CheY funktionell wichtigen Reste in der inaktiven (oben) aktiven (unten) Konformation.

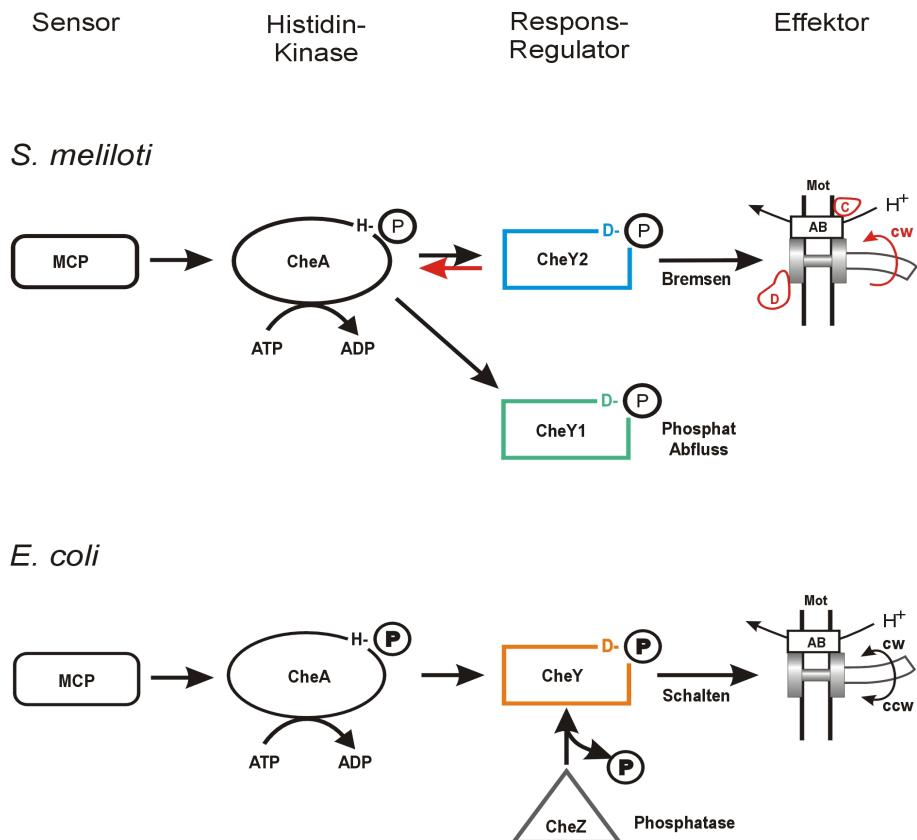
Die Bindungsstellen von CheY an CheA, CheZ und das Motorprotein FliM liegen in sich überlappenden C-terminalen Regionen von CheY. Bei Bindung von CheY an CheA-P öffnet sich das aktive Zentrum um Asp57 [83] und unterstützt somit die Phosphatübertragung von His48 (CheA) auf Asp57 (CheY) [67]. Die daran beteiligten Reste sind Phe14, das die Phosphorylierungsstelle in CheY abschirmt und die Seitenkette von Lys109, die eine Wasserstoffbrücke zu Asp57 bildet [84]. Die mit der Phosphory-

lierung (Aktivierung) einhergehenden Strukturveränderungen werden über den in der Nähe von Asp57 gelegenen Aminosäurerest Thr87 an die C-terminale Motorbindungsstelle (N-terminale Region von FliM liegt [85]) weitergegeben [86, 87]. Dies induziert beim C-terminal gelegenen Rest Tyr106 einen Konformationswechsel (Abb. 1.2 (B)). Dieser wird hauptsächlich durch die Kopplung von Thr87 mit Tyr106 verursacht und allgemein als Y-T-Kopplung bezeichnet. Die im inaktiven Zustand von CheY exponierte Seitenkette von Tyr106 klappt in Richtung des Proteinkerns um und ermöglicht so die Bindung an FliM [88], während die Affinität von CheY-P zu CheA deutlich erniedrigt wird [89]. Die Regulation der Konzentration an freiem CheY-P erfolgt durch Auto-phosphataseaktivität von CheY-P (Halbwertszeit von 10,5 s [72, 90]) und vor allem die Phosphatase CheZ. Die Affinität von CheZ zu CheY-P ist im Vergleich zu CheY deutlich erhöht [76] und bewirkt eine 10-fache Beschleunigung der Dephosphorylierungsreaktion. Es zeigt sich also, daß trotz intensiver Forschung in den letzten 35 Jahren die Regulationsmechanismen des chemotaktischen Systems von *E. coli* nicht vollständig geklärt sind. Im übergreifenden Zusammenhang ist die Kenntnis einfacher Modellsysteme und der grundlegenden Regulationsmechanismen für das Verständnis komplexer Systeme entscheidend. Neue und allgemeingültige Prinzipien von unterschiedlichen, mehr oder weniger komplexen Modellsystemen sind deshalb von besonderem Interesse.

### 1.3.2 Das sensorische System von *S. meliloti*

Organismen der  $\alpha$ -Untergruppe der Proteobakterien wie *Rhodobacter sphaeroides*, *Caulobacter crescentus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* weisen Unterschiede zum gut untersuchten Chemotaxis-System der Enterobakterien ( $\gamma$ -Untergruppe der Proteobakterien) auf [91]. *Sinorhizobium meliloti*, besitzt einen phylogenetischen Abstand zu *E. coli* von über 500 Mio. Jahren. Ihre chemotaktischen Systeme unterscheiden sich in einigen, funktionell sehr wichtigen Aspekten. Diese Unterschiede sind einerseits durch Anpassung an unterschiedliche Biotope bedingt: *E. coli* als Bewohner der Darmflora des Menschen, *S. meliloti* als stickstofffixierendes Bodenbakterium und Symbiont der Leguminosen, andererseits auch das Ergebnis einer unterschiedlichen Evolution. Ihre Erforschung in den letzten Jahren hat zu faszinierenden neuen Erkenntnissen und einem verbesserten und erweiterten Verständnis taktischer Mechanismen geführt. Die Fortbewegung der *E. coli*- und *S. meliloti*-Zellen ist geprägt durch geradlinige Schwimmbewegungen, die durch statistisch variierte Richtungsänderungen unterbrochen sind. Die momentane Bewegung ist abhängig vom Rotationszustand des Motors, der bei beiden Bakterien durch eine His-Kinase-Signalkette gesteuert wird. Diese globalen Ähnlichkeiten beruhen auf unterschiedlichen und charakteristischen Mechanismen bzw. Prozessen.

In Abb. 1.3 sind die allgemeinen und speziellen Komponenten sowie Mechanismen der Signaltransduktion in *S. meliloti* (oben) und *E. coli* (unten) schematisch dargestellt.



**Abb. 1.3:** Vergleichendes Schema der Signaltransduktion im 2-Komponentensystem von *Sinorhizobium meliloti* (oben) und *Escherichia coli* (unten), (modifiziert nach Schmitt, 2002 [91]). Die allgemeinen Komponenten sind über den Schemata angegeben. Entsprechende Rezeptor- (MCP), Chemotaxis- (Che) und Motorproteine (Mot) der chemosensorischen Signalketten sind dargestellt. Die Phosphorylierung (P) der His- und Asp-Seitenketten, der Fluß der Protonen ( $H^+$ ) durch MotA-MotB-Kanäle, sowie die Rotationsrichtung des Motors im (CW) oder gegen (CCW) den Uhrzeigersinn sind angegeben. Analoge, aber funktionell unterschiedliche Proteine sind durch verschiedene Farben markiert. Grundlegende Unterschiede zum System von *E. coli* sind im Schema von *S. meliloti* rot markiert (z.B. die Motorproteine MotC und MotD).

Im Zwei-Komponenten System von *S. meliloti* existieren zwei Responsregulatoren, CheY1 und CheY2 [92], jedoch kein homologes zur Phosphatase CheZ in *E. coli*. CheY2 ist der Hauptresponsregulator, der die Motorrotation reguliert, CheY1 moduliert die Aktivität von CheY2 [93]. CheY2 und CheY1 besitzen 129 bzw. 121 Reste, Molekülmassen von

13708 Da bzw. 13470 Da und eine Sequenzidentität von 35,2 %. Ein Sequenzvergleich mit Responsregulatoren aus anderen Organismen ist in Abb. 1.4 gegeben.

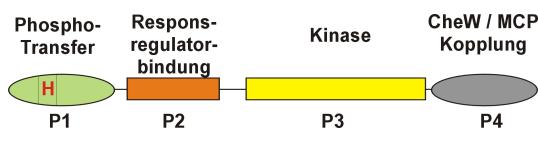
**Abb. 1.4:** Sequenzvergleich und Identität (in %) von Responsregulator-Proteinen verschiedener Organismen. Funktionell wichtige und streng konservierte Reste sind rot, weitere konservierte Reste sind grün markiert. Blau gekennzeichnete Aminosäurereste sind an der Aktivierung der jeweiligen Reponsregulatoren beteiligt.

Die für Responsregulatoren typischen, hochkonservierten Reste der Magnesiumbindungsstelle (CheY1: Asp9, Asp10; CheY2: Asp13, Asp14) [94] und der Phosphorylierungsstelle (CheY1: Asp54; CheY2: Asp58) [83] sowie die funktionell wichtige Aminosäuren (CheY1: CheY2: Thr88, Lys110; CheY1: Thr84, Lys106) sind bei allen Proteinen einschließlich CheY1 und CheY2 zu finden. Der bei CheY aus *E. coli* für die Motorbindung wichtige aromatische Rest Tyr106 (Y-T-Kopplung) ist nur bei CheY1 konserviert, bei CheY2 an dieser Stelle ein Valin sitzt.

Durch Aktivierung (Phosphorylierung) von CheY2 steigt dessen Affinität zur Motorbindungsstelle. Die Bindung von CheY2-P an den Motor bewirkt im Gegensatz zu *E. coli* keine Umkehr der Rotationsrichtung, sondern eine Verlangsamung der im Uhrzeigersinn (CW) erfolgenden Rotation [93, 95] (Abb. 1.3). Bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit bilden die vier bis sechs rigiden, rechtshändig-helikalen Filamente [96–98] ein Bündel, das die Zelle vorantreibt. Eine unterschiedliche Drehzahl einzelner Motoren bewirkt ein auseinanderfallen des Flagellenbündels und führt zur Änderung der Fortbewegungsrichtung.

Zur Zurücksetzung des Signals trägt der spontane Zerfall von CheY2-P bei, mit einer Halbwertszeit des aktivierte Zustands von etwa 10,5 s [99]. Da die Signalprozesse in einem Zeitraum von ca. 100 ms ablaufen, kann die Sensitivität des Systems nicht alleine durch die Halbwertszeit erklärt werden [76]. Ein Homologes zur Phosphatase CheZ in *E. coli* ist in *S. meliloti* nicht vorhanden. Zur effektiven Dephosphorylierung trägt der Retrophosphorylierungs-Mechanismus bei. Retrophosphorylierung ist für alle untersuchten Vertreter der  $\alpha$ -Untergruppe der Proteobakterien und zahlreiche nichtenterische Bakterien mit mehreren Responsregulatoren ein effektiver Mechanismus zur Dephosphorylierung des Hauptresponsregulators [91]. Bei diesem Prozess wird die Phosphatgruppe von CheY2-P zurück auf nicht aktivierte CheA übertragen und weiter zu CheY1, das als Phosphatabfluss agiert [99]. CheY1 ist im Gegensatz zu CheY2 nicht zur Retrophosphorylierung fähig. Zur Aufrechterhaltung der Sensitivität des chemotaktischen Systems (Signalprozesse < 100 ms reicht selbst ein 10-facher Überschuss von CheY1 im Vergleich zu CheA in der Zelle nicht aus um alles Phosphat aufzunehmen [99]. Daher sind weitere Phosphat-Transferprozesse notwendig, wie z.B. zu CheB, das ebenfalls durch CheA phosphoryliert wird und viermal schneller zerfällt [99]. Die Dephosphorylierung von CheY1 erfolgt *in vitro* mit einer Halbwertszeit von 10 s und wird *in vivo* möglicherweise durch zusätzliche Proteinfaktoren beschleunigt [99]. Diese Prozesse regulieren die Konzentration von CheY2-P bzw. CheY1-P und gewährleisten so die Sensitivität des Systems.

Die Phosphorylierung beider Responsregulatoren erfolgt durch die Histidin-Autokinase CheA, die durch die Rezeptoren (MCP's) aktiviert wird. Abweichend von *E. coli* besitzt *S. meliloti* nicht nur fünf, sondern acht Rezeptoren. Bei beiden ist die Methylesterase CheB und die Methyltransferase CheR an der Regulation der Sensitivität der Rezeptoren beteiligt. Die cytosolischen Rezeptor-Proteinkomplexe sind durch den CheW - CheA Komplex an das Zwei-Komponentensystem gekoppelt. Die Histidin Kinase CheA besitzt eine Molekülmasse von 81 kDa und setzt sich aus vier Domänen (P1 - P4) zusammen. Diese sind für Phosphattransfer (P1), Responsregulator-Bindung (P2), Kinaseaktivität (P3) und für die Rezeptorkopplung zuständig (Abb. 1.5).

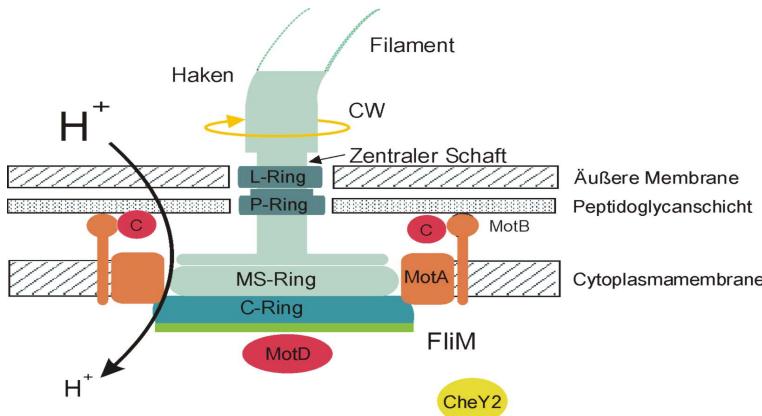


**Abb. 1.5:** Schema der Domänenstruktur der Histidin-Kinase CheA. Die vier Domänen sind mit P1 bis P4 nummeriert.

Die Sequenzidentität dieser Domänen zu den aus *E. coli* beträgt 36,8 %, 24,1 %, 50,0 % und 56,4 %. Es ist auffallend, daß vor allem die Bindungsdomäne P2 eine abweichende

Primärstruktur besitzt [92]. Durch äußere Stimuli wird durch die Rezeptor - CheA (P4) Kopplung die Kinasefunktion aktiviert. Durch ATP abhängige Autophosphataseaktivität wird His48 in P1 phosphoryliert.

Durch Rezeptor-CheA-Kopplung wird somit die CheY2-P-Konzentration reguliert, diese wiederum steuert den Rotationszustand des Motors (schnell - langsam). Im Vergleich zum Flagellenmotor von *E. coli* 1.1 sind bei *S. meliloti* zu den Motorproteinen MotA und MotB, die Protonenkanäle ausbilden, noch zwei weitere Proteine beteiligt: MotC und MotD (Abb. 1.6).



**Abb. 1.6:** Motormodell von *S. meliloti* mit den zusätzlichen Motorproteinen MotC und MotD.

MotC ist ein periplasmatisches Protein, das mit der periplasmatischen Domäne von MotB interagiert und diese vermutlich stabilisiert. MotD, am C-Ring des Motors lokalisiert, wechselwirkt mit FliM [100] und ist für die Motorrotation, die nur im CW-Modus erfolgt, entscheidend [95]. Die unterschiedlichen Funktionsweisen der protonengetriebenen Motoren von *S. meliloti* und *E. coli* sind auf Basis ihrer Grundprinzipien verstanden [91, 95, 100], jedoch sind weder der Mechanismus der Umwandlung von elektrochemischer Energie ( $H^+$ -Gradient) in mechanische Arbeit (Drehmoment) noch die Steuerung der Rotation im Detail verstanden.

## 1.4 Zielsetzungen der Arbeit

Die oben beschriebenen Aspekte, der automatischen Verarbeitung von NMR-Spektren sowie der Signaltransduktion bei *S. meliloti* und verwandten Bakterien, sind in enger Weise mit den Zielsetzungen dieser Arbeit verknüpft. Als Einstieg in eine automatisierte Strukturbestimmung ist gerade die Vorverarbeitung der Spektren von zentraler Bedeutung. Im Hinblick auf eine effektive und schnelle Strukturbestimmung biologischer Makromoleküle sollte hier die Spektrenvorverarbeitung automatisiert werden. Dies umfaßt die automatische Signalsuche in nD-NMR-Spektren ( $n > 2$ ) und deren Klassifizierung.

Besonderheiten des chemotaktischen Systems von *S. meliloti* waren Ausgangspunkt für die Charakterisierung des Zwei-Komponenten-Systems. Der Schwerpunkt lag beim Haupt-Responsregulator CheY2, der mittels Kernmagnetischer-Resonanz-Spektroskopie (NMR) eingehend untersucht werden sollte:

1. Zur Aufklärung der Mechanismen und Prozesse, die entscheidend an der Phosphorylierung und Aktivierung von CheY2 beteiligt sind, sollten die dreidimensionalen Lösungsstrukturen von CheY2, in der inaktiven und aktiven Konformation, bestimmt und verglichen werden.
2. Weitere Einblicke in die Zusammenhänge zwischen Phosphorylierung und Aktivierung von CheY2 sollten durch Untersuchung von Mutantenproteinen mittels *chemical shift mapping*, sowie durch Bestimmung von Phosphorylierungskinetiken mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR gewonnen werden.
3. Die Retrophosphorylierung ist ein neuer Mechanismus zur effizienten De-Phosphorylierung des Responsregulators CheY2. Seine Bindung an CheA in nichtaktivierter und aktivierter Konformation ist ein Novum, das hier in Form von Bindungsstudien ausführlich untersucht werden sollte.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

Im Folgenden sind die verwendeten biochemischen und biophysikalischen Methoden beschrieben. Übersichten und methodische Grundlagen finden sich u.a. in [101–104] bzw. [13–15, 105–110].

### 2.1 Automatisierte Verarbeitung von NMR-Spektren

Die Routinen zur Automatisierung der Spektrenverarbeitung wurden in der Programmiersprache *C* entwickelt und sind als Implementation im Programm AUREMOL [41] verwirklicht. Einige bereits in AUREMOL existierende Routinen wurden an die jeweiligen Erfordernisse angepaßt bzw. direkt verwendet. Dies waren folgende Routinen:

1. zum Einlesen von 1D Intensitätswerten (*1D-slice*), senkrecht zu einer 2D Ebene im 3D-Spektrum,
2. zur automatischen Suche von Signalen (*peakpicking*),
3. zur Volumenintegration (Segmentierung) und
4. zur Berechnung der Signalwahrscheinlichkeiten im 2D Fall.

### 2.2 Proteinanalyse

#### 2.2.1 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Lämmli [111, 112] durchgeführt. Die Proteine wurden in einem 1 mm dicken Minigel in einer Twin Minigel Apparatur von Biometra aufgetrennt. Die Färbung der Gele erfolgte mit dem anionischen Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau.

## 2.2.2 *Western-Blot*

Nach der Auftrennung von Proteinproben im SDS-Gel wurden diese in einer *Tank Blot* Apparatur (Harvard-Biolabs) unter Verwendung von Tris/Glycin-Puffer mit 20 % Methanol auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia) übertragen. Die Protein-Banden wurden mit speziellen Antikörpern (Pineda-Antikörper-Service, Berlin) in einer Verdünnung von 1:1000 unter Verwendung des ECL-Nachweissystems (Amersham Pharmacia) detektiert.

## 2.2.3 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit Hilfe des Biorad-Protein-*Assays* mit dem Farbreagens Coomassie-Brilliant-Blau durchgeführt. Zur Eichung der Farbreaktion wurden Proben mit 1- 10 µg BSA, 800 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl Farbreagens verwendet. Die optische Dichte des Ansatzes wurde bei 595 nm (Spektrometer: Pharmacia Ultraspec III) bestimmt. Bei den zu testenden Proteinproben wurde ebenso verfahren. Für die Konzentrationsangabe einer unbekannten Proteinprobe wurde der Mittelwert aus drei Einzelmessungen verwendet. Eine Korrektur der mit dem Bradford-Test bestimmten Proteinkonzentrationen wurde durch Vergleich mit den Werten aus Aminosäureanalysen der verschiedenen Proteine durchgeführt.

## 2.3 Expression und Reinigung von CheY2

### 2.3.1 Zellanzucht und Expression von CheY2

Für die rekombinante Expression des Fusionsproteins *S. meliloti* CheY2-Intein-CBD mit dem IMPACT-System [113–116] wurde der *E. coli* Stamm ER2566 [116] verwendet. Dieser wurde mit dem Plasmid pRU2313 (Amp<sup>R</sup>, 387 bp *NdeI-SapI* PCR Fragment mit *cheY2*, in pTYB1, NE BioLabs) transformiert. Für die Vorkultur zur Expression wurden 20 ml LB/Amp mit einer aus der Transformation erhaltenen Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem 300 ml Erlenmeyerkolben im Schüttelwasserbad (New Brunswick) kultiviert. Zur Isolierung von rekombinantem CheY2 wurde je 1 l Minimalmedium mit Glucose und Ammoniumsulfat (Tab. 2.1) mit 5 ml Vorkultur beimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,5 kultiviert.

Dieser Punkt der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen war bei nicht isotopenmarkierten bzw. <sup>15</sup>N-markierten Proben der Induktionsstart. Die Proteinexpression wurde bei einer Wachstumstemperatur von 16°C über eine Dauer von 19 h durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert. Da die <sup>13</sup>C-Isotopenmarkierung einen hohen Kostenfaktor darstellt wurde ein modifiziertes Expressionsprotokoll verwendet. Die Hauptkultur wurde zunächst bei 37°C im M9 Minimalmedium mit 1 g/l <sup>12</sup>C-Glucose und 1 g/l <sup>14</sup>NH<sub>4</sub>Cl bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,5 kultiviert. Nach Sedimentation bei 5000 g

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung des M9 Expressionsmediums.

Material	Menge	Sterilisation
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	7,52 g/l	autoklaviert
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g/l	
NaCl	0,5 g/l	
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	250 mg/l	filtriert (0,22 µm)
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	14 mg/l	
FeCl <sub>3</sub>	5 mg/l	
<sup>14</sup> NH <sub>4</sub> Cl bzw. <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl	1 g/l	
Ampicillin	100 mg/l	
Thiamin	0,2 mg/l	
<sup>12</sup> C-Glucose bzw. <sup>13</sup> C-Glucose	10 g/l 1 g/l	

und 4°C wurden die Zellen in frischem M9-Medium mit 1 g/l <sup>13</sup>C-Glucose und 1 g/l <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl resuspendiert. Die Proteinexpression bei 30°C wurde nach einer Erholungsphase von 30 min mit 0,3 mM IPTG induziert. Nach weiteren 5 h Wachstum wurden die Zellen geerntet und bei -80°C gelagert.

### 2.3.2 Zellaufschluß und Reinigung von CheY2

Die bei 5000 g und 4°C sedimentierten Zellen aus insgesamt 2 l Medium wurden in 20 ml Aufschlußpuffer (20 mM HEPES pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mit einer French Press Minicell bei einem Innendruck von 20000 psi. Nicht aufgeschlossene Zellen und unlösliche Membranbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 48000 g und 4°C vom cytosolischen Anteil getrennt. Dieser wurde abgenommen und bei 4°C gelagert. Ein nahezu vollständiger Aufschluß des Sediments wurde durch zwei- bis dreimalige Wiederholung des French Press-Aufschlusses erreicht. Nach Aufschluß und Sedimentation wurden die jeweiligen Überstände vereinigt und mittels Affinitätschromatographie weiter gereinigt.

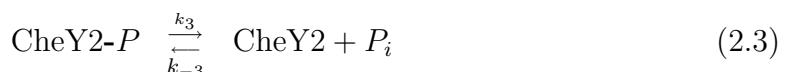
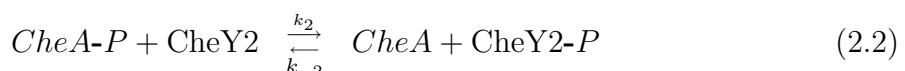
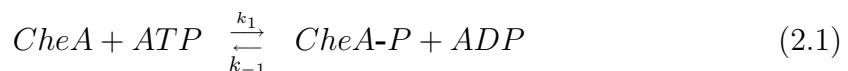
Das Fusionsprotein CheY2-CBD wurde durch Affinitätschromatographie über eine Chitin-Agarosesäule von den cytosolischen Bestandteilen getrennt und gereinigt. Es wurden Glassäulen mit einem Innendurchmesser von 2,6 cm verwendet, die mit 15 ml Material gefüllt wurden. Nach Aquilibrieren der Säule mit drei Säulenvolumen Puf-

fer wurde der Überstand aus der Zelllyse mit einer Durchflußgeschwindigkeit von ca. 0,4 ml/min bei 4 °C aufgetragen. Dem Waschschnitt mit etwa 10 Säulenvolumen Aufschlußpuffer folgte das Auftragen von drei Säulenvolumen 50 mM DTT, gelöst in Aufschlusspuffer, zur Induktion der Spaltungsreaktion des Inteins. Letzteres wurde mit erhöhter Durchlaufgeschwindigkeit von ca. 3 ml/min durchgeführt um die frühzeitige Elution von abgespaltenem Protein zu verhindern. Nach einer 16 stündigen Inkubationszeit konnte das vollständig abgespaltene Protein in hoher Reinheit von der Säule eluiert werden.

Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE getestet und CheY2-enthaltende Fraktionen (ca. 20- 30 ml) vereinigt. Diese wurden unter Verwendung eines Dialyse-schlauchs mit einer Ausschlussgrenze von 6- 8 kDa gegen 1 l 20 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,5 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, für 2 h und nach Pufferwechsel für weitere 24 h dialysiert. Das Dialysat wurde durch Ultrafiltration bei einem N<sub>2</sub>-Druck von 3 bar in einer Amicon Rührzelle unter Verwendung einer 3 kDa-Cellulose-Membran auf ca. 2 mg/ml ankonzentriert. Den abschließenden Reinigungsschritt zur Abtrennung von hoch- und niedermolekularen Verunreinigungen, bei gleichzeitigem Pufferwechsel auf 20 mM Tris/HCl pH 6,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, bildete eine FPLC Gelfiltrationschromatographie. Nach Äquilibrierung der Säule (Superdex75 bzw. Superdex200) mit Puffer wurde 1 ml CheY2-Lösung injiziert. CheY2 wurde mit einer konstanten Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert und das Eluat in 0,5 ml-Fraktionen gesammelt. Die Detektion der aufgetrennten Proteine im Elutionsvolumen erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. Nach SDS-Page Analyse wurden CheY2 enthaltende Fraktionen vereinigt und mittels Ultrafiltration konzentriert.

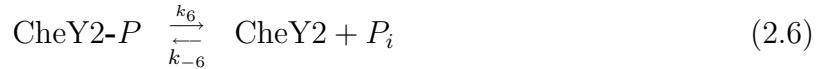
## 2.4 Phosphorylierung und Berylliofluoridierung von Responsregulatoren

Innerhalb des Zwei-Komponenten-Systems wird CheY2 durch Bindung an die aktivierte Histidin-Autokinase CheA phosphoryliert. Die Phosphorylierung von CheA erfolgt unter Umsetzung von ATP zu ADP. Die entsprechenden Reaktionsschritte sind in den Gleichungen (2.1 - 2.3) beschrieben:



Viele Responsregulator-Proteine können in Abwesenheit der jeweiligen Histidinkinase

durch kleine, molekulare Phosphordonoren aktiviert, d.h. phosphoryliert werden [77, 117–119]. In den Gleichungen 2.4 - 2.6 sind die im System CheY2 - AcP ablaufenden Reaktionen gegeben. Die Zerfallskonstanten einzelner Reaktionen sind mit  $k_i$  bezeichnet.



Aufgrund der geringen Halbwertszeit des phosphatgebundenen Zustands ( $\leq 20$  s) ist der Umsatz des Phosphodonors für lange NMR-Messungen (bis zu drei Tage) zu groß, um für die gesamte Meßdauer einen hohen Überschuß an Donormolekülen zu gewährleisten. Folglich sind in den Spektren Signale der aktiven und inaktiven Konformation zu beobachten. Außerdem führen hohe Donorkonzentrationen zu Proteinaggregation und bereiten bei der Einstellung des Spektrometers Probleme. Bei Verwendung von AcP entsteht Essigsäure (Gl. (2.4), (2.5)) in der Probe, was zu einer Erniedrigung des pH-Werts führt, da die Pufferkonzentration NMR-technisch beschränkt ist. Diese Effekte verursachen bei der Spektrenauswertung und Zuordnung Probleme. Eine ausreichend hohe Population der aktiven Konformation kann nicht über die Dauer der Messung sichergestellt werden. Die Unterscheidung zwischen beiden Signalgruppen ist bei kleinen Unterschieden kaum möglich. Insbesondere sind die chemischen Verschiebungen, als wichtigste Größen der NMR Strukturbestimmung, sehr pH-sensitiv.

Diese Probleme können bei Verwendung von Berylliumfluorid ( $\text{BeF}_3^-$ ) [120, 121] umgangen werden. Mit  $\text{BeF}_3^-$  kann eine für mehrere Monate stabile und phosphatanaloge, aktive Konformation erzeugt werden. Dies trifft für einige bakterielle Responsregulatoren zu [122, 123] und wurde für CheY2 aus *S.meliloti* in dieser Arbeit nachgewiesen (3.4.1).

## 2.5 Herstellung von CheY2- $\text{BeF}_3^-$

Die Herstellung der stabilen, phosphat-analogenen Konformation von CheY2 mittels  $\text{BeF}_3^-$  wurde in Anlehnung an das Protokoll in [122] und [123] durchgeführt. Hierzu wurde eine frische Stammlösung 1 %  $\text{BeCl}_2$  / 1 % HCl hergestellt und der pH-Wert mit NaOH an den der NMR-Probe angepaßt. Die Lösung wurde in einem Verhältnis von  $\text{BeCl}_2 : \text{CheY2} = 5 : 1$  zur Proteinprobe gegeben. Anschließend wurde in  ${}^2\text{H}_2\text{O}$  gelöstes NaF im Verhältnis NaF :  $\text{BeCl}_2 = 10 : 1$  zur Probe geben und der pH-Wert für die NMR-Messungen eingestellt.

## 2.6 CheY1, CheA<sub>174–316</sub> (P2), MotD

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemotaxis-Proteine, der Responsregulator CheY1, die CheY2 Bindungsstelle von CheA: CheA<sub>174–316</sub> (P<sub>2</sub>-Domäne), CheY2-Mutanten sowie das Motorprotein MotD wurden im Labor von Dr. B. Scharf<sup>1</sup> exprimiert und für NMR-Messungen aufgereinigt.

## 2.7 NMR-Proben und Messbedingungen

Die Probenzusammensetzung war je nach NMR-Experiment unterschiedlich. Standardmäßig enthielten alle Proben 0,1 mM DSS als internen Standard zur Referenzierung. Die chemische Verschiebung der <sup>1</sup>H-Methylgruppe in DSS wurde zur indirekten Referenzierung der <sup>13</sup>C-, <sup>15</sup>N- [124] und <sup>31</sup>P- [125] Dimensionen in den Spektren verwendet. Das für die Funktion von CheY2 essentielle zweiwertige Ion Mg<sup>++</sup> war in allen Proben, durch Zugabe von MgCl<sub>2</sub>, in einer Konzentration von 5 mM enthalten. Durch Titrationsexperimente mit MgCl<sub>2</sub> an einer 1 mM Probe wurde gezeigt, daß diese Konzentration ausreichend zur vollständigen Komplexierung von CheY2 mit Mg<sup>++</sup> ist. Ein Vergleich der NMR Spektren von CheY2 in NaP<sub>i</sub>- und Tris/HCl- Puffer ergab keine Unterschiede. Da jedoch CheY2 im Tris/HCl Puffersystem größere Stabilität zeigte, wurde dieser für die weiteren Messungen verwendet. Zu allen Proben wurde Proteaseinhibitorgemisch (1000-fach, 100 µM Pepstatin, 100 µM Leupeptin, 10 µM BPTI in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) im Verhältnis 1:1000 und 0,01 mM Natrium-Azid gegeben. Der Anteil von <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O lag für wässrige Proben bei 10 % <sup>2</sup>, für Proben in Deuteriumoxid bei 99,7 %. Die CheY2-Konzentration betrug bei <sup>1</sup>H-detektierten Spektren 0,5- 1,2 mM, bei <sup>31</sup>P-Messungen zwischen 10 und 30 µM. Alle Spektren wurden bei einer Probentemperatur von 298 K aufgenommen. Die Eichung der Temperatureinheit des NMR Spektrometers wurde mit einer Ethylenglykolprobe durchgeführt [126]. Bei diesem Verfahren kann die Temperatur durch Analyse der Protonenverschiebungen der CH<sub>2</sub>- und OH-Gruppen im Bereich zwischen 273 K und 416 K kalibriert werden. Der pH-Wert der Proben wurde mit einem Knick 761 pH-Meter unter Verwendung einer 3 mm Glaselektrode gemessen, ohne den Isotopeneffekt des Deuteriums in den Proben zu berücksichtigen. Durch Zugabe der entsprechenden Menge an NaO<sup>2</sup>H bzw. <sup>2</sup>HCl wurde der pH-Wert auf 6,83 titriert. In dieser Zusammensetzung waren die NMR Proben etwa zwei bis drei Monate stabil, abhängig von Messdauer und den durchgeführten Experimenten. Für zeitlich länger als zwei Monate auseinanderliegenden Experimente wurde CheY2 jeweils frisch präpariert. Eine Lagerung bei -20 °C war nicht möglich, da das Protein präzipitierte. Für die chemischen Verschiebungen und die Probenqualität konnten keine Unterschiede zwischen

<sup>1</sup>Lehrstuhl für Genetik, Universität Regensburg

<sup>2</sup>Der <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O-Anteil in der Probe ist für die Stabilisierung des NMR Spektrometers während der Messungen erforderlich, „Lock-Signal“.

den verschiedenen Proben festgestellt werden.

## 2.8 NMR-Experimente

Mit den in Abschnitt 2.7 beschriebenen Proben konnten NMR Spektren mit guter Qualität aufgenommen werden. Die Datenaufnahme kann in drei größere Bereiche eingeteilt werden: Spektren für

1. die sequentielle Zuordnung (Haupt- und Seitenketten)
2. die Gewinnung von Strukturinformationen und
3. die Untersuchung der Wirkungsweise eines Proteins.

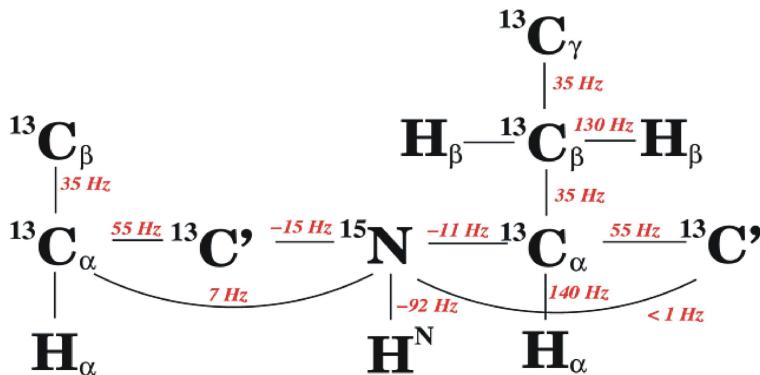
Eine Beschreibung der verwendeten Spektren ist in den jeweils angegebenen Referenzen aber auch in [105–107] zu finden. Für die Aufnahme der Datensätze standen Bruker Spektrometer vom Typ DMX500, DRX600 und DRX800 zur Verfügung, mit Protonen-Resonanzfrequenzen von 500 MHz, 600 MHz und 800 MHz. Zur Aufnahme und Prozessierung der Daten stand das Softwarepaket XWINNMR [127] zur Verfügung. 1D- $^{31}\text{P}$ -Spektren wurden mit 8192 Datenpunkten aufgenommen. 2D-Spektren mit 2048 Datenpunkten in der direkten  $^1\text{H}$ -Dimension und 512 Datenpunkten in der indirekten  $^{15}\text{N}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -Dimension. Alle 3D-Spektren wurden mit 1024 Datenpunkten in  $^1\text{H}$  Dimension, 128 in  $^{13}\text{C}$  (TPPI [128]) und 64 in  $^{15}\text{N}$  (*constant time, echo-antiecho* [129]) gemessen. Die weitere Analyse und Auswertung der Spektren erfolgte mit den Programmen AURELIA [130] und AUREMOL [41].

### 2.8.1 Tripelresonanz-Experimente

Ziel der sequentiellen und partiellen Zuordnung ist es, eine maximale Zahl an chemischen Verschiebungen für  $^1\text{H}$ -, ( $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -) Kerne zu identifizieren. Bis dato ist dies der wichtigste und auch zeitaufwendigste Prozeß der Strukturbestimmung. Mit wachsender Größe von Biomolekülen nehmen Signalüberlagerungen und Relaxationseffekte zu. Dies sind mitunter auch die Gründe, weshalb die Strukturbestimmung mit homonuklearen 2D COSY, TOCSY und NOESY Spektren, nach der Methode von Wüthrich [131, 132], nur bis zu einer Molekülmasse von etwa 10 kDa möglich ist. Mit Tripelresonanz-Experimenten<sup>3</sup> [13–15, 107, 108], die eine Isotopenmarkierung der Proteine mit  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  erfordern, können Proteine bis zu einer Größe im Bereich von

<sup>3</sup>Die Nomenklatur der Tripelresonanz-Experimente wurde von Ikura *et al.* [13] eingeführt. Der Name des Experiments, z.B. CBCA(CO)NH, beschreibt wie die Magnetisierung im Verlauf des Experiments transferiert und durch welche Spins sie frequenzmarkiert wird. Eingeklammerte Kerne sind nur am Magnetisierungstransfer beteiligt, d.h. ihre Resonanzfrequenz taucht im Spektrum nicht auf.

20 kDa untersucht werden. In diesen Experimenten werden für den Magnetisierungs-transfer J-Kopplungen benutzt, die groß im Vergleich zur Linienbreite sind. Für das Proteinrückgrat sind die skalaren homo- und heteronuklearen Kopplungskonstanten in Abb. 2.1 (J-Kopplungskonstanten [108]) zusammengefaßt.



**Abb. 2.1:** J-Kopplungskonstanten des Proteinrückgrats für  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  markierte Proteine.

## 2.8.2 Zuordnung der Hauptkette

Die Grundlage der sequentiellen Zuordnung bildete das HNCA Experiment [133, 134]. Bei diesem wird eine Amid-Gruppe mit dem CA Kern der eigenen und der in Richtung N-Terminus vorausgehenden Aminosäure korreliert. Mehrdeutige Zuordnungen konnten durch die Experimente CBCA(CO)NH [16], HBHA(CO)NH [135] und  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC [136] eindeutig geklärt werden. Die Carbonylverschiebungen der Hauptkette wurden aus einem HNCO-Spektrum [133, 134] bestimmt.

## 2.8.3 Zuordnung der Seitenketten

Die  $\text{C}^\beta$  und  $\text{H}^\beta$  chemischen Verschiebungen wurden aus den bereits bei der Hauptkettenzuordnung verwendeten Experimenten CBCA(CO)NH, HBHA(CO)NH entnommen. Die Auswertung von HCCH-TOCSY [17] und CC(CO)NH [137] Spektren lieferte den Großteil der partiellen Zuordnung. Fehlende bzw. mehrdeutige Zuordnungen konnten zu einem späteren Zeitpunkt teilweise unter Zuhilfenahme von  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC,  $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC [136] und 2D NOESY Spektren geklärt werden. Die NH<sub>2</sub>- und CO- Verschiebungen der Asparagin- und Glutamin-Seitenketten wurden aus HNCA, CBCA(CO)NH und HNCO ermittelt. Die chemischen Verschiebungen der Ringprotonen von Histidin und Phenylalanin konnten aufgrund ihrer NOE-Kontakte in den 2D-NOESY/ $^2\text{H}_2\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC und HCCH-TOCSY Spektren identifiziert werden.

## 2.8.4 NOESY-Spektren

Die wichtigsten strukturellen Informationen bei der NMR-Strukturbestimmung sind die aus den NOE-Spektren abgeleiteten paarweisen Proton-Proton Abstände. Die NOE-Spektroskopie beruht auf dem Effekt der Kreuzrelaxation zwischen dipolar gekoppelten Protonenpaaren. In einem Zwei-Spin-System ist die Änderung der Magnetisierung des einen Kerns  $I$  an die des zweiten  $S$  gekoppelt:

$$\frac{d\Delta I_z(t)}{dt} = -\rho_I \Delta I_z(t) - \sigma_{IS} \Delta S_z(t) \quad (2.7)$$

$$\frac{d\Delta S_z(t)}{dt} = -\rho_S \Delta S_z(t) - \sigma_{IS} \Delta I_z(t) \quad (2.8)$$

Hierin bedeuten  $\rho_I$ ,  $\rho_S$  die Autorelaxationsraten und  $\sigma_{IS}$  die Kreuzrelaxationsrate. Bei der Annahme eines isolierten Zwei-Spin-Systems (*isolated two-spin approximation*), d.h. für sehr kurze Mischzeiten  $\tau_m$  (*initial rate regime*), ist die Intensität  $I_{IS}$  eines Kreuzsignals proportional zum Produkt aus Kreuzrelaxationsrate und Mischzeit. Die Kreuzrelaxationsrate wiederum ist proportional zur inversen sechsten Potenz des Abstands  $r_{IS}^{-6}$  der beteiligten Kerne [105, 106]:

$$\begin{aligned} I_{IS} &\propto \sigma_{IS} * \tau_m \\ &\propto r_{IS}^{-6} \end{aligned} \quad (2.9)$$

Diese Näherung gilt für Biomoleküle mit typischen Mischzeiten zwischen 50 ms und 150 ms nicht mehr exakt. Dennoch ist dieser Bereich ein guter Kompromiß aus Intensität der Kreuzsignale und Störeffekten höherer Ordnung, wenngleich in manchen Fällen auch Mischzeiten zwischen 20 ms und 300 ms benutzt werden können. Die Terme höherer Ordnung beschreiben z.B. Spindiffusion oder Magnetisierungsrücktransfer. Diese Effekte führen dazu, daß Kreuzsignale eine größere bzw. kleinere Intensität besitzen als die aus der linearen Beziehung (2.9) abgeleitete und eine zusätzliche Fehlerkorrektur für die experimentell bestimmten Abstände erfordern. Die Kalibrierung der Abstandsabhängigkeit der Signalvolumina erfolgt in linearer Näherung meist unter Verwendung eines Kreuzsignals mit bekanntem Abstand (z.B. Methylengruppen 0,18 nm, aromatische Ringprotonen 0,25 nm):

$$r_i = r_{ref} * \left( \frac{S_{ref}}{S_i} \right)^{1/6} \quad (2.10)$$

Hierbei ist  $r_i$  der zu bestimmende Abstand,  $r_{ref}$  der Referenzabstand und  $S_x$  das jeweilige Volumen. Durch diese Art der Kalibrierung fließen zusätzliche Fehler in die Abstände ein. Einerseits durch die Wahl des Referenzsignals (starke Kopplung, i.A. kleine Distanz), andererseits durch die als gleich angenommenen Korrelationszeiten<sup>4</sup> für

---

<sup>4</sup>In erster Näherung ist  $\sigma$  proportional zur Korrelationszeit  $\tau_c$ , d.h.  $I_{IS}$  ist direkt proportional  $\tau_c$ , somit abhängig von der Dynamik der betrachteten Spinpaare.

verschiedene Protonenpaare. Die so bestimmten Beschränkungen können bei Strukturrechnungen nicht als feste, spezifische Distanzen verwendet werden, sondern stellen vielmehr einen Abstandsbereich für die Spinpaare dar. Dies wird in den Strukturrechnungen durch Verwendung von unteren und oberen Grenzen für den jeweiligen Abstand berücksichtigt. Die Fehler in den Abständen liegen zwischen 10 - 40 % [109]. Kreuzsignale, deren Protonen nicht weiter als 5 Aminosäuren entfernt liegen (*medium range signals*) tragen zur Festigung der Sekundärstrukturelemente bei, während NOE-Kontakte über mehr als 5 Reste (*long range*) die Hauptinformation für die Tertiärstruktur des Proteins enthalten. Erstere legen zusammen mit anderen Parametern wie z.B. dihedralen Winkel die Sekundärstruktur fest. Langreichweite Kontakt bestimmen im Wesentlichen die globale Faltung des Proteins und sind daher entscheidend für die 3D Strukturbestimmung.

Für die Strukturbestimmung von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> wurden Abstandsinformationen aus den 2D NOESY-Spektren in H<sub>2</sub>O bzw. <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, einem 3D <sup>15</sup>N-NOESY-HSQC und einem 3D <sup>13</sup>C-NOESY-HSQC Spektrum verwendet. Diese wurden mit Ausnahme des <sup>15</sup>N-NOESY-HSQC Spektrums am 800 MHz Spektrometer aufgenommen. Bei allen Experimenten wurde eine Mischzeit  $\tau_m$  von 100 ms verwendet.

### 2.8.5 Wasserstoffbrücken

Bei der Ausbildung und Stabilisierung von Sekundärstrukturelementen sind Wasserstoffbrücken wesentlich beteiligt. Aus diesem Grund ist die Kenntnis möglichst vieler Wasserstoffbrücken für die 3D Strukturbestimmung sehr hilfreich. Diese können einerseits direkt über die relativ kleine ( $^3J_{NCO} < 1\text{Hz}$ ) Kopplung mit NMR Spektroskopie gemessen werden. Für größere Moleküle beschränkt jedoch die Relaxation der Magnetisierung während der relativ langen Magnetisierungs-Transferzeit die Anwendung dieser Methode.

Wasserstoffbrücken im Molekül können auch indirekt lokalisiert werden. Hierbei wird ausgenutzt, daß die an Wasserstoffbrücken beteiligten Protonen nur langsam mit dem Lösungsmittel austauschen. Bei der Realisierung des Experiments kann das in wässrigem Puffer gelöste Protein gefriergetrocknet und anschließend in D<sub>2</sub>O resuspendiert werden. Durch eine Meßreihe mit zeitlich aufeinanderfolgenden <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC Spektren können langsam austauschende Amidprotonen identifiziert werden, da deren Signale länger beobachtet werden können. Jedoch ist nicht jedes langsam austauschende Amidproton an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt, möglich wäre auch eine schlechte Lösungsmittelzugänglichkeit. Mit dieser Methode können zwar potentielle Amidgruppen identifiziert werden, jedoch fehlt die Information über die jeweils beteiligte Carbonylgruppe. Die HN-CO-Paare und somit die Wasserstoffbrücken können durch bereits feststehende Sekundärstrukturelemente und bestehende NOE-Kontakte relativ sicher zugeordnet werden.

Aufgrund der hohen Molekülmasse von CheY2 (14 kDa) konnten Wasserstoffbrücken nicht direkt aus entsprechenden HNCO-Spektren bestimmt werden. Zu deren Bestimmung mit der indirekten Methode wurde  $^{15}\text{N}$  markiertes Protein gefriergetrocknet, in  $\text{D}_2\text{O}$  resuspendiert und direkt im Anschluß eine Folge von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren im Abstand von 30 min aufgenommen. Die Zuordnung langsam austauschender Amidprotonen zu Wasserstoffbrücken, d.h. zu den jeweiligen Carbonylgruppen, wurde in Kombination mit bestehenden NOE-Kontakten und der Sekundärstruktur durchgeführt.

### 2.8.6 Protein-Protein-Wechselwirkungen

Ergeben sich bei Protein-Protein Wechselwirkung Komplexe mit Molekülmassen von etwa 20 bis 80 kDa, ist bei NMR Untersuchungen die Verwendung der TROSY-Spektroskopie [7] notwendig. Das TROSY-Prinzip nutzt die Interferenz von dipolarer Kopplung und Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA) aus. Die vier Multiplettsignale einer HN-Gruppe im Protein besitzen aufgrund dieser Interferenz unterschiedliche Linienbreiten. Verglichen mit Standard HSQC-Experimenten wird durch Selektion des Signals mit der geringsten Linienbreite im TROSY Spektrum eine erhebliche Verbesserung der Spektrenqualität erreicht.

Die durch Protein-Interaktion induzierten spektralen Veränderungen in  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren können unter der Voraussetzung einer bereits vorhandenen Zuordnung in einer Titrationsreihe mit nicht markiertem Liganden verfolgt werden. Signallage und Intensität sind eng mit der Konformation und chemischen Umgebung des jeweiligen Kerns verknüpft (s. 2.9). Die beobachteten Veränderungen können durch strukturelle Unterschiede, chemischen Austausch, Relaxationseffekte oder durch die Nähe des Liganden verursacht werden und erlauben eine Charakterisierung der Protein-Protein Wechselwirkung. Werden diese Veränderungen auf die Proteinoberfläche projiziert (*chemical shift mapping*) kann die Bindungsstelle lokalisiert und näher beschrieben werden.

Die Wechselwirkungen von CheY2 bzw. CheY2-BeF<sub>3</sub> mit bekannten und möglichen Bindungspartnern der Chemotaxis-Signalkette (P2, CheY1) bzw. dem Motorprotein MotD wurden anhand von Titrationsreihen untersucht. Die gegen den flüchtigen Puffer Ammoniumacetat dialysierten Ligandenproteine wurden in der entsprechenden Menge gefriergetrocknet und in der NMR-Probe resuspendiert. Bei einer konstanten  $^{15}\text{N}$ -CheY2 bzw. CheY2 BeF<sub>3</sub> Konzentration von ca. 0,5 mM wurde die Konzentration des Liganden schrittweise um 0,1 mM erhöht und jeweils ein 2D  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektrum aufgenommen. Nach 6 bis 8 Titrationsschritten wurden keine weiteren spektralen Veränderungen beobachtet. Letztere wurden in vier Klassen eingeteilt:

1. verschwindende Signale (Intensitätsverlust > 0,97),
2. relativer Intensitätsverlust  $I_{rel}$ ,

3. chemische Verschiebungsänderung  $\Delta\text{ppm}_g$ ,
4. keine Änderung.

Zur Normierung der Signalamplituden wurde der Amplitudenmittelwert einer Gruppe relativ gleich bleibender Signale (ca. 11 %) verwendet. pH-induzierte Effekte konnten durch Überprüfung des pH-Wertes bei jedem Titrationsschritt ausgeschlossen werden. Für die Darstellung der spektralen Veränderungen auf der Proteinoberfläche wurden Signale der Klasse 1, der Klasse 2 und der Klasse 3 berücksichtigt. Als Signifikanzniveau wurde jeweils die doppelte Varianz der Intensitätsquotienten bzw. chemischen Verschiebungen verwendet.

### 2.8.7 $^{31}\text{P}$ -Messungen

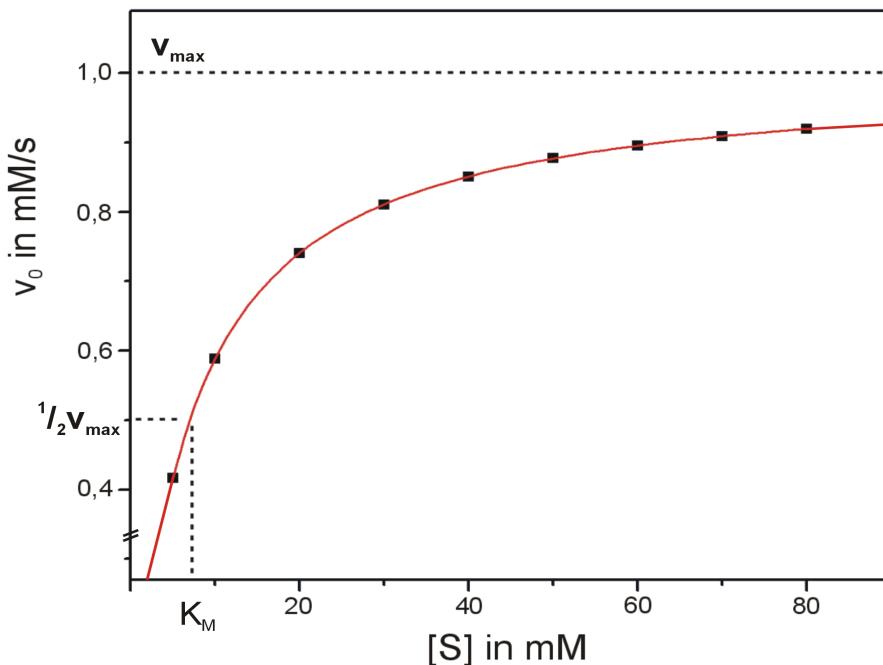
Die Untersuchung der Phosphorylierungseigenschaften von CheY1, CheY2 und CheY2-Mutanten wurde mittels 1D  $^{31}\text{P}$ -Spektroskopie [138] durchgeführt. Als Phosphordonor wurde AcP [99] im Konzentrationsbereich zwischen 5 mM und 80 mM verwendet. Der Anteil an freiem Phosphat zu Beginn einer Messreihe betrug ca. 15 %. Die Konzentration der Responsregulator Proteine lag zwischen 10 und 30  $\mu\text{M}$ . Pro Messpunkt wurden 16 FID's mit jeweils 8192 Datenpunkten akkumuliert. Die Spektrenweite betrug 40 ppm, bei indirekter Referenzierung auf DSS. Mit einem Relaxationsdelay von 5 s ergab sich eine Messdauer von 93 s. Je nach Geschwindigkeit des AcP-Zerfalls (Gl. (2.4) - (2.6)) war der zeitliche Abstand zweier Messpunkte zwischen 30 min (Gl. (2.4)) und 5 bis 10 min (Gl. (2.5) und (2.6)). Die Spektren wurden mit 16000 Datenpunkten prozessiert. Die Dekonvolution der Spektren in eine Summe von Lorentzlinien und deren Integration erfolgte mit dem Programm XWINNMR. Zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit (Gl. 2.11) der Gesamtreaktion (Gl. (2.4) bis (2.6)) wurde zunächst die zeitliche Abhängigkeit des relativen Volumens des AcP-Signals mit dem Programm ORIGIN an eine Gleichung erster Ordnung angepaßt. Der Betrag  $|m|$  der Steigung dieser Geraden gibt direkt die Anfangsgeschwindigkeit. Nach Abzug der Zerfallsrate von AcP in Puffer ohne Protein ist ein Vergleich der Umsatzraten verschiedener Proteine und ggf. die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante  $k_3$  (Gl. (2.6)) und Halbwertszeit  $T_{\frac{1}{2}}$ , im Rahmen der Michaelis-Menten Enzymkinetik möglich.

Die Michaelis-Menten-Gleichung der Enzymkinetik [139] beschreibt den Substratumsatz eines Enzyms, wie z.B. AcP und CheY2 (s. Gl. 2.3):

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.11)$$

Diese Funktion zweiter Ordnung (Hyperbelgleichung) beschreibt die Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  einer Reaktion von der Substratkonzentration  $[S]$ . Die Ma-

Maximalgeschwindigkeit  $v_{max}$  und die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  sind enzymspezifische Parameter der Reaktion. In Abb. 2.2 ist Gl. (2.11) für die Parameter  $V_{max}=1 \text{ mM/s}$  und  $K_M=7 \text{ mM}$  graphisch dargestellt (—). Die Bestimmung dieser zunächst unbekannten Größen eines Enzyms kann durch Anpassung der experimentell bestimmten Anfangsgeschwindigkeiten (■) an Gl. (2.11) erfolgen.



**Abb. 2.2:** Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  einer enzymatischen Reaktion (Ordinate) von der Substratkonzentration  $[S]$  (Abszisse) für eine Michaelis-Menten-Reaktion. Die Anpassung (—) der Meßpunkte (■) an die Gleichung (2.11) liefert die gesuchten Größen  $v_{max}=1 \text{ mM/s}$  und  $K_M=7 \text{ mM}$ .

Aus der Maximalgeschwindigkeit kann mit der bekannten Enzymkonzentration  $[E]$  die Geschwindigkeitskonstante  $k$  für den Zerfall des Enzym-Substrat Komplexes berechnet werden:

$$v_{max} = k * [E] \quad (2.12)$$

Für eine Zerfallsgleichung erster Ordnung (z. B. Gl. (2.6) für CheY2 und CheY1) kann mittels  $k$  die Halbwertszeit  $T_{\frac{1}{2}}$  für die jeweiligen Probenbedingungen berechnet werden (z.B. von CheY2-P, CheY1-P):

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k} \quad (2.13)$$

Bei der experimentellen Realisierung ist die nicht zu vermeidende Zeitverzögerung von zwei bis drei Minuten zwischen Probenzusammenstellung und erstem Messpunkt im Vergleich zur gesamten Messdauer vernachlässigbar. Somit entspricht die ermittelte Anfangsgeschwindigkeit und die daraus berechnete Halbwertszeit auch der des Proteins bei den gewählten Messbedingungen. In jedem Fall stellt sie aber eine obere Grenze dar.

## 2.9 Chemische Verschiebung

Die chemische Verschiebung eines Kerns spiegelt die lokalen chemischen und strukturellen Gegebenheiten wider und ist eng verknüpft mit der Konformation des Proteins. Daher steht nach Abschluß der sequentiellen Zuordnung mit den chemischen Verschiebungen der Hauptkettenatome bereits strukturelle Information zur Verfügung. Mit *chemical-shift-index* (CSI)-Analysen [25, 140, 141] können in diesem Stadium bereits relativ gute Sekundärstruktur-Vorhersagen getroffen werden, was für den Prozeß der NOE-Zuordnung hilfreich sein kann. Bei der CSI-Analyse erfolgt ein Vergleich der chemischen Verschiebungen des Proteins mit den Werten von nicht strukturierten (*random-coil*) Hexapeptiden.

Je nach Sekundärstrukturelement und Kern sind die Werte der chemischen Verschiebung durchwegs kleiner bzw. größer. Somit kann für sequentiell aufeinanderfolgende Aminosäuren mit tendenziell gleichen Unterschieden auf die Sekundärstruktur geschlossen werden. Für  $H^\alpha$ -Kerne sind die chemischen Verschiebungen in  $\alpha$ -helikalen Bereichen kleiner, für  $\beta$ -Faltblattstrukturen größer als die *random-coil* Werte.  $C^\alpha$ ,  $C^\beta$  und C Kerne verhalten sich genau umgekehrt. Im Falle eines nachfolgenden Prolinrestes ist eine Korrektur der chemischen Verschiebung notwendig, da sonst  $\beta$ -Faltblatt Konformationen vorgetäuscht werden können [142].

Darüberhinaus können aus den chemischen Verschiebungen konformationelle Einschränkungen für die dihedralen Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$  abgeleitet werden. Dies ist mit dem Programm TALOS [26] möglich. TALOS benützt eine Datenbank von Proteinen, für die sowohl chemische Verschiebungen als auch hochauflöste Röntgenstrukturen existieren. Unter Verwendung der  $C^\alpha$ ,  $C^\beta$ , C,  $H^\alpha$  und  $H^N$  chemischen Verschiebungen jeweils eines Aminosäure-Triplets sucht das Programm in der Datenbank nach homologen Bereichen mit ähnlichen chemischen Verschiebungen. Falls die in der Mitte liegenden Aminosäuren der 10 besten Treffer ähnliche  $\Phi$ - und  $\Psi$ -Werte besitzen, können für die ursprüngliche Aminosäure ähnliche Winkelbereiche angenommen und für die Strukturrechnung verwendet werden [25, 26, 140, 141, 143, 144]. Die Fehler werden mit etwa 3 % angegeben. Falsche Winkelvorhersagen können durch Inkonsistenzen mit anderen experimentellen Daten (z.B. NOE's) identifiziert werden.

Abgesehen von der NMR Strukturbestimmung sind die chemischen Verschiebungen wichtige Größen zur Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Von der Änderung der chemischen Verschiebung kann auf eine veränderte chemische Umgebung bzw. Konformation geschlossen werden. Durch Projektion der chemischen Verschiebungsänderungen auf die Proteinoberfläche (*chemical shift mapping*) können Bindungsstelle und/oder induzierte Konformationsänderungen näher charakterisiert werden.

## 2.10 Kombinierte chemische Verschiebungsänderung

Die bei Konformationsänderungen beobachteten Änderungen chemischen Verschiebungen waren für  $^1\text{H}$ -Kerne um den Faktor von 5- 10 kleiner als die der  $^{15}\text{N}$ - bzw.  $^{13}\text{C}$ -Kerne. Um die chemischen Verschiebungsänderungen unterschiedlicher Kerne gleichermaßen zu berücksichtigen, wurde die mit den Skalierungsfaktoren  $f_i$  der Kerne  $A_i$  gewichtete Summe  $\Delta ppm_g(A_1, \dots A_N)$  aus den Einzelverschiebungen  $\Delta ppm_i$  berechnet:

$$\Delta ppm_g(A_1, \dots A_N) = \frac{1}{N} * \sum f_i * \Delta ppm_i \quad (i = 1 \dots N) \quad (2.14)$$

Als Wichtungsfaktor einer Kernsorte wurde der Faktor verwendet, der die in Proteinen beobachtete Varianz der chemischen Verschiebung (BMRB, [50]) des entsprechenden Kerns auf die normierte Varianz der  $^{15}\text{N}$ -Kerne der Hauptkette skaliert. Für die Hauptkettenatome gilt für  $^{15}\text{N}$  Kerne somit  $f_{^{15}\text{N}} \equiv 1$ . Die Faktoren von  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kernen sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

## 2.11 NOE-Zuordnung

Die in Abschnitt 2.8.4 erwähnten NOESY-Spektren wurden mit XWINNMR [127] prozessiert und mit AURELIA [130] bzw. AUREMOL [41] weiter bearbeitet und analysiert. Die Signalvolumina wurden nach automatischer Signalsuche und manueller Nachbearbeitung mit der in AURELIA enthaltenen Segmentierroutine bestimmt. Die Zuordnung der NOESY Spektren erfolgte durch eine manuelle, strukturbasierte Methode. Zunächst wurden eindeutig identifizierbare intraresiduale und sequentielle Kreuzsignale des 2D-NOESY/ $\text{H}_2\text{O}$  und 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC Spektrums zugeordnet. Hierbei wurde das Vorwissen über die Sekundärstruktur (2.9) und den darin typischerweise auftretenden NOE-Kontakten [22, 145] mit einbezogen. Diese Zuordnung bildete die Grundlage für die Normierung der aus den Signalvolumina bestimmten Abstände. Der Normierungsfaktor wurde so gewählt, daß möglichst viele sequentielle und intraresiduale Abstände

**Tabelle 2.2:** Skalierungsfaktoren zur Berechnung der gewichteten chemischen Verschiebungänderung nach Gl. (2.14). Aufgrund der Normierung auf die  $^{15}\text{N}$ -Werte gilt  $f_{^{15}\text{N}} \equiv 1$ .

Typ	$f_{^1\text{H}}$	$f_{^{13}\text{C}}$	$f_{^{13}\text{C}^\alpha}$	Typ	$f_{^1\text{H}}$	$f_{^{13}\text{C}}$	$f_{^{13}\text{C}^\alpha}$
ALA	6,17	1,70	1,80	LEU	6,26	1,95	1,84
ARG	6,50	1,81	1,62	LYS	6,42	2,00	1,83
ASN	6,80	2,51	2,28	MET	6,47	1,82	1,66
ASP	7,37	2,37	2,00	PHE	5,65	1,96	1,53
GLN	6,47	2,05	1,83	PRO	—	5,95	6,12
GLU	6,03	1,74	1,68	SER	6,37	2,28	1,86
GLY	5,80	2,21	3,02	THR	8,15	2,81	1,86
HIS	6,11	2,11	1,88	VAL	6,99	2,44	1,63
ILE	6,65	2,42	1,70				

$d$  im Bereich der dafür typischen Werte lagen (z.B.  $d_{\alpha N}^{(i,i+1)}$ ,  $d_{\alpha N}^{(i,i)}$ ,  $d_{NN}^{(i,i+1)}$ ,  $d_{NN}^{(i,i)}$ ,  $d_{\beta\beta}^{(i,i)}$ ). Die weitere Zuordnung, einschließlich des 2D-NOESY/ $^2\text{D}_2\text{O}$  und 3D- $^{13}\text{C}$  NOESY-HSQC Spektrums, erfolgte iterativ und ging mit der Strukturverfeinerung einher. Mit den Strukturinformationen aus Iterationsschritt  $i$  wurden vorläufige Proteinstrukturen berechnet (2.13), die zur Simulation von NOESY Spektren verwendet wurden. Für die Rückrechnung von NOESY-Spektren wurde das auf dem Relaxationsmatrixformalismus [146–148] basierende Programm RELAX [149] verwendet. Durch Vergleich der simulierten mit den experimentellen Daten war im Schritt  $i+1$  die Identifizierung weiterer NOE-Signale und eine Korrektur bzw. Vervollständigung der bestehenden Zuordnung möglich (2.8.3). Dieser iterative Prozeß wurde beendet, als eine maximal mögliche Zahl an eindeutigen, intraresidualen, sequentiellen, mittel- oder langreichweitigen Kreuzsignalen identifiziert war.

## 2.12 Molekulardynamik

Ein häufig verwendetes Verfahren bei der Berechnung von 3D-Proteinstrukturen aus experimentellen Daten ist das sog. *simulated annealing*. Dies kann sowohl im kartesischen Raum (CNS [150]) als auch im Torsionswinkelraum durchgeführt werden (DYANA [35]). Der hohen Zahl an Freiheitsgraden in einem Protein stehen vergleichbar wenige experimentell bestimmte Randbedingungen gegenüber, so daß das zu lösende Gleichungssystem unterbestimmt ist. Eine Lösung des Systems wird durch Hinzunahme empirischer Daten wie Bindungswinkel und Bindungslängen der kovalent gebundenen Atome

und Beachtung sterischer Einschränkungen (z.B. Van-der-Waals Radien) möglich. Diese zusätzlichen Randbedingungen werden in einem effektiven Kraftfeld zusammengefaßt. In Kombination mit den experimentellen Daten wird aus einer zufälligen Anfangsstruktur mit bekannter Primärstruktur ein minimaler Konformationsraum für das untersuchte Molekül bestimmt, der die experimentellen und empirischen Daten bestmöglichst erklärt. Jeder in der Rechnung verwendete Parameter führt zu einer potentiellen Energie der jeweiligen Konformation. Ist die Endstruktur mit den Eingabedaten konform und besitzt diese minimale Energie so entspricht sie mit hoher Wahrscheinlichkeit einer möglichen und natürlich existierenden Konformation am globalen Energieminimum. Ohne experimentelle Daten besitzt eine Aminosäurekette eine Vielzahl an Konformationen (aufgrund frei drehbarer Bindungen). Entscheidend für die Bestimmung der natürlichen Faltung eines Proteins ist daher die Zahl der experimentell bestimmten Randbedingungen. Die Einschränkung des Konformationsraums, d.h. die Anzahl der Beschränkungen, ist von größerer Bedeutung als die absolut exakte Übereinstimmung der experimentellen Daten (Abstände oder Winkel) mit den tatsächlichen Werten. Da bei der NMR Proteinstrukturbestimmung in Lösung die Moleküle aufgrund der Brownschen Bewegungen keine feste Konformation besitzen (wie z. B. bei Proteinkristallen in der Röntgenkristallographie) schränken die experimentellen Daten den Konformationsraum auf einen Unterraum ein, der im Idealfall am globalen Energieminimum liegt. Zur Charakterisierung dieses Unterraums wird bei der NMR-Strukturbestimmung üblicherweise ein darin enthaltenes Bündel von Strukturen berechnet. Dieses beschreibt die Faltung des Proteins samt der möglichen Fluktuationen. Der RMSD- (*root mean square deviation*, mittlere quadratische Abweichung) Wert des Strukturbündels zur mittleren Struktur ist ein Maß für die Schwankungen der relativen Atomlagen. Dieser darf jedoch nicht überinterpretiert werden, da er nicht unerheblich vom verwendeten Algorithmus und von der Anzahl der Startstrukturen beeinflußt wird.

Bei der Strukturbestimmung mit dem *simulated annealing*-Verfahren wird die Startstruktur auf einige tausend Kelvin aufgeheizt, so daß mögliche Potentialbarrieren überwunden werden können. Unter dem Einfluß der empirischen Parameter (Kraftfeld) kann sich das System in ein Energieminimum entwickeln. Der Hochtemperaturphase folgt ein iterativer Abkühlungsprozeß bei dem die Temperatur des Systems schrittweise gesenkt wird, während die Kraftkonstanten für die experimentellen Daten zunehmend stärker gewichtet werden. Bei jedem Schritt wird unter Berücksichtigung der jeweiligen Randbedingungen die Energie des Systems minimiert. Da nicht sichergestellt werden kann, daß sich die Endstruktur im globalen Energieminimum befindet, ist es notwendig dieses Protokoll mit mehreren Startstrukturen durchzuführen. Hierdurch werden potentiell mögliche und unterschiedliche Wege, die die Struktur im Verlauf der Rechnung durchlaufen kann, auf der Energiehyperfläche abgetastet. Bei Konvergenz der Startstrukturen beschreibt das System zu großer Wahrscheinlichkeit den Konformationsraum um das globale Energieminimum.

Werden als generalisierte Koordinaten Torsionswinkel anstelle von karthesischen Koordinaten verwendet, vereinfacht sich die Potentialfunktion enorm. Im Torsionswinkelraum werden Rotationen um frei drehbare Bindungen verwendet, translatorische Bewegungen der Atome, die ggf. die chemischen Eigenschaften (Bindungslängen) verletzen brauchen nicht durch zusätzliche Kraftfelder und Bestrafungsfunktionen berücksichtigt werden. Ein von DYANA verwendeteter, vereinfachter, rekursiver Algorithmus zur Lösung der Lagrangegleichungen im Torsionswinkelraum führt zu einer erheblichen Verringerung der effektiven Rechenzeit, so daß mehr Zeit für die Lösung der Lagrangegleichungen verwendet werden kann. Generell führt dies zu kürzeren Gesamtrechenzeiten und besser definierten Strukturen.

Die Verfeinerung von vorläufig bestimmten Proteinstrukturen stellt einen iterativen Prozeß dar, in dessen Verlauf die Vollständigkeit und Qualität der Eingabedaten optimiert werden. Durch Vergleich der berechneten Strukturen mit den experimentellen Daten verbessert werden können beispielsweise NOE-Verletzungen identifiziert (z.B. mit MOL-MOL [151]) und ggf. korrigiert werden. Durch Überlagerung von simulierten NOESY Spektren der berechneten Strukturen (z. B. mit der in AURELIA [130] bzw. AURE-MOL [41] enthaltenen Routine RELAX [41]) mit den experimentellen Daten können Zuordnungsfehler identifiziert und weitere Abstandbeschränkungen gewonnen werden.

## 2.13 Strukturrechnung

Für die Strukturbestimmung wurden die experimentell bestimmten Wasserstoffbrücken (2.8.5),  $\Phi$  und  $\Psi$  Winkel (2.9) sowie Proton-Proton Abstände (2.11) verwendet. Die Fehler der aus den NOESY Spektren abgeleiteten Abstände für NH- bzw. CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen wurden mit 10 %, 20 % und 30 % berücksichtigt. Die obere Grenze eines Abstands setzt sich somit aus Distanz plus Fehler zusammen. Die unteren Grenzen wurden für alle Abstände auf 0,18 nm gesetzt. Mit dem Befehl *hbond* wurden Wasserstoffbrücken in den Strukturrechnungen berücksichtigt. Die von DYANA verwendeten Standardwerte [152] für Wasserstoffbrücken beschränken den Abstand zwischen Wasserstoffatom und Akzeptor auf 0,18 - 0,20 nm, die Distanz zwischen kovalent an das Wasserstoffatom gebundenem Atom und Akzeptor auf 0,27 - 0,30 nm. Die Strukturrechnung erfolgte durch Minimierung von 250 zufällig erzeugten Anfangsstrukturen im Torsionswinkelraum (2.12) mit dem in DYANA implementierten Protokoll *anneal*. Dieses Protokoll umfaßt einen *simulated annealing* Schritt mit 800 Hochtemperatur- und 3200 Abkühlsschritten mit anschließenden 1000 Schritten Energieminimierung nach dem Konjugierten-Gradienten-Verfahren. Bei der Bewertung der Strukturrechnung verwendet DYANA die potentielle Energie, die als indirektes Maß, unter Berücksichtigung des Kraftfeldes, in Form einer Bestrafungsfunktion, der sog. *target function* (TF), angegeben wird. Die Berechnung vorläufiger Strukturen im Rahmen der iterativen NOESY-

Zuordnung (2.11) erfolgte ausschließlich mit Abstandsbeschränkungen. Die endgültigen Rechnungen wurden mit allen experimentellen Einschränkungen (3.4.8) durchgeführt. Die Auswahlkriterien für Strukturensembles waren durch niedrige TF-Werte, passende Ramachandran Winkel [153–155] und eine minimale Zahl an NOE-Verletzungen (2.14) gegeben.

## 2.14 Strukturanalyse und Strukturbewertung

Bei der Bewertung von Strukturen können unterschiedliche Parameter einbezogen werden. Die aus der Strukturrechnung erhaltene potentielle Energie stellt ein relatives Maß für die Erfüllung der experimentellen (Abstände, Winkel) und empirischen (Kraftfeld) Randbedingungen dar. Da diese Größe vom Rechenverfahren und den experimentellen Daten abhängt, kann sie nur eingeschränkt als Bewertungsmaßstab verwendet werden. Verletzte NOE-Kontakte und Winkel erhöhen im Kraftfeld die Energie, sind also indirekt in der potentiellen Energie enthalten. Die globalen sowie die lokale RMSD-Werte geben an, wie gut ein Strukturbündel in sich definiert ist. Große Werte können durch widersprüchliche, qualitativ schlechte oder zu wenig Eingabedaten verursacht werden. Jedoch ist auch diese Größe nur bedingt aussagekräftig, da sie in Analogie zur Energie ein relatives, von der Methode abhängiges Maß darstellt. Größen wie Bindungswinkel, Diederwinkel und Bindungslängen beschreiben die in der Natur existierenden Geometrien und Eigenschaften des Molekülbaus und besitzen für die Bewertung einen objektiven Charakter. Die Überprüfung dieser Parameter ist mit dem Programm PROCHECK [156] möglich. Eine besondere Bedeutung besitzt der Ramachandran-Plot [153–155], der Auskunft über die Verteilung der  $\Phi$  und  $\Psi$  Winkel der Proteinhauptkette gibt. Da in natürlich gefalteten Molekülen bestimmte Winkelkombinationen bevorzugt werden kann eine Aussage über Sinn und Unsinn der Faltung und Sekundärstruktur der untersuchten Struktur getroffen werden. Die Berechnung der Sekundärstrukturelemente nach Kabsch & Sander [157] und die 3D Darstellung ist mit dem Programm MOLMOL möglich. Die räumliche Darstellung eines Proteins erleichtert die Identifizierung falscher Winkel und ermöglicht eine Zuordnung zur entsprechenden Faltungsklasse (Topologie). Die bisher beschriebenen Bewertungsgrößen liefern Aussagen, wie gut eine Proteinstruktur von den experimentellen Daten erklärt wird. Jedoch geben sie keinen Hinweis, ob eine berechnete Struktur die experimentellen Daten erklärt. Dies kann mit dem in AUREMOL implementierten Programm RFAC [48] überprüft werden. In Analogie zum R-Faktor der Röntgenkristallographie berechnet RFAC unter Verwendung von Struktur Zuordnung und experimentellen Daten R-Werte für NMR Strukturen. Dieser gibt an, wie gut die aus einer Struktur abgeleiteten, simulierten Volumina der NOESY Kreuzsignale mit den experimentell gemessenen übereinstimmen, also wie gut die Struktur die experimentellen Daten erklärt. Die Kombination möglichst vieler Bewertungskriterien gibt schließlich ein (absolutes und vergleichbares) Maß für die Qualität einer NMR-Struktur.

Zur Visualisierung, Analyse und Bewertung von Strukturen wurden die Programme MOLMOL [151], PROCHECK [156] und RFAC [48] verwendet. Mit MOLMOL wurden Sekundärstruktur [157], globale Faltung der Proteinmodelle und NOE-Verletzungen, durch Einlesen der DYANA Eingabedaten untersucht. Die Berechnung von RMSD Werten erfolgte ebenfalls mit dem Programm MOLMOL. Die Verteilung der Bindungslängen und -winkel wurde mit dem Programm PROCHECK untersucht. Für die Berechnung der R-Faktoren der NMR-Strukturen wurde das in AUREMOL implementierte Programm RFAC verwendet.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Automatisierte Vorverarbeitung von NMR-Spektren

#### 3.1.1 Lokales und Globales Rauschniveau in NMR-Spektren

Die lokalen Rauschniveaus sind geeignete Orientierungswerte für die Signalamplituden in NMR-Spektren. Die lokalen Rauschniveaus wurden aus den Datenpunkten des Spektrums berechnet. Für jede 1D-Datenreihe in Richtung der direkten und indirekten Dimensionen der 3D-Datenmatrix wurde ein Wert  $\sigma_{nij}$  für die Varianz der Rauschamplitude berechnet. Hierin ist  $n$  die Dimension in Richtung der Datenreihe,  $i$  und  $j$  die Position in der 2D-Ebene senkrecht zu  $n$ . Ist  $\sigma_l$  die Varianz der Amplituden eines Segments aus  $k$  Datenpunkten der 1D-Datenreihe, so wurde  $\sigma_{nij}$  mit dem minimalen  $\sigma_l$  einer 1D-Reihe gleichgesetzt:

$$\sigma_{nij} = \min_{l=1..k}(\sigma_l) \quad (3.1)$$

Für die Berechnung der  $\sigma_l$  wurden jeweils 20 % (mindestens jedoch 10) der Datenpunkte der jeweiligen Dimension, unter Berücksichtigung ihres Vorzeichens verwendet. Das lokale Rauschniveau eines Datenpunktes kann [40] mit dem geometrischen Mittel der  $\sigma_{nij}$  der 1D-Datenreihen, die durch den Datenpunkt verlaufen, gleichgesetzt werden. Als globales Rauschniveau  $\sigma^G$  des Spektrums wurde der Minimalwert aller  $\sigma_{nij}$  verwendet. Falls dieses das Rauschniveau im Spektrum adäquat beschreibt und die Rauschamplituden um Null normalverteilt sind, müßten 99,7 % der Rauschsignale betragsmäßig kleiner als  $3*\sigma^G$  sein. Dieser Wert war als Niveau für die Signalsuche jedoch ungünstig, da die Rauschsignale überdurchschnittlich stark vertreten waren. Ein möglicher Grund hierfür ist, daß  $\sigma^G$  mit dem Minimum der  $\sigma_l$  gleichgesetzt wurde. Die Signalklassifizierung nach der Bayesschen Analyse erfordert eine repräsentative Menge an Rauschsignalen. Um eine für die Weiterverarbeitung sinnvolle Anzahl von Rauschsignalen zu erhalten wurde das Niveau  $3*\sigma^G$  weiter verfeinert.

### 3.1.2 Niveau für die automatische Signalsuche

In der von Koradi *et al.* [40] beschriebenen Methode für 2D-Spektren wurde das Rauschniveau eines Datenpunktes mit dem geometrischen Mittel der für den 2D-Fall berechneten Werte von  $\sigma_{nij}$  gleichgesetzt. Das globale Rauschniveau  $\sigma^G$ , das Minimum der  $\sigma_{nij}$  wurde dort nach Skalierung mit einem empirischen Faktor von zwei bzw. drei als unteres Niveau zur automatischen Signalsuche verwendet.

Im Gegensatz dazu erwies sich bei einer analogen Vorgehensweise im 3D-Fall, im Rahmen dieser Arbeit, der Wert von  $3 * \sigma^G$  als Niveau ( $=: T$ ) für eine automatische Signalsuche jedoch als betragsmäßig zu gering.

Das Niveau  $3 * \sigma^G$  wurde durch ein iteratives Verfahren weiter verfeinert. Vor der Iteration wurde eine Signalsuche auf dem Niveau  $3 * \sigma$  durchgeführt. Hier wurden Signale mit positiven und/oder negativen Amplituden, betragsmäßig größer als  $3 * \sigma$ , berücksichtigt. Im ersten Schritt der Iteration wurde der Mittelwert und die Varianz aller positiven bzw. negativen Signalamplituden berechnet. Im Schritt  $i + 1$  wurden zur Berechnung des Mittelwerts  $\mu_{i+1}$  und der Varianz  $\sigma_{i+1}$  die Signale verwendet, deren Amplituden betragsmäßig kleiner als eine obere Grenze  $L_i + 1$  waren. Der Wert von  $L_i + 1$  wurde aus  $\mu_i$  und  $\sigma_i$  des  $i$ -ten Schrittes wie folgt berechnet:

$$L_{i+1}^\pm = \pm(\mu_i^\pm \pm 0,5 * \sigma_i^\pm) \quad (3.2)$$

Die unterschiedlichen Vorzeichen in Gl. 3.2 berücksichtigen die Vorzeichen der Signalamplituden. Bei den ausschließlich positiven Signalamplituden gilt in Gl. 3.2 das „+“-Zeichen, bei negativen das „-“-Zeichen. Je nach Anwendungsfall muß entschieden werden ob positive, negative oder beide Werte benötigt werden. Das Abbruchkriterium der Iteration war, daß die Varianz  $\sigma_i^\pm$  etwa gleich dem Wert von  $(\pm\mu_i^\pm - 3 * \sigma^G)$  ist. Nach Abschluß der Iteration im Schritt  $k$  wurde  $T$  mit  $(\mu_k^\pm \pm \Delta\mu)$  gleichgesetzt, mit  $\Delta\mu = \min \{(\sigma_k^\pm); (|\pm\mu_k^\pm - 3 * \sigma^G|)\}$ . Dieses iterative Verfahren liefert vor allem bei zu kleinen Werten von  $\sigma^G$  ein gut geeignetes Niveau für die Signalsuche im Hinblick auf die Signalklassifizierung mittels Bayesscher Analyse. Diese erfordert stets eine repräsentative Menge an Rauschsignalen, was mit dem iterativ bestimmten Niveau erfüllt werden konnte.

Der Grundgedanke dieses iterativen Verfahrens beruht auf der Annahme einer Normalverteilung für die Amplituden der Rauschsignale. Durch die Wahl einer Grenze  $T$  bei der Signalsuche werden die gefundenen Signale durch eine bei  $T$  abgeschnittene Normalverteilung beschrieben. Ist der Bereich um das Maximum der Verteilung durch Signalamplituden vertreten und ist das Abbruchkriterium der Iteration erfüllt, so entspricht der Mittelwert der Amplituden gerade dem Erwartungswert der abgeschnittenen Normalverteilung. Ist der Bereich des Maximums der Verteilung nicht durch die Signale vertreten, so ist der Mittelwert aus der Iteration gerade das ursprüngliche Niveau der Signalsuche.

Da die in AUREMOL implementierte Version der Signalsuche maximal 65000 Signa-

le zuläßt, zur Berücksichtigung der Normalverteilung der Rauschsignale aber i.a. eine größere Zahl erforderlich ist, wurde diese Routine durch eine dynamische Speicherresservierung für jedes neu gefundene Signal erweitert. Somit ist im Prinzip die Anzahl der Signale nur noch durch den Arbeitsspeicher des Rechners begrenzt. Für die Verwendung der identifizierten Signale in anderen Routinen muß diese jedoch nach Bearbeitung und Analyse wieder auf die von AUREMOL maximal erlaubte Anzahl reduziert werden. Dies stellt für Proteinspektren keine Einschränkung dar, denn diese beinhalten nach Analyse und Reduktion der Daten weit weniger als 65000 wahre Proteinsignale. Bei dem 3D NOESY-HSQC-Spektrums von CheY2 wurden bei der Signalsuche auf dem Niveau  $3 * \sigma_{nij}$  etwa 250000 Signale gefunden. Mit dem aus der Iteration erhaltenen Wert etwa 10000, die für eine weitere Verarbeitung ausreichend und sinnvoll waren.

### 3.1.3 Signalklassifizierung

Grundlage für die Bayessche Analyse war die für den 2D-Fall in AUREMOL implementierte Routine [158]. Zur Analyse der Charakteristik von Rauschsignalen wurde eine Signalsuche auf dem Niveau  $0,5 * T$  (3.1.2) durchgeführt. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeitsverteilungen für die Bayessche Analyse erfordert die Auswahl einer repräsentativen Menge von Signalen einer Klasse. In diesem Fall wurden die beiden Klassen Rauschsignale und wahre Proteinsignale verwendet. Die Repräsentanten wurden unter Berücksichtigung von Intensität und chemischer Verschiebung ausgewählt. Für die Klasse der Rauschsignale wurde der Amplitudenbereich  $> 0,5 * T$ , für die Signalklasse eine untere Schwelle von  $1,5 * T$  gewählt. Als zusätzliches Kriterium für die Klasseneinteilung wurden die in der BMRB [50] verfügbaren statistischen Werte für chemische Verschiebungen von Proteinsignalen verwendet. Erfüllt ein Signal das erste Kriterium für die (Rausch-) Signalklasse, so wurde es nur dann als Repräsentant verwendet, wenn die chemischen Verschiebungen in den jeweiligen Dimensionen des Spektrums (außerhalb) innerhalb des Bereichs von Proteinsignalen lagen.

Ausgehend von dieser Einteilung wurden für jede Klasse die Wahrscheinlichkeitsverteilungen einzelner Merkmale berechnet. Dies waren zunächst die bereits im 2D-Fall berücksichtigten Größen Intensität und Volumen (d.h. Signalform) ([158]). Die Trennschärfe der beiden Merkmale war nicht ausreichend. Daher wurden weitere Merkmale herangezogen. Zunächst wurde die Existenz eines intensiven Diagonalsignals, in Form des Amplitudenverhältnisses von Diagonalsignal zum betrachteten Signal berücksichtigt. Nach Bayesscher Analyse mit den obigen drei Merkmalen wurde die Anzahl der Kreuzsignale, mit Signalwahrscheinlichkeiten von mindestens 0,5 und gleichen Koordinaten in den indirekten Dimensionen, ermittelt. Bei der Wahl der Repräsentanten zur Berechnung der Wahrscheinlichkeitsverteilungen wurden Kreuzsignale mit Qualitätswerten  $< 0,5$  bzw.  $> 0,5$  für die Klasse der Rauschsignale bzw. der wahren Signale berücksichtigt. Mit den Wahrscheinlichkeitswerten für das Merkmal Kreuzsignal wurden schließlich die Signalwahrscheinlichkeiten neu berechnet.

## 3.2 Automatisierte Spektrenverarbeitung am Beispiel des $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrums von CheY2

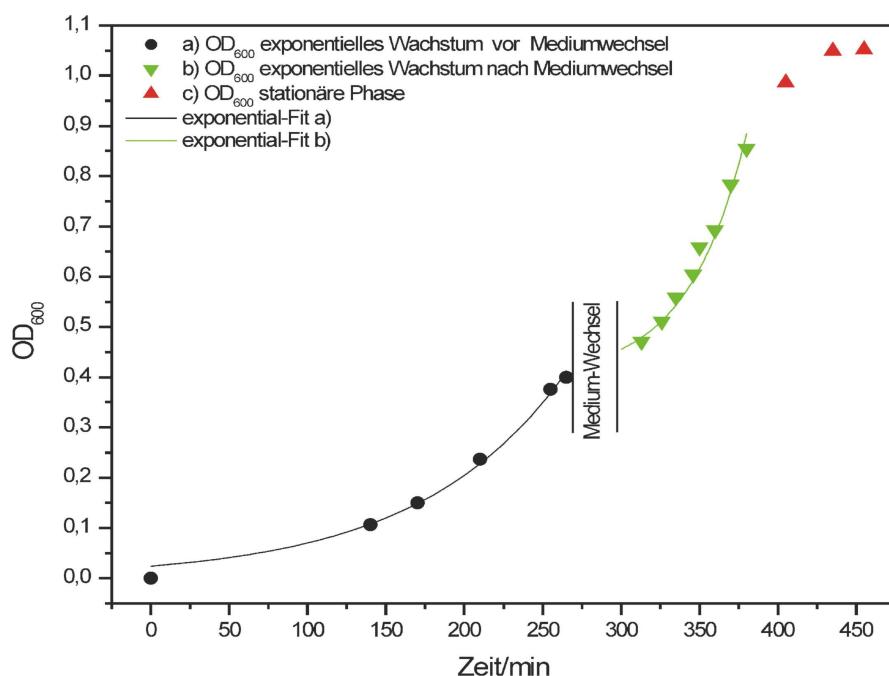
Anhand des  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrums von CheY2 wurde die Automatisierung von Signalsuche (3.1.2) und Bayesscher Analyse (3.1.3) getestet. Bei diesem Spektrum mit 1024 x 128 x 256 Datenpunkten in der direkten  $^1\text{H}$ - und den indirekten  $^{15}\text{N}$ - bzw.  $^1\text{H}$ -Dimensionen konnte die automatische Signalsuche mit anschließender Bayesscher Analyse innerhalb von 15 min auf einer *Silicon-Graphics* Workstation (Betriebssystem IRIX, Version 6.5; ca. 160 MB Arbeitsspeicher; 180 MHz MIPS R5000 (IP32) Prozessor) durchgeführt werden. Die anfängliche Zahl von 256000 Signalen wurde durch eine Verfeinerung des Niveaus zur Signalsuche auf 6800 reduziert. Die anschließende Bayessche Analyse der Signale unter Berücksichtigung der Eigenschaften Diagonalsignal und Kreuzsignal führte zu endgültigen 890 Signalen. Ein qualitativer Vergleich der Trennschärfe der Bayesschen Analyse mit bzw. ohne den Merkmalen Diagonal- und Kreuzsignal zeigte, daß die zusätzlichen Kriterien die Diskriminierung zwischen wahren Signalen und Rauschsignalen deutlich verbessern.

## 3.3 Biochemie

### 3.3.1 Expressionsprotokoll für $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Markierung

Nach Expression und Reinigung von rekombinantem CheY2 nach dem IMPACT-Verfahren (2.3) lagen die Proteinausbeuten zwischen 4 mg und 8 mg je Liter Minimalmedium (10 g/l  $^{12}\text{C}$ -Glucose). Aus einem zwei Liter-Ansatz konnten hiermit nicht-markierte und  $^{15}\text{N}$ -markierte 1 mM CheY2 NMR-Proben hergestellt werden. Da die  $^{13}\text{C}$ -Isotopenmarkierung einen Kostenfaktor darstellt, wurde eine Vorschrift für eine Glucosekonzentration von 1 g pro 1 Minimalmedium entwickelt.

Zur Optimierung der Expressionsraten wurden Induktorkonzentration, Zusammensetzung des Minimalmediums, Zusatz von Spurenelementen, Expressionsstamm, Temperatur und Expressionsdauer variiert. Für jeden Ansatz wurde nach Abschluß des Zellwachstums eine gleiche Probe der Bakterienkultur untersucht. Zum Vergleich der Expressionsraten wurden die Proben 5 min bei 100°C in SDS-Puffer inkubiert und mittels SDS Gelelektrophorese analysiert. Gleichzeitig wurde der Anteil des löslich exprimierten Proteins bestimmt. Hierzu wurde das Cytosol der geernteten Zellen nach deren Aufschluß durch dreimalige *French Press* Passage untersucht. Die Quantifizierung erfolgte durch vergleichende Western-Blot Analysen (2.2).



**Abb. 3.1:** Wachstumskurve einer Expressionskultur mit Wechsel des Expressionsmediums in der exponentiellen Wachstumsphase. Das exponentielle Wachstum wird nach Austausch des Mediums fortgesetzt. Die zu Beginn der stationären Phase erreichte optische Zelldichte entspricht der des ungestörten Wachstums.

Im Bereich von 10 µM bis 1 mM IPTG wurde keine Veränderung der Proteinausbeute durch die Induktorkonzentration festgestellt. Durch Zugabe verschiedener Spurenelemente und Variation der Zusammensetzung des Minimalmediums wurde keine Steigerung der exprimierten Proteinmenge beobachtet. Die Proteinausbeute war bei Verwendung des *E. coli*-Expressionsstamms ER2566 im Vergleich zum Stamm BL21 geringfügig höher. Die größten Effekte wurden bei Variation von Temperatur und Expressionsdauer beobachtet. Bei Temperaturen über 30°C wurde, unabhängig von der Expressionsdauer, ein steigender Anteil an Protein in Form von unlöslichen *inclusion bodies* beobachtet. Im Bereich von 16 bis 30°C war dieser Anteil vergleichsweise gering. Die exprimierte Proteinmenge nahm im Bereich von 16 bis 30°C zu und erreichte bei 30°C und einer Expressionsdauer von 5 h ein Optimum. Eine weitere Steigerung der exprimierten Proteinmenge wurde durch Austausch des Minimalmediums kurz vor dem Induktionszeitpunkt erreicht. Hierzu wurden die in unmarkiertem Minimalmedium bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 gewachsenen Zellen bei 4°C sedimentiert. Anschließend in frischem Minimalmedium mit 1 g/l <sup>13</sup>C-Glucose resuspendiert. Der Wechsel des Mediums hatte keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum (Abb. 3.1). Die Expression wur-

de nach Resuspension und einer 30-minütigen Erholungsphase bei 30°C mit 0,3 mM IPTG induziert. Nach einer Induktionsdauer von 5 h wurden die Zellen geerntet. Die exprimierten Proteine wurden durch Affinitäts- und Flüssigkeitschromatographie gereinigt. Nach dieser Optimierung lag die Proteinausbeute im Bereich der Ausbeute des IMPACT-Verfahrens (16°C, 10 g/l Glucose). Auch im Hinblick auf Durchführbarkeit und Probenqualität wurden vergleichbar gute Ergebnisse erzielt. Durch Reduktion der erforderlichen Glucosemenge von 10 g auf 1 g pro 1 Expressionsmedium konnten die anfallenden Kosten für <sup>13</sup>C-isotopenmarkierte Proteinproben um den Faktor 10 verringert werden.

### 3.3.2 Reinigung von CheY2

Rekombinantes CheY2 wurde in zwei Schritten gereinigt. Nach Zellaufschluß mittels French-Press wurde das löslich exprimierte Protein im ersten Schritt durch Affinitätschromatographie über Chitin-Agarose von den cytosolischen Bestandteilen getrennt. Die Proteinprobe wurde nach Dialyse und Konzentrierung im zweiten Schritt flüssigkeitschromatographisch gereinigt. Die hohe Reinheit des resultierenden Proteins zeigte sich in den NMR-Spektren. Bei der Reinigung und Lagerung der Proteinproben mußten folgende Punkte beachtet werden:

- ◊ Dialyse und Ultrafiltration nach Chitin-Agarose Chromatographie war nur in Hochsalzpuffer (0,5 M NaCl) möglich, da sonst Proteinaggregationsprodukte gebildet wurden.
- ◊ Zur Ultrafiltration mußten Membranen aus regenerierter Zellulose verwendet werden, da CheY2 an anderen Membranen, z.B. Polyethylen adhäsierte.
- ◊ Nach dem zweiten Reinigungsschritt, der Gelfiltration an Superdex 75/200 konnte CheY2 auch in Niedrigsalzpuffer gelagert werden.
- ◊ CheY2 war labil gegen wiederholtes Einfrieren und Auftauen und präzipitierte unter diesen Bedingungen.
- ◊ Proben mit 1 mM CheY2 bzw. CheY2-BeF<sub>3</sub> waren etwa zwei bzw. sechs Monate stabil.

## 3.4 Strukturbestimmung

### 3.4.1 Das Phosphat-Analogon CheY2-BeF<sub>3</sub>

Neben der inaktiven Form von CheY2 war auch die durch Phosphorylierung aktivierte Form des Responsregulators strukturell zu untersuchen. Für NMR-Messungen wurde

der Phosphodonor Acetylphosphat (AcP) zur Phosphorylierung von CheY2 verwendet (2.4). In den gemessenen HSQC-Spektren waren neben den Signalen der inaktiven Konformation von CheY2 weitere Signale vorhanden, die der phosphorylierten Form zuzuordnen sind. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der phosphorylierten Form ( $T_{1/2}=10,5$  s [99], 20,9 s, diese Arbeit) waren diese zusätzlichen Signale 1 h nach Zusatz von AcP (100 mM in 1 mM CheY2) verschwunden. Ein hoher Phosphorylierungsgrad von CheY2 konnte auf diese Weise nicht für die gesamte Messdauer üblicher NMR-Experimente gewährleistet werden.

Der Quotient der Signalvolumina der beiden Konformationen ergab ein mittleres Populationsverhältnis von  $[CheY2] : [CheY2-P] = 3 : 1$ . Die im HSQC-Spektrum von CheY2 zugeordneten Signale (Abb. 3.3 (A)) konnten bis auf Ala 89 im Spektrum von CheY2 in Gegenwart von AcP identifiziert werden (d. h. 99,1%). Die Unterschiede in den  $^1H$  bzw.  $^{15}N$  chemischen Verschiebungen lagen im Mittel bei 0,016 ppm bzw. 0,101 ppm. Darüber hinaus konnten im HSQC-Spektrum von CheY2 mit AcP außer Asn 60, Leu 87 und Thr 88 insgesamt 97,5% der Signale von CheY2- $BeF_3^-$ , die durch  $BeF_3^-$  modifizierte Form von CheY2, identifiziert werden. Die mittleren Abweichungen der chemischen Verschiebungen lagen bei 0,015 ppm ( $^1H$ ) bzw. 0,091 ppm ( $^{15}N$ ).

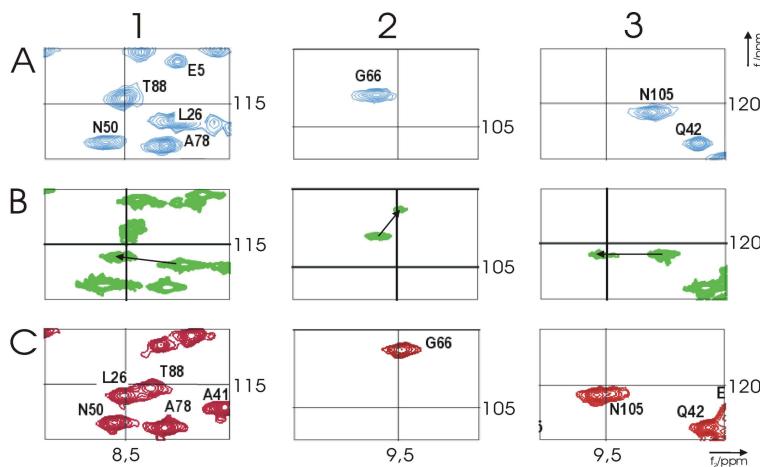
Da das HSQC-Spektrum von CheY2 in Anwesenheit von AcP eine Überlagerung der CheY2 und CheY2- $BeF_3^-$  Spektren darstellt, entspricht die Konformation des Proteintrückgrats von CheY2-P dem von CheY2- $BeF_3^-$ . Für die Aminosäuren Leu 26, Gly 66 und Asn 105, die in  $\alpha$ -Helix, Schleife und  $\beta$ -Strang liegen, ist dies exemplarisch in Abb. 3.2 dargestellt. Da zudem die im HSQC-Spektrum sichtbaren Signale der Seitenkettenamide von Asn und Gln bei CheY2-P und CheY2- $BeF_3^-$  an identischen Positionen auftreten sind die Strukturen beider Proteinformen nahezu identisch. Kleinere Unterschiede in der Orientierung von Seitenketten und in der Beschaffenheit der Oberfläche (z.B. Ladungszustand der Phosphat- vs. Berylliumfluoridgruppe) können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Aufgrund des schnellen Umsatzes von AcP in der Probe wären für längere Messungen sehr hohe AcP-Konzentrationen nötig. Dies hätte eine Erniedrigung des pH-Wertes durch die entstehende Essig- und Phosphorsäure zur Folge. Daher wurde zur Untersuchung der aktiven Konformation von CheY2 das über mehrere Monate stabile (2.5) CheY2-Phosphatanalogon CheY2- $BeF_3^-$  verwendet.

### 3.4.2 Sequentielle Zuordnung von CheY2 und CheY2- $BeF_3^-$

#### Haupt- und Seitenkettenzuordnung

Die Zuordnung der Hauptkette wurde nach der Tripelresonanzmethode durchgeführt (2.8.2). Für die Zuordnung der Seitenketten wurden HCCH-TOCSY- und NOESY-Spektren verwendet 2.8.3. Im Verlauf der Auswertung der NOESY-Spektren (2.11)



**Abb. 3.2:** Ausschnitte aus den HSQC Spektren von CheY2 (blau), CheY2 + AcP (grün) und CheY2-BeF<sub>3</sub> (rot). Als Beispiele sind die Signale der Reste Leu 26 (1, A-C), Gly 66 (2, A-C) und Asn 105 (3, A-C) gezeigt. Die Signalverschiebungen sind in den Ausschnitten 1B, 2B und 3B durch Pfeile verdeutlicht. Zur Orientierung (Abb. 3.3) sind die ppm-Werte benachbart liegender Gitterlinien angegeben.

konnten die bestehenden Zuordnungen teilweise ergänzt werden. Für beide Proteinformen, CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub>, wurden die gleichen NMR-Experimente verwendet und ausgewertet. Da eine eindeutige Zuordnung der CheY2-BeF<sub>3</sub> HSQC-Spektren anhand der Zuordnung von CheY2 nicht möglich war, wurde CheY2-BeF<sub>3</sub> neu zugeordnet. Durch dieses systematische Vorgehen wurde zudem eine Beeinflussung der CheY2-BeF<sub>3</sub>-Struktur durch vorhandene CheY2 Daten vermieden, so daß kleinere, strukturelle Unterschiede zwischen beiden Konformationen nicht durch Zuordnungsfehler verdeckt wurden. Tab. 3.1 zeigt eine Gegenüberstellung der Zuordnung beider Proteine. Einzelheiten werden im Folgenden näher beschrieben.

**CheY2** Für die N-terminalen, lösungsmittelexponierten Aminosäuren Met1, Ser2 und Leu3 war die Zuordnung der Resonanzlinien mit Tripelresonanzexperimenten nicht möglich, jedoch konnten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Protonen über sequentielle NOE-Kontakte identifiziert werden. Die Reste Ala4 bis Pro51 konnten nahezu eindeutig zugeordnet werden. Ausnahmen bilden Val16 und Arg19, deren Zuordnungen nur über NOE-Kontakte möglich waren. Die Aminosäuren-Triplets (Gln28, Leu29, Gly30) und (Ala101, Leu102, Gly103) konnten nur mit Hilfe von NOE-Kontakte eindeutig eingeordnet werden. Weitere schwer zugängliche Aminosäuren liegen im aktiven Bereich von CheY2 und umfassen Asp58,

**Tabelle 3.1:** Resonanzlinienzuordnung (Spalte 1 - 3) und Anzahl der identifizierten HSQC-Signale der Hauptketten-Aminogruppen (Spalte 4 - 5).

Atom	CheY2	CheY2- BeF <sub>3</sub>	HSQC - Signale	CheY2	CheY2- BeF <sub>3</sub>
Hauptkette			Ala	21/21	21/21
HN	96,8%	97,6%	Arg	3/3	2/3
N	93,8%	97,6%	Asn	5/5	5/5
CA	96,1%	100,0%	Asp	6/7	7/7
HA	98,6%	97,8%	Gln	9/9	9/9
CO	90,7%	94,6%	Glu	4/4	4/4
aliphatische Seitenketten			Gly	10/10	10/10
HN	55,2%	57,1%	His	2/2	2/2
N	31,0%	48,2%	Ile	9/9	8/9
H	79,6%	90,3%	Leu	16/16	16/16
C	73,4%	94,0%	Lys	12/12	12/12
CO	75,8%	100%	Met	5/6	5/6
aromatische Seitenketten			Phe	4/5	5/5
H	91,5%	89,4%	Pro	0/4	0/4
C	14,3%	14,7%	Ser	2/3	3/3
Total			Thr	5/5	5/5
H	80,6%	90,0%	Val	8/8	8/8
C	77,8%	90,9%			
N	90,9%	88,3%			

Phe59, Asn60, Met61, (Pro62) und Lys98. Die jeweiligen Signale in den Tripelresonanz-Experimenten waren schwach, verbreitert oder teilweise nicht vorhanden. Die Zuordnungen dieser Reste wurde größtenteils aus NOESY-Daten gewonnen. Die sequentielle Zuordnung der durch die fünf Proline beschränkten Bereiche (Met1 - Asn50, His52 - Met61, Lys63 - Asn76, Ala78 - Lys110, Phe112 - Lys129) war mit Ausnahme obiger Reste ohne große Probleme möglich. Die Seitenketten von Alaninen und Glycinen konnten vollständig zugeordnet werden. Asp, Glu und Thr waren ebenfalls gut zugänglich, jedoch wurden keine Hydroxylprotonen beobachtet. Aufgrund entarteter bzw. fehlender Signale der Methylgruppen von Ile, Leu und Val war eine vollständige Zuordnung nicht möglich. CH<sub>3</sub>-Gruppen der Methionin-, NH<sub>3</sub>-Gruppen der Lysin- und HN- bzw. NH<sub>2</sub>-Gruppen der Argininseitenketten konnten nicht identifiziert werden. Die Signale der

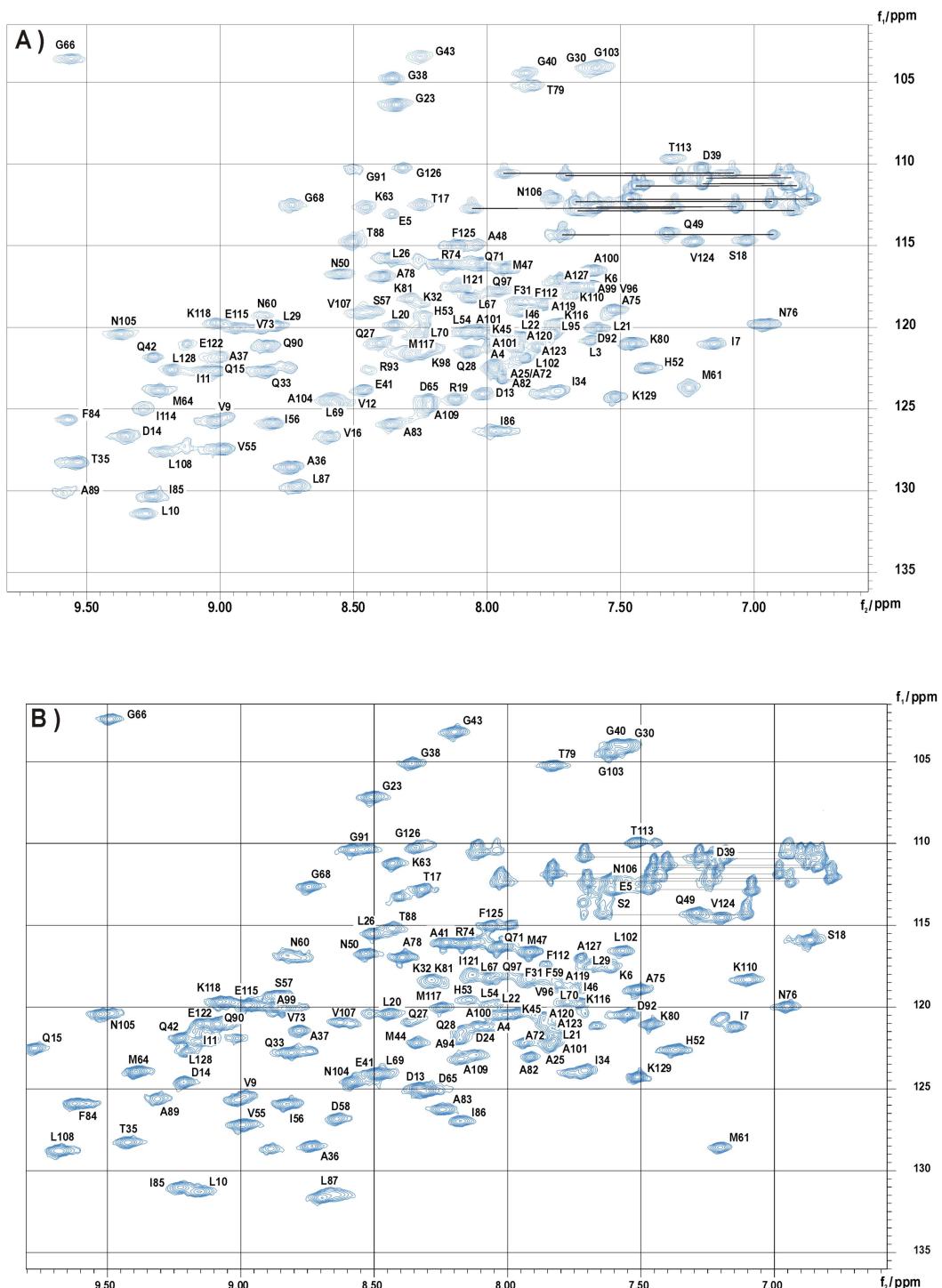
relativ langen, aliphatischen Seitenketten von Arg und Lys waren generell sehr schwach. Die chemischen Verschiebungen der Ringprotonen der aromatischen Reste His und Phe konnten dagegen nahezu vollständig ermittelt werden. Alle Amid- und Carbonylgruppen von Asn- und Gln-Seitenketten konnten zugeordnet werden. Außer den C<sup>δ</sup> und C<sup>γ</sup> Atomen von Pro62 wurden alle chemischen Verschiebungen der Prolinreste bestimmt. Bei den Aminosäureresten Ile7, Lys8, Gln33, Ile34, Leu108, Phe125 und Gly126 waren in den HSQC-Spektren zwei Konformationen zu sehen. Die Zuordnungsliste von CheY2 ist in Anhang A zu finden. Abb. 3.3 (A) zeigt ein beschriftetes HSQC-Spektrum von CheY2.

**CheY2-BeF<sub>3</sub>** Bei CheY2-BeF<sub>3</sub> konnten für die N-terminalen Aminosäuren Met1 und Ser2 die chemischen Verschiebungen der Protonen nicht identifiziert werden. Die sequentielle und partielle Zuordnung der Reste 3-85 war ohne größere Probleme möglich. Val16 wurde über NOE-Kontakte identifiziert. Für Arg19 konnten keine Tripelresonanzsignale beobachtet werden. Die Zuordnungen hierfür stammen ebenfalls aus NOESY-Spektren. Die im aktiven Bereich liegenden Aminosäurereste Asp58 bis einschließlich Met61 zeigten schwache und eindeutige Signale. Aufgrund geringer Intensität, Signalüberlappung und entarteten chemischen Verschiebungen war eine Einordnung der Reste Ile86, Leu87, Thr88, Arg93, Leu95 und Ile114 nur durch Kombination von Tripelresonanz- und NOESY-Spektren möglich. Für die Zuordnung der aromatischen und aliphatischen Seitenketten gilt analoges wie für CheY2. Mit Ausnahme der Protonen H<sup>δ2</sup> und H<sup>δ2</sup> von Pro111 konnten alle chemischen Verschiebungen der Proline identifiziert werden. Bei Ile7, Lys8, Gln33, Ile34, Gly91, Val107, Thr113, Lys116 und Phe125 wurden jeweils zwei Konformationen beobachtet. In Anhang B ist die Liste der zugeordneten chemischen Verschiebungen von CheY2-BeF<sub>3</sub> gegeben. Abb. 3.3 (B) zeigt das zugeordnete HSQC-Spektrum von CheY2-BeF<sub>3</sub>.

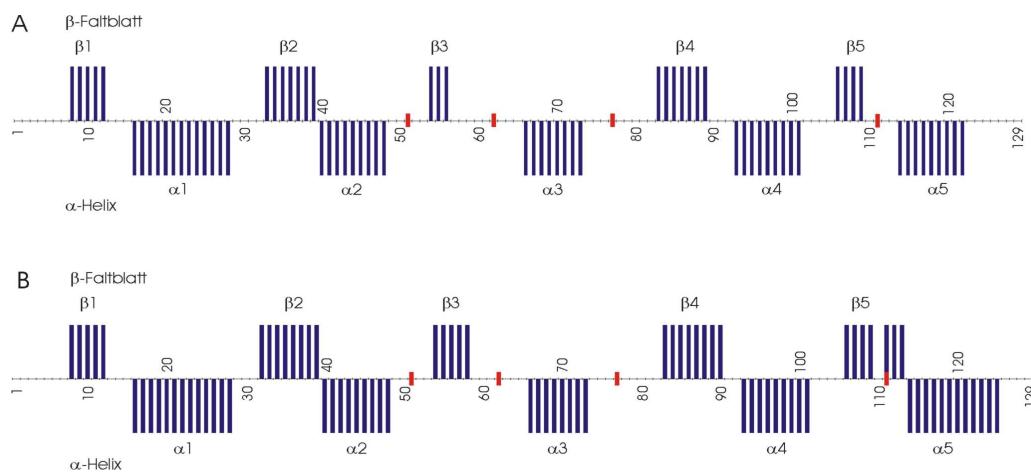
### 3.4.3 Sekundärstrukturvorhersage

Auf Basis charakteristischer chemischer Verschiebungswerte der Hauptkettenatome kann nach der sequentiellen Zuordnung eine Sekundärstrukturvorhersage durchgeführt werden (2.9). Dies wurde für beide Proteine anhand der H<sup>α</sup>-, C<sup>α</sup>-, C<sup>β</sup>- und C-chemischen Verschiebungen unter Berücksichtigung der Prolinkorrektur [142] mit dem Programm CSI [25] durchgeführt. In Abb. 3.4 sind die zugehörigen CSI-*Plots* für CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> dargestellt.

Deutliche Längenunterschiede von zwei bzw. drei Resten sind bei β<sub>3</sub> und α<sub>5</sub> zu beobachten. Beide Proteine zeigen die für Responsregulatoren typische (β/α)<sub>5</sub> Verteilung der Sekundärstrukturelemente. Die CSI-Analyse spricht einerseits für die Qualität der Zuordnungen und andererseits für eine stabile Faltung der Proteine in Lösung.



**Abb. 3.3:** Zugeordnete HSQC-Spektren von (A) CheY2 und (B) CheY2-BeF<sub>3</sub>. Die Beschriftung der Signale gibt den Aminosäurerest im Einbuchstabencode und die Position in der Primärsequenz wieder. Horizontale Linien verbinden die Seitenketten NH<sub>2</sub>-Gruppen von Asn und Gln.



**Abb. 3.4:** CSI-Plot für (A) CheY2 und (B) CheY2-BeF<sub>3</sub>. Der Konsens zwischen chemischer Verschiebung von H<sup>α</sup>-, C<sup>α</sup>-, C<sup>β</sup>- und C-Atomen und Sekundärsturkturelement ist gegen die Sequenz aufgetragen. Aufeinanderfolgende, nach oben zeigende Balken weisen auf eine β-Faltblattkonformation hin, nach unten gerichtete auf α-helikale Bereiche. Für dazwischenliegende Bereiche ist eine unstrukturierte, schleifenförmige Konformation anzunehmen. Prolinreste sind durch kleine rote Balken markiert.

### 3.4.4 Dihedrale Winkel

Die in den chemischen Verschiebungen enthaltene Strukturinformation kann dazu benutzt werden, dihedrale  $\Phi$ - und  $\Psi$ -Winkelbeschränkungen der Proteinhauptkette zu ermitteln. Mit dem Programm Talos (2.9, 2.13) konnten bei CheY2 für 76, bei CheY2-BeF<sub>3</sub> für 72 Aminosäuren gut definierte Vorhersagen getroffen werden. Davon wurden nur diejenigen in den Strukturrechnungen berücksichtigt, die in gut definierten Sekundärstrukturelementen lagen. Für CheY2 waren dies 52, für CheY2-BeF<sub>3</sub> 58 Einschränkungen für dihedrale  $\Phi$ - und  $\Psi$ -Winkel. Diese wurden bei der Strukturbestimmung berücksichtigt und trugen wesentlich zur Festigung der Sekundärstrukturelemente bei.

### 3.4.5 Wasserstoffbrücken

Wasserstoffbrücken sind durch ihren struktur-stabilisierenden Effekt für die Strukturrechnung sehr hilfreich. Bei CheY2 war eine direkte Bestimmung über HNCO-Experimente nicht möglich. Zur Identifizierung der Wasserstoffbrücken wurden die Austauschraten der H<sup>N</sup>-Protonen mit Deuteronen untersucht. Hierzu ist es erforderlich, das Protein zu lyophilisieren. Da CheY2 nach Gefriertrocknung sehr instabil war (3.3.2)

konnten aus den Meßdaten in Kombination mit NOE-Kontakten nur fünf Wasserstoffbrücken zwischen bzw. innerhalb von Sekundärstrukturelementen ermittelt werden, bei CheY2-BeF<sub>3</sub> insgesamt sieben. Diese wurden bei der Strukturbestimmung berücksichtigt, zeigten jedoch nur wenig Effekte.

### 3.4.6 NOESY-Spektren

Der größte Teil der bei der Strukturbestimmung verwendeten Einschränkungen bestand aus Abstandsinformationen aus NOE-Daten. Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über die Zuordnung der NOESY-Spektren und den daraus gewonnenen Abstandsbeschränkungen. Gleiche Zuordnungen verschiedener Spektren wurden mit der in DYANA enthal-

**Tabelle 3.2:** Anzahl der zugeordneten NOE-Signale für CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> (Spalte 2 - 4) und Gesamtzahl der NOE-Kontakte (Spalte 5).

Spektren-Typ	Anzahl zugeordneter Signale in den NOESY-Spektren			eindeutige Signale
	2D <sup>1</sup> H	3D <sup>15</sup> N	3D <sup>13</sup> C	
CheY2	950	543	588	1598
CheY2-BeF <sub>3</sub>	926	522	629	1595

tenen Routine *distance unique* aus der Liste aller Abstandsbeschränkungen entfernt. Diese Routine wählt jeweils die Möglichkeit mit dem kleinsten Abstand. Hierdurch werden die durch Relaxationseffekte verursachten Fehler in den ermittelten Abständen, die im Allgemeinen zu groß sind, teilweise umgangen. Jedoch können Abstände aufgrund von Spindiffusion als zu klein bestimmt werden. Diese können im Verlauf der Strukturbestimmung durch Analyse der Ausgabedateien des Strukturrechnungsprogramms identifiziert werden.

Für erste Strukturrechnungen bei CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> wurde zur Eichung der 2D-NOESY Spektren das auf 0,18 nm kalibrierte Signalvolumen von H<sup>β2</sup> Pro77/H<sup>β2</sup> Pro77 verwendet. Bei Methylen- (CH<sub>2</sub>-) Gruppen können Fehler in der Distanzzeichnung durch z.B. skalare und starke Kopplung oder Beweglichkeit nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Strukturbestimmung diese Eichung durch Vergleich der ermittelten Abstände mit typischen Werten für sequentielle und intraresiduale Kontakte verfeinert. Hierbei wurden Kontakte aus den Sekundärstrukturelementen α<sub>2</sub>, α<sub>5</sub> und β<sub>2</sub> bis β<sub>4</sub> verwendet. Die Distanzzeichnung der Signalvolumina der 3D-Spektren erfolgte durch Vergleich sich entsprechender 2D- und 3D-Signalvolumina. Der Großteil der Abstandsinformationen wurde aus 2D-NOESY-Spektren gewonnen. In den spektralen Bereichen der aliphatischen Seitenketten mit erheblichen Signalüberlagerungen wurden nur eindeutige Signale zugeordnet. In den 3D-<sup>15</sup>N-NOESY-HSQC Spektren konnten

nahezu alle Signale zugeordnet werden, während in den 3D- $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC Spektren aufgrund von Signalüberlagerungen im Bereich der aliphatischen Seitenketten viele Signale nicht eindeutig zugeordnet werden konnten und deshalb in den Strukturrechnungen nicht berücksichtigt wurden.

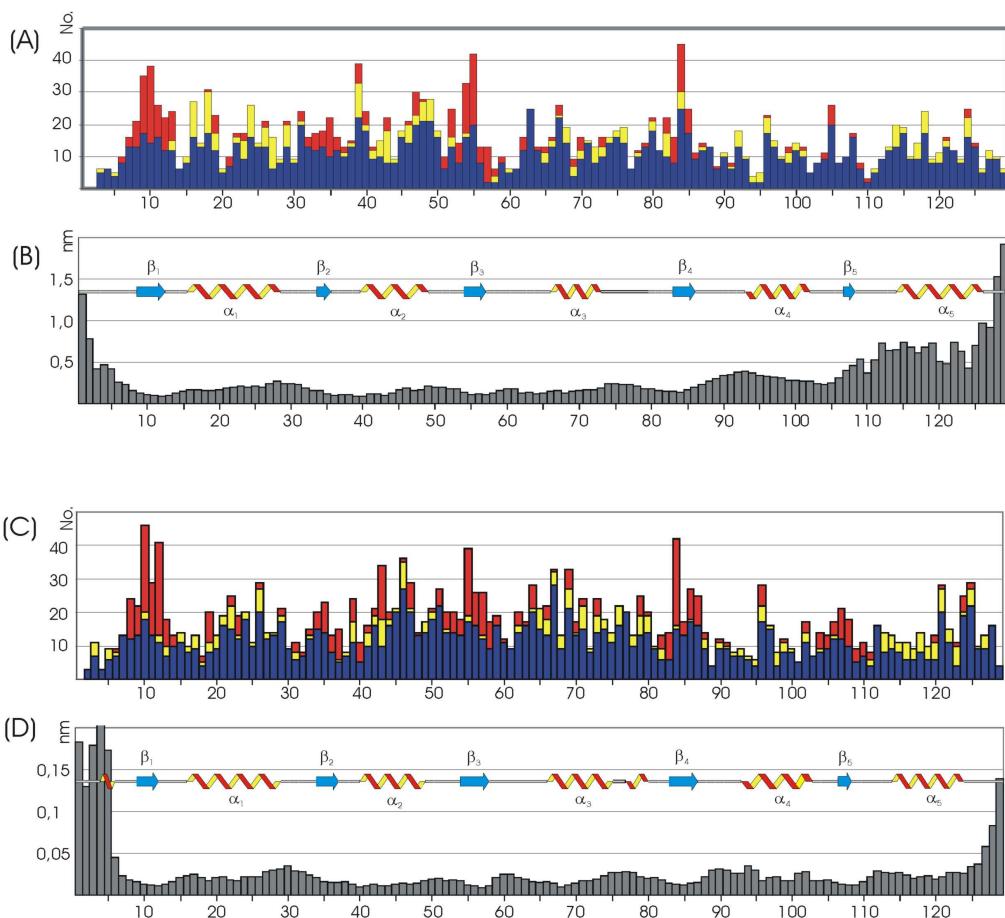
### 3.4.7 Tertiärstrukturen von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub>

Ziel dieser Arbeit war es, anhand der Tertiärstrukturen von CheY2 in der inaktiven und aktiven Form die Funktionsweise des Responsregulators besser zu verstehen. Die 3D-Strukturen von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> wurden unter Verwendung des Programms DYANA mit den experimentell bestimmten Beschränkungen ermittelt (2.13). Die bei der Strukturrechnung verwendeten experimentellen Daten setzen sich für CheY2 aus 1598 Abstandsbeschränkungen, 52 dihedralen Winkeln und fünf Wasserstoffbrücken zusammen was einer Gesamtzahl von 1655 Einschränkungen bzw. 12,8 pro Aminosäurerest entspricht. Bei CheY2-BeF<sub>3</sub> wurden 1595 Abstände, 58 dihedrale Winkel und sieben Wasserstoffbrücken berücksichtigt, mit einer Gesamtzahl von 1660 bzw. etwa 12,9 Beschränkungen je Aminosäurerest. Die Gesamtzahl sowie die Menge der mittel- und langreichweitigen Abstandsinformationen trugen entscheidend zur Definition der globalen Faltung bei. Die sequenzspezifischen Darstellungen der für die Strukturbestimmung von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> berücksichtigten kurz- mittel- und langreichweitigen NOE-Kontakte sind in Abb. 3.5 (A) und (C) angegeben. Es zeigte sich eine ähnliche Verteilung der identifizierten NOE-Kontakte über die Sequenz, wobei die Zahl der langreichweitigen Kontakte von  $\alpha_4$  deutlich erhöht ist.

#### 3D-Struktur von CheY2

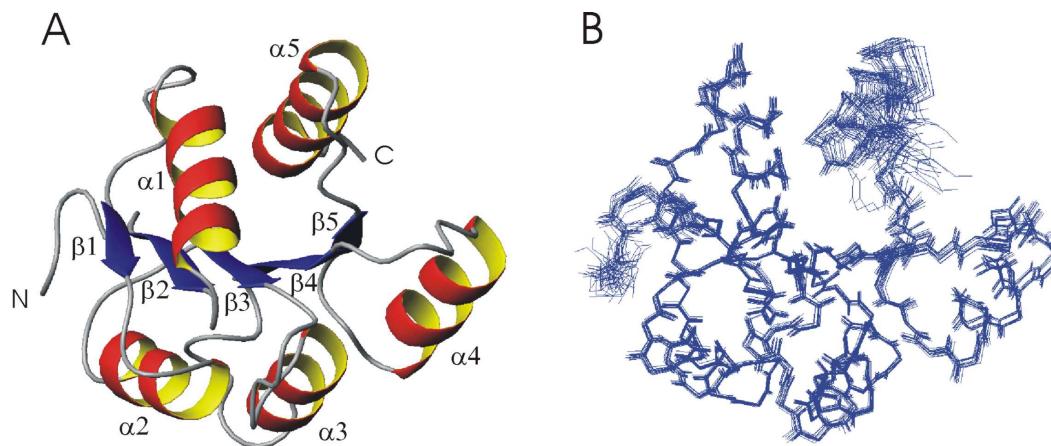
Das Bändermodell von CheY2 gibt Aufschluß über die Faltung der Hauptkette und die Topologie der Sekundärstrukturelemente. In Abb. 3.6 (A) ist die CheY2-Struktur mit kleinstem DYANA TF-Wert dargestellt. Die fünf  $\beta$ -Stränge ( $\beta_1$  bis  $\beta_5$ ) bilden das zentrale, parallele, 5-strängige  $\beta$ -Faltblatt. Die fünf  $\alpha$ -Helices ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$ ) und ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ) liegen auf gegenüberliegenden Seiten der Faltblatt ebene. Diese Anordnung beschreibt die für Responsregulator-Proteine typische ( $\alpha/\beta$ )<sub>5</sub> Topologie in einer offenen ( $\alpha/\beta$ )-Konformation.

Anzahl und Qualität der experimentell bestimmten Einschränkungen definieren den Konformationsraum nahe am Energieminimum. Dieser ist bei der NMR-Strukturbestimmung durch ein Bündel von Strukturen, die mit den experimentellen Daten konform sind, repräsentiert. In Abbildung 3.6 (B) ist die Überlagerung der Hauptketten von 16 CheY2-Strukturen mit minimalem DYANA TF-Wert gegeben. Die geringe Variation der relativen Atomlagen zeigt, daß die Konformation durch die experimentellen Daten gut definiert ist. Die N- und C-terminalen Enden und  $\alpha_5$  sind aufgrund fehlender Ein-



**Abb. 3.5:** (A), (C): Sequenzspezifische Darstellung der bei der Strukturbestimmung von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> berücksichtigten ■: kurz-; □: mittel-; ■: langweitreichenden NOE-Kontakte. (B), (D): Sequenzabhängige RMSD-Werte der CheY2- und CheY2-BeF<sub>3</sub>-Strukturbündel aus jeweils 16 Strukturen mit kleinsten DYANA TF-Werten. Die Sekundärstrukturen sind als Orientierungshilfe angegeben.

schränkungen weniger gut definiert. Eine quantitative Beschreibung dieses Sachverhalts ist durch Analyse der RMSD-Werte des Strukturbündels möglich. Diese wurden mit dem Programm MOLMOL für die Hauptkettenatome und für alle schweren Atome (N, C, O, S) einschließlich der Seitenketten berechnet. Die Mittelwerte der globalen RMSD Werte betragen für den gefalteten Proteinbereich (Aminosäure 6 bis 124) 0,042 nm bzw. 0,098 nm (3.4.8, Tab. 3.3). Die sequenzspezifische Verteilung der globalen RMSD-Werte ist in Abb. 3.5 (B) gegeben. Erhöhte Variabilität der Atompositionen ist am N- und C-Terminus und in β<sub>4</sub> und α<sub>5</sub> zu beobachten. Dies korreliert mit einer geringeren Anzahl an NOE-Kontakten, insbesondere sind β<sub>4</sub> und α<sub>5</sub> durch relativ wenige langreichweite Kontakte fixiert (Abb. 3.5 (A)).

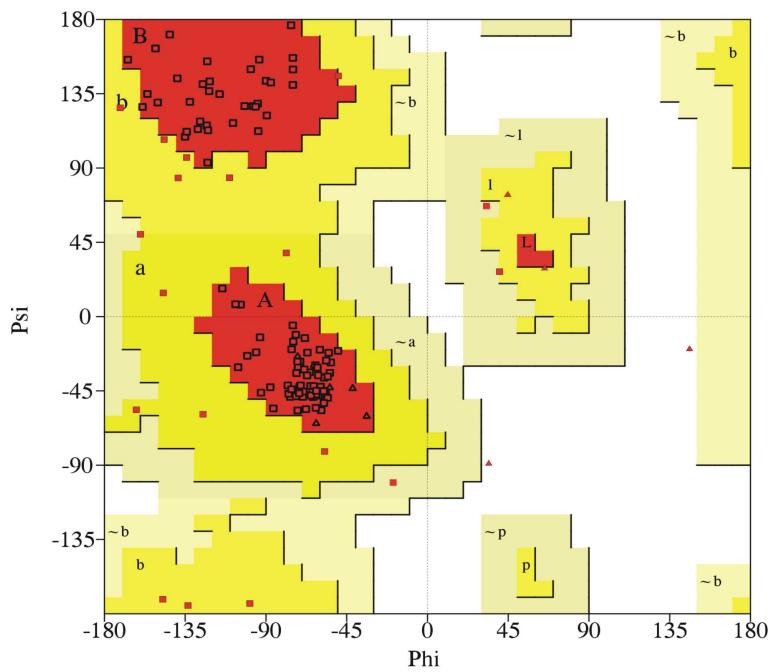


**Abb. 3.6:** (A) Bändermodell von CheY2 bestehend aus den  $\beta$ -Strängen  $\beta_1\text{-}\beta_5$  (blau),  $\alpha$ -Helices  $\alpha_1\text{-}\alpha_5$  (gelb-rot) und Schleifenregionen (grau) in der  $(\alpha/\beta)_5$  Topologie. (B) Bündel der 16 Strukturen mit kleinsten DYANA TF-Werten. Die Orientierung des Bündels entspricht Abbildung (A)

Bei der Strukturrechnung ist die Gesamtenergie der Endstruktur abhängig vom verwendeten Kraftfeld und ist daher ein relatives Qualitätsmaß. Eine mehr objektive Bewertung erfordert die Berücksichtigung zusätzlicher molekularer Größen und Geometrien, wie z. B. der Bindungswinkel. Diese können mit dem Programm PROCHECK analysiert werden. Im Ramachandran-Diagramm (Abb. 3.7) ist die Verteilung der  $\Phi$ - und  $\Psi$ -Winkel für die CheY2 Struktur mit kleinstem DYANA TF-Wert gegeben. Der Großteil der Winkelpaare (84,1%, offene Rechtecke) liegt in bevorzugten Bereichen. Einige Reste liegen in zusätzlich erlaubten (14,2%, rot ausgefüllte Rechtecke) und möglichen (1,8% beschriftete, rote Rechtecke) Gebieten. Mit Ausnahme von Glycinresten (rote Dreiecke), für die aufgrund der fehlenden Seitenkette  $\Phi$ - und  $\Psi$ -Winkelbereiche erlaubt sind, liegen keine Reste im nicht erlaubten Gebiet. Die Aminosäurereste Pro51, Pro62, Pro77, Pro111 bilden eine Ausnahme, weil die Aminogruppe im Pentacyclus fixiert ist und daher die freie Drehbarkeit um Bindungen zum  $C^\alpha$ -Atom ( $\Phi$ -Winkel) derart eingeschränkt ist, daß Prolinreste auch als „Helixbrecher“ gelten.

Die Beurteilung, ob eine berechnete Struktur die experimentellen Daten erklärt, ist anhand der NMR R-Faktoren möglich. Diese wurden mit AUREMOL berechnet und liegen für CheY2 zwischen 0,08 und 0,18 (Tab. 3.3).

Insgesamt zeigen die zur Qualitätsbeurteilung herangezogenen Größen, daß die Konformation von CheY2 erstens gut definiert ist und zweitens die experimentellen Daten gut erklärt.

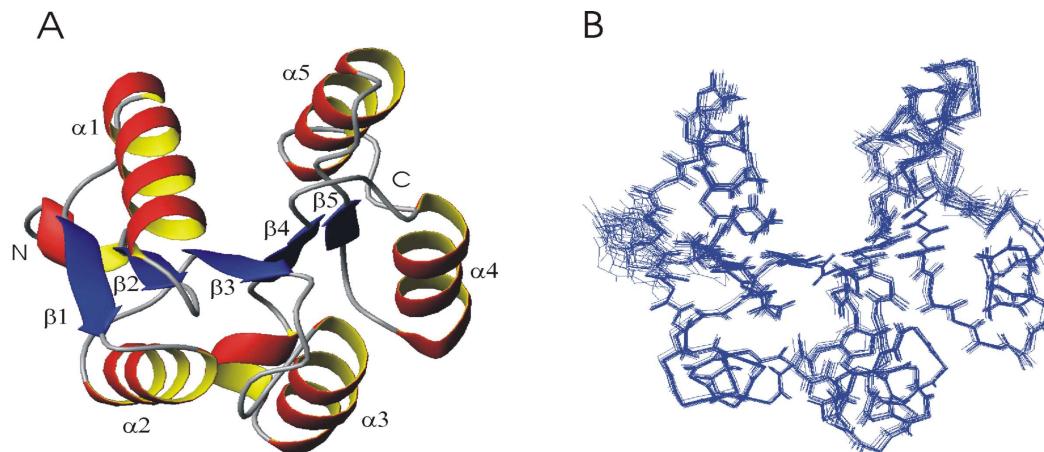


**Abb. 3.7:** Verteilung der  $\Phi$ - und  $\Psi$ -Winkel bei CheY2. A, B (rot): Gebiet für bevorzugte Winkel von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Strängen; L: linksgängige Helices; a, b, l (gelb): zusätzlich erlaubte Gebiete;  $\tilde{a}$ ,  $\tilde{b}$ ,  $\tilde{l}$  (hellgelb): zusätzlich mögliche Bereiche; weiß: sterisch sehr ungünstige Winkelpaare (außer Gly und Pro);  $\square$ : Winkelpaare einzelner Aminosäurereste mit Ausnahme von Glcin- ( $\triangle$ ) und Prolinresten.

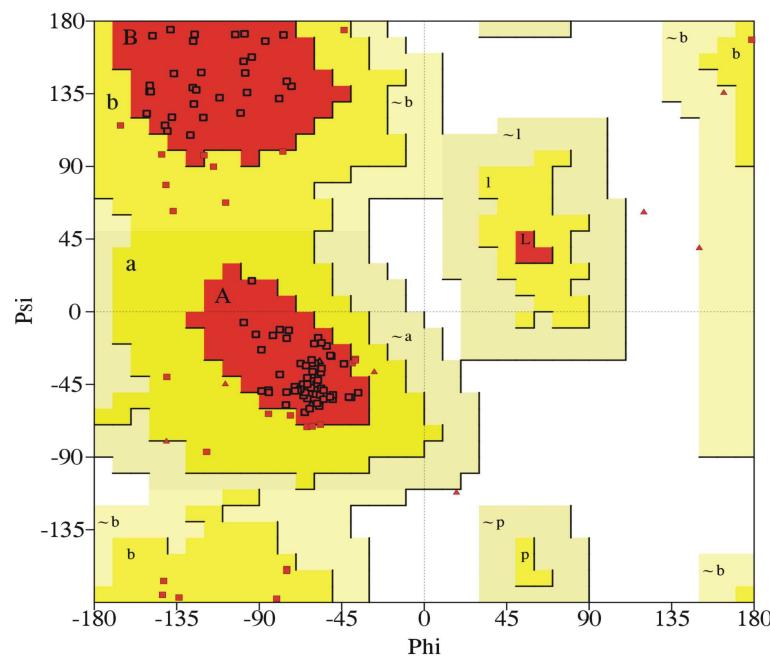
### 3D-Struktur von CheY2-BeF<sub>3</sub>

Abb. 3.8 (A) zeigt das Bändermodell von CheY2-BeF<sub>3</sub> (vgl. 3.4.7). Faltung und Topologie sind analog zu CheY2. Unterschiede sind in der Verteilung und räumlichen Anordnung der Sekundärstrukturelemente zu beobachten. Die Überlagerung der 16 Strukturen von CheY2-BeF<sub>3</sub> mit kleinsten DYANA-TF- Werten ist in Abb. 3.8 (B) gezeigt. Das Strukturbündel ist durch die experimentellen Daten gut definiert. Die mittleren globalen RMSD-Werte (3.4.8, Tab. 3.3) der Hauptkettenatome und schweren Atome betragen 0,027 nm bzw. 0,083 nm. N- und C-Terminus weisen aufgrund fehlender experimenteller Daten (Abb. 3.5 (C)) erhöhte Variabilität auf. Dies zeigt sich auch in der sequenzspezifischen Auftragung der globalen RMSD-Werte (Abb. 3.5 (D)), die für N- und C-Terminus deutlich erhöht sind.

Das mit PROCHECK erstellte Ramachandran-Diagramm der CheY2-BeF Struktur mit kleinstem Wert der DYANA-TF ist in Abb. 3.9 zu sehen. Für eine Beschreibung des Graphen sei auf Abschnitt 3.4.7 verwiesen. 80,5% der Reste, ausgenommen Glycin- und



**Abb. 3.8:** (A): Bändermodell von CheY2-BeF<sub>3</sub>. blau:  $\beta$ -Stränge; rot-gelb:  $\alpha$ -Helices; grau: Schleifenregionen. Die Nummerierung erfolgt vom N- (N) zum C-Terminus (C). (B): CheY2-BeF<sub>3</sub> Strukturbündel der 16 Konformationen mit kleinsten DYANA TF-Werten.



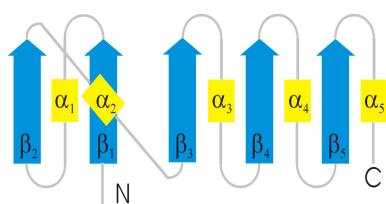
**Abb. 3.9:** Verteilung der dihedralen Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$  bei CheY2-BeF<sub>3</sub> im Ramachandran-Plot. Beschreibung im Text, Symbole wie in Abb. 3.7.

Prolinreste, liegen innerhalb des bevorzugten Winkelbereichs. In zusätzlich erlaubten Regionen liegen 19,5%. Ungünstige Winkelkombinationen wurden nicht beobachtet. Die NMR R-Faktoren für CheY2-BeF<sub>3</sub> liegen zwischen 0,07 und 0,18 (Tab. 3.3), d.h. die experimentellen Daten sind durch die Struktur gut erklärt.

Insgesamt zeigt sich, daß die Struktur von CheY2-BeF<sub>3</sub> ist gut definiert und erklärt die experimentellen Daten. Dies geht deutlich aus den zur Bewertung herangezogenen Größen hervor.

### 3.4.8 Strukturvergleich von CheY2 mit CheY2-BeF<sub>3</sub>

In Tab. 3.3 sind die in den Abschnitten 3.4.4 bis 3.4.7 beschriebenen Strukturdaten für CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> zusammengefaßt und einander gegenübergestellt. Diese umfassen die aus den experimentellen Daten gewonnenen konformationellen Einschränkungen (NOE-Daten, dihedrale Winkel, Wasserstoffbrücken) sowie die zur Bewertung herangezogenen Größen (DYANA-TF, NOE-Verletzungen, RMSD-Werte, Ramachandran Winkel, NMR-R-Faktoren). Die mit insgesamt 1655 bzw. 1660 experimentellen Einschränkungen bestimmten 3D Strukturen von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> besitzen etwa gleiche Qualität, was aus den in Tab. 3.3 gegebenen Daten ersichtlich ist. Die NOE-Daten waren bei der Strukturbestimmung für die Definition der globalen Faltung und der Sekundärstrukturelemente entscheidend. Durch die Verwendung der aus den chemischen Verschiebungen abgeleiteten Einschränkungen für dihedrale Winkel konnten die Sekundärstrukturelemente in weitgehender Übereinstimmung mit CSI-Analysen gefestigt werden. Aufgrund der Größe und der Eigenschaften von CheY2 war die Zahl der bestimmten Wasserstoffbrücken im Vergleich zu den NOE-Daten relativ gering, weshalb die Verwendung der Wasserstoffbrücken in den Strukturrechnungen zu keiner merklichen Verbesserung der Strukturdaten führte. Beide Strukturen besitzen die für Responseregulatoren typische offene  $\alpha/\beta$ -Konformation [159] mit der in Abb. 3.10 skizzierten Topologie.



**Abb. 3.10:** Anordnung der Sekundärstrukturelemente in der für Responseregulatoren typischen offenen  $\alpha/\beta$  Konformation.

Bei detaillierter Analyse der Strukturen von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> können Unterschiede in der lokalen Struktur und in der Verteilung bzw. räumlichen Anordnung der Sekundärstrukturelemente festgestellt werden. Bei CheY2-BeF<sub>3</sub> ist eine Verlängerung der Sekundärstrukturelemente um zwei bis drei Reste zu beobachten. Dies ist in Abb.

**Tabelle 3.3:** Zusammenfassung und Gegenüberstellung der Strukturdaten von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub>.

Parameter	CheY2	CheY2-BeF <sub>3</sub>
<b>NOE's</b>		
intraresidual	796	815
sequentiell ( $ i - j  = 1$ )	437	406
mittelreichweitig ( $ i - j  \leq 5$ )	179	155
langreichweitig ( $ i - j  > 5$ )	186	219
Total	1598	1595
<b>Dihedrale Winkel</b>		
$\Phi, \Psi$	52	58
<b>Wasserstoffbrücken</b>	5	7
Insgesamt:	1655	1660
pro Rest:	12,9	12,8
<b>Strukturrechnung <sup>a</sup></b>		
Minimaler TF-Wert	2,80	1,92
Maximaler TF-Wert	3,00	1,96
Durchschnitt	2,93( $\pm 0,4$ )	1,95 ( $\pm 0,2$ )
NOE-Verletzungen ( $> 0,02$ nm)	3 ( $\pm 1$ )	5 ( $\pm 2$ )
NOE-Verletzungen ( $> 0,03$ nm)	0	0
Winkelverletzungen ( $> 5^\circ$ )	0	0
<b>RMSD <sup>b</sup> (nm)</b>		
Hauptkettenatome	0,042 ( $\pm 0,015$ )	0,027 ( $\pm 0,007$ )
Alle schweren Atome (N, C, O, S)	0,098 ( $\pm 0,016$ )	0,083 ( $\pm 0,013$ )
<b>Ramachandran-Winkel <sup>c</sup> (%)</b>		
Bevorzugt	84,1 ( $\pm 0,70$ )	80,5 ( $\pm 0,63$ )
Zusätzlich erlaubt	14,2 ( $\pm 0,82$ )	19,5 ( $\pm 0,63$ )
Zus. möglich	1,8 ( $\pm 0,29$ )	0,0 ( $\pm 0,0$ )
Verboten	0,0 ( $\pm 0,0$ )	0,0 ( $\pm 0,0$ )
<b>R-Faktoren <sup>d</sup></b>		
intraresidual	0,08	0,12
sequentiell	0,18	0,08
mittelreichweitig	0,10	0,07
langreichweitig	0,11	0,18
interresidual	0,17	0,16

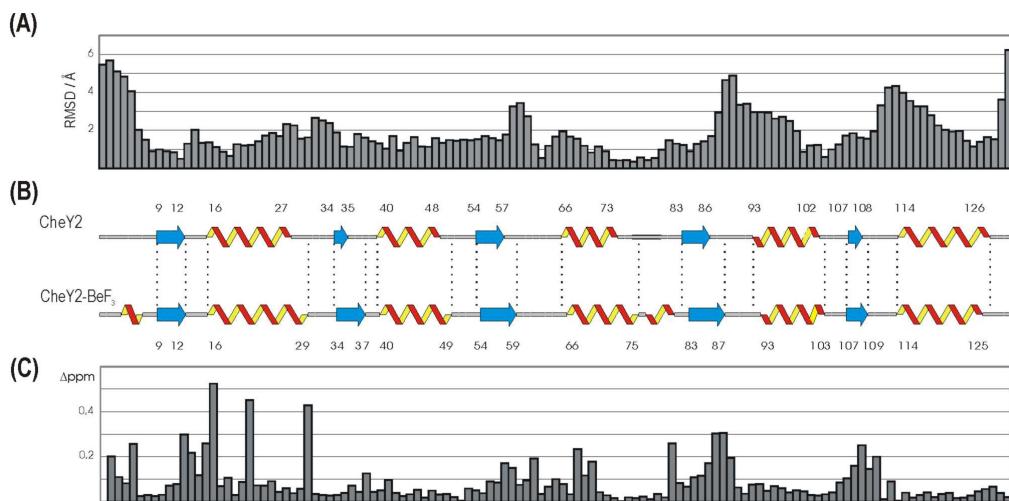
<sup>a</sup> Bündel von 16 aus 250 Strukturen.

<sup>b</sup> RMSD-Werte zur mittleren Struktur (Aminosäuren 6 - 124).

<sup>c</sup> Ramachandran-Statistik gemäß PROCHECK.

<sup>d</sup> R-Faktoren für die angegebenen Signalgruppen gemäß AUREMOL

3.11 (B), die die sequentielle Verteilung der Sekundärstrukturelemente wiedergibt, zu erkennen. Diese Tendenz wurde bereits im Rahmen der Zuordnung durch entsprechende NOE-Kontakte beobachtet. Dieses kann erstens durch eine mit der Bindung von  $\text{BeF}_3$

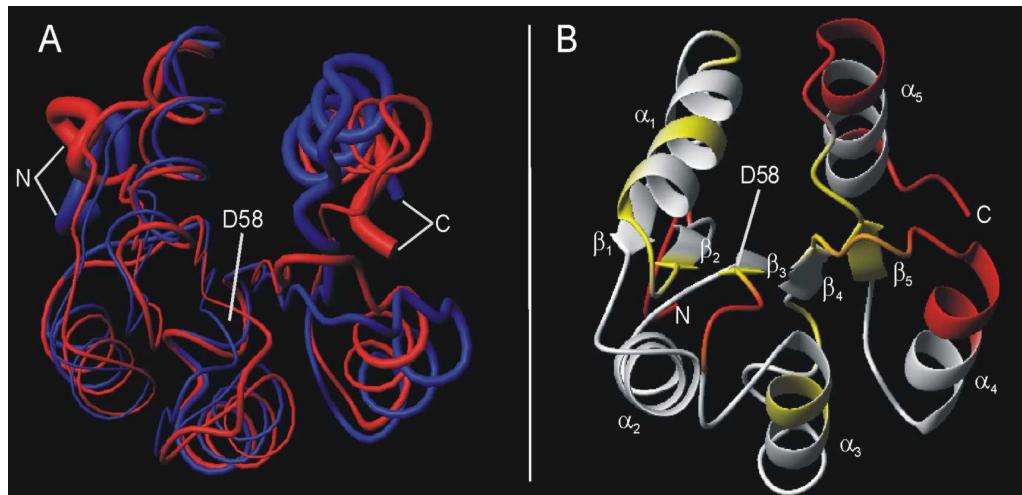


**Abb. 3.11:** (A) RMSD-Werte von CheY2 und CheY2- $\text{BeF}_3$  zur mittleren Struktur für die Hauptkettenatome N, C<sup>α</sup> und C' in Abhängigkeit von der Sequenzposition. (B) Sekundärstruktur von CheY2 und CheY2- $\text{BeF}_3$ . (C) Sequenzspezifische, gewichtete chemische Verschiebungsdifferenzen der <sup>1</sup>H-, <sup>15</sup>N- und <sup>13</sup>C-Atome der Hauptkette.

einhergehenden Stabilisierung der Struktur verursacht sein, wofür auch die erhöhte Stabilität der NMR-Proben von CheY2- $\text{BeF}_3$  spricht (3.3.2), zweitens durch die größere Zahl der kurz- und langreichweitigen NOE-Kontakte bei CheY2- $\text{BeF}_3$  bedingt sein (Tab. 3.3). Bei CheY2- $\text{BeF}_3$  neigen die Reste 5- 7 und 80- 83 zur Ausbildung helikaler Strukturen, obwohl diese Reste in unstrukturierten Bereichen des Proteins liegen (Abb. 3.11 (B)). Diese Tendenz konnte durch CSI-Analysen der <sup>13</sup>C<sup>α</sup> chemischen Verschiebungen bestätigt werden.

Die RMSD-Werte der schweren Hauptkettenatome N, C<sup>α</sup> und C der überlagerten CheY2- und CheY2- $\text{BeF}_3$ -Strukturen mit kleinsten DYANA TF-Werten charakterisieren räumliche Verschiebungen der Sekundärstrukturelemente. Die Auftragung der RMSD-Werte gegen die Sequenz ist in Abbildung 3.11 (A) dargestellt. Für ein Signifikanzniveau von 0,28 nm (der doppelten Standardabweichung aller RMSD-Werte), können mit Ausnahme von N- und C-Terminus drei weitere zusammenhängende Sequenzbereiche lokalisiert werden. Die N- und C-terminalen Enden in beiden Strukturen sind weniger gut definiert und weisen somit auch im Strukturvergleich höhere RMSD-Werte auf. Der Bereich von Asp58 bis Asn60 liegt im aktiven Zentrum des Proteins. Die lokalen, strukturellen Änderungen können auf die Modifikation von CheY2 mit  $\text{BeF}_3$  zurückgeführt werden.

Die weiteren Sequenzbereiche, von Ile85 bis Leu95 und von Pro111 bis Ala119 liegen in  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  und in den jeweiligen N-terminal angrenzenden Schleifenregionen. In der Schleifendarstellung von CheY2 in Abb. 3.12 (B) sind die Reste mit RMSD-Werten  $> 0,28$  nm rot markiert. In Abb. 3.12 (A) sind die Strukturbündel CheY2 (3.6 (B)) und CheY2-



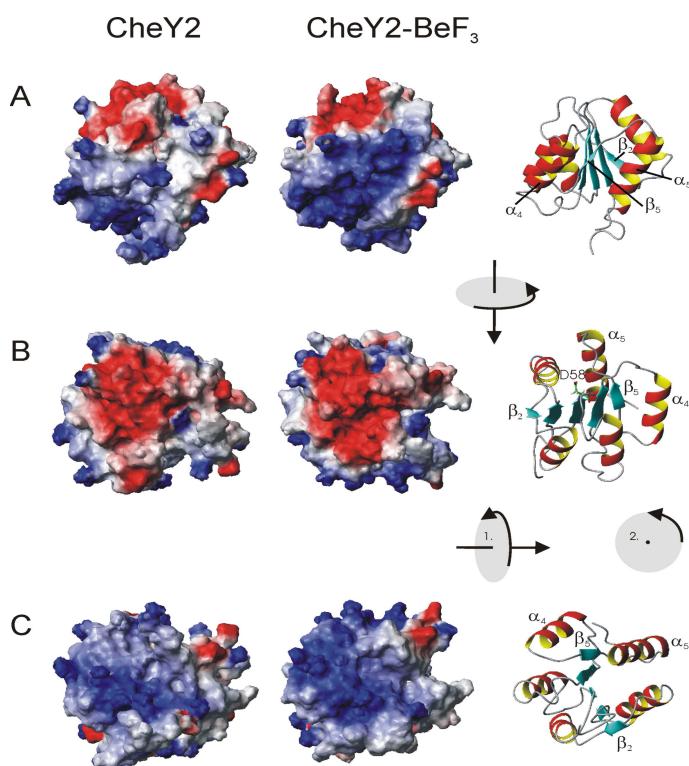
**Abb. 3.12:** (A) Überlagerung der Strukturbündel von CheY2 (blau) und CheY2- $\text{BeF}_3$  (rot). Der Durchmesser der Linien ist proportional zum lokalen RMSD-Wert des jeweiligen Bündels. (B) Schleifendarstellung von CheY2. RMSD-Werte  $> 0,28$  nm (rot) und chemische Verschiebungsumterschiede  $> 0,15$  ppm (gelb) sind gekennzeichnet. Reste, die beide Bedingungen erfüllen sind orange gefärbt.

$\text{BeF}_3$  (3.8 (B)) überlagert, wobei der Durchmesser der Linien proportional zum lokalen RMSD-Wert (Abb. 3.5 (B), (D)) des jeweiligen Bündels ist. Die Unterschiede zwischen beiden Strukturen sind in den oben genannten Bereichen (vgl. Abb. 3.11 (A)) signifikant größer als die Variation jeweiligen Strukturbündel. Die höheren RMSD-Werte weisen somit auf einen wirklichen Konformationsunterschied hin.

Die RMSD-Werte korrelieren mit den Unterschieden in den  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}'$  und  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebungen der Hauptkette. Diese sind in Abb. 3.11 (C) gegen die Sequenzposition aufgetragen. Werte über dem Niveau von 0,15 ppm, der doppelten Standardabweichung, können als signifikant betrachtet werden. Dies trifft für die im Protein in räumlicher Nähe liegenden Bereiche zwischen  $\beta_1$  und  $\alpha_2$  und den Resten 57 - 69 zu. Diese liegen im aktiven Zentrum des Proteins, das durch Bindung von  $\text{BeF}_3$  an Asp58 sowohl chemisch als auch strukturell verändert wird. Die erhöhten Werte in den  $\beta$ -Strängen  $\beta_4$  und  $\beta_5$  und den angrenzenden Schleifenregionen können einerseits durch die relativ große räumliche Verschiebung der Helices  $\alpha_4$  und  $\alpha_5$ , andererseits auch durch einen  $\text{BeF}_3$ -induzierten, intramolekularen Signalmechanismus verursacht werden. Für die Beteiligung an einem

Signalmechanismus spricht, daß die beeinflußten Reste in  $\beta_5$ , Asn106, Val107, Leu108 und Ala109, Teil der Wechselwirkungsfläche von CheY2 sind. Dieser C-Terminal lokalisierte Bereich beinhaltet die Bindungsflächen von CheY2 zur Kinase CheA und zum Motor (3.5; 3.6). Die Effekte bei Leu21 und Leu29 sind Ursache der räumlichen Verschiebung von  $\alpha_1$  und  $\alpha_5$ , die eine veränderte inter-residuale Wechselwirkung zwischen beiden Sekundärstrukturelementen induziert.

Die Oberflächen beider Moleküle zeigen in oben genannten Regionen unterschiedliche Ladungsverteilungen. Diese sind in Abbildung 3.13 für verschiedene Orientierungen (A- C) von CheY2 und CheY2- $\text{BeF}_3$  gezeigt. Positive Ladungen sind blau, negative rot



**Abb. 3.13:** Oberflächenladung (positiv: blau; negativ: rot) von CheY2 und CheY2- $\text{BeF}_3$  in verschiedenen Orientierungen (A- C). Zur Orientierung (für den Betrachter) sind jeweils Bändermodell von CheY2 und Drehrichtung angegeben.

hervorgehoben. Der negativ geladene Oberflächenbereich des aktiven Zentrums (Abb. 3.13 (B)) dehnt sich leicht aus. Jedoch entspricht dies nicht der Situation in phosphoryliertem CheY-P, da in der Berechnung des Potentials die Phosphatgruppe nicht berücksichtigt wurde. Konkrete Aussagen über diesen Bereich des Proteins sind da-

her kaum möglich. Im C-terminalen Teil, vor allem im Oberflächenbereich zwischen  $\alpha_4$  und  $\alpha_5$  nimmt die positiv geladene Fläche deutlich zu (Abb. 3.13 (A) und (C)). Dieser Bereich weist auch signifikante Strukturveränderungen und chemische Verschiebungunterschiede auf (Abb. 3.12 (B)) und ist daher möglicherweise für die Funktion von CheY2 von Bedeutung.

Im Wesentlichen können in den CheY2- und CheY2-BeF<sub>3</sub>-Strukturen zwei Regionen mit signifikanten Unterschieden lokalisiert werden. Diese schließen das aktive Zentrum, das die Magnesium- und Phosphatbindungsstelle enthält, und die Sekundärstrukturelemente  $\alpha_4$ ,  $\beta_5$  und  $\alpha_5$  ein.

## 3.5 Protein-Protein-Wechselwirkungen

Zur Charakterisierung der Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen CheY2, CheY2-BeF<sub>3</sub> und Proteinen der Chemotaxis-Signalkette wurden die Signalveränderungen in <sup>15</sup>N TROSY-HSQC-Spektren von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> bei steigender Ligandenkonzentration untersucht. Ohne Ligand waren die chemischen Verschiebungen der Signale im TROSY-HSQC- und standard HSQC-Experiment identisch. Die in den Spektren beobachteten Signalveränderungen in Anwesenheit eines Liganden können somit auf Wechselwirkungseffekte zurückgeführt werden. Die Titrationsexperimente wurden mit 0,5 mM <sup>15</sup>N-CheY2 bzw. <sup>15</sup>N-CheY2-BeF<sub>3</sub> Proben und einer schrittweise um 0,1 mM steigenden Ligandenkonzentration durchgeführt (2.8.6). Die Zuordnung der TROSY-Spektren konnte aus dem Vergleich mit den vorhandenen HSQC-Spektren gewonnen werden. Die bei der Titration von CheY2 bzw. CheY2-BeF<sub>3</sub> mit der P2-Domäne beobachteten Signalveränderungen konnten beschrieben in vier Klassen eingeteilt werden (2.8.6).

Die Effekte der Protein-Protein Wechselwirkungen werden in den nächsten Abschnitten im Einzelnen wiedergegeben.

### 3.5.1 Wechselwirkung von CheY2 mit der P2-Domäne von CheA

Die Wechselwirkung von CheY2 mit der Kinase CheA ist Grundvoraussetzung für den Phosphattransfer. Wegen der hohen Molekülmasse von CheA (81 kDa) wurde zur Charakterisierung der Wechselwirkung die P2-Domäne eingesetzt. Diese hat eine Molekülmasse von 15 kDa und ist im CheA-Molekül für die CheY2-Bindung verantwortlich (Abb. 1.5).

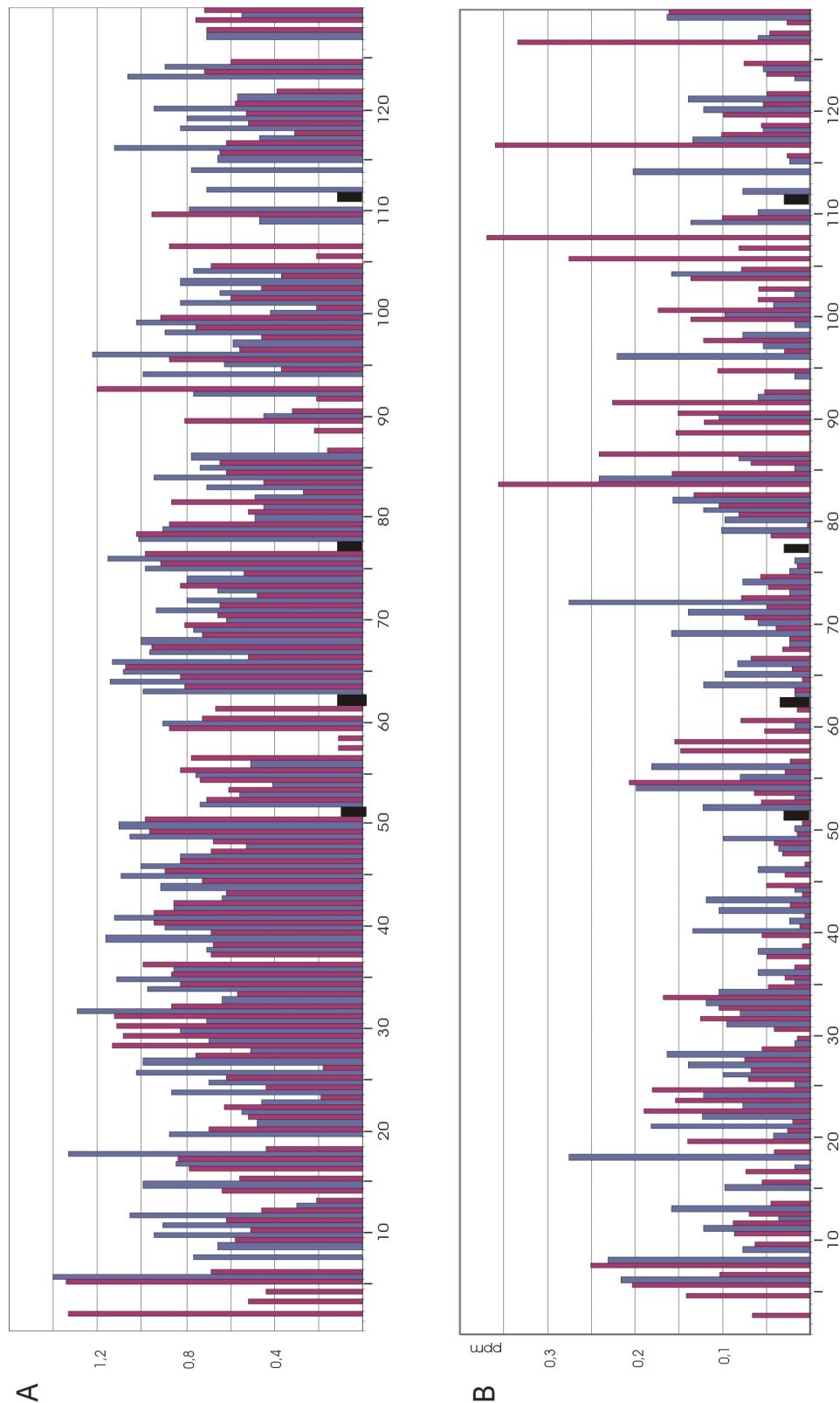
Bei der Titration von CheY2 mit der P2-Domäne konnte das [P2] : [CheY2] Verhältnis bis zu einem Wert von 1,4 : 1 in 0,1 mM Schritten erhöht werden. Eine weitere Erhöhung der P2-Konzentration erwies sich durch zunehmende Proteinpräzipitation und der damit verbundenen Verschlechterung der Spektrenqualität als nicht praktikabel. Im Verlauf

der Meßreihe wurde beim Großteil der Signale keine signifikante Veränderung der chemischen Verschiebung und/oder Intensität beobachtet. Als Signifikanzniveau, wurde die doppelte Varianz der jeweiligen Werte verwendet. Für chemische Verschiebungen ergab sich ein Niveau von  $> 0,15$  ppm, für den relativen Intensitätsverlust ein Wert von  $> 0,70$ . Reste, die keine signifikanten Verschiebungsänderungen zeigen sind nicht direkt an der Wechselwirkung beteiligt. Einige Signale konnten bereits nach dem ersten Titrationsschritt nicht mehr vom Rauschen unterschieden werden, was einem Intensitätsverlust  $> 0,97$  entspricht. Bei den Signalen einer weiteren Gruppe von Signalen wurden signifikante chemische Verschiebungsänderungen und Intensitätsverluste beobachtet. Zudem wurde eine Verbreiterung der Signale festgestellt. Eine Korrelation zwischen Abnahme der Signalintensität und den relativ wenigen schwachen, neu auftretenden Signalen konnte wegen der Verschlechterung der Spektrenqualität nicht hergestellt werden. Das Auftreten neuer Signale würde auf langsamem Austausch hinweisen. Die vierte Gruppe umfaßt Signale mit chemischen Verschiebungsänderungen von mehr als 0,15 ppm und teilweisem Intensitätsverlust. Sind die Signale der gebundenen und nicht gebundenen Konformation in schnellem Austausch, so kann die Reduktion der Intensitäten auf eine erhöhte  $T_2$ -Relaxation im Komplex während der INEPT-Sequenz zurückgeführt werden. Deutliche Austauschverbreiterungen und Verschiebungsunterschiede von Signalen sind indikativ für eine direkte Beteiligung an der Protein-Protein-Wechselwirkung.

Wird hingegen bei der Interaktion von CheY2 mit der P2-Domäne die Struktur im Bindungsbereich stabilisiert, so steigt die Korrelationszeit und damit die Relaxationsrate für die Reste in dieser Region. Dies führt bei den betroffenen Resten zu erhöhten Liniendurchmesser und reduzierten Intensitäten. Im Histogramm (3.14 (A) und (B)) sind die sequenzspezifischen Intensitätsänderungen und chemischen Verschiebungsänderungen von CheY2 bei der Wechselwirkung mit der P2-Domäne als blaue Balken hervorgehoben.

Im Protein können drei Bereiche lokalisiert werden, deren Aminosäurereste die für Protein-Protein-Wechselwirkung charakteristische Effekte zeigen. Die räumliche Lage dieser Bereiche ist aus Abb. 3.15 (A, links), in der die entsprechenden Reste farblich herausgestellt sind, zu entnehmen. Im Folgenden werden die Bereiche näher beschrieben.

Der erste Bereich umfaßt die N-terminalen Reste Met1 bis Lys6 sowie Helix  $\alpha_1$ . Die Interpretation der Effekte im N-terminalen Bereich ist schwierig, da dieser unstrukturiert und flexibel ist. Einige Reste von Helix  $\alpha_1$  wechselwirken mit  $\alpha_5$ . Die durch die Wechselwirkung induzierten Effekte sind daher auf eine gegenseitige Verschiebung dieser Helices zurückzuführen. Ähnliches wurde bereits bei der Aktivierung von CheY2 festgestellt. Die Verlagerung der Helices  $\alpha_1$  und  $\alpha_5$  scheint daher wichtig für den Konformationswechsel bei Aktivierung zu sein. Zudem ist dies ein Hinweis darauf, daß die Konformation von CheY2 im Komplex mit der P2-Domäne eine ähnlich zur freien, phosphorylierten Form von CheY2 ist.



**Abb. 3.14:** Sequenzspezifische Auftragung der relativen Intensitätsverluste (A) und chemischen Verschiebungsänderungen (B) bei Titration von CheY2 (blau) und CheY2-BeF (rot) mit der P2-Domäne von CheA. Prolinreste sind durch schwarze Rechtecke gekennzeichnet.

Der zweite Bereich umfaßt Aminosäurereste in Nähe der Phosphorylierungsstelle Asp58. Die beobachteten Effekte deuten darauf hin, daß durch Bindung von CheY2 an die P2-Domäne eine Konformationsänderung im aktiven Zentrums induziert wird, die für den Phosphattransfer von der P1-Domäne von CheA zu CheY2 erforderlich ist.

Der dritte Bereich enthält die C-terminal gelegenen Sekundärstrukturelemente  $\alpha_4$ ,  $\beta_5$  und  $\alpha_5$ . Die Effekte sind hier am stärksten ausgeprägt. Die Reste Ala89, Thr88, Gly91, Arg93, Asn105, Asn106, Val107, Thr113, Glu122 und Phe125 liegen in Nähe der Proteinoberfläche, wobei die Atome der ersten sieben Reste in einem zusammenhängenden Oberflächenbereich liegen, der in Abb. 3.15 (A, rechts) zu sehen ist. Abb. 3.15 (A, rechts) zeigt eine C-terminale Ansicht des CPK- (Corey-Pauling-Koltun) Modells von CheY2. Die oberflächennahen Reste, die bei der Wechselwirkung von CheY2 mit der P2-Domäne signifikant beeinflußt wurden sind rot gefärbt und benannt. Bei dem in dieser Darstellung nicht sichtbaren Oberflächenbereich wurden keine deutlichen Effekte beobachtet. Diese Tatsache, zusammen mit den Ergebnissen, die für den dritten Bereich erzielt wurden ist ein starker Hinweis darauf, daß die P2-Bindungsstelle von CheY2 C-terminal lokalisiert ist und daß die oben genannten Reste aus dem dritten Bereich wesentlich an der P2-Bindung beteiligt sind. Die Beeinflussung der nicht in der Bindungsfläche gelegenen Reste wird wahrscheinlich durch indirekte Effekte aufgrund struktureller Veränderungen verursacht.

Die bei der P2-Wechselwirkung signifikant beeinflußten Bereiche zeigten auch bei der Aktivierung von CheY2 deutliche Effekte. Daher ist es wahrscheinlich, daß die Konformation von CheY2 im Komplex mit der P2-Domäne ein Übergangszustand zur aktivierten Form ist.

### 3.5.2 Wechselwirkung von CheY2-BeF<sub>3</sub> mit der P2-Domäne von CheA

Für den Transfer der Phosphatgruppe von CheY2-P zu CheA bei der Retroposphorylierung ist eine Wechselwirkung von aktiviertem CheY2 mit CheA notwendig. Diese wurde in einer Titrationsreihe von CheY2 mit der P2-Domäne von CheA durch NMRExperimente belegt. Die Titration einer 0,5 mM CheY2-BeF<sub>3</sub> - Probe mit der P2-Domäne konnte bis zu einem Konzentrationsverhältnis von [P2] : [CheY2] = 1,6 : 1 durchgeführt werden, bevor bei weiterer Erhöhung der Ligandenkonzentration Proteinpräzipitation und eine Verschlechterung der Spektrenqualität beobachtet wurden. Die bei CheY2-BeF<sub>3</sub> durch die Wechselwirkung mit der P2-Domäne hervorgerufenen Effekte waren im Vergleich zu CheY2 bei ähnlichen Protein - Ligand Konzentrationsverhältnissen zu beobachten. Abb. 3.14 zeigt die Intensitätsveränderungen (A, rot) und chemischen Verschiebungsänderungen (B, rot) in Abhängigkeit von der Sequenzposition. Chemische Verschiebungsänderungen von mehr als 0,15 ppm und Intensitätsverluste größer als 0,70

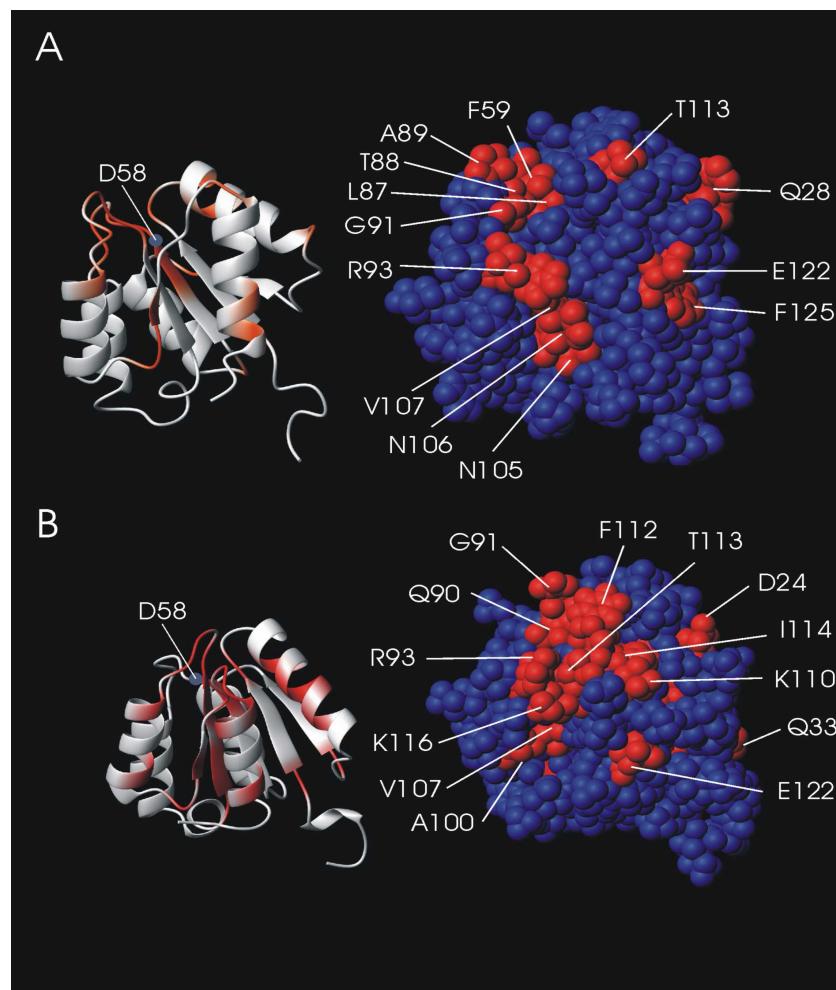
können analog zu CheY2 als signifikant betrachtet werden. Aus Abb. 3.14 ist zu erkennen, daß eine Häufung der signifikant beeinflußten Reste am N-terminalen Ende und in  $\alpha_1$ , im aktiven Zentrum und im C-terminalen Bereich der Sekundärstrukturelemente  $\beta_4$ ,  $\alpha_4$ ,  $\beta_5$  und  $\alpha_5$  auftritt. In der Bänderdarstellung von CheY2-BeF<sub>3</sub> der Abb. 3.15 (B, links) sind die Reste mit signifikanten Veränderungen farblich hervorgehoben. Hieraus ist ersichtlich, daß die betroffenen Regionen ähnlich zu den bei CheY2 definierten drei Bereichen ist. Sie zeigen im Vergleich zu CheY2 jedoch deutlicher ausgeprägte Effekte. Die durch die Wechselwirkung verursachten Veränderungen können analog zu CheY2 verursacht sein.

Der N-Terminus ist flexibel und unstrukturiert, so daß keine konkreten Aussagen getroffen werden können. Helix  $\alpha_1$  wechseltwirkt in CheY2-BeF<sub>3</sub> mit dem Proteinkern und  $\alpha_5$ . Der Einfluß der P2-Bindung auf die Reste in  $\alpha_1$  ist daher möglicherweise die Folge von strukturellen Veränderungen von CheY2-BeF<sub>3</sub>, also indirekter Natur.

CheY2-BeF<sub>3</sub> ist ein Analogon der phosphorylierten Form CheY2-P. CheY2-P ist zur Retroporphosphorylierung fähig. Die Bindung von aktiviertem CheY2-P an die P2-Domäne verursacht daher möglicherweise konformationelle Änderungen im Aktiven Zentrum die für den Transfer von Phosphat entscheidend sind.

Die im C-terminalen Bereich gelegenen, signifikant beeinflußten Reste Gln90, Gly91, Arg93, Ala100, Val107, Lys110, Phe112, Thr113, Ile114, Lys116 liegen in Nähe eines zusammenhängenden Oberflächenbereichs. Auf Basis derselben Begründung wie bei CheY2 kann geschlossen werden, daß die Bindungsfläche von CheY2-BeF<sub>3</sub> zur P2-Domäne von CheA C-terminal lokalisiert ist und oben genannte Reste, einschließlich und Glu122 wesentlich an der Bindung beteiligt sind. Abb. 3.15 (B, rechts) zeigt eine C-terminalen Aufsicht auf das CPK-modell von CheY2-BeF<sub>3</sub>. Die bei der P2-Bindung signifikant beeinflußten Reste nahe der Proteinoberfläche sind rot hervorgehoben und benannt. Außer dem aktiven Zentrum wurden auf der in Abb. 3.15 (B, rechts) nicht gezeigten Oberfläche keine signifikanten Effekte beobachtet. Ein weiterer Hinweis, daß oben genannte Reste die Wechselwirkungsfläche von CheY2-BeF<sub>3</sub> mit der P2-Domäne definieren. Bei Aktivierung von CheY2 wurden ähnliche Proteinbereiche signifikant beeinflußt, weswegen P2-gebundenes CheY2-BeF<sub>3</sub> wahrscheinlich einen Übergangzustand darstellt, der den effektiven Rücktransfer des Phosphats von CheY-P zu CheA ermöglicht.

Ein Vergleich der CheY2- und CheY2-BeF<sub>3</sub>-Wechselwirkung mit der P2-Domäne von CheA zeigt daß einerseits ähnliche Proteinbereiche signifikant beeinflußt werden, andererseits, die signifikant beeinflußten Aminosäurereste und Oberflächenbereiche der überlappenden Bindungsstellen verschieden sind. Eine unterschiedliche Bindung und Affinität von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> zu CheA ist daher naheliegend. Die Spezifität der Wechselwirkung ist zudem für den Retroporphosphorylierungsmechanismus als auch für die Signaltransduktion zum Motor entscheidend, da CheY-P sowohl an CheA als auch an den Motor bindet.



**Abb. 3.15:** Darstellung der bei der Titration von CheY2 (A) bzw. CheY2- $\text{BeF}_3$  (B) mit der P2 - Domäne beobachteten Effekte. Signifikant beeinflußte Reste sind in den Bändermodellen (links) orange gefärbt. Im C-terminalen Oberflächenbereich gelegene, stark beeinträchtigte Aminosäurereste sind in den CPK-Darstellungen (rechts) von rot hervorgehoben und bezeichnet.

### 3.5.3 Wechselwirkung von CheY2 mit CheY1 und MotD

Zur Aufklärung der Regulationsmechanismen des Responseregulators CheY2 wurde die Wechselwirkung mit weiteren Proteinen untersucht. Der in Betracht gezogene, zweite Responseregulator CheY1 von *S. meliloti* und das an der endoplasmatischen Oberfläche (FliM) des Flagellenmotors lokalisierte MotD-Protein könnten durch potentielle Interaktionen die Signaltransduktion und Regulation innerhalb der Chemotaxis-Signaltransduktionskette beeinflussen.

**CheY2 bzw. CheY2-BeF<sub>3</sub> - CheY1:** Die analog zur Titration mit der P2 Domäne von CheA aufgestellte Meßreihe mit CheY1 als Ligand wurde bis zu einem Konzentrationsverhältnis CheY1 : CheY2 = 2 : 1 durchgeführt. Hier konnten in den CheY2- und CheY2-BeF<sub>3</sub> - TROSY-HSQC-Spektren mit CheY1 keine Veränderungen beobachtet werden. Aus diesem Grund ist eine Wechselwirkung von CheY2 in der inaktiven und aktiven Konformation mit CheY1 unwahrscheinlich.

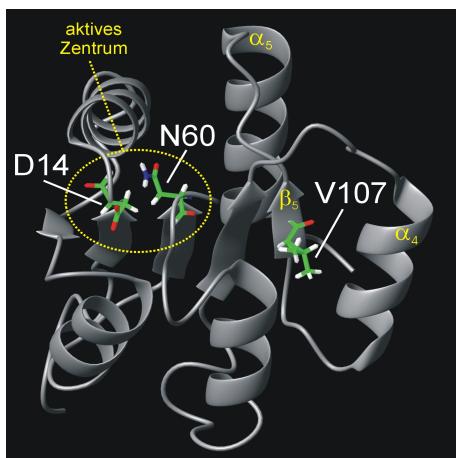
**CheY2-D14K - MotD:** Die dauernd an den Motor bindende Mutante CheY2-D14K [160] wurde auf eine mögliche Wechselwirkung mit dem MotD-Protein untersucht. Falls CheY2 im aktivierte Zustand mit MotD eine Wechselwirkung eingehen sollte, so sollte dies auch bei der konstitutiv aktiven Mutante CheY2-D14K verstärkt der Fall sein. Bei der Titration von CheY2-D14K mit MotD, bis zu einem Konzentrationsverhältnis von MotD : CheY2-D14K = 2 : 1 konnten keine signifikanten Signalveränderungen festgestellt werden, weswegen eine direkte Wechselwirkung beider Proteine eher unwahrscheinlich ist.

Eine denkbare Wechselwirkung mit dem FliM-Protein an der Motorbasis konnte bisher noch nicht untersucht werden, da rekombinantes FliM-Protein aus technischen Gründen nicht in genügender Konzentration verfügbar war.

### 3.6 Charakterisierung von CheY2 Mutanten

Sowohl bei Aktivierung von CheY2 als auch bei der Wechselwirkung von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> mit der P2-Domäne von CheA wurden das Aktive Zentrum („saure Tasche“) und der C-terminale Bereich ( $\alpha_4$ ,  $\beta_4$ ,  $\alpha_5$ ) der Proteine wesentlich beeinflusst. Die beiden im aktiven Zentrum gelegenen Punktmutationen Asp14Lys und Asn60Arg sowie der Austausch Val107Trp im C-terminalen Bereich wurden von K. Fuchs [160] biochemisch charakterisiert. Die räumliche Lage dieser Mutationsstellen in der CheY2-Struktur ist in Abb. 3.16 anhand des Bändermodells von CheY2 verdeutlicht.

Die Punktmutation Val107Trp führt zu einer stark reduzierten Bindung an den Flagellenmotor, die Phosphorylierung ist jedoch kaum beeinträchtigt. Das Mutantenprotein CheY2-D14K besitzt eine permanent aktive Konformation, kann also stets an den Motor binden, wird jedoch nicht phosphoryliert. CheY2-N60R bindet an den Flagellenmotor und ist phosphorylierbar. Der phosphatgebundene Zustand besitzt im Vergleich zu CheY2 eine deutlich erhöhte Halbwertszeit (B. Scharf, pers. Mitteilung). Die Mutantenproteine CheY2-V107W, CheY2-D14K und CheY2-N60R besitzen also im Hinblick auf Motorbindung und Phosphorylierung interessante Eigenschaften und wurden daher mittels NMR-Spektroskopie weitergehend untersucht.



**Abb. 3.16:** Bändermodell von CheY2. Die funktionell wichtigen Aminosäurereste Asp14 und Asn60, die im aktiven Zentrum lokalisiert sind, sowie der Rest Val107, der im C-terminalen Bereich ( $\alpha_4$ ,  $\beta_5$ ,  $\alpha_5$ ) auf  $\beta$ -Strang fünf liegt, sind hervorgehoben und bezeichnet.

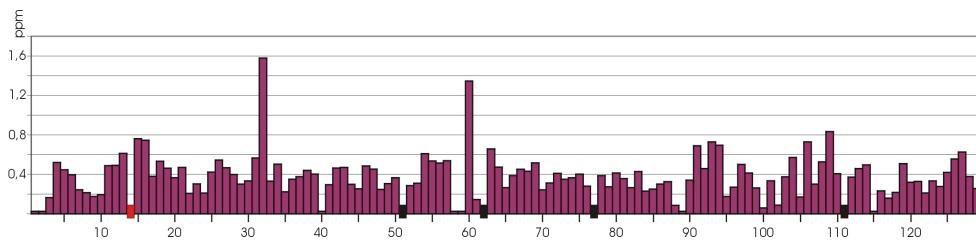
### 3.6.1 CheY2-V107W

Der Valinrest in Position 107 in CheY2 ist wichtig für die Bindung an den Motor. Bei vergleichbaren Responsregulatoren findet sich in dieser Position immer ein aromatischer Aminosäurerest. Bei *E. coli*-CheY ist dieser Rest (Tyr 106) entscheidend für die Bindung an den Flagellenmotor (Y-T-Kopplung; 1.3.1). CheY2 von *S. meliloti* besitzt keinen analogen Y-T-Kopplungsmechanismus. Aufgrund dieser möglicherweise funktionell wichtigen Unterschiede in der Motorbindung und -steuerung sollte das Mutantenprotein CheY2-V107W von *S. meliloti* genauer untersucht werden.

Der Vergleich des HSQC-Spektrums von CheY2-V107W mit dem von CheY2 und auch CheY2-BeF<sub>3</sub> zeigte, daß viele Signale wesentlich verschoben waren. Eine eindeutige Übertragung der Zuordnung war nur für etwa 40% der Signale möglich. Aus diesem Grund war eine quantitative Charakterisierung dieser Mutante (z.B. mittels *chemical shift mapping*) nicht möglich. Mg<sup>++</sup>-Komplexierung im aktiven Zentrum von CheY2 ist essentiell für dessen Phosphorylierung. Um eine niedrigere Mg<sup>++</sup>-Affinität als Ursache für dieses Ergebnis auszuschließen wurde eine Mg<sup>++</sup>-Titration über einen Konzentrationsbereich von 5 mM bis 100 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Da keine Veränderungen in den Spektren beobachtet wurden kann eine verringerte Mg<sup>++</sup>-Affinität ausgeschlossen werden, sofern Mg<sup>++</sup> überhaupt komplexiert wird. Letzteres ist aber anzunehmen, da die Mutante phosphoryliert werden kann [160]. Die Analyse der aufgenommenen Spektren zeigte, daß das Protein gefaltet und nicht denaturiert in der NMR-Probe vorlag. Wegen der großen Differenzen zum HSQC-Spektrum von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> konnten keine sequenzspezifischen Aussagen getroffen werden. Jedoch weisen die Daten auf größere konformationelle Unterschiede hin, die Ursache der veränderten Motorbindung sein könnten. Dies zeigt auch, daß der C-terminale Oberflächenbereich von CheY2 die Bindung an den Motor wesentlich beeinflußt.

### 3.6.2 CheY2-D14K

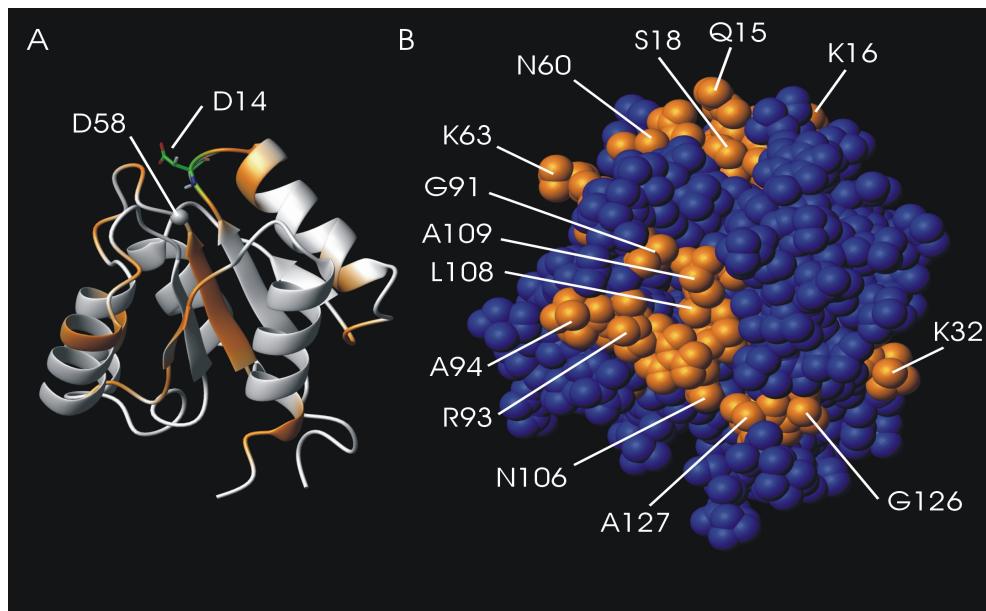
Der Austausch des nahe am aktiven Zentrum gelegenen Aminosäurerestes Asp14 durch Lys führt zu einer permanent aktivierte Form von CheY2 [160], die nicht mehr phosphoryliert werden kann. Das HSQC-Spektrum von CheY2 D14K zeigte wenig Ähnlichkeit zu dem von CheY2-BeF<sub>3</sub>. Jedoch konnte durch Vergleich mit dem relativ ähnlichen HSQC-Spektrum von CheY2 eine fast vollständige und eindeutige Zuordnung der Signale erreicht werden. Lediglich die Aminosäurereste Gly40, Ala89 und Glu115 wurden im HSQC-Spektrum der CheY2-D14K Mutante nicht identifiziert, auch nicht durch Vergleich mit den Daten von CheY2-BeF<sub>3</sub>. An der Stelle des mutierten Aminosäurerests Asp 14 wurde kein Signal beobachtet. Dies spricht erstens für die Stimmigkeit der CheY2-Zuordnung, zweitens für lokale, chemische und strukturelle Veränderungen in dem Mutantenprotein. Die sequenzspezifischen chemischen Verschiebungsunterschiede  $\Delta ppm_g(^1H, ^{15}N)$  (2.10) zwischen den HSQC-Spektren von CheY2 und CheY2-D14K sind als Histogramm in Abb. 3.17 dargestellt.



**Abb. 3.17:** Sequenzspezifische chemische Verschiebungsunterschiede  $\Delta ppm_g(^1H, ^{15}N)$  zwischen CheY2 und der Mutante CheY2- D14K. ■: Mutationsstelle; ▒: Prolinreste;

Die Verschiebungsänderung war für <sup>1</sup>H- bzw. <sup>15</sup>N-Atome maximal 0,45 ppm bzw. 1,6 ppm. Alle Reste, deren chemische Verschiebungsänderungen über dem Niveau von 0,52 ppm (doppelte Standardabweichung) liegen, sind in der Bänderdarstellung von Abbildung 3.18 (A) orange gefärbt. In der Umgebung der D14K Mutation sind in naheliegender Weise lokale Verschiebungsänderungen zu beobachten. Des Weiteren induziert die Mutation in räumlich entfernten Bereichen signifikante chemische Verschiebungsänderungen. Diese sind im N-terminalen Bereich von  $\alpha_2$ , in  $\beta_3$ , und in den C-terminal gelegenen Sekundärstrukturelementen  $\alpha_4$ ,  $\beta_5$  und  $\alpha_5$  lokalisiert.

In Abb. 3.18 (B) ist eine C-terminale Aufsicht auf das CPK-Modell von CheY2 dargestellt. Signifikant beeinflusste und oberflächennahe Aminosäurereste sind orange gefärbt und bezeichnet. Auf der nicht gezeigten Proteinoberfläche wurden keine Effekte beobachtet. Im wesentlichen können zwei größere Bereiche identifiziert werden. Erstens das



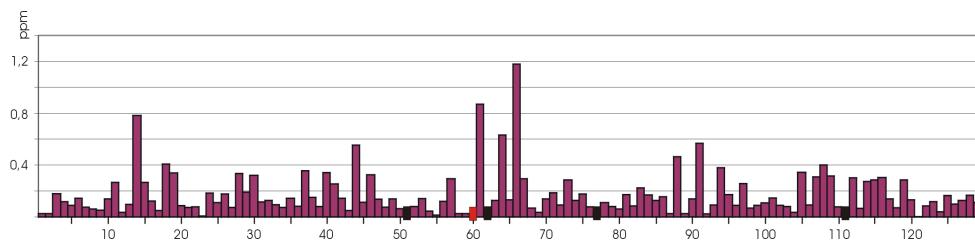
**Abb. 3.18:** (A) Bändermodell von CheY2. Reste mit signifikanten chemischen Verschiebungsunterschieden  $> 0,52$  ppm zwischen CheY2 und der Mutante CheY2-D14K sind orange gefärbt. (B) CPK-Darstellung von CheY2 in C-terminaler Aufsicht auf die Proteinoberfläche. Nahe der Proteinoberfläche liegende Aminosäurereste, die durch die Mutation Asp14Lys signifikant beeinflusst wurden, sind farblich hervorgehoben und gekennzeichnet.

aktive Zentrum, das die Mutationsstelle enthält (Gln15, Lys16, Ser18, Asn60, Lys63) und zweitens eine C-terminal gelegener zusammenhängender Bereich, der die Reste Gly91, Arg93, Ala94, Asn106, Leu108, Ala109, Gly126 und Ala127 enthält. Einige der letztgenannten Reste (Gly91, Arg93, Asn106, Gly126) wurden auch bei Aktivierung und/oder P2-Bindung signifikant beeinflusst. Aufgrund dieser Ergebnisse, in Kombination mit den Eigenschaften der Mutante CheY2-D14K (keine Phosphorylierung, verstärkte Motorbindung) ist eine der aktiven Form von CheY2 analoge, von der Phosphorylierung unabhängige, Konformation der C-terminal gelegenen Motorbindungsstelle anzunehmen. Für eine C-terminal gelegene Motorbindungsstelle spricht auch eine stark verringerte Affinität zum Motor durch die C-terminal in  $\beta$ -Strang fünf eingeführte Punktmutation Val107Trp.

### 3.6.3 CheY2-N60R

Die Mutation von Asn60Arg führt bei CheY2 zu einer permanent aktivierte Konformation [160]. CheY2-N60R kann durch CheA phosphoryliert werden. Der phosphatgebun-

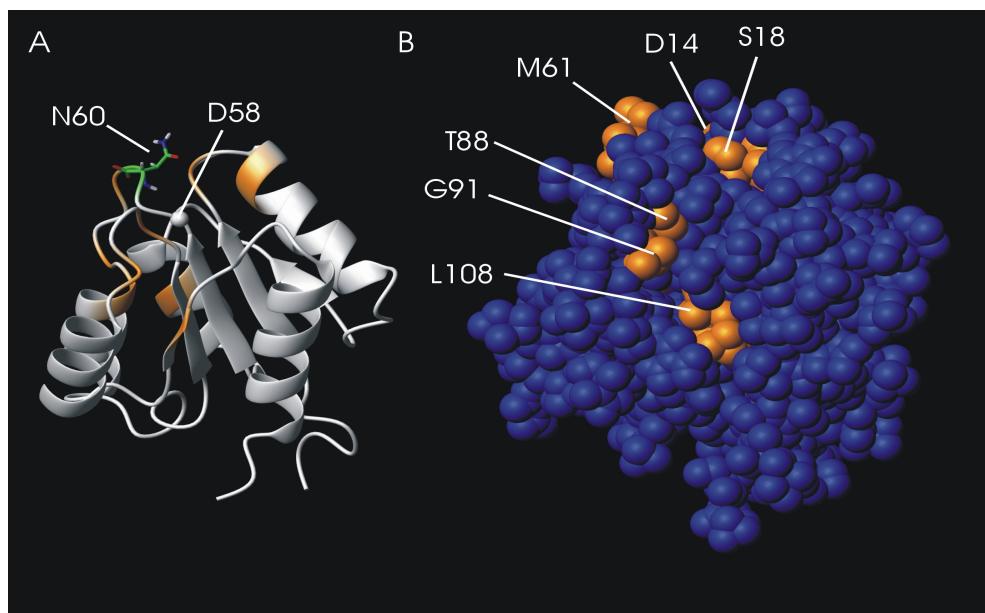
dene Zustand besitzt jedoch im Vergleich zu CheY2 eine deutlich erhöhte Halbwertszeit (pers. Mitteilung von Dr. B. Scharf), ist also stabiler. Asn 60 liegt im Bereich der Phosphat- (Asp 58) und Mg<sup>++</sup>-Bindungsstelle (Asp 13, 14). Aufgrund Phosphorylierungseigenschaften und des zu CheY2-D14K ähnlichen Phänotyps wurde diese Mutante mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Das HSQC-Spektrum von CheY2-N60R wurde durch Vergleich mit dem von CheY2 zugeordnet. Außer den Resten Asp58, Phe59, Leu87 und Ala89 wurden alle Signale identifiziert. Das fehlende Signal von Asn 60 ist ein Indiz für die Richtigkeit der Zuordnung. Eine Ergänzung der fehlenden Zuordnungen war nicht durch Vergleich mit dem HSQC-Spektrum von CheY2-BeF<sub>3</sub> möglich. Abbildung 3.19 zeigt die sequenzspezifischen chemischen Verschiebungsunterschiede  $\Delta ppm_g(^1H, ^{15}N)$  (2.10) zwischen den CheY2-N60R- und CheY2-HSQC-Spektren.



**Abb. 3.19:** Sequenzspezifische chemische Verschiebungsunterschiede  $\Delta ppm_g(^1H, ^{15}N)$  zwischen CheY2 und der Mutante CheY2- N60R. ■: Mutationsstelle; ■: Prolinreste;

Die maximalen chemischen Verschiebungsunterschiede für <sup>1</sup>H- bzw. <sup>15</sup>N-Atome lagen bei 0,43 ppm bzw. 1,9 ppm. Für Reste, deren chemische Verschiebungsunterschiede größer sind als die doppelte Standardabweichung 0,38 ppm sind durch die Mutation signifikant beeinflußt. Die Verteilung dieser Reste (Asp14, Ser18, Met44, Met61, Met64, Gly66, Thr88, Gly91, Leu108) über die Tertiärstruktur ist in der Bänderdarstellung von CheY2 in Abb. 3.20 (A) gegeben. Die signifikant beeinflußten Aminosäurereste sind dort orange gefärbt. Die beeinflußten Reste sind im Bereich der Mutation, des räumlich nahen aktiven Zentrums, in  $\alpha_4$  und  $\beta_5$  lokalisiert, jedoch weniger ausgeprägt als beim Mutantenprotein CheY2-D14K.

Das CPK-Modell von CheY2 in Abb. 3.20 (B) zeigt die C-terminale Aufsicht auf die Proteinoberfläche. Signifikant beeinflußte und oberflächennahe Reste sind orange gefärbt. Die Auswirkungen der Mutation auf die Gesamtstruktur ist mit Ausnahme der Mutationsstelle im Vergleich CheY2-D14K sehr gering. Zusammen mit den Eigenschaften von CheY2-N60R (phosphorylierbar, hohe Stabilität des phosphorylierten Zustands) kann angenommen werden, daß (i) die Mutation die Ursache der festeren Phosphatbindung ist und (ii) der für die Motorbindung erforderliche Konformatinswechsel durch Phosphorylierung und nicht alleine durch die Mutation induziert wird.



**Abb. 3.20:** (A) Bänderdarstellung von CheY2. Reste mit signifikanten chemischen Verschiebungsunterschieden  $> 0,38$  ppm im Vergleich zur Mutante CheY2-N60R sind orange gefärbt. (B) CPK-Darstellung von CheY2 in C-terminaler Ansicht auf die Proteinoberfläche. In Nähe der Proteinoberfläche gelegene Aminosäurereste, die durch die Mutation Asn60Arg signifikant beeinflußt wurden, sind hervorgehoben.

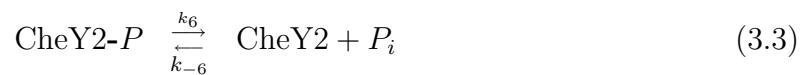
Insgesamt kann aus den Ergebnissen der Mutantenproteine CheY2-V107W, CheY2-D14K und CheY2-N60R gefolgert werden, daß (i) die Motorbindungsfläche in CheY2 C-terminal lokalisiert ist und (ii) Phosphorylierung und Motorbindung entkoppelt sind, d.h. Phosphorylierung ist keine notwendige Voraussetzung für die Bindung von CheY2 an den Motor.

### 3.7 Phosphorylierungskinetik

Zur Charakterisierung des Phosphatumsatzes von CheY2 wurden  $^{31}\text{P}$ -Messungen am System Protein - AcP durchgeführt. Wie in (2.4) und (2.8.7) beschrieben, kann die aus dem AcP-Umsatz in der NMR Probe berechnete Umsatzrate zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der Halbwertszeit, sowie zum Vergleich von Mutantenproteinen verwendet werden. Außerdem erlaubt das Verfahren die Untersuchung von Systemen mit mehreren Komponenten der Signaltransduktionskaskade. Einige der analog zu Gl. (3.3) bestimmten Anfangsgeschwindigkeiten abzüglich der Zerfallsrate von AcP in Abwesenheit von Protein (Gl. 3.4) sind in Tab. 3.4 zusammengefaßt.

**Tabelle 3.4:** Umsatzraten bzw. Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion (2.6) für CheY2 und Proteinen der Chemotaxis-Signalkette bei Verwendung von AcP als Phosphordonor

	Zusammensetzung				Anfangsgeschwindigkeit ( $\mu\text{M}/\text{s}$ )
	CheY2/ $\mu\text{M}$	CheY1/ $\mu\text{M}$	CheA/ $\mu\text{M}$	AcP/ $\text{mM}$	
1	0	0	0	10	$0,0361 \pm 0,0018$
2	5,16	0	0	10	$0,0731 \pm 0,0036$
3	25,8	0	0	10	$0,4555 \pm 0,0227$
4	25,8	0	0	2,5	$0,1120 \pm 0,0056$
5	25,8	0	0	3,5	$0,1680 \pm 0,0084$
6	25,8	0	0	5	$0,2650 \pm 0,0132$
7	25,8	0	0	10	$0,4296 \pm 0,0214$
8	25,8	0	0	30	$0,7025 \pm 0,0351$
9	25,8	0	0	40	$0,7768 \pm 0,0388$
10	25,8	0	0	60	$0,8745 \pm 0,0437$
11	25,8	0	0	80	$0,9756 \pm 0,0487$
12	25,8	24,6	0	10	$1,4343 \pm 0,0717$
13	12,9	24,6	0	10	$1,6000 \pm 0,0801$
14	0	24,6	0	10	$1,7109 \pm 0,0855$
15	25,8	0	15	10	$0,2960 \pm 0,0147$
16	19,8	0	23	10	$0,0860 \pm 0,0043$
17	10,3	0	1	10	$0,1511 \pm 0,0075$
18	25,8	24,6	30	10	$1,3368 \pm 0,0668$
19	0	18,9	23	10	$0,8696 \pm 0,0434$



**Phosphorylierung von CheY2:** Die experimentell bestimmten Anfangsgeschwindigkeiten sind im Kontext der jeweils verwendeten Probe und deren Zusammensetzung zu betrachten. Standardmäßig wurde in 20 mM Tris-Puffer bei pH 6,83 gemessen. Die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten ist im Rahmen der Fehlergrenzen mit unabhängigen Proben reproduzierbar. Für zwei unabhängig hergestellte Proteinproben ist

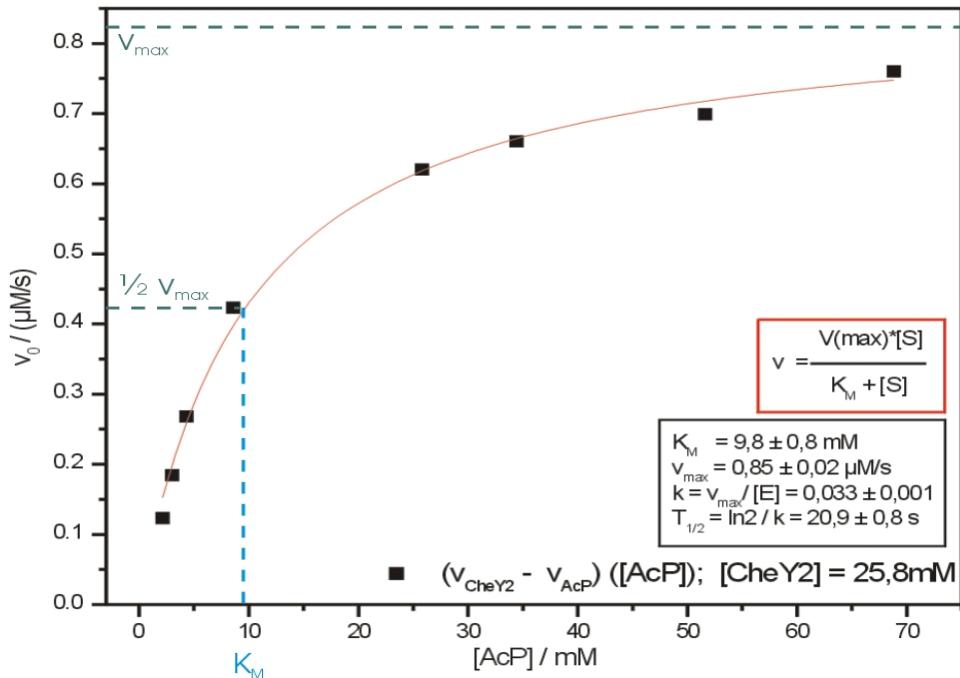
dies beispielhaft in den Zeilen drei und sieben zu sehen. Bei der Auswertung der Messdaten stellte sich heraus, daß bei CheY2 eine Proteinkonzentration von etwa  $30 \mu\text{M}$  ein guter Kompromiß zwischen erforderlicher Proteinmenge ( $0,21 \text{ mg}$  pro Messpunkt bei CheY2) und der Qualität der Meßdaten ist.

In den Zeilen 4 - 11 (Tab. 3.4) ist die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Substratkonzentration im Bereich von  $2,5 \text{ mM}$  bis  $80 \text{ mM}$  AcP gegeben. Aus der in Abb. 3.21 gezeigten Anpassung der substratabhängigen Anfangsgeschwindigkeiten an die hyperbolische Michaelis-Menten-Gleichung (2.11) wurde die Michaelis-Menten-Konstante und die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion zu  $K_M = (9,8 \pm 0,8) \text{ mM}$  und  $v_{max} = (0,85 \pm 0,02) \mu\text{M}/\text{s}$  bestimmt. Unter Verwendung von Gleichung (2.12) wurde hieraus die Geschwindigkeitskonstante  $k$  der Reaktionsgleichung (2.6) zu  $(0,033 \pm 0,001) 1/\text{s}$  ermittelt. Die Halbwertszeit des phosphatgebundenen Zustands ergibt sich dann mit  $v_{max}$  und  $[\text{CheY2}] = 30 \mu\text{M}$  aus Gleichung (2.13) und wurde für CheY2 zu  $T_{1/2} = (20,9 \pm 0,8) \text{ s}$  bestimmt.

**Phosphorylierung von CheY1:** Für den zweiten Responsregulator, CheY1, wurden ebenfalls Messungen der Umsatzraten für AcP bestimmt [161]. Aufgrund der im Vergleich zu CheX2 deutlich größeren Geschwindigkeitskonstante von CheY1 (Tab. 3.4, Zeile 14 vs. 3) wurde eine CheY1-Konzentration von etwa  $20 \mu\text{M}$  gewählt. Im Bereich von  $5 \text{ mM}$  bis  $120 \text{ mM}$  AcP konnte jedoch keine hyperbolische Gleichung an die Messdaten angepaßt werden. Die Daten konnten vielmehr durch eine lineare Gleichung erster Ordnung mit Steigungen im negativen Bereich angepaßt werden. Durch Berücksichtigung des fiktiven Messpunktes  $(0,0)$  stellte sich heraus, daß sich CheY1 bereits bei  $5 \text{ mM}$  AcP im gesättigten Bereich befindet. Eine Abschätzung der oberen Grenze der Halbwertszeit von CheY1-P ergab einen Wert von  $11 \text{ s}$ . Als obere Grenze für die Michaelis-Menten-Konstante konnte aus den Messdaten ein Wert von ca.  $2 \text{ mM}$  bestimmt werden.

**Phosphorylierungskinetiken von CheY2, CheA, CheY1** Die Erweiterung des Systems auf drei Chemotaxis-Proteine umfaßt die Responsregulatoren CheY1, CheY2 und die Kinase CheA. Im Vergleich zu CheY2, ist bei Anwesenheit von CheA und einem  $[\text{CheY2}]:[\text{CheA}]$  Verhältnis von ca. 1:1 die Umsatzrate um etwa 80 % reduziert (Tab. 3.4, Zeilen 7, 16). Für CheY1 ergibt sich unter den gleichen Bedingungen, in Anwesenheit der Kinase eine Reduktion der Umsatzrate um 50 %, verglichen mit dem Wert von CheY1. (Tab. 3.4, Zeilen 14, 19). Das ist ein Hinweis auf eine größere Affinität von CheY2 als von CheY1 zu CheA.

Da durch die Bindung von CheA an CheY2 bzw. CheY1 das aktive Zentrum abgeschirmt wird kann dieses nicht mehr durch AcP phosphoryliert werden. Dieser Fall könnte durch kompetitive Hemmung der Responsregulatoren beschrieben werden. Im



**Abb. 3.21:** Anpassung der gemessenen AcP-Umsatzraten (■) von CheY2 an die Michaelis-Menten-Gleichung (—). Maximale, halbmaximale Geschwindigkeit und die Michaelis-Menten-Konstante sind gekennzeichnet. Die bestimmten Größen sind in der Grafik angegeben.

Fall von CheY2 wird durch die Bindung von CheY2-P an CheA die Konzentration an freiem CheY2-P zusätzlich reduziert wodurch der Phosphatumsatz verringert wird. Zudem muß das durch Retroporphosphorylierung entstandene CheA-P zusätzlich als Substrat, mit einer von AcP verschiedenen Affinität zu CheY2 in Betracht gezogen werden. Die deutlich reduzierten Raten bei einem  $[\text{CheY2}] : [\text{CheA}]$  Verhältnis ca. 2 : 1 bzw. 1 : 1 (Tab. 3.4, Zeilen 15, 16) können also einerseits Ursache des Retroporphosphorylierungsmechanismus sein, andererseits auch durch eine größere Affinität von CheY2 und CheY2-P zu CheA als zu AcP bedingt sein. Da bei CheY1 der Phosphattransfer von CheY1 zu CheA im Vergleich zu CheY2 deutlich reduziert ist [99] kann die Reduktion der Umsatzraten nur durch kompetitive Hemmung durch CheA-Bindung erklärt werden. Dies zusammen mit den unterschiedlichen Michaelis-Menten-Konstanten würde den größeren Einfluß von CheA auf die Umsatzrate von CheY2 erklären.

Im Allgemeinen ist ein System mit drei Proteinen schwer zu charakterisieren. Dies ist einerseits durch die steigende Zahl der Freiheitsgrade und den Phosphattransfer von CheY2-P über CheA zu CheY1 bedingt. Andererseits ist die Bestimmung der Anfangs-

geschwindigkeiten bei hohen Enzymkonzentrationen sowie für kleine Donorkonzentrationen problematisch. Zudem sind erhebliche Proteinmengen zur exakten Charakterisierung des Systems bei Molekulargewichten von  $M_r(\text{CheY2}) \approx 14 \text{ kDa}$ ,  $M_r(\text{CheY1}) \approx 14 \text{ kDa}$  und  $M_r(\text{CheA}) \approx 81 \text{ kDa}$  erforderlich.

**CheY2 - Mutantenproteine** Durch die Bestimmung der Umsatzraten von CheY2-Mutantenproteinen ([160]) konnte überprüft werden, ob die Proteine phosphoryliert werden können, bzw. Phosphatumsatz zeigen. Bei allen Proteinen mit Ausnahme von CheY2-D58N konnte ein Phosphatumsatz beobachtet werden, d.h. die Proteine können durch AcP phosphoryliert werden. Die Mutation in der Phosphatbindungsstelle (Asp 58 → Asn) zeigt im Rahmen des Messfehlers so gut wie keinen Phosphatumsatz. Somit ist das Aspartat in Position 58 tatsächlich die Phosphorylierungsstelle. Des Weiteren sind keine weiteren Phosphorylierungsstellen zu erwarten.

# Kapitel 4

## Diskussion

Durch Automatisierung von Signalsuche und Signalklassifizierung wurde eine Grundlage für eine automatische Vorverarbeitung von n-dimensionalen NMR-Spektren geschaffen. Die exakte Bestimmung der dreidimensionalen Lösungsstrukturen von CheY2 ( $\text{RMSD} = 0,042 \text{ nm}$ ) und CheY2- $\text{BeF}_3$  ( $\text{RMSD} = 0,027 \text{ nm}$ ) war für die Aufklärung der Funktionsweise des Responsregulators entscheidend. Anhand der beiden Strukturen wurde der Aktivierungsmechanismus von CheY2 auf atomarer Ebene aufgeklärt. Durch Analyse der Wechselwirkungen der beiden Moleküle, CheY2 und CheY2- $\text{BeF}_3$  mit der CheY2-Bindungsdomäne (P2-Domäne) der Histidinkinase CheA wurden deren Bindungsflächen sowie die jeweils an der Bindung beteiligten Aminosäurereste identifiziert. Die Charakterisierung von vier CheY2-Mutantenproteinen mit veränderter Phosphorylierung und/oder Motorbindung lieferte neue Einblicke in die molekularen Zusammenhänge dieser beiden Prozesse.

### 4.1 Automatisierung der Spektrenbearbeitung

Die ständige Weiterentwicklung der NMR-spektroskopischen Techniken erfordert die Entwicklung entsprechender Programme und neuer Algorithmen zur weitgehend automatisierten Auswertung der Messdaten. Im Bereich der Spektrenauswertung ist oftmals manuelle und zeitaufwendige Vorgehensweisen unumgänglich. Eine schnelle und effiziente Datenbearbeitung kann nur durch Automatisierung möglichst vieler Einzelschritte erreicht werden.

Die Bearbeitungszeit für die entwickelte automatisierte Signalsuche und Signalklassifizierung eines 3D-Spektrums mit  $1024 \times 128 \times 256$  Datenpunkten lag bei ca. 15 min. Durch leistungsfähige Rechner mit ausreichend Arbeitsspeicher und Optimierung des Zugriffs auf die Datenpunkte ist eine Reduktion auf wenige Minuten durchaus möglich. Dies wäre auch wünschenswert, da bei wiederholter Anwendung der zeitliche Aufwand im angemessenen Rahmen bleiben sollte.

Das automatisch bestimmte untere Niveau zur Signalsuche ist für eine Signalklassifi-

zierung mittels Bayesscher Analyse entscheidend, da diese eine repräsentative Menge an Rauschsignalen benötigt. Liegt es zu hoch kann die Rauschklasse nicht statistisch angemessen erfaßt werden. Bei viel zu niedrigem Niveau ist die Zahl der zu berücksichtigenden Signale und damit der zeitliche Aufwand deutlich erhöht. Die Qualität der Signalklassifizierung hängt also entscheidend von der Lage dieses Niveaus ab. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Auswahl von Repräsentanten der verschiedenen Signalklassen. Für die Automatisierung dieses Prozesses wurden die typischen chemischen Verschiebungen der Aminosäuren (BMRB) verwendet. Stimmen diese Verschiebungswerte nicht mit denen des jeweilig betrachteten Spektrums überein, so sinkt die Trennschärfe der Klassifizierung. Dies ist möglicherweise auch der Grund weshalb die Kriterien Intensität und Signalform bei der automatischen Signalklassifizierung eine nicht ausreichende Trennschärfe hatten.

Die Automatisierung der Spektrenbe- und -verarbeitung inclusive Strukturbestimmung ist im Wesentlichen auf drei Bereiche verteilt. Dies sind die Vorverarbeitung der Spektren, die sequentielle Zuordnung und die NOESY-Zuordnung in Kombination mit Strukturbestimmung bei bekannter Zuordnung. Die Verknüpfung dieser drei Bereiche ist jedoch äußerst schwer, da die Erfordernisse der einen Methode die Unsicherheiten der anderen sind (die NOESY-Zuordnung ist abhängig von der sequentiellen Zuordnung, diese wiederum von der Qualität der Spektrenvorverarbeitung).

Die unterschiedlichen Bereiche der Automation der Strukturbestimmung sind unterschiedlich gewichtet. Für die NOESY-Zuordnung gibt es bereits gut funktionierende Routinen, während bisher für die automatische Spektrenvorverarbeitung und sequentielle Zuordnung kaum allgemein anwendbare Methoden existieren.

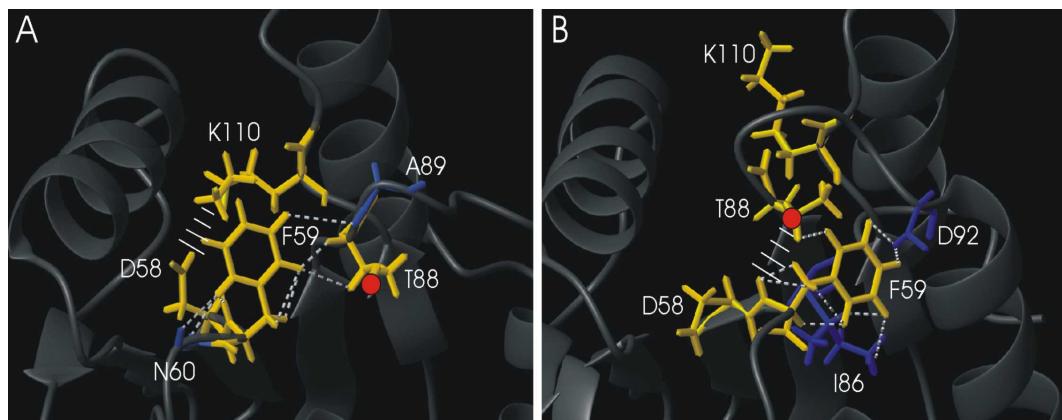
Das Ziel der automatischen Strukturbestimmung aus NMR-Daten stellt also auch in Zukunft eine große und interessante Herausforderung dar, insbesondere aufgrund der Entwicklungen der NMR-Techniken (z.B. Kryo-Probenköpfe, 900 MHz Spektrometer, nD-Experimente, Meßzeit).

## 4.2 Struktur und Aktivierung von CheY2

Die Kenntnis der Molekülstruktur von CheY2 und CheY2-P ist eine Voraussetzung für das Verständnis ihrer Funktionsweise. CheY2 besitzt die für Responsregulatoren typische offene  $(\alpha / \beta)_5$  Konformation. Das aktive Zentrum beinhaltet die streng konservierten Reste Asp13, Asp14 und Asp58. Die ersten beiden sind wesentlich an der Komplexierung von  $Mg^{++}$  beteiligt, Asp58 ist die Phosphorylierungsstelle des Proteins. Die Modifikation von CheY2 mit  $BeF_3^-$  führt zu einer stabilen phosphat-analogen Konformation. Dies geht eindeutig aus den nahezu identischen HSQC-Spektren von CheY2-P und CheY2- $BeF_3$  hervor. Zudem wurde bereits für andere Responsregulatoren gezeigt [122] [123] [159], daß im  $BeF_3$ -gebundenen Zustand die tetraedrale Geometrie und das Oberflächenpotential sehr ähnlich zur  $PO_4^{2-}$ -gebundenen Form sind. Da

CheY2-BeF<sub>3</sub> über mehrere Monate stabil ist, war es für die Charakterisierung der aktiven Konformation von CheY2 ideal geeignet.

Die gute Qualität der CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> Strukturen mit RMSD-Werten von 0,042 nm bzw. 0,027 nm für die Hauptkettenatome ermöglichen Aussagen über den Mechanismus der Aktivierung nach Phosphorylierung. Ein Teil der freien Energie der gemischten Anhydridbindung an Asp58 wird für lokale und weitreichende Konformationsänderungen im CheY2-P-Molekül verbraucht [162]. Hier war es interessant herauszufinden, welche Strukturbindungen im Nahbereich der Asp58 - Phosphat - Bindungsstelle zum Konformationswechsel in Regionen führen, die für die Wechselwirkung mit dem Flagellennmotor zuständig sind. Die größten Unterschiede zwischen beiden Strukturen, mit RMSD-Werten > 0,25 nm, wurden im aktiven Zentrum und bei den C-terminal gelegenen Sekundärstrukturelementen  $\alpha_4 - \beta_5 - \alpha_5$  beobachtet (3.4.8). Diese Unterschiede liegen deutlich über Variation innerhalb der einzelnen Strukturbündel. In Abbildung 4.1 sind vergleichend die Orientierungen der Reste Asp58, Phe59, Thr88 und Lys110 im CheY2- (A) und CheY2-BeF<sub>3</sub> - (B) Molekül gezeigt.



**Abb. 4.1:** Konformation der Reste Asp58, Phe59, Thr88 und Lys110 (gelb) im aktiven Zentrum bei (A) CheY2 und (B) CheY2-BeF<sub>3</sub>. Die Carboxylatgruppe von Thr88 ist als rote Kugel dargestellt, mögliche Wasserstoffbrücken durch parallele Linien. NOE-Kontakte, die die Position der Seitenkette von Phe59 fixieren sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Zusätzliche, in NOE-Kontakten zu Phe59 involvierte Reste sind blau unterlegt.

Aus den ermittelten Unterschieden zwischen aktiver und inaktiver Form des CheY2-Moleküls wurde die folgende Modellvorstellung für den Vorgang der Aktivierung entwickelt: In der Anordnung bei CheY2 wird eine Wasserstoffbrücke zwischen Lys110 und Asp58 begünstigt. Dadurch wird die Orientierung von Helix  $\alpha_5$  sowie das aktive Zentrum stabilisiert. Im CheY2-BeF-Molekül wird durch die Verschiebung von  $\alpha_5$

die Orientierung von Lys110 verändert, so daß diese Wasserstoffbrücke aufbricht. Die Seitenkette von Phe59 klappt in Richtung von  $\alpha_4$  um und liegt damit in Nähe der hydrophoben Seitenketten von Ile86, Leu95 und Val96. Eine Konformation, die hydrophobe stabilisierende Wechselwirkungen zwischen diesen Resten und dem aromatischen Ring von Phe59 begünstigt. Die Carboxylatgruppe von Thr88 wird in Richtung Asp58 verschoben und begünstigt in dieser Konstellation die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Hauptkettenamid von Asp58.

Diese im Zuge der CheY2-Aktivierung beobachteten Konformationsänderungen führen durch die koordinierte Verschiebung von Phe59, Thr88 und Lys110 zu einem weitreichenden Effekt (*long-range effect*). Die räumliche Verschiebung von Helix  $\alpha_5$  ist Ursache für die veränderte Wechselwirkung von Lys110 mit dem aktiven Zentrum. Die Verschiebung von  $\alpha_4$  wird durch Interaktion von Thr88 mit Asp58 und Umorientierung der Seitenkette von Phe59 in Richtung der hydrophoben Reste Ile86, Leu95 und Val96 verursacht.

Für das CheY-Molekül von *E.coli* wurden ebenfalls *long-range* Effekte postuliert. [122]. In diesem Fall wird das aktive Zentrum in der nicht-phosphorylierten Form durch den in  $\alpha_1$  gelegenen Rest Phe 14 „abgeschirmt“ [163] [164]. Bei Aktivierung wird die Wasserstoffbrücke zwischen Lys110 und Asp58 aufgebrochen und eine neue zwischen Thr88 und Asp58 gebildet. Laut M. McEvoy *et. al* [165] ist Thr 88 zentral am Schaltmechanismus bei CheY beteiligt. Die Umorientierung der Seitenkette von Thr88 ist mit einer solchen der Seitenkette von Tyr 106 verknüpft. Diese dreht sich aus einer lösungsmittelexponierten Lage zum Proteinkern hin. Dadurch wird die im Bereich von  $\alpha_4 - \beta_5 - \alpha_5$ , gelegene Seitenkette aus der Bindungsfläche für sowohl CheA als auch für den Motor (FliM) entfernt. Das erhöht die Affinität zur Motorbindungsstelle (FliM). Der Mechanismus zeichnet sich durch punktuell erhöhte Werte der chemischen Verschiebungsänderungen für die Reste D58, T88, Y106 und K110 aus [50]. Er ist durch entsprechende NMR- und Kristall-Strukturdaten belegt [122] und wird allgemein als Y-T-Kopplung bezeichnet.

Im CheY2-Molekül ist der Thr-Rest konserviert, nicht jedoch der aromatische Rest in  $\beta$ -Strang 5. Somit kann ein Y-T-Kopplungsmechanismus ausgeschlossen werden. Wird an der Tyr106-analogen Position 107 in *S. meliloti* ein aromatischer Rest eingefügt, so ist die Motorbindung schwächer [160]. Die NMR-Daten von CheY2-V107W weisen auf größere konformationelle Veränderungen hin. Die schwache Motorbindung wird hier aber nicht durch Fehlen der Phosphorylierung bedingt [160], vielmehr finden Strukturveränderungen statt, die im Bereich der Motorbindungsstelle ( $\alpha_4 - \beta_5 - \alpha_5$ ) lokalisiert sind.

Im Vergleich zum *E.coli*-CheY sind die chemischen Verschiebungsänderungen als Folge der Aktivierung bei CheY2 nicht punktuell auf einzelne Reste beschränkt, sondern über eine größere, zusammenhängende, C-terminal gelegene Region von CheY2 verteilt. Die Spezifität Proteinwechselwirkung von CheY2-P mit CheA oder dem Motor, wird daher nicht durch den Schaltmechanismus eines einzelnen Aminosäurerests erreicht, sondern

durch Veränderung größerer Oberflächenbereiche.

Diese verschiedenen Mechanismen könnten (i) durch unterschiedliche Spezifitäten für Protein-Protein-Interaktionen bedingt sein, da *E. coli*-CheY-P zusätzlich mit der Phosphatase CheZ wechselwirkt und (ii) durch Unterschiede in der Motorsteuerung verursacht sein. Bei *E. coli* folgt die Antwort des Motors bei Änderungen der CheY-P-Konzentration einer sigmoidalen Kinetik [166]. Dieses Verhalten ist als eine Art Domino-Effekt zu verstehen, der bei einer bestimmten Besetzungszahl der 35 FliM-Bindungsstellen zu einer Umkehr der Motorrotation führt. Da die Motorrotation bei *S. meliloti* erstens nur im Uhrzeigersinn erfolgt und zweitens durch Bindung von CheY2-P abgebremst wird ist eine graduelle Verlangsamung in Abhängigkeit Motorgebunden CheY2-P-Moleküle anzunehmen.

### 4.3 Wechselwirkung mit der P2-Domäne von CheA

Zusätzlich zur Interaktion mit dem Motor (FliM + Protein ?) bindet CheY2-P an die nicht aktive His-Autokinase zum Transfer des Phosphats. Diese Retro-Phosphorylierung ist als Mechanismus im sensorischen Signalweg neu und bedarf daher einer eingehenden Analyse. Aus diesem Grund wurden die Wechselwirkungen von CheY2 bzw. CheY2-BeF<sub>3</sub> mit der P2-Domäne von CheA mittels *chemical shift mapping* untersucht. Die CheY2-Bindedomäne von CheA (P2-Domäne) umfaßt die Reste 174 - 316 und wurde rekombinant exprimiert.

Bei der Titration von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> mit P2 wurden an unterschiedlichen Resten chemische Verschiebungsänderungen, relativer Intensitätsverlust und verschwindende Signale beobachtet. Für diese Beobachtungen gibt es mehrere Interpretationen: (i) Bei schnellem Austausch ist eine Intensitätsabnahme aufgrund erhöhter T<sub>2</sub>-Relaxation während des INEPT-Schrittes anzunehmen. Für indirekt beteiligte Reste sind keine signifikanten chemischen Verschiebungsänderungen zu erwarten. (ii) Ein signifikanter chemischer Verschiebungsunterschied, zusammen mit einer durch Austauschverbreiterung induzierten Intensitätsreduktion, spricht für eine Beteiligung der Amidgruppe an der Interaktion. (iii) Analoges gilt für Signale im langsamen Austausch, deren Intensitätsreduktion mit dem Auftreten eines neuen Signals verbunden ist. (v) Eine durch Protein-Protein-Wechselwirkung verursachte starke Austauschverbreiterung ist für Signale zu erwarten, die bereits bei kleinen Ligandenkonzentrationen verschwinden und keine signifikanten Verschiebungsunterschiede zeigen.

Bei CheY2 war der Großteil der Veränderungen im C-terminalen Bereich, innerhalb von  $\alpha_4$ ,  $\beta_5$  und  $\alpha_5$ , sowie im aktiven Zentrum des Proteins lokalisiert. Nahe der Proteinoberfläche gelegene, beeinflußte Reste sind in der C-terminalen Region zu finden

(Abb. 3.15). Dies lässt auf eine C-terminal gelegene CheA-Bindungsfläche im CheY2-Molekül schließen. Bei der Aktivierung von CheY2 wurden in ähnlichen Bereichen signifikante Unterschiede beobachtet. Zudem ist die Bindung von CheY2 an CheA-P direkt an die Aktivierung von CheY2 gekoppelt. Hieraus kann auf den Mechanismus der Wechselwirkung geschlossen werden. Die CheA-P-Bindung induziert im CheY2-Molekül einen Konformationswechsel, der die Phosphorylierung durch die P1-Domäne von CheA begünstigt. Dieser Konformationswechsel im Zuge der Bindung an CheA könnte für den Übergang von der inaktiven in die aktive Form von CheY2 entscheidend sein.

Bei der Wechselwirkung von CheY2-BeF<sub>3</sub> mit der P2-Domäne von CheA wurden ebenfalls signifikante Veränderungen im aktiven Zentrum, in Helix α<sub>1</sub> und in der C-terminalen Region α<sub>4</sub> - β<sub>5</sub> - α<sub>5</sub> beobachtet. Der Vergleich der bindenden Proteinoberflächen von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> zeigt aber deutliche Unterschiede in der Lokalisation dieser Bereiche. Fünf Reste werden sowohl bei CheY2 als auch bei CheY2-BeF<sub>3</sub> bei der Wechselwirkung signifikant beeinflusst.

Anhand der Daten kann ein Arbeitsmodell für die Wechselwirkung zwischen CheY2-BeF<sub>3</sub> und P2 beschrieben werden. Der Einfluß auf die räumlich von der Bindungsstelle entfernt gelegenen Bereiche α<sub>1</sub> und das aktive Zentrum wird durch *long-range* Effekte verursacht. Die Konformation des Proteins, insb. des aktiven Zentrums in der P2-gebundenen Form ist optimal für den Phosphattransfer von CheY2-P zurück zu CheA. Die unterschiedliche Lokalisation der Bindungsflächen von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> zur P2-Domäne spiegelt unterschiedliche, spezifische Bindungsmodi wieder.

Bei aus *E.coli*-CheY liegt die Bindestelle für die P2-Domäne auch im C-terminalen Bereich. Dies geht aus NMR-Titrationsexperimenten und Kristallstrukturanalysen hervor [165, 167–169]. Die bei CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> beteiligten Reste Gly91 und Glu122 sind bei CheY (*E. coli*) an der Bindung zur P2-Domäne beteiligt. Dies erklärt möglicherweise die Tatsache, daß *S. meliloti*-CheA-Kinase den Responsregulator CheY (*E. coli*) phosphorylieren kann (B. Scharf, pers. Mitteilung). Die Frage ob die unterschiedliche Phosphorylierung (Retrophosphorylierung) von CheY2 (*S. meliloti*) und CheY (*E. coli*) durch verschiedenartige Bindung an den Kinasen und/oder durch den Phosphattransfermechanismus verursacht wird, bleibt weiter offen.

#### 4.4 Mutantenproteine CheY2-D14K, CheY2-N60R und CheY2-V107W

Die *S. meliloti*-Mutanten CheY2-D14K und CheY2-N60R zeigen eine reduzierte Schwimmgeschwindigkeit und sind chemotaktisch nur schwach aktiv. Bei diesen als dauernd aktiv einzustufenden Phänotypen liegt daher eine verstärkte Bindung an den Flagellenmotor vor. Die Mutantenproteine in Kombination mit den Strukturen von CheY2 und

CheY2-BeF<sub>3</sub> ermöglichen Einsichten in den Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und Motorbindung.

CheY2-D14K kann nicht mehr durch CheA phosphoryliert werden [160]. CheY2-N60R hingegen ist phosphorylierbar und besitzt eine deutlich erhöhte Halbwertszeit (B. Scharf, pers. Mitteilung). Bei CheY2-D14K wurden signifikante Unterschiede in den chemischen Verschiebungen im Bereich des aktiven Zentrums, das nahe an der Mutationsstelle liegt, und in der C-terminalen Region des Proteins beobachtet. Ähnliche Bereiche werden auch bei der Aktivierung von CheY2 durch Berylliofluoridierung signifikant beeinflußt. Daher wird vermutet, daß die Konformation von CheY2-D14K der von CheY2-BeF<sub>3</sub> weitgehend entspricht. Ursache hierfür ist die Punktmutation, die einen Wechsel zurück in die inaktive Form verhindert. Zudem wird die Motorbindungsstelle von CheY2 im C-terminalen Bereich vermutet. Hierfür spricht u.a. die stark reduzierte Motorbindung einer C-terminal eingeführten Punktmutation Val107Trp.

Beim Mutantenprotein CheY2-N60R waren die signifikanten chemischen Verschiebungsänderungen im Wesentlichen auf den Bereich der Mutation beschränkt. Im C-terminalen Bereich, der Motorbindungsstelle wurden kaum Veränderungen beobachtet. Der Phänotyp von CheY2-N60R kann somit nicht durch eine mutationsbedingte Konformationsänderung erklärt werden. Vielmehr ist anzunehmen, daß die Mutation die Phosphatbindung stabilisiert. Die permanent aktive Konformation ist also primär nicht mutationsbedingt, sondern Ursache der Phosphatbindung in Analogie zur Aktivierung von CheY2.

Insgesamt konnte anhand der drei Mutantenproteine CheY2-D14K, CheY2-N60R und CheY2-V107W nachgewiesen werden, daß (i) die Motorbindungsstelle von CheY2 analog wie die P2-Bindungsstelle C-terminal lokalisiert ist und daß (ii) in CheY2 die Phosphorylierung abgekoppelt von der Motorbindung ist, d.h. die Phosphorylierung ist nur im Wildtypprotein eine notwendige Bedingung für die Bindung an den Motor. Dies trifft auch für *E. coli*-CheY zu, mit überlappenden C-terminalen Bindungsstellen für CheA und den Motor [170] und [171].

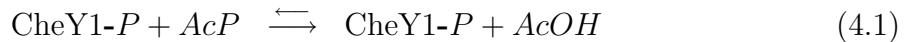
Entsprechende Mutanten von CheY (*E.coli*) und CheY2 (*S. meliloti*) zeigen ähnliches Verhalten. Die Mutantenproteine CheY-D13K und CheY-N59R bewirken einen dauernd aktiven Phänotyp [172] [173]. Die Phosphorylierbarkeit der Mutante CheY-D13K ist stark reduziert. Hier wird angenommen, daß die Punktmutation im aktiven Zentrum den Phosphattransfer durch die Kinase hemmt. Die Aktivierung erfolgt unabhängig von der Phosphorylierung durch Strukturveränderungen im C-terminalen Bereich, der Motorbindungsstelle [67] [174].

Die *E. coli* Mutante CheY-N59R ist im Vergleich zu nativem CheY mit AcP normal phosphorylierbar und besitzt die gleiche Autodephosphorylierungsrate. Jedoch kann CheY-N59R-P nicht effektiv durch die Phosphatase CheZ dephosphoryliert werden [173]. Dieser Vergleich zeigt, daß trotz der unterschiedlichen Zwei-Komponenten Systeme von *E.coli* und *S.meliloti* durchaus vergleichbare Mechanismen wirksam sind, soweit es die globalen Merkmale der Komponenten betrifft.

## 4.5 Phosphorylierungskinetik von CheY2

Die weitgehende Übereinstimmung mittels  $^{32}\text{P}$  [160] bzw. durch  $^{31}\text{P}$ -NMR (3.7) bestimmten Daten unterstreicht die Zuverlässigkeit der  $^{31}\text{P}$ -NMR Methode. Durch Bestimmung einzelner Phosphat-Umsatzraten im System Protein/AcP bei einigen CheY2 Mutanten (s. 3.7) konnte ermittelt werden, inwieweit die Phosphatbindung durch die Mutation gestört ist. Jedoch ließen die Einzelmessungen keine Aussage darüber zu, ob die Effekte durch veränderte Affinität zu AcP oder durch unterschiedliche Halbwertszeiten verursacht sind. Diese beiden Größen könnten bei ausreichenden Proteingehalten durch Variation der Substratkonzentration ermittelt werden. Dies wurde für CheY2 und CheY1 durchgeführt. Aus den an die Michaelis-Menten-Gleichung angepaßten Meßdaten wurde eine Geschwindigkeitskonstante  $k$  der Reaktionsgleichung (2.6) von  $0,033 \pm 0,001\,1/\text{s}$  ermittelt, entsprechend Halbwertszeit von  $T_{1/2} = 20,9 \pm 0,8\,\text{s}$ . Diese liegt doppelt so hoch wie die von Sourjik und Schmitt [99] beschriebene Halbwertszeit von ca. 10.5 s. Das kann auf unterschiedliche Pufferzusammensetzungen (pH 6,83 bzw. 7,9) und Messbedingungen beruhen [119]. Die Michaelis-Menten-Konstante für das System CheY2 - AcP wurde mit  $K_M = 9,8 \pm 0,8\,\text{mM}$  bestimmt.

Im Vergleich zu CheY2 war der Phosphatumsatz von CheY1 deutlich höher. Aus den Messdaten mit unterschiedlichen AcP Konzentrationen konnte keine Reaktionskinetik ermittelt werden. Es stellte sich heraus, daß die Reaktion 4.1



bei den verwendeten AcP-Mengen (10 mM bis  $> 120\,\text{mM}$ ) bereits im Sättigungsbe reich lag. Eine Abschätzung der Halbwertszeit des Zerfalls ergab den von Sourjik und Schmitt [99] genannten Wert von ca. 11 s.

In der chemotaxis Signalkette trägt der Zerfall von CheY2-P aufgrund der intrinsischen Phosphataseaktivität laufend zur Inaktivierung von CheY2-P bei. Die Halbwertszeit von CheY2-P ( $T_{1/2} = 20\,\text{s}$ ) ist für die zuverlässige Signaltransduktion um zwei Größenordnungen zu langsam. Die Signalprozesse erfolgen im Bereich von Millisekunden.

Die Beschleunigung des CheY2-P Zerfalls wird bei *S. meliloti* durch die aufwendige, aber höchst effiziente Retrophosphorylierung erreicht, bei dem die Phosphatgruppe von CheY2-P über CheA zu CheY1 übertragen wird. CheY1 fungiert als Phosphatabfluß, der selbst im Sekunden-Takt wieder unphosphoryliert zur Verfügung stehen muß. Auf Dauer reicht selbst ein 10-facher Überschuß nicht aus, um alles Phosphat aufzunehmen [99].

Daher erfordert die Sensitivität des chemotaktischen Systems weitere Mechanismen die CheY2-P effektiv dephosphorylieren. Ein möglicher beschleunigter Abbau durch andere Proteine, wie z.B. CheB von *S. meliloti*. CheB, die Methylesterase zur Demethylierung der Rezeptoren. CheB zerfällt vier mal schneller als CheY2-P und wird zudem durch

CheA phosphoryliert (B. Scharf, pers. Mitteilung). Ein Effektiver Phosphatabbau wäre durch Phosphattransfer von CheY2-P zu CheA und weiter zu CheB gegeben.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

- ◊ Die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie ist einerseits durch die Meßtechniken und -methoden, andererseits durch die Ver- und Bearbeitung der experimentellen Daten geprägt. Die manuelle Vorverarbeitung der Daten stellt einen sehr zeitaufwendigen Prozeß dar, der durch Automatisierung möglichst vieler Einzelschritte verkürzt werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Routinen zur Automation von Signalsuche und Signalklassifizierung in n-Dimensionalen NMR-Spektren entwickelt. Das Grundniveau für die automatische Signalsuche wurde aus der Verteilung der Amplituden der einzelnen Datenpunkte berechnet. Dieses konnte mittels eines iterativen Verfahrens, das speziell die Charakteristik der *peak-picking*-Routine berücksichtigt, weiter verfeinert werden. Für Signalklassifizierung auf Basis der Bayesschen Analyse ist eine statistisch signifikante Menge an Rauschsignalen erforderlich. Hierzu erwies sich das oben genannte Niveau als günstig, da bei der automatischen Signalsuche über diesem Niveau eine ausreichende Menge an Rauschsignalen vorhanden war. Bei der Bayesschen Analyse wurden die beiden Klassen Rauschsignal und wahres Signal verwendet. Analog zum 2D-Fall wurden die Signalwahrscheinlichkeiten zunächst aus den Verteilungsfunktionen der Eigenschaften Intensität und Signalform berechnet. Die Trennschärfe dieser beiden Merkmale erwies sich jedoch als nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zwei neue Merkmale berücksichtigt. Erstens die Existenz eines Diagonalsignals und zweitens die Anzahl der Kreuzsignale im jeweiligen Spinsystem. Hierdurch wurde die Trennschärfe der Bayesschen Analyse, vor allem bei NOESY-artigen 3D-Spektren, deutlich gesteigert. Insgesamt stellen die hier beschriebenen, automatisierten Routinen einen effektiven Weg zur Reduktion von NMR-Daten dar und liefern eine solide Basis für die weitere Datenverarbeitung wie z.B. Strukturbestimmung.
- ◊ In der sensorischen Signalkette von *Sinorhizobium meliloti* ist CheY2 (14 kDa) der dominante Responsregulator, der in seiner aktiven, phosphorylierten Form

(CheY2-P) die Rotation des Flagellenmotors steuert. CheY2 wird an Asp58 durch die Histidin-Autokinase CheA phosphoryliert. Ein ungewöhnlicher Rücktransfer des Phosphats von CheY2-P nach CheA sorgt für eine effiziente, schnelle (ms) Inaktivierung des Responsregulators. Von CheA wird der Phosphatrest auf den anderen Responsregulator übertragen, der als Phosphatabfluß fungiert. Mit Analysen der NMR-Lösungsstrukturen von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> (als stabiles Struktur-Analogon von CheY2-P) sollten Unterschiede zwischen den beiden Konformationen geklärt werden, die (i) zur Molekül-Aktivierung führen und die (ii) den Phosphattransfer ermöglichen. Es wurde zunächst nachgewiesen, daß BeF<sub>3</sub>-gebundenes CheY2 ein stabiles Analogon der aktiven, phosphorylierten Form darstellt. Aus diesem Grund wurde CheY2-BeF<sub>3</sub> zur Strukturbestimmung der aktiven Form, CheY2-P verwendet. Die Strukturen wurden mit 1655 bzw. 1660 nichtredundanten experimentellen Einschränkungen bestimmt. Die Strukturbündel der 16 energieärmsten Strukturen besitzen RMSD-Werte von 0,42 Å bzw. 0,27 Å. Beide Konformationen sind also sehr gut definiert, und besitzen die für Responsregulatorproteine typische globale Faltung in Form einer offenen ( $\alpha/\beta$ )<sub>5</sub>-Konformation. Durch Vergleiche beider Strukturen wurden die molekularen Mechanismen bei Aktivierung des Proteins aufgeklärt. Die Phosphatbindung an Asp58 verursacht größere Konformationsänderungen, die eine C-terminal gelegene Motorbindungsstelle aktivieren. Ferner ändert sich die Konformation des aktiven Zentrums: eine Wasserstoffbrücke zwischen Asp58 und Lys110 bricht auf. Dies ermöglicht eine räumliche Verschiebung von Helix  $\alpha_5$  und  $\beta$ -Strang  $\beta_5$ . Die Stabilisierung des aktiven Zentrums wird im phosphatgebundenen Zustand durch eine neue Wasserstoffbrücke zwischen Asp58 und Thr88 erreicht. Aus dem Umklappen der Seitenkette von Phe59 resultiert eine hydrophobe Interaktion mit den Resten Ile86, Leu95 und Val96. Hierdurch wird die räumliche Verschiebung von  $\alpha_4$  induziert. Diese innermolekularen Verschiebungen erklären die bei Aktivierung von CheY2 beobachteten Konformationsänderungen. Diese sind im Wesentlichen auf den C-terminalen Bereich von  $\alpha_4$  -  $\beta_5$  -  $\alpha_5$  konzentriert, der die Motorbindungsstelle enthält. Die Modulation der C-terminalen Oberfläche des Moleküls ist somit Ursache für die erhöhte Affinität von CheY2-P zum Flagellenmotor.

- ◊ Voraussetzung für Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Responsregulators CheY2 sind starke Wechselwirkungen von CheY2 und CheY2-P (CheY2-BeF<sub>3</sub> ) mit der Bindungsdomäne P2 von CheA. Für die folgenden Studien wurde daher das P2-Fragment rekombinant exprimiert und gereinigt. CheY2 bindet in der inaktiven und aktiven Konformation mit etwa gleicher Affinität an die Kinase CheA. Die jeweiligen Interaktionsflächen mit der P2-Domäne wurden in der C-terminalen Region  $\alpha_4$  -  $\beta_4$  -  $\alpha_5$  lokalisiert. Aufgrund der unterschiedlichen Konformationen von CheY2 und CheY2-BeF<sub>3</sub> liegen diese Bindungsdomänen in unterschiedlichen

Oberflächenbereichen. In beiden Konformationen sind die Reste Gly91, Arg93, Val107, T113 und Glu122 entscheidend an der Bindung beteiligt. Die übrigen Interaktionen gehen von unterschiedlichen Resten aus: bei CheY2 sind dies Gln28, Ala89, Thr88, Leu87, Asn106, Asn 105 und Phe125, bei CheY2-BeF<sub>3</sub> sind es Asp24, Q33, Gln90, Ala100, Lys110, Ile114, Lys116 und Phe112. Für die Bindung von CheY2 bzw. CheY2-BeF<sub>3</sub> an P2 sind folglich überlappende, aber insgesamt distinktive Wechselwirkungen verantwortlich. Bei Bindung von P2 an CheY2 bzw. CheY2-P nehmen letztere daher Konformationen an, die den Phosphattransfer von bzw. nach CheA begünstigen. Die Bindung von CheY2 bzw. CheY2-P an CheA kann hier (i) durch unterschiedliche Bindungsmodi, d.h. verschiedene Interaktionsflächen und (ii) bei gleichen Wechselwirkungsflächen in CheA durch eine identische, CheA-gebundene Konformation von CheY2 bzw. CheY2-P erklärt werden. Die mittels NMR-Spektroskopie gezeigte effektive Wechselwirkung von inaktiven und aktiven CheY2 ist zudem eine notwendige Voraussetzung für den ungewöhnlichen Retrophosphorylierungs-Mechanismus im Zwei-Komponenten-System von *S. meliloti*.

- ◊ Durch NMR-spektroskopische Charakterisierung der Mutantenproteine CheY2-D14K und CheY2-N60R wurden die Zusammenhänge zwischen Aktivierung und Motorbindung erhellt. Beide Mutationen führen bei *S. meliloti* zu einer dauernd aktivierte Form des Proteins. Die Veränderungen in CheY2-D14K korrelieren sehr gut mit denen bei der Aktivierung von CheY2. Daraus, daß CheY2-D14K nicht phosphoryliert werden kann, ist zu schließen, daß die Konformation der Mutante die aktiven Form von CheY2 simuliert. Die Veränderungen sind auf den C-terminalen Bereich der Elemente von  $\alpha_4$ ,  $\beta_5$  und  $\alpha_5$  konzentriert.

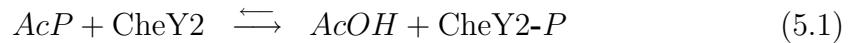
Die Mutante CheY2-N60R kann im Gegensatz zu CheY2-D14K phosphoryliert werden, sie zerfällt jedoch mit einer deutlich erhöhten Halbwertszeit. Gemessene Veränderungen im Molekül sind lokal auf die Mutationsstelle beschränkt. Die globale Konformation der Motorbindungsstelle ist nicht verändert. Die Punktmutation ist somit die Ursache einer festeren Phosphatbindung ohne größere Effekte auf die globale Struktur. Der Konformationswechsel zur aktiven Form muß daher analog zu CheY2 durch (eine stabilere) Phosphorylierung an Asp58 ausgelöst werden.

Eine weitere Punktmutation Val107Trp führt zu einem schnell schwimmenden Phänotyp, dessen Flagellenmotor nicht mehr reguliert ist. Der Austausch hemmt die Bindung von CheY2-V107W an den Motor. Trotz dieser reduzierte Affinität zum Motor ist sie phosphorylierbar.

Insgesamt folgt aus den Daten, daß Motorbindungsstelle C-terminal lokalisiert ist. Dieser Bereich von CheY2 und schließt das Sekundärstrukturelement  $\beta_4$  und benachbarte Bereiche der Helices  $\alpha_4$  und  $\alpha_5$  ein. Insbesondere zeigen die Ergebnis-

se, daß in CheY2 Phosphorylierung und Motorbindung voneinander abgekoppelte Prozesse sind, d.h. daß die Bindung von Phosphat nicht notwendig für die Bindung an den Motor ist.

- ◊ Die Phosphorylierungskinetiken von CheY2 wurden gemäß



mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie gemessen. Im Rahmen einer Michaelis-Menten Reaktionskinetik wurden die Halbwertszeiten von CheY2-P und CheY1-P mit 21 s bzw. 11 s bestimmt. Die  $K_M$ -Werte von CheY2 und CheY1 in Bezug auf AcP wurden mit 9,8 mM bzw. 2 mM bestimmt. Das Mutantenprotein CheY2-D58N wird nicht phosphoryliert. Dadurch konnte demonstriert werden, daß Asp 58 die einzige Phosphorylierungsstelle in CheY2-Molekül ist. Durch Messungen im ternären System CheY2 - CheA - CheY1 wurde zudem gezeigt, daß CheY2-P effektiv an CheA bindet, CheY1 aber nicht. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, daß die aktive Form CheY2-P zum Retrotransfer des Phosphats an CheA binden muß. Es bleibt zu klären, wie CheY2-P *in vivo* den „Spagat“ zwischen FliM (Motorsteuerung) und CheA (Retrophosphorylierung) schafft, weil diese beiden Liganden in verschiedenen, membrangebundenen Komplexen lokalisiert sind.

**Abkürzungen:**

[.]	Konzentration
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AcP	<u>Acetylphosphat</u>
AcOH	Essigsäure
Amp	<u>Ampicillin</u>
ATP	<u>Adenosin-Tri-Phosphat</u>
BeF	<u>Beryllium-Fluorid</u>
BSA	<u>Bovine serum albumin</u>
c[...]	Konzentration
CNS	<u>Crystallography and NMR system</u>
COSY	<u>Correlation spectroscopy</u>
CPK	Kalottenmodell nach <u>Corey</u> , <u>Pauling</u> , <u>Koltun</u>
CSI	<u>Chemical shift index</u>
CW	<u>clockwise</u>
CCW	<u>counter clockwise</u>
d	Abstand
$d_{XY}(i,j)$	Abstand von Atom X zu Y in Aminosäure an Position i bzw. j
DA	<u>Dalton</u>
$\Delta ppm_g(A, B)$	gewichtete chemische Verschiebung der Kerne A und B
DSS	4,4-Dimethyl-4-Silapenthal-Sulfonsäure
DTT	<u>Dithiothreitol</u>
DYANA	<u>Dynamics algorithms for NMR applications</u>
ECL	<u>Enhanced Chemoluminescence</u>
EDTA	<u>Ethylenediamintetraacetat</u>
FID	<u>Free induction decay</u>
FPLC	<u>Fast performance liquid chromatography</u>
FRET	<u>Fluoreszenz Energie Transfer</u>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HSQC	<u>Heteronuclear single quantum coherence</u>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
IMPACT	<u>Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag</u>
INEPT	<u>insensitive nuclei enhanced by polarisation transfer</u>

k	Geschwindigkeitskonstante einer chem. Reaktion
K	<u>K</u> elvin
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
LB	<u>L</u> uria <u>b</u> roth
M	<u>M</u> olar
MCP	<u>M</u> ethyl accepting <u>c</u> hemotaxis <u>p</u> rotein
MWCO	<u>M</u> olecular <u>w</u> eight <u>c</u> utoff
NMR	<u>N</u> nuclear <u>m</u> agnetic <u>resonance</u>
NOESY	<u>N</u> uclear <u>o</u> verhauser <u>e</u> nhancement <u>s</u> pectroscopy
P2	CheY2-Bindedomäne von CheA
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid <u>g</u> ele <u>e</u> lektrophorese
$P_i$	anorganisches Phosphat
ppm	<u>p</u> arts <u>p</u> er <u>m</u> illion
RMSD	<u>r</u> oot <u>m</u> ean <u>s</u> quare <u>d</u> eviation
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat
T	Temperatur in Kelvin
$T_{\frac{1}{2}}$	Halbwertszeit
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
TF	<u>t</u> arget <u>f</u> unction: Energiemaß für berechnete Strukturen in DYANA
TPPI	<u>T</u> ime <u>p</u> roportional <u>p</u> hase <u>i</u> ncrementation
TOCSY	<u>T</u> otal <u>correlation <u>spectroscopy</u></u>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	<u>T</u> ransverse <u>relaxation <u>optimized <u>spectroscopy</u></u></u>
$v_{max}$	Maximalgeschwindigkeit

# Literaturverzeichnis

- [1] Nirenberg, M., Protein synthesis and the RNA code. *Harvey Lect.*, 59:155–185, 1965.
- [2] Watson, J. D., Crick, F. H. C. A Structure of Desoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171:737–738, 1953.
- [3] Watson, J. D., Crick, F. H. C. Genetical Implications of the Structure of Desoxyribonucleic Acid. *Nature*, 171:962–967, 1953.
- [4] Montelione, G. T. & Anderson, S. Structural genomics: keystone for a Human Proteome Project. *Nat. Struct. Biol.*, 6:11–12, 1999.
- [5] Williamson, M. P., Havel, T. F., & Wüthrich, K. Solution conformation and proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by proton NMR and distance geometry. *J. Mol. Biol.*, 182:295–315, 1985.
- [6] Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. NMR structure determination of proteins and protein complexes larger than 20kDa. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:564–570, 1998.
- [7] Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., & Wüthrich, K. Attenuated  $T_2$  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. USA*, 94:12366–12371, 1997.
- [8] Riek, R., Wider, G., Pervushin, K., & Wüthrich, K. Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution nmr with very large molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:4918–4923, 1999.
- [9] Griswold, I. J. and Dahlquist, F. W. Bigger is better: megadalton protein NMR in solution. *Nat. Struct. Biol.*, 9(8):567–568, 2002.
- [10] Mueller, L., and Montelione, G. T. Structural Genomics in Pharmaceutical Design. *J. Struct. Funct. Genomics.*, 2:67–70, 2002.
- [11] Kennedy, M. A., Montelione, G. T. Role for NMR in Structural Genomics. *J. Struct. Funct. Genomics*, in press:<http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/publications/pdfs/kennedy.pdf>, 2002.
- [12] Lin, Y., & Wagner, G. Efficient side-chain and backbone assignment in large proteins; application to tGCN5. *J. Biomol. NMR*, 15:227–239, 1999.

- [13] Ikura, M., Kay, L.E. & Bax, A. A novel approach for sequential assignment of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  spectra of larger proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin. *Biochemistry*, 29:4659–4667, 1990.
- [14] Kay, L.E., Ikura, M., Tschudin, R. & Bax, A. Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *J. Magn. Res.*, 89:496–514, 1990.
- [15] Montelione, G.T. & Wagner, G. Triple resonance experiments for establishing conformation-independent sequential NMR assignments in isotope-enriched polypeptides. *J. Magn. Res.*, 87:183–188, 1990.
- [16] Grzesiek, S. & Bax, A. Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J. Biomol. NMR*, 3:185–204, 1993.
- [17] Kay, L.E., Xu, G.Y., Singer, A.U., Muhandiram, D.R., & Forman-Kay, J.D. A gradient enhanced HCCH-TOCSY experiment for recording side-chain  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  correlations in  $\text{H}_2\text{O}$  samples of proteins. *J. Magn. Reson. (B)*, 101:333–337, 1993.
- [18] Günthert, P. Structure calculation of biological macromolecules from NMR data. *Q. Rev. Biophys.*, 31:145–237, 1998.
- [19] Wider, G., Macura, S., Anil Kumar Ernst, R. R., and Wüthrich, K. Homonuclear Two-Dimensional  $^1\text{H}$  NMR of proteins. experimental procedures. *J. Mag. Res.*, 56:207–234, 1984.
- [20] Solomon, I. Relaxation processes in a system of two spins. *Phys. Rev.*, 99:559–565, 1955.
- [21] Wider, G., Technical aspects of NMR spectroscopy with biological macromolecules and studies of hydration in solution. *Progr. NMR Spectrosc.*, 32:193–275, 1998.
- [22] Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons, 1986. ISBN 0-471-82893-9.
- [23] Luginbühl, P., Szyperski, T. and Wüthrich, K. 1995. *J. Magn. Res.(B)*, 109:229–233, Statistical basis for the use of  $^{13}\text{C}^\alpha$  chemical shifts in protein structure determination.
- [24] Spera, S., and Bax, A. Empirical correlation between protein backbone conformation and  $\text{c}^\alpha$  and  $\text{c}^\beta$   $^{13}\text{C}$  nuclear-magnetic-resonance chemical-shifts. *J. Am Chem. Soc.*, 113:5490–5492, 1991.
- [25] Wishart, D.S., Sykes, B.D. The 13-C Chemical Shift Index: A Simple Method for the Identification of Protein Secondary Structure using 13-C Chemical Shift Data. *J. Biomol. NMR.*, (submitted).
- [26] Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR*, 13:289–302, 1999.
- [27] Cordier, G. & Grzesiek, S. Direct observation of hydrogen bonds in proteins by interresidue  $^{3h}\text{j}_{\text{NC}'}$  scalar couplings. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:1601–1602, 1999.

- [28] Cornilescu, G., Hu, J.-S., Bax, A. Identification of the hydrogen bonding network in a protein by scalar coupling. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:2949–2950, 1999.
- [29] Tjandra, N., Omichinski, J., Gronenborn, A., Clore, G., & Bax, A. Use of dipolar  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  couplings in the structure determination of magnetically oriented macromolecules in solution. *Nat. Struct. Biol.*, 4:732–738, 1997.
- [30] Ottiger, M., & Bax, A. Bicelle-based liquid crystals for NMR-measurement of dipolar couplings at acidic and basic pH values. *J. Biomol. NMR*, 13:187–191, 1999.
- [31] Günthert, P., Braun, W. and Wüthrich, K. Efficient computation of three-dimensional structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J. Mol. Biol.*, 217:517–530, 1991.
- [32] Braun, W. Distance geometry and related methods for protein structure determination from NMR data. *Q. Rev. Biophys.*, 19:115–157, 1987.
- [33] Havel, T. F. An evaluation of computational strategies for use in the determination of protein structure from distance constraints obtained by nuclear magnetic resonance. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 56:43–78, 1991.
- [34] Brünger, A. T. and Nilges, M. Computational challenges for macromolecular structure determination by X-Ray and solution NMR spectroscopy. *Q. Rev. Biophys.*, 26:49–125, 1993.
- [35] Güntert, P., Mumenthaler, C., & Wüthrich, K. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.*, 273:283–298, 1997.
- [36] Nilges, M., Clore, G. M., and Gronenborn, A. M. Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing calculations. *FEBS Lett.*, 229:317–324, 1998.
- [37] Montelione, G. T. Zheng, D., Huang, Y. J., Gunsalus, K. C., Szyperski, T. Protein NMR spectroscopy in structural genomics. *Nat. Struct. Biol.*, 7:Suppl. 982–985, 2000.
- [38] Monleon, D., Colson, K., Moseley, H. N. B., Anklin, C., Oswald, R., Szyperski, T. A., and Montelione, G. T. Rapid analysis of protein backbone resonance assignments using cryogenic probes, a distributed Linux-based computing architecture, and an integrated set of spectral analysis tools. *J. Struct. Funct. Genomics*, 2(2):93–101, 2002.
- [39] Szyperski, T., Yeh, D. C., Sukumaran, D. K., Moseley, H. N. B., and Montelione, G. T. Reduced-dimensionality NMR spectroscopy for high-throughput protein resonance assignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(12):8009–8014, 2002.
- [40] Koradi, R. Billeter, M. Engeli, M. Güntert, P. and Wüthrich, K. Automated Peak Picking and Peak Integration in Macromolecular NMR Spectra Using AUTOPSY. *J. Mag. Res.*, 135:288–297, 1998.

- [41] Ganslmeier, B., Institut für Biophysik und physikalische Biochemie, Universität Regensburg. *AUREMOL*. <http://www.biologie.uni-regensburg.de/Biophysik/Kalbitzer/software/>.
- [42] Zimmerman, D. E., Kulikowski, C. A., Feng, W., Tashiro, M., Chien, C.-Y., Rios, C. B., Moy, F. J., Powers, R., and Montelione, G. T. Automated analysis of protein NMR assignments using methods from artificial intelligence. *J. Mol. Biol.*, 269:592–610, 1997.
- [43] Moseley, H. N., Monleon, D., and Montelione, G. T. Automatic determination of protein backbone resonance assignments from triple resonance nuclear magnetic resonance data. *Methods Enzymol.*, 339:91–108, 2001.
- [44] Moseley, H. N., Montelione, G. T. Automated analysis of NMR assignments and structures for proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9(5):635–642, 1999.
- [45] Oezguen, N., Adamian, L., Rajarathnam, K., and Braun, W. Automated assignment and 3D structure calculations using combinations of 2D homonuclear and 3D heteronuclear NOESY spectra. *J. Biomol. NMR*, 22:249–263, 2002.
- [46] Linge, J. P., O'Donoghue, S. I., and Nilges, M. Automated analysis of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA. *Methods Enzymol.*, 339:71–90, 2001.
- [47] AUTOASSIGN. <http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/>.
- [48] Gronwald, W., Kirchhäuser, R., Görler, A., Kremer, W., Ganslmeier, B., Neidig, K.P., & Kalbitzer, H.R. RFAC, a program for automated NMR R-factor estimation. *J. Biomol. NMR*, 17:137–151, 2000.
- [49] Gronwald, W., Moussa, S., Elsner, R., Jung, A., Ganslmeier, B., Trenner, J., Kremer, W., Neidig, K. P., Kalbitzer, H. R. Automated assignment of NOESY NMR spectra using a knowledge based method (KNOWNOE). *J. Biomol. NMR*, 23(4):271–284, 2002.
- [50] BioMagResBank (BMRB). <http://www.bmrb.wisc.edu>.
- [51] ProteinDataBank (PDB). <http://www.rcsb.org/pdb/>.
- [52] Bertone, P., Kluger, Y., Lan, N., Zheng, D., Christendat, D., Yee, A., Edwards, A. M., Arrowsmith, C. H., Montelione, G. T., and Gerstein, M. SPINE: an integrated tracking database and data mining approach for identifying feasible targets in high-throughput structural proteomics. *Nucleic Acids Res.*, 29(19):2884–2898, 2001.
- [53] Berg, H. C. Chemotaxis in bacteria. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 4:119–136, 1975.
- [54] Parkinson, J. S. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*, 73:857–871, 1993.
- [55] Stock, J. B., Surette, M.. Chemotaxis, in *escherichia coli* and *salmonella typhimorum*. *Cellular Mol. Biol.*, pages 1103–1129, 1996.
- [56] Silverman, M., and Simon, M. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature*, 249:73–74, 1974.

- [57] Macnab, R. M. Genetics, structure and assembly of the bacterial flagellum. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 46:77–106, 1990.
- [58] Berg, H. C., & Brown, D. A. Chemotaxis in *escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature*, 239:500–504, 1972.
- [59] Parkinson, J. S. and Kofoid, E. C. Communication modules in bacterial signalling proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 26:71–112, 1992.
- [60] Rudolph, J., Tolliday, N., Schmitt, C., Schuster, S. C., and Oesterhelt, D. Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *EMBO J.*, 14:4249–4257, 1995.
- [61] Ota, I. M., and Varshavsky, A. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science*, 262:566–570, 1993.
- [62] Kim, C., Jackson, M., Lux, R., & Khan, S. Determinants of Chemotactic Signal Amplification in *escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 307:119–135, 2001.
- [63] Surette, M. G., Levit, M. Liu, Y., Lukat, G., Ninfa, E. G., Ninfa, A., and Stock, J. B. Dimerization Is Required for the Activity of the Protein Histidine Kinase CheA That Mediates Signal Transduction in Bacterial Chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, 271(2):939–945, 1996.
- [64] Bren, A., & Eisenbach, M., How Signals Are Heard during Bacterial Chemotaxis: Protein-Protein Interactions in Sensory Signal Propagation. *J. Bacteriol.*, 182:6865–6873, 2000.
- [65] Duke, T. A. J., Novère, N. L., Bray, D. Conformational Spread in a Ring of Proteins: Stochastic Approach to Allostery. *J. Mol. Biol.*, 308:541–553, 2001.
- [66] Falke, J. J., Bass, R. B., Butler, S. L., Chervitz, S. A. and Danielson, M. A. The two-component signalling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases and adaptation enzymes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 13:457–512, 1997.
- [67] Djordjevic, S., and Stock, A. M. Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: components of a dynamic signalling system. *J. Struct. Biol.*, 124:189–200, 1998.
- [68] Scharf, B. E., Fahrner, K. A., and Berg, H. C. CheZ Has No Effect on Flagellar Motors Activated by CheY<sup>13DK106YW</sup>. *J. Bacteriol.*, 180(19):5123–5128, 1998.
- [69] Silversmith, R. E., and Bourret, R. B., Throwing the switch in bacterial chemotaxis. *Trends Microbiol.*, 7:16–21, 1999.
- [70] Stock, J. Levit, M. Hair brains in bacterial chemotaxis. *Curr. Biology*, 10:11–14, 2000.
- [71] Stock, J. B., Surette, M. G., Levit, M., and Park, P. Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanisms of catalysis. *American Society for Microbiology*, In Hoch, J. A. and Silhavy, T. J. (ed.), Two-Component Signal Transduction:25–52, 1995.

- [72] Hess, J. F., Bourret, R. B. and Simon, M. I. Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature*, 336:139–143, 1998.
- [73] Drake, S. K., Bourret, R. B., Luck, L. A. Simon, M. I. and Flake, J. J. Activation of the phosphosignaling protein CheY. *J. Biol. Chem.*, 268:13081–13088, 1993.
- [74] Lowry, D. F., Roth, A. F., Rupert, P. B., Dahlquist, F. W., Moy, F. J., Domaille, P. J., and Matsumura, P. Signal transduction in Chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, 269:26358–26362, 1994.
- [75] Stewart, R. C. Kinetic Characterization of Phosphotransfer between CheA and CheY in the Bacterial Chemotaxis Signal Transduction Pathway. *Biochemistry*, 36:2030–2040, 1997.
- [76] Bren, A., Welch, M., Blat, Y., and Eisenbach, M. Signal termination in bacterial chemotaxis: CheZ mediates dephosphorylation of free rather than switch-bound CheY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:10090–10093, 1996.
- [77] Da Re, S.S., Deville-Bonne, D., Tolstykh, T., Vron, M., Stock, J.B. Kinetics of CheY phosphorylation by small molecular phosphodonor. *FEBS Lett.*, 457(3):323–326, 1999.
- [78] Segall, J. E. Block, S. M. & Berg, H. C. Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(23):8987–8991, 1986.
- [79] Barkai, N., Alon, U., Leibner, S. Robust amplification in adaptive signal transduction networks. *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. IV*:1–7, 2001.
- [80] Sourjik, V., & Berg, H. C., Binding of the *escherichia coli* response regulator cheY to its target measured *in vivo* by fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:123–127, 2002.
- [81] Duke, T. A. J., and Bray, D. Heightened sensitivity of a lattice of membrane receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:10104–10108, 1999.
- [82] Levin, M. D., Shimizu, T. S., and Bray, D. Binding and Diffusion of CheR Molecules Within a Cluster of Membrane Receptors. *Biophys. J.*, 82:1809–1817, 2002.
- [83] Sanders, D. A., Gillece-Castro, B. L., Stock, A. M., Burlingame, A. L., and Koshland, Jr., D. E. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J. Biol. Chem.*, 264:21770–21778, 1989.
- [84] Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M., and Stock, J. B. Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, 266:8348–8354, 1991.
- [85] Bren, A., and Eisenbach, M. The N-terminus of the flagellar switch protein FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator CheY. *J. Mol. Biol.*, 278:507–514, 1998.

- [86] Zhu, X., Rebello, J., Matsumura, P., Volz, K. Crystal structures of the CheY mutants Y106W and T87I/Y106W. *J. Biol. Chem.*, 272:5000–5006, 1997.
- [87] Appleby, J. L. and Bourret, R. B. Proposed signal transduction role for conserved CheY residue Thr87 a member of the response regulator active-site quintet. *J. Bacteriol.*, 180:3563–3569, 1998.
- [88] Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S.-I. and Eisenbach, M. Effects of phosphorylation, Mg<sup>2+</sup>, and conformation of the chemotaxis protein CheY on its binding to the flagellar switch protein FliM. *Biochemistry*, 33:10470–10476, 1994.
- [89] Li, J., Swanson, R. V., Simon, M.I. Weis, R. M. The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase chea. *Biochemistry*, 34(15):14626–14636, 1995.
- [90] Hess, J. F., Oosawa, K., Kaplan, N., and Simon, M. I. Phosphorylation site of three proteins in the signalling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell*, 53:79–87, 1998.
- [91] Schmitt, R. Sinorhizobial chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm. *Microbiology*, 148:627–631, 2002.
- [92] Greck, M., Platzer, J., Sourjik, V., Schmitt, R. Analysis of the chemotaxis operon in *rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.*, 15(6):989–1000, 1995.
- [93] Sourjik, V., Schmitt, R. Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.*, 22(3):427–436, 1996.
- [94] Stock, A. M., Martinez-Hackert, E., Rasmussen, B. F., West, A. H., Stock, J. B., Ringe, D., and Petsko, G. A. Structure of the mg 2+ bound form of chey and mechanism of phosphoryl transfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry*, 32:13375–13380, 1993.
- [95] Platzer, J., Sterr, W., Hausmann, M., and Schmitt, R. Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotary speed variation in *rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 179(20):6391–6399, 1997.
- [96] Scharf, B., Schuster-Wolff-Bühring, H., Rachel, R., and Schmitt, R... Mutational analysis of the *rhizobium lupini* H13-3 and *rhizobium meliloti* flagellin genes: Importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J. Bacteriol.*, 183:5334–5342, 2001.
- [97] Schmitt, R., Bamberger, I., Acker, G., und Mayer, F. Feinstrukturanalyse der komplexen Geißeln von *rhizobium lupini* H13-3. *Arch. Microbiol.*, 100:145–162, 1974.
- [98] Trachtenberg, S., DeRosier, D. J., Aizawa, S. J., and Macnab, R. M. Pairwise perturbation of flagellin subunits. The structural basis for the difference between plain and complex flagellar filaments. *J. Mol. Biol.*, 195:569–576, 1986.
- [99] Sourjik, V., and Schmitt, R. Phosphotransfer between CheA, CheY1, and CheY2 in the Chemotaxis Signal Transduction Chain of *Rhizobium meliloti*. *Biochemistry*, 37:2327–2335, 1998.

- [100] Eggenhofer, E. Molekulare Charakterisierung von zwei essentiellen Komponenten der Motorfunktion bei *rhizobium meliloti*. *Diplomarbeit*, 2001.
- [101] Bast Eckhard. *Mikrobiologische Methoden*. Spektrum Akadeher Verlag, 1999. ISBN 3-8274-0786-9.
- [102] Gassen H.G., Schrimpf G. *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, 1999. ISBN 3-8274-0798-2.
- [103] Lottspeich F., Zorbas H. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, 1998. ISBN 3-8274-0041-4.
- [104] H. Rehm. *Der Experimentator: Proteinbiochemie*. Gustav Fischer Verlag, 1997. ISBN 3-437-25750-1.
- [105] Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer III, A.G., Skelton, N.J. *Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice*. Academic Press, 1996. ISBN 0-12-164490-1.
- [106] Frank J.M. van de Ven. *Multidimensional NMR in Liquids. Basic Principles and Experimental Methods*. VCH, 1995. ISBN 1-56081-665-1.
- [107] Ferentz, A.E. and Wagner, G. NMR spectroscopy: a multifaceted approach to macromolecular structure. *Q. Rev. Biophys.*, 33(1):29–65, 2000.
- [108] Sattler, M., Schleucher, J. and Griesinger, C. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog. NMR Spectrosc.*, 34:93–158, 1999.
- [109] Neuhaus, D., Williamson, M.P. *The Nuclear Overhauser Effekt in Structural and Conformational Analysis*. Wiley-VCH, 2000. ISBN 0-471-24675-1.
- [110] Croasmun, W.R., Carlson, R.M.K., Two-Dimensional NMR Spectroscopy. VCH, 1994. ISBN 1-56081-664-3.
- [111] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259):680–685, 1970.
- [112] Laemmli, U. K., Favre, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packing events. *J. Mol. Biol.*, 80(4):575–599, 1973.
- [113] Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H., and Xu, M.-Q. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*, 192:277–281, 1997.
- [114] Chong, S., Montello, G.E., Zhang, A., Cantor, E.J., Liao, W., Xu, M -Q, Benner, J. Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucl. Acids Res.*, 26:5109–5115, 1998.

- [115] Evans, T.C., Benner, J., Xu, M -Q. Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Science*, 7:2256–2264, 1998.
- [116] New England BioLabs. *IMPACT<sup>TM</sup>- CN Protein Purification System Now Featuring Fusion to C- or N- Terminus of the Target Protein - Instruction manual*. <http://www.neb.com>.
- [117] McMearry, W.R., Stock, J.B. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J. Biol. Chem.*, 269(50):31567–31572, 1994.
- [118] Lukat, G.S., McCleary, W.R., Stock, A.M., Stock, J.B. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(2):718–722, 1992.
- [119] Silversmith, R.E., Appleby, J.L., Bourret, R.B. Catalytic mechanism of phosphorylation and dephosphorylation of CheY: kinetic characterization of imidazole phosphates as phosphodonorers and the role of acid catalysis. *Biochemistry*, 36(48):14965–14974, 1997.
- [120] Martin, R.B. Ternary hydroxide complexes in neutral solutions of Al<sup>3+</sup> and F<sup>-</sup>. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 155(3):1194–1200, 1988.
- [121] Goldstein, G. Equilibrium Distribution of Metal-Fluoride Complexes. *Analyt. Chem.*, 36(1):243–244, 1964.
- [122] Cho, H.S. Lee, S.-Y., Yan, D., Pan, X., Parkinson, J.S., Kustu, S., Wemmer, D.E., and Pelton, J.G. NMR Structure of Activated CheY. *J. Mol. Biol.*, 297:543–551, 2000.
- [123] Yan, D., Cho, H.S. Hastings, C.A., Igo, M.M., Lee, S.-Y., Pelton, J.G. Steward, V., Wemmer, D.E., Kustu, S., Beryllofluoride mimics phosphorylation of NtrC and other bacterial response regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(26):14789–14794, 1999.
- [124] Wishart, D.S., Bigam, C.G. Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E. Markley, J.L., and Sykes, B.D. 1h, 13C and 15N Chemical Shift Referencing in Biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR*, 6:135–140, 1995.
- [125] Maurer, T., and Kalbitzer, H.R. Indirect Referencing of 31P and 19F NMR Spectra. *J. Magn. Reson. B*, 113:177–178, 1996.
- [126] Amman, C., Meier, P. and Merbach, A.E. *J. Magn. Reson.*, 46:319–321, 1982.
- [127] Bruker Analytik GmbH, Karlsruhe.
- [128] Marion, D., and Wüthrich, K. Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy COSY for measurements of 1H-1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113(3):967–974, 1983.
- [129] Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S.J., Sørensen, O.W., & Griesinger, C. A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J. Biomol. NMR*, 4:301–306, 1994.

- [130] Neidig, K.P., Geyer, M., Görler, A., Antz, C., Saffrich, R., Beneicke, W. & Kalbitzer, H.R. AURELIA, a program for computer-aided analysis of multidimensional spectra. *J. Biomol. NMR*, 6:255–270, 1995.
- [131] Dubs, A., Wagner, G. & Wüthrich, K. Individual assignments of amide proton resonances in proton NMR spectrum of the basic pancreatic trypsin inhibitor. *Biochim. biophys. Acta*, 577:177–194, 1979.
- [132] Wagner, G. & Wüthrich, K. Sequential resonance assignments in protein  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectra. Basic pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.*, 155:347–366, 1982.
- [133] Grzesiek, S. Dobeli, H., Gentz, R., Garotta, G., Labhardt, A. M., Bax, A.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-gamma. *Biochemistry*, 31(55):8180–8190, 1992.
- [134] Stonehouse, J., Clowes, R.T., Shaw, G.L. Keeler, J. & Laue, E.D. *J. Biomol. NMR*, 5:226–232, 1995.
- [135] Muhandiram, D.R. & Kay, L.E. *J. Magn. Reson. B*, 103:203–216, 1994.
- [136] Schleucher, J. Schwendinger, M. Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S. J., Sorensen, O. W., Griesinger, C. A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J. Biomol. NMR*, 4(2):301–306, 1994.
- [137] Carlomagno, T., Maurer, M., Sattler, M., Schwendinger, M.G., Glaser, S.J., & Griesinger, C. PLUSH TACSY: Homonuclear planar TACSY with two-band selective shaped pulses applied toCalpha, C' transfer and Cbeta, Caromatic correlations. *J. Biomol. NMR*, 8:161–170, 1996.
- [138] Hubbard, J.A., MacLachlan, L.K., Johnson, P., Findlow, S.C., Ladds, J.C., Lewis, C.J., Carter, P.S., Jones, J.J. & Fosberry, A.P. A Method for Identification of Inhibitors of the Phosphorylation Reactions of Bacterial Response Regulator Proteins Using  $^{31}\text{P}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Biochem.*, 299:31–36, 2001.
- [139] Voet, D., Voet, J.G. *Biochemie*. VCH, 1994. ISBN 3-527-29249-7.
- [140] Wishart, D.S., Sykes, B.D., Richards, F.M. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.*, 222(2):311–333, 1991.
- [141] Wishart, D.S., Sykes, B.D., Richards, F.M. The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 31(6):1647–1651, 1992.
- [142] Wishart, D.S., Bigam, C.G., Holm, A. Hodges, R.S. Sykes, B.D.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR*, 5(1):67–81, 1995.

- [143] Wishart, D.S., Sykes, B.D., Richards, F.M. Simple techniques for the quantification of protein secondary structure by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *FEBS*, 293(1-2):72–80, 1991.
- [144] Wishart, D.S., Sykes, B.D. Chemical shift as a tool for structure determination. *Methods Enzymol.*, 239:363–392, 1994.
- [145] Evans, Jeremy .N.S. *Biomolecular NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, 1996. ISBN 0-19-854766-8.
- [146] Keepers, J.W. & James, T.L. A theoretical study of distance determinations from NMR. two-dimensional nuclear Overhauser effect spectra. *J. Magn. Res.*, 57:404–412, 1984.
- [147] James, T.L. Relaxation matrix analysis of twodimensional nuclear Overhauser effect spectra. *Curr. Opinion Struct. Biol.*, 1:1042–1053, 1991.
- [148] Zhou, L. Dyson, H.J. and Wright P.E. A NOESY HSQC simulation program, SPIRIT. *J. Biomol. NMR*, 11:17–29, 1998.
- [149] Görler, A. & Kalbitzer, H.R. RELAX: a flexible program for the back calculation of NOE-SY spectra based on complete-relaxation-matrix formalism. *J. Magn. Reson.*, 124:177–188, 1997.
- [150] Brunger, A.T. Adams, P.D. Clore, C.M. Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S. Kuszewski, J. Nilges, N. Pannu, N.S. Read, R.J. Rice, L.M. Simonson, T. and Warren, G.L. Crytstallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.*, D54:905–921, 1998.
- [151] Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics*, 14:51–55, 1996.
- [152] Williamson, M. P., Havel, T. F. & Wüthrich, K. Solution conformation of proteinase inhibitor IIa from bull seminal plasma by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.*, 182:295–315, 1985.
- [153] Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., and Sasisekharan, V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *J. Mol. Biol.*, 7:95–99, 1963.
- [154] Ramachandran, G.N., and Sasisekharan, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. *Adv. Protein Chem.*, 23:283–437, 1968.
- [155] Venkatachalam, C.M. and Ramachandran, G.N. Conformation of Polypeptide Chains. *Ann. Rev. Biochim.*, 38:45–93, 1969.
- [156] Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., & Thornton, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26:283–291, 1993.
- [157] Kabsch, W., Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22(12):2577–2637, 1983.

- [158] Antz, C. Neidig, K. and Kalbitzer, H. R. A general Bayesian method for an automated signal class recognition in 2D NMR spectra combined with a multivariate discriminant analysis. *J. Biomol. NMR*, 5:287–296, 1995.
- [159] Lee, S.Y., Cho, H.S., Pelton, J.G., Yan, D., Berry, E.A., and Wemmer, D.E. Crystal Structure of Activated CheY Comparison with other activated receiver Domains. *J. Biol. Chem.*, 276(19):16425–16431, 2001.
- [160] Fuchs, K. Konstruktion und Funktion von CheY2-Mutanten des Bodenbakteriums *Sinorhizobium meliloti*. *Diplomarbeit*, 2002.
- [161] Klinger, M. *Diplomarbeit*, 2002-2003.
- [162] Stock, A. M., Robinson, V. L., Goudreau, P. N. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 68:183–215, 2000.
- [163] Bellsolell, L., Prieto, J., Serrano, L. and Coll, M. Magnesium binding to the bacterial chemotaxis protein CheY results in large conformational changes involving its functional surface. *J. Mol. Biol.*, 238:489–495, 1994.
- [164] Volz, K. and Matsumura, P. Crystal structure of *Escherichia coli* CheY refined at 1.7-åresolution. *J. Biol. Chem.*, 266:15511–15519, 1991.
- [165] McEvoy, M.M., Hausrath, A.C., Randolph, G.B., Remington, S.J. and Dahlquist, F.W. Two binding modes reveal flexibility in kinase/response regulator interactions in the bacterial chemotaxis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:7333–7338, 1998.
- [166] Scharf, B. E., Fahrner, K. A., Turner, L., and Berg, H. C. Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:201–206, 1998.
- [167] Gouet, P., Chinardet, N., Welch, M., Guillet, V., Birck, C., Mourey, L. and Samama, J. P. Further insights into the mechanism of function of the response regulator CheY from crystallographic studies of the CheY-CheA<sub>124–257</sub> complex. *Acta Crystallogr.*, 57(Pt 1):44–51, 2001.
- [168] Welch, M., Chindaret, N., Mourey, L. Birck, C., Samama, J.P. Structure of the CheY-binding domain of histidine kinase CheA in complex with CheY. *Nat. Struct. Biol.*, 5(1):25–29, 1998.
- [169] Mourey, L. Re, D. S., Pedelacq, J. D., Tolstykh, T., Faurie, C., Guillet, V., Stock, J. B. and Samama, J.P. Crystal Structure of the CheA Histidine Phosphotransfer Domain that Mediates Response Regulator Phosphorylation in Bacterial Chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, 276(33):31074–31082, 2001.
- [170] McEvoy, M. M., Bren, A., Eisenbach, M. and Dahlquist, F. W. Identification of the Bindng Interfaces on CheY for Two of its Targets, the Phosphatase CheZ and the Flagellar Switch Protein FliM. *J. Mol. Biol.*, 289:1423–1433, 1999.

- [171] Zhu, X., Volz, K., and Matsumura, P. The CheZ-binding Surface of CheY Overlaps the CheA- and FliM-binding Surfaces. *J. Biol. Chem.*, 272(38):23758–23764, 1997.
- [172] Bourret, R. B., Hess, J. F., and Simon M. I. Conserved aspartate residues and phosphorylation in signal transduction by the chemotaxis protein CheY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:41–45, 1990.
- [173] Silversmith, R. E., Smith, J. G., Guanga, G. P., Les, J. T., and Bourret, R. B. Alteration of a nonconserved active site residue in the chemotaxis response regulator CheY affects phosphorylation and interaction with CheZ. *J. Biol. Chem.*, 276(21):18478–18484, 2001.
- [174] Jiang, M., Bourret, R. B., Simon, M. I. and Volz, K. Uncoupled Phosphorylation and Activation in Bacterial Chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, 272(18):11850–11855, 1997.

## Anhang A: Chemische Verschiebungen von CheY2

Met 1		CG	36,069	CG	25,460	CA	58,888
HB2	1,934	CA	58,597	CD	29,226	HN	9,031
HB3	1,934	HN	8,36	CB	33,389	Val 12	
HA	4,306	Lys 6		HA	4,790	HG1*	0,546
Ser 2		HG2	1,233	CE	41,724	HG2*	0,546
C	174,082	HG3	1,233	CA	56,207	N	123,968
HB2	3,97	HB2	1,93	Val 9		C	174,420
HB3	3,97	HB3	1,93	HG2*	0,649	HB	2,137
HA	4,50	N	116,902	HG1*	0,695	CG2	20,792
CA	59,391	C	175,981	HB	1,918	CG1	20,997
CB	63,458	CG	25,525	N	125,253	CB	32,009
Leu 3		CD	28,600	C	172,710	HA	4,772
HD1*	0,511	HE2	3,020	CG2	22,908	CA	59,990
HD2*	0,511	HE3	3,202	CG1	23,181	HN	8,581
HB2	1,48	CB	33,385	CB	34,412	Asp 13	
HB3	1,48	HA	4,240	HA	5,126	N	123,326
N	120,757	CE	44,036	CA	60,441	C	175,119
C	177,704	CA	56,087	HN	9,023	HB3	2,34
CD1	23,361	HN	7,591	Leu 10		HB2	2,683
CD2	23,361	Ile 7		HG2*	0,468	HA	4,55
CG	27,388	HG2*	0,783	HD1*	0,574	CB	42,732
HA	4,04	HB	1,94	HG	1,101	CA	54,764
CB	44,300	N	120,757	HB2	1,659	HN	8,040
CA	55,636	CG2	17,871	HB3	1,659	Asp 14	
HN	7,69	C	175,116	N	131,034	N	125,895
Ala 4		CG1	26,510	C	174,255	C	175,875
N	120,757	HA	3,984	CD2	23,863	HB2	2,845
C	178,224	CB	38,115	CG	27,138	HB3	2,845
CB	22,515	CA	60,349	CD1	27,957	HA	4,80
HB1	3,257	HN	7,147	CB	43,881	CB	41,200
HB2	3,257	Lys 8		HA	5,14	CA	55,462
HB3	3,257	HG3	1,382	CA	52,159	HN	9,323
HA	4,266	HB2	1,39	HN	9,28	Gln 15	
CA	55,717	HB3	1,39	Ile 11		N	121,399
HN	7,986	HG2	1,529	HG2*	0,737	C	175,639
Glu 5		HD2	1,630	HG12	1,145	HB2	2,20
N	112,406	HD3	1,630	HG13	1,145	HB3	2,219
C	177,015	HN	11,046	HB	1,646	CB	29,254
HB2	2,13	N	131,677	N	122,041	HA	4,520
HB3	2,13	C	176,502	C	176,842	CA	54,126
CB	29,406	HE2	2,890	CB	40,212	HN	9,07
HA	3,99	HE3	2,890	HA	5,044	Val 16	

HG1*	1,045	HG	1,745	CA	47,642	N	120,757
HG2*	1,045	HB2	1,91	HN	8,354	C	178,107
N	126,538	N	119,472	Asp 24		CB	28,321
C	177,018	C	179,434	N	121,399	HA	4,122
HB	2,14	CD1	25,590	C	178,409	CA	59,110
HA	3,462	CD2	25,590	HB3	2,785	HN	8,081
CB	31,672	CG	27,064	HB2	2,819	Leu 29	
CA	66,593	HA	4,15	HA	4,416	HD1*	0,802
HN	8,62	CB	41,417	CB	41,037	HD2*	0,802
Thr 17		CA	57,864	CA	57,512	HG	1,262
HG2*	1,350	HN	8,36	HN	8,27	N	116,902
N	111,764	Leu 21		Ala 25		C	175,637
C	177,014	HG	1,673	HB1	1,618	HB2	2,26
CG2	21,748	N	119,472	HB2	1,618	HB3	2,314
HB	3,884	C	176,693	HB3	1,618	CD1	22,452
HA	4,239	HB2	2,273	N	122,041	CD2	22,452
CA	66,079	HB3	2,273	C	179,427	CG	25,616
CB	68,122	CD1	27,775	CB	21,009	HA	4,32
HN	8,258	CD2	27,775	HA	4,144	CB	42,672
Ser 18		CG	33,578	CA	55,179	CA	54,961
N	114,333	HA	4,31	HN	7,972	HN	7,652
C	176,844	CB	41,226	Leu 26		Gly 30	
HB3	3,147	CA	57,869	HD1*	0,571	N	103,413
HB2	3,99	HN	7,591	HD2*	0,571	C	174,464
HA	4,313	Leu 22		HB3	1,141	HA2	3,529
CB	45,048	HD1*	0,736	N	114,975	HA1	4,18
HG	5,072	HD2*	0,736	C	180,044	CA	44,264
CA	62,026	HG	1,553	HB2	2,02	HN	7,590
HN	7,043	HB2	1,741	HA	4,10	Phe 31	
Arg 19		HB3	1,741	CB	40,862	N	117,545
HD2	0,882	N	120,757	CA	57,678	C	175,309
HD3	0,882	C	178,226	HN	8,354	HB2	2,669
HB2	1,946	CD1	24,853	Gln 27		HB3	2,716
HB3	1,946	CD2	24,853	N	120,114	CB	38,460
N	123,968	CG	26,651	C	179,068	HA	4,226
C	179,262	HA	4,10	HB2	2,14	CA	59,164
HA	3,939	CB	41,274	HB3	2,14	HD1	6,91
CB	31,158	CA	57,864	CB	33,372	HD2	6,91
CA	60,495	HN	7,88	HA	4,117	HZ	6,97
HN	8,128	Gly 23		CA	59,763	HE1	7,65
Leu 20		N	105,983	HN	8,396	HE2	7,65
HD1*	1,368	C	175,649	Gln 28		HN	7,88
HD2*	1,368	HA2	3,530	HB2	1,850	Lys 32	
HB3	1,63	HA1	3,993	HB3	1,850	HG3	1,443

HG2	1,550	HN	7,754	CB	42,789	Met 44	
HD2	1,709	Thr 35		CA	53,983	HB3 1,891	
HD3	1,709	HG2*	1,208	HN	7,191	N 121,399	
HB3	1,747	N	127,823	Gly 40		C 177,718	
HB2	1,973	C	171,644	N	104,055	HB2 2,260	
N	118,187	CG2	24,068	C	174,273	HG2 2,423	
C	176,479	HB	3,789	HA2	3,686	HG3 2,423	
HE3	2,245	HA	4,526	HA1	3,967	CB 31,388	
CG	24,938	CA	61,331	CA	48,479	CG 32,315	
CD	28,632	CB	68,703	HN	7,883	HA 4,31	
HE2	3,146	HN	9,554	Glu 41		CA 57,230	
CB	36,049	Ala 36		N	123,326	HN 8,30	
CE	39,172	HB1	1,25	C	179,262	Lys 45	
HA	4,67	HB2	1,25	HB2	2,056	HG2 1,044	
CA	56,202	HB3	1,25	HB3	2,056	HG3 1,044	
HN	8,245	N	127,823	HG2	2,191	HD2 1,617	
Gln 33		C	175,477	HG3	2,191	HD3 1,617	
NE2	112,149	CB	22,053	CB	29,768	HB2 1,919	
N	122,041	HA	5,41	HA	4,09	HB3 1,919	
C	172,905	CA	50,129	CA	59,810	N 120,114	
CD	180,250	HN	8,723	HN	8,444	C 179,962	
HB2	2,137	Ala 37		Gln 42		CG 24,911	
HB3	2,137	HB1	1,250	NE2	114,290	CD 29,236	
HG2	2,310	HB2	1,250	N	121,399	CB 32,153	
HG3	2,310	HB3	1,250	C	179,167	HA 4,03	
CB	28,869	N	122,041	CD	180,996	CE 41,729	
CG	34,034	C	175,978	HB2	2,108	CA 59,715	
HA	4,622	CB	22,931	HB3	2,108	HN 7,985	
CA	55,445	HA	4,567	HG2	2,440	Ile 46	
HE22	6,952	CA	50,094	HG3	2,440	HD1* 0,771	
HE21	7,692	HN	9,033	CB	28,686	HG2* 1,228	
HN	8,804	Gly 38		CG	32,944	HG12 1,365	
Ile 34		N	104,055	HA	4,018	HG13 1,365	
HG2*	0,750	C	172,877	CA	58,519	HB 1,809	
HG12	1,354	HA2	3,622	HE22	6,921	N 118,187	
HG13	1,354	HA1	4,560	HE21	7,716	C 177,528	
HB	1,62	CA	44,824	HN	9,256	CG2 19,264	
N	123,326	HN	8,362	Gly 43		CG1 28,799	
C	175,656	Asp 39		N	102,771	HA 3,789	
CG2	18,950	N	109,836	C	173,390	CB 38,066	
CG1	27,080	C	176,325	HA2	3,529	CA 65,058	
CB	41,287	HB3	2,997	HA1	4,00	HN 7,863	
HA	5,09	HB2	3,338	CA	47,328	Met 47	
CA	59,705	HA	4,894	HN	8,253	HG2 1,695	

HG3	1,695	CA	50,420	HB3	1,632	Phe 59	
N	115,618	HD22	6,920	N	119,472	C 175,673	
C	176,333	HD21	7,711	C	172,351	HB3 3,09	
HB3	2,041	HN	8,55	CD1	25,808	HB2 3,40	
HB2	2,314	Pro 51		CD2	25,808	CB 39,153	
CB	30,846	HB3	1,946	CG	28,400	HA 4,90	
CG	33,763	C	176,498	CB	44,794	CA 59,344	
HA	4,19	HG2	2,004	HA	5,318	HD1 7,22	
CA	56,744	HG3	2,004	CA	53,153	HD2 7,22	
HN	7,94	HB2	2,25	HN	8,041	HZ 7,29	
Ala 48		CG	27,462	Val 55		HE1 7,34	
HB1	1,435	HD3	3,804	HG2*	0,355	HE2 7,34	
HB2	1,435	CB	32,050	HG1*	0,952	Asn 60	
HB3	1,435	HD2	4,074	HB	1,48	N 119,309	
N	115,618	HA	4,553	N	126,538	HB2 2,225	
C	179,086	CD	50,139	C	174,085	HB3 2,225	
CB	21,503	CA	65,106	CG1	21,952	HA 3,612	
HA	3,919	His 52		CG2	21,952	CB 38,059	
CA	54,161	N	122,041	CB	33,449	CA 54,575	
HN	8,130	C	173,217	HA	4,977	HN 8,848	
Gln 49		HB3	2,818	CA	59,778	Met 61	
NE2	110,419	CB	29,725	HN	9,036	N 123,711	
N	113,692	HB2	3,23	Ile 56		HB2 2,084	
C	176,159	HA	4,34	HD1*	0,747	HB3 2,084	
CD	180,214	CA	54,636	HG2*	0,886	HG2 2,668	
HB2	2,111	HD2	6,47	HG12	1,270	HG3 2,668	
HB3	2,111	HN	7,426	HG13	1,270	HA 4,765	
HG2	2,469	HE1	7,57	HB	1,589	HN 7,259	
HG3	2,469	His 53		N	125,253	Pro 62	
CB	29,922	N	118,829	C	174,082	HG2 1,924	
CG	33,416	C	175,290	CB	39,112	HG3 1,924	
HA	4,368	HB2	3,189	HA	4,789	HB3 1,926	
CA	56,349	HB3	3,189	CA	59,805	C 176,327	
HE22	6,870	CB	33,482	HN	8,805	HB2 2,471	
HN	7,330	HA	4,519	Ser 57		HD2 3,696	
HE21	7,462	CA	59,750	N	118,187	HD3 3,696	
Asn 50		HE1	7,19	HB3	3,086	CB 32,771	
ND2	110,436	HD2	7,72	HB2	3,489	HA 4,371	
N	116,260	HN	8,253	HA	4,158	CA 63,090	
CG	177,743	Leu 54		CA	55,605	Lys 63	
HB3	2,693	HD1*	0,799	HN	8,46	HG2 1,361	
HB2	2,969	HD2*	0,799	Asp 58		HG3 1,361	
CB	38,780	HG	1,340	HB2	2,735	HD2 1,724	
HA	4,943	HB2	1,632	HB3	2,735	HD3 1,724	

HB3	1,808	HB2	2,130	HB3	2,15	HN	8,157
N	111,764	CD2	20,900	HG2	2,516	Ala 75	
HB2	2,360	CD1	25,029	HG3	2,516	HB1	1,50
HE2	2,955	CG	26,985	CB	29,293	HB2	1,50
HE3	2,955	HA	4,30	HA	3,89	HB3	1,50
CG	25,808	CB	40,420	CG	35,126	N	118,187
CD	29,573	CA	56,894	CA	59,177	C	177,359
HA	3,680	HN	8,067	HE22	6,887	CB	20,501
CB	31,379	Gly 68		HE21	7,195	HA	4,282
CE	41,810	N	111,764	HN	8,035	CA	52,679
CA	61,745	C	174,435	Ala 72		HN	7,528
HN	8,457	HA2	3,707	HB1	1,571	Asn 76	
Met 64		HA1	4,240	HB2	1,571	ND2	112,149
HB3	1,698	CA	46,920	HB3	1,571	N	119,472
N	123,326	HN	8,73	N	122,041	HB3	2,66
HB2	2,146	Leu 69		C	180,815	HB2	3,70
CG	30,394	HB2	1,727	CB	21,541	CB	39,293
CB	35,984	HB3	1,727	HA	4,13	HA	5,05
HA	4,334	N	123,964	CA	55,198	CA	50,076
CA	56,225	C	180,477	HN	7,966	HN	6,942
HN	9,249	HA	4,22	Val 73		Pro 77	
Asp 65		CB	42,194	HG1*	0,946	C	177,877
N	123,968	CA	58,056	HG2*	0,946	HG2	2,032
C	176,500	HN	8,573	N	119,472	HG3	2,032
HB3	2,670	Leu 70		C	179,102	HB3	2,130
HB2	3,312	HD1*	0,534	HB	2,001	HB2	2,465
HA	4,546	HD2*	0,534	CG1	20,997	CG	27,380
CB	41,224	HB2	1,783	CG2	21,295	HD3	3,523
CA	53,009	HB3	1,783	CB	26,388	HD2	3,805
HN	8,238	N	120,757	HA	4,118	CB	32,186
Gly 66		C	177,193	CA	64,599	HA	4,21
N	102,770	CD1	20,421	HN	8,833	CD	50,139
C	176,328	CD2	20,421	Arg 74		CA	65,523
HA2	3,940	CG	25,406	HG2	1,457	Ala 78	
HA1	4,321	HA	3,053	HG3	1,457	HB1	1,547
CA	47,594	CB	40,775	HB3	1,686	HB2	1,547
HN	9,555	CA	58,168	N	115,618	HB3	1,547
Leu 67		HN	8,231	C	176,326	N	116,260
HD1*	0,833	Gln 71		HB2	2,03	C	179,257
HD2*	0,833	NE2	110,864	CG	27,681	CB	20,191
HB3	1,372	N	115,618	CB	29,374	HA	4,42
HG	1,739	C	178,409	HA	4,11	CA	53,661
N	117,545	CD	180,174	CD	42,482	HN	8,382
C	179,776	HB2	2,15	CA	57,104	Thr 79	

HG2*	1,030	HN	8,286	CG2	24,886	HB2	1,60
N	104,698	Ala 82		CG1	27,343	HB3	1,60
C	175,763	HB1	1,413	HA	4,785	N	129,107
CG2	21,604	HB2	1,413	CB	41,160	C	178,238
HB	4,623	HB3	1,413	CA	59,836	CB	19,981
HA	4,65	N	122,648	HN	9,25	HA	4,772
CA	61,510	C	177,891	Ile 86		CA	52,101
CB	69,223	CB	21,399	HG12	1,374	HN	9,56
HN	7,822	HA	4,22	HG13	1,374	Gln 90	
Lys 80		CA	53,420	HB	1,80	NE2	112,577
HG3	1,442	HN	7,94	N	125,895	N	120,757
HG2	1,538	Ala 83		C	173,056	C	176,325
HD2	1,735	HB1	1,523	CG1	24,608	CD	179,548
HD3	1,735	HB2	1,523	CB	40,113	HB2	2,24
HB2	1,932	HB3	1,523	HA	5,290	HB3	2,24
N	120,114	N	125,253	CA	57,838	HG2	2,474
C	177,368	C	176,501	HN	7,972	HG3	2,474
HB3	2,001	CB	21,528	Leu 87		CB	28,846
CG	24,661	HA	4,74	HD1*	0,744	CG	33,432
CD	29,838	CA	51,302	HD2*	0,744	HA	4,385
HE2	3,059	HN	8,369	HG	1,345	CA	56,221
HE3	3,059	Phe 84		HB3	1,49	HE22	7,081
CB	32,593	N	125,253	HB2	1,509	HE21	7,593
CE	36,427	C	174,613	N	129,107	HN	8,83
HA	4,349	HB3	2,464	C	175,457	Gly 91	
CA	59,806	HB2	3,271	CD1	25,978	N	109,836
HN	7,449	CB	45,037	CD2	25,978	C	173,907
Lys 81		HA	5,400	CG	27,616	HA1	3,904
HG2	1,443	CA	56,243	CB	43,853	HA2	3,904
HG3	1,443	HD1	6,83	HA	5,40	CA	45,662
HD2	1,704	HD2	6,83	CA	52,611	HN	8,641
HD3	1,704	HE1	7,07	HN	8,696	Asp 92	
HB2	1,798	HE2	7,07	Thr 88		N	120,114
N	117,545	HZ	7,34	HG2*	1,336	HB3	2,708
C	176,669	HN	9,526	N	113,691	HB2	2,896
HB3	2,135	Ile 85		C	172,876	HA	4,676
CG	25,808	HD1*	0,424	CG2	22,043	CB	41,200
CD	29,573	HG2*	0,617	HB	4,117	CA	53,228
HE2	3,021	HG12	1,350	HA	5,078	HN	7,62
HE3	3,021	HG13	1,350	CA	59,419	Arg 93	
CB	31,844	HB	1,563	CB	70,741	HB2	1,932
HA	4,40	N	129,750	HN	8,491	HB3	1,932
CE	41,810	C	173,738	Ala 89		N	122,041
CA	55,765	CD1	23,112	HB1	1,60	C	178,040

CB	29,988	HG2	2,401	CB	21,740	HD22	7,301
HA	4,040	HG3	2,401	HA	4,140	HD21	8,058
CA	58,923	CB	28,189	CA	54,682	HN	9,323
HN	8,43	CG	34,627	HN	7,860		Asn 106
Ala 94		HA	4,53	Leu 102		N	111,121
HB1	1,468	CA	59,276	HD1*	0,755	C	172,877
HB2	1,468	HE22	7,044	HD2*	0,755	HB3	2,265
HB3	1,468	HE21	7,873	HB2	1,527	HB2	2,834
N	120,757	HN	7,971	HB3	1,702	HA	4,761
C	180,119	Lys 98		N	116,260	CB	41,867
CB	21,541	HB2	1,850	C	176,670	CA	52,041
HA	4,226	HB3	1,850	CD1	22,505	HN	7,748
CA	54,739	N	120,757	CD2	22,505	Val 107	
HN	8,327	C	178,222	CG	26,516	HG1*	0,866
Leu 95		CB	32,919	HA	4,320	HG2*	0,866
HD2*	0,681	HA	4,122	CB	42,726	N	118,187
HD1*	0,813	CA	59,245	CA	54,770	C	173,909
HB3	1,586	HN	8,232	HN	7,600	HB	2,041
HB2	1,796	Ala 99		Gly 103		CG1	21,134
N	120,114	HB1	1,236	N	103,413	CG2	21,134
C	178,256	HB2	1,236	C	175,987	CB	33,873
CD1	24,360	HB3	1,236	HA2	3,82	HA	4,969
HA	4,013	N	119,472	HA1	4,23	CA	60,967
CB	40,845	C	179,451	CA	45,848	HN	8,47
CA	57,621	CB	22,071	HN	7,604	Leu 108	
HN	7,75	HA	3,802	Ala 104		HD2*	0,662
Val 96		CA	54,691	HB1	1,290	HD1*	0,804
HG2*	0,843	HN	8,777	HB2	1,290	HB3	1,261
HG1*	0,994	Ala 100		HB3	1,290	HG	1,509
N	117,545	HB1	1,591	N	123,968	HB2	1,553
C	178,200	HB2	1,591	C	176,674	N	127,180
HB	2,151	HB3	1,591	CB	21,899	C	174,264
CG1	20,801	N	119,472	HA	4,140	CD1	24,545
CG2	23,067	C	181,330	CA	53,108	CD2	24,545
HA	3,407	CB	22,050	HN	8,554	CG	26,865
CB	31,425	HA	4,210	Asn 105		HA	4,608
CA	67,175	CA	55,108	ND2	112,809	CB	45,541
HN	7,707	HN	8,027	N	120,114	CA	53,277
Gln 97		Ala 101		C	174,661	HN	9,209
NE2	110,436	HB1	1,537	HB3	2,219	Ala 109	
N	116,902	HB2	1,537	HB2	2,90	HB1	1,318
C	180,999	HB3	1,537	CB	39,073	HB2	1,318
HB2	2,347	N	121,399	HA	4,614	HB3	1,318
HB3	2,347	C	179,437	CA	56,179	N	124,611

C	176,667	CB	71,298	HG2	0,898	HA	3,700
CB	19,981	Ile 114		HG3	1,402	CB	38,321
HA	4,98	HD1*	0,686	HB3	1,94	CA	65,801
CA	51,057	HG2*	1,011	HB2	1,959	HN	8,130
HN	8,240	HG12	1,033	N	119,472	Glu 122	
Lys 110		HG13	1,033	C	177,535	HB3	1,768
N	118,829	N	124,611	CG	24,658	N	120,757
HN	7,63	CG2	16,889	CD	29,151	C	179,802
Pro 111		C	177,021	HA	3,721	HB2	2,14
HG2	1,992	HB	2,028	CB	32,864	CB	29,307
HG3	1,992	HA	3,871	CE	41,867	CG	33,701
C	175,444	CB	37,200	CA	60,512	HA	4,382
HB2	2,317	CA	64,977	HN	9,010	CA	58,994
HB3	2,317	HN	9,309	Ala 119		HN	9,14
CG	30,141	Glu 115		HB1	1,589	Ala 123	
CB	34,326	N	119,472	HB2	1,589	HB1	1,59
HD2	4,202	C	179,799	HB3	1,589	HB2	1,59
HD3	4,202	HB2	2,07	N	118,187	HB3	1,59
HA	4,580	HB3	2,07	C	180,593	N	120,757
CD	57,639	HG2	2,621	CB	21,367	C	178,420
CA	62,059	HG3	2,621	HA	4,31	CB	21,523
Phe 112		CB	28,919	CA	54,675	HA	4,21
N	118,187	HA	4,09	HN	7,808	CA	54,658
C	174,762	CA	60,408	Ala 120		HN	7,808
HB2	3,23	HN	8,94	HB1	1,468	Val 124	
HB3	3,23	Lys 116		HB2	1,468	HG2*	0,23
CB	40,349	N	119,472	HB3	1,468	HG1*	0,89
HA	5,12	C	179,621	N	120,114	HB	1,973
CA	55,782	HB2	2,009	C	179,618	N	114,333
HD1	7,01	HB3	2,009	CB	21,115	C	177,174
HD2	7,01	CB	32,767	HA	4,23	CG1	20,883
HZ	7,06	HA	4,022	CA	54,415	CG2	21,202
HE1	7,16	CA	58,901	HN	7,863	HA	3,89
HE2	7,16	HN	7,721	Ile 121		CB	32,990
HN	7,821	Met 117		HD1*	0,621	CA	64,151
Thr 113		N	120,114	HG2*	0,646	HN	7,221
HG2*	1,304	C	176,842	HG12	1,520	Phe 125	
N	109,194	HB2	2,15	HG13	1,520	N	114,333
C	175,810	HB3	2,15	HB	1,92	C	176,158
CG2	21,679	CB	31,506	N	116,902	HB3	2,65
HB	4,741	HA	4,23	CD1	14,039	HB2	3,35
HA	4,758	CA	57,831	C	179,261	HA	4,55
CA	58,845	HN	8,258	CG2	18,117	CB	41,701
HN	7,31	Lys 118		CG1	27,650	CA	59,748

HZ	7.29	HN	8.504	HD1*	0.944	CA	55.676
HE1	7.41	Ala 127		HD2*	0.944	HN	9.19
HE2	7.41	HB1	1.360	HB3	1.49	Lys 129	
HD1	7.44	HB2	1,360	HG	1,599	HG2	1,380
HD2	7.44	HB3	1,360	HB2	1,82	HG3	1,380
HN	8,12	N	118,187	N	122,041	HB2	1,801
Gly 126		C	179,253	C	176,331	HB3	1,801
N	109,836	CB	20,463	CD1	24,661	N	123,968
C	170,801	HA	4,034	CD2	24,661	HA	4,203
HA2	3,768	CA	52,663	CG	27,485	HN	7,535
HA1	4,363	HN	7,78	HA	4,22		
CA	43,803	Leu 128		CB	42,177		

## Anhang B: Chemische Verschiebungen von CheY2-BeF<sub>3</sub>

Met 1		HA	3.905	CG	24.982	CG2	19.242
CB 34.500		CG	36.144	CE	41.387	CG1	24.843
CA 54.281		CB	29.368	CD	30.040	CD1	14.372
C 180.983		CA	58.360	CB	32.992	CB	41.888
Ser 2		C	177.014	CA	56.289	CA	58.487
N 113,558	Lys 6		C	176,496	C	174,586	
HN 7,699	N 117,481	Val 9		Val 12			
CB 62,389	HN 7,611	N	125,728	N	123,071		
CA 58,182	HB3 1,755	HN	9,017	HN	8,122		
C 176,496	HB2 1,755	HG2*	0,606	HG2*	0,456		
Leu 3		HA	4,205	HG1*	0,506	HG1*	0,506
N 121,015	CG 24,905	HB	1,805	HB	1,976		
HN 7,822	CE 42,004	HA	5,155	HA	4,855		
HG 1,596	CD 28,613	CG2	22,117	CG2	20,985		
HD2* 0,860	CB 32,992	CG1	22,117	CG1	23,249		
HD1* 0,306	CA 55,771	CB	34,027	CB	31,700		
HB3 1,703	C 175,978	CA	59,913	CA	59,395		
HB2 1,703	Ile 7		C	172,872	C	175,806	
HA 4,324	N 120,426	Leu 10		Asp 13			
CG 32,219	HN 7,202	N	131,618	N	125,139		
CD2 24,670	HG2* 0,506	HN	9,167	HN	8,335		
CD1 24,670	HG13 1,206	HG	1,002	HB3	2,522		
CB 41,793	HG12 1,206	HD2*	0,390	HB2	2,522		
CA 54,992	HB 1,855	HD1*	0,506	HA	4,555		
C 177,014	HA 3,955	HB3	1,606	CB	43,864		
Ala 4		CG2	18,042	HB2	1,606	CA	55,253
N 121,604	CG1 26,644	HA	5,005	CA	55,253	C	174,425
HN 8,062	CB 38,169	CG	26,622	Asp 14			
HB3 1,475	CA 59,913	CD2	23,341	N	124,550		
HB2 1,475	C 175,115	CD1	26,622	HN	9,208		
HB1 1,475	Lys 8		CB	43,864	HB3	2,686	
HA 4,122	N 132,207	CA	52,665	CB	39,722		
CB 17,326	HN 11,024	C	174,425	CA	55,253		
CA 54,736	HG3 1,058	Ile 11		C	175,461		
C 178,567	HG2 1,058	N	122,782	Gln 15			
Glu 5		HE3	2,897	HG2*	0,656	NE2	110,346
N 112,768	HE2	2,897	HG13	0,906	N	122,193	
HN 7,625	HD3	1,527	HG12	0,906	HN	9,768	
HG3 2,313	HD2	1,527	HD1*	0,406	HG3	2,373	
HG2 2,313	HB3	1,347	HB	1,606	HG2	2,373	
HB3 2,105	HB2	1,383	HA	5,455			
HB2 2,105	HA	4,755					

HE22	6,884	HB3	1,674	HB3	1,655	CG	26,919
HE21	7,264	HB2	1,674	HB2	1,655	CD2	21,520
HB3	2,005	HA	3,855	HA	4,051	CD1	21,520
HB2	2,289	CG	29,231	CG	23,861	CB	40,757
HA	4,671	CD	40,974	CD2	26,214	CA	57,324
CG	33,731	CB	30,921	CD1	26,214	C	180,120
CD	180,456	CA	60,431	CB	41,275	Gln 27	
CB	28,809	C	178,912	CA	57,324	NE2	110,989
CA	54,281	Leu 20		C	178,049	N	121,015
C	178,224	N	120,426	Gly 23		HN	8,376
Val 16		HN	8,444	N	106,289	HG3	2,605
N	113,221	HG	1,399	HN	8,499	HG2	2,605
HN	8,380	HD2*	0,606	HA2	3,505	HE22	7,443
HG2*	0,983	HD1*	0,606	HA1	3,955	HE21	6,846
HG1*	1,083	HB3	1,430	CA	47,488	HB3	2,086
HB	2,055	HB2	1,430	C	175,806	HB2	2,086
HA	3,505	HA	4,055	Asp 24		HA	4,405
CG2	20,395	CG	27,144	N	121,015	CG	34,119
CG1	22,449	CD2	22,870	HN	8,075	CD	180,268
CB	31,438	CD1	22,870	HB3	2,671	CB	28,332
CA	66,643	CB	41,293	HB2	2,791	CA	58,878
C	177,014	CA	57,812	HA	4,405	C	179,085
Thr 17		C	179,775	CB	40,757	Gln 28	
N	112,768	Leu 21		CA	57,324	NE2	111,631
HN	8,321	N	121,015	C	178,567	N	121,604
HG2*	1,006	HN	7,802	Ala 25		HN	8,171
HB	3,905	HG	1,839	N	122,193	HE22	6,789
HA	4,105	HD2*	0,848	HN	7,857	HE21	7,450
CG2	22,645	HD1*	0,848	HB3	1,705	HB3	2,249
CB	67,679	HB3	1,867	HB2	1,705	HB2	2,249
CA	65,608	HB2	1,867	HB1	1,705	HA	4,055
C	177,186	HA	4,255	HA	4,106	CG	34,119
Ser 18		CG	26,685	CB	18,495	CD	179,866
N	115,714	CD2	23,861	CA	55,253	CB	27,814
HN	6,860	CD1	23,861	C	179,430	CA	58,878
HB3	3,905	CB	42,311	Leu 26		C	178,222
HB2	3,905	CA	57,842	N	115,125	Leu 29	
HA	4,755	C	180,638	HN	8,499	N	117,481
CA	61,723	Leu 22		HG	1,106	HN	7,693
Arg 19		N	120,426	HD2*	0,456	HG	2,005
HG3	1,222	HN	8,021	HD1*	0,456	HD2*	0,856
HG2	1,222	HG	1,336	HB3	1,905	HD1*	0,856
HD3	3,185	HD2*	0,656	HB2	1,905	HB3	1,705
HD2	3,185	HD1*	0,656	HA	4,005	HB2	2,205

HA	4,270	CB	36,098	HN	8,717	HG3	2,299
CG	26,214	CA	55,771	HB3	1,206	HG2	2,299
CD2	22,870	C	176,323	HB2	1,206	HB3	1,905
CD1	22,870	Gln 33		HB1	1,206	HB2	1,905
CB	42,311	NE2	110,989	HA	5,455	HA	3,990
CA	54,928	N	122,782	CB	22,119	CG	37,043
C	175,633	HN	8,813	CA	50,076	CB	29,368
Gly 30		HG3	2,631	C	175,633	CA	59,395
N	103,932	HG2	2,631	Ala 37		C	179,257
HN	7,611	HE22	6,831	N	121,604	Gln 42	
HA2	3,505	HE21	7,401	HN	8,785	NE2	112,274
HA1	4,055	HB3	2,086	HB3	1,206	N	121,604
CA	44,381	HB2	2,250	HB2	1,206	HN	9,222
C	174,598	HA	4,555	HB1	1,206	HG3	2,655
Phe 31		CG	33,894	HA	4,543	HG2	2,405
N	118,070	CD	179,967	CB	22,637	HE22	7,591
HN	7,912	CB	28,332	CA	50,076	HE21	7,065
HE2	6,891	CA	55,253	C	176,323	HB3	2,005
HE1	6,944	C	172,872	Gly 38		HB2	2,005
HD2	7,565	Ile 34		N	104,521	HA	3,965
HD1	7,620	N	123,961	HN	8,362	CG	33,219
HB3	2,605	HN	7,707	HA2	3,605	CD	179,644
HB2	2,605	HG2*	0,656	HA1	4,555	CB	28,332
HA	4,652	HG13	1,306	CA	44,381	CA	58,360
CB	38,169	HG12	1,306	C	173,217	C	179,257
CA	59,395	HB	1,606	Asp 39		Gly 43	
C	175,288	HA	5,005	N	110,412	N	102,754
Lys 32		CG2	18,269	HN	7,243	HN	8,198
N	118,070	CG1	27,550	HB3	2,855	HA2	3,228
HN	8,280	CB	41,275	HB2	3,405	HA1	3,455
HG3	1,371	CA	59,395	HA	5,105	CA	46,970
HG2	1,371	C	175,633	CB	42,311	C	173,217
HE3	2,894	Thr 35		CA	54,218	Met 44	
HE2	2,894	N	128,673	C	176,496	N	122,193
HD3	1,486	HN	9,427	Gly 40		HN	8,335
HD2	1,486	HG2*	1,127	N	103,932	HG3	2,686
HB3	1,714	HB	3,655	HN	7,611	HG2	2,686
HB3	1,714	HA	4,505	HA2	3,647	HB3	1,805
HB2	1,943	CG2	23,341	HA1	3,791	HB2	2,205
HB2	1,943	CB	68,714	CA	48,005	HA	4,255
HA	4,555	CA	60,948	C	174,253	CG	32,090
CG	24,435	C	171,664	Glu 41		CB	30,921
CE	41,993	Ala 36		N	123,961	CA	56,807
CD	28,719	N	128,673	HN	8,499	C	177,531

Lys 45		C 176,323		HB3	1,867	CA	53,183
N	120,426	Ala 48		HB2	2,140	C	172,527
HN	7,966	N 115,714		HA	4,445	Val 55	
HG3	1,606	HN 8,226		CG	27,155	N	127,495
HG2	1,606	HB3 1,406		CD	49,642	HN	8,988
HE3	2,851	HB2 1,406		CB	31,956	HG2*	0,194
HE2	2,851	HB1 1,406		CA	64,572	HG1*	0,840
HD3	1,661	HA 3,905		C	176,496	HB	1,456
HD2	1,661	CB 17,978		His 52		HA	4,905
HB3	1,855	CA 53,700		N	122,782	CG2	21,438
HB2	1,855	C 179,085		HN	7,366	CG1	21,438
HA	3,955	Gln 49		HE2	9,141	CB	33,073
CG	23,995	NE2	112,274	HE1	7,538	CA	59,395
CE	40,840	N	113,946	HD2	6,492	C	174,598
CD	27,396	HN	7,297	HB3	2,755	Ile 56	
CB	31,956	HG3	2,455	HB2	3,404	N	126,317
CA	59,395	HG2	2,455	HA	4,255	HN	8,826
C	179,947	HE22	6,853	CB	29,368	HG2*	0,556
Ile 46		HE21	7,550	CA	54,736	HG13	1,245
N	118,659	HB3	2,055	C	173,390	HG12	1,245
HN	7,761	HB2	2,055	His 53		HD1*	0,805
HG2*	0,706	HA	4,305	N	119,248	HB	1,565
HG13	1,056	CG	33,731	HN	8,144	HA	4,755
HG12	1,056	CD	180,469	HE1	7,703	CG2	17,742
HD1*	0,679	CB	29,885	HD2	7,177	CG1	26,512
HB	1,705	CA	56,289	HB3	3,155	CB	37,651
HA	3,705	C	176,151	HB2	3,455	CA	59,395
CG2	17,272	Asn 50		HA	4,505	C	174,598
CG1	28,097	ND2	112,274	CB	32,992	Ser 57	
CD1	12,404	N	116,303	CA	59,395	N	119,248
CB	37,651	HN	8,540	C	175,288	HN	8,867
CA	65,090	HD22	7,455	Leu 54		HB3	2,905
C	177,531	HD21	7,600	N	119,837	HB2	3,605
Met 47		HB3	2,655	HN	8,075	HA	5,034
N	116,303	HB2	2,905	HG	1,273	CB	67,161
HN	7,912	HA	4,894	HD2*	0,631	CA	55,771
HG3	2,267	CG	177,662	HD1*	0,802	C	173,562
HG2	2,619	CB	38,451	HB3	1,485	Asp 58	
HB3	2,005	CA	50,398	HB2	1,485	N	126,906
HB2	2,305	Pro 51		HA	5,195	HN	8,649
HA	4,162	HG3	2,031	CG	27,716	HB3	2,930
CG	33,731	HG2	2,031	CD2	22,796	HB2	3,586
CB	30,403	HD3	3,491	CD1	25,965	HA	5,807
CA	56,289	HD2	3,768	CB	44,899	CB	44,381

CA	52,147	HD2	3,472	HA	4,379	CD1	26,075
C	175,978	HB3	2,355	CB	41,275	CB	41,275
<b>Phe 59</b>							
N	118,070	HB2	1,905	CA	53,183	CA	57,842
HZ	7,203	HA	4,355	C	177,014	C	179,430
HN	7,939	CG	26,919	<b>Gly 66</b>		<b>Leu 70</b>	
HE2	7,347	CD	50,767	N	101,576	N	119,837
HE1	7,347	CB	32,474	HN	9,481	HN	7,789
HD2	7,061	CA	62,502	HA2	4,358	HG	1,644
HD1	7,061	C	175,806	HA1	3,870	HD2*	0,837
HB3	2,882	<b>Lys 63</b>		CA	47,488	HD1*	0,606
HB2	3,208	N	111,001	C	176,496	HB3	1,855
HA	4,973	HN	8,430	<b>Leu 67</b>		HB2	1,855
CB	39,214	HG3	1,306	N	118,070	HA	4,155
CA	58,811	HG2	1,306	HN	8,062	CG	28,944
C	174,770	HE3	2,231	HG	1,655	CD2	25,795
<b>Asn 60</b>		HE2	2,231	HD2*	0,648	CD1	25,795
ND2	111,631	HD3	1,625	HD1*	0,806	CB	40,240
N	116,770	HD2	1,625	HB3	1,306	CA	57,842
HN	8,818	HB3	1,705	HB2	2,105	C	177,186
HD22	6,921	HB2	1,705	HA	4,255	<b>Gln 71</b>	
HD21	7,693	HA	3,555	CG	26,622	NE2	110,346
HB3	2,583	CG	25,570	CD2	22,449	N	116,303
HB2	3,040	CE	41,543	CD1	24,802	HN	8,021
HA	4,005	CD	28,944	CB	40,240	HG3	2,258
CG	176,500	CB	30,921	CA	56,807	HG2	2,435
CB	37,133	CA	61,984	C	179,602	HE22	6,875
CA	54,218	C	177,531	<b>Gly 68</b>		HE21	7,216
C	171,837	<b>Met 64</b>		N	112,179	HB3	2,105
<b>Met 61</b>		N	123,961	HN	8,744	HB2	2,105
N	128,673	HN	9,386	HA2	3,641	HA	3,755
HN	7,179	HG3	1,655	HA1	3,795	CG	34,686
HG3	2,655	HG2	1,655	CA	46,970	CD	179,816
HG2	2,655	HB3	2,055	C	177,014	CB	28,850
HB3	2,005	HB2	2,055	<b>Leu 69</b>		CA	59,395
HB2	2,005	HA	4,255	N	123,961	C	178,222
HA	4,555	CG	30,997	HN	8,485	<b>Ala 72</b>	
CG	32,333	CB	35,580	HG	1,306	N	122,193
CB	28,567	CA	56,289	HD2*	0,452	HN	7,939
CA	53,634	C	178,049	HD1*	0,676	HB3	1,506
<b>Asp 65</b>							
<b>Pro 62</b>		N	125,139	HB3	1,615	HB2	1,506
HG3	2,183	HN	8,294	HB2	1,795	HB1	1,506
HG2	2,183	HB3	2,455	HA	4,051	HA	4,055
HD3	3,731	HB2	3,155	CG	24,982	CB	17,978
				CD2	24,982	CA	55,253

C	180,638	HB3	2,566	HE3	2,924	HB3	1,406
	Val 73	HB2	3,670	HE2	2,924	HB2	1,406
N	119,837	HA	4,989	HD3	1,680	HB1	1,406
HN	8,826	CG	177,824	HD2	1,680	HA	4,605
HG2*	0,956	CB	38,922	HB3	2,005	CB	21,084
HG1*	0,853	CA	50,074	HB2	2,005	CA	51,629
HB	2,205	Pro 77		HA	4,305	C	176,669
HA	3,755	HG3	1,279	CG	23,216	Phe 84	
CG2	22,247	HG2	1,279	CE	41,662	N	125,728
CG1	25,345	HD3	3,855	CD	28,809	HZ	7,355
CB	29,169	HD2	4,125	CB	31,956	HN	9,632
CA	65,608	HB3	2,055	CA	59,395	HE2	7,110
C	179,085	HB2	2,359	C	177,359	HE1	7,110
	Arg 74	HA	4,105	Lys 81		HD2	6,821
N	115,714	CG	27,594	N	118,070	HD1	6,821
HN	8,157	CD	50,136	HN	8,280	HB3	2,405
HG3	1,456	CB	31,956	HG3	1,404	HB2	3,305
HG2	1,456	CA	65,090	HG2	1,404	HA	5,405
HD3	2,905	C	177,877	HE3	2,958	CB	44,899
HD2	2,905	Ala 78		HE2	2,958	CA	56,289
HB3	1,705	N	116,892	HD3	1,664	C	174,425
HB2	2,005	HN	8,389	HD2	1,664	Ile 85	
HA	4,005	HB3	1,506	HB3	1,705	N	131,029
CG	27,789	HB2	1,506	HB2	1,705	HN	9,222
CD	42,622	HB1	1,506	HA	4,379	HG2*	0,606
CB	28,850	HA	4,305	CG	25,120	HG13	1,245
CA	56,807	CB	19,013	CE	40,804	HG12	1,245
C	176,323	CA	53,700	CD	28,809	HD1*	0,816
	Ala 75	C	179,257	CB	31,438	HB	1,506
N	118,659	Thr 79		CA	55,253	HA	4,705
HN	7,516	N	104,521	C	176,669	CG2	16,684
HB3	1,406	HN	7,830	Ala 82		CG1	27,550
HB2	1,406	HG2*	1,006	N	122,782	CB	41,793
HB1	1,406	HB	4,546	HN	7,912	CA	59,395
HA	4,255	HA	4,555	HB3	1,356	C	174,425
CB	19,013	CG2	21,154	HB2	1,356	Ile 86	
CA	52,665	CB	69,232	HB1	1,356	N	126,906
C	177,359	CA	61,466	HA	4,205	HN	8,171
	Asn 76	C	175,806	CB	17,978	HG2*	0,821
ND2	110,346	Lys 80		CA	53,183	HG13	1,306
N	119,837	N	121,015	C	174,943	HG12	1,306
HN	6,956	HN	7,461	Ala 83		HB	1,855
HD22	6,899	HG3	1,556	N	126,317	HA	5,355
HD21	7,707	HG2	1,556	HN	8,267	CG2	17,363

CG1	28,455	HG2	2,405	HN	8,116	HB2	2,505
CB	38,169	HE22	7,643	HB3	1,406	HA	4,055
CA	58,360	HE21	7,092	HB2	1,406	CG	33,731
C	172,872	HB3	2,195	HB1	1,406	CD	180,520
Leu 87		HB2	2,195	HA	4,105	CB	28,815
N	131,618	HA	4,755	CB	17,326	CA	58,487
HN	8,703	CG	33,894	CA	54,604	C	179,366
HG	1,201	CD	180,996	C	180,220	Lys 98	
HD2*	0,798	CB	29,619	Leu 95		N	123,071
HD1*	0,622	CA	54,218	N	121,786	HN	9,200
HB3	1,556	C	175,115	HN	9,013	HG3	1,376
HB2	1,556	Gly 91		HG	1,771	HG2	1,376
HA	5,255	N	109,823	HD2*	0,807	HE3	2,946
CG	27,626	HN	8,580	HD1*	0,807	HE2	2,946
CD2	25,743	HA2	3,455	HB3	1,376	HD3	1,646
CD1	26,685	HA1	3,955	HB2	1,376	HD2	1,646
CB	44,899	CA	45,935	HA	4,051	HB3	1,805
CA	53,183	C	173,390	CG	32,803	HB2	1,805
C	174,425	Asp 92		CD2	24,802	HA	4,051
Thr 88		N	120,426	CD1	24,802	CG	25,273
N	115,125	HN	7,543	CB	40,240	CE	42,004
HN	8,458	HB3	2,755	CA	57,842	CD	29,025
HG2*	1,213	HB2	2,755	C	178,394	CB	32,474
HB	4,683	HA	4,755	Val 96		CA	59,395
HA	4,652	CB	38,106	N	118,070	C	178,394
CG2	22,449	CA	52,663	HN	7,816	Ala 99	
CB	71,303	C	176,734	HG2*	0,906	N	119,837
CA	58,360	Arg 93		HG1*	1,050	HN	8,867
C	175,806	N	120,501	HB	2,105	HB3	1,156
Ala 89		HN	8,505	HA	3,305	HB2	1,156
N	125,728	HG3	1,649	CG2	21,295	HB1	1,156
HN	9,290	HG2	1,649	CG1	21,195	HA	3,560
HB3	1,606	HD3	3,128	CB	31,438	CB	17,460
HB2	1,606	HD2	3,128	CA	67,161	CA	54,736
HB1	1,606	HB3	1,867	C	178,394	C	179,430
HA	4,757	HB2	1,867	Gln 97		Ala 100	
CB	19,531	HA	4,505	NE2	110,989	N	120,426
CA	52,665	CG	26,622	N	118,070	HN	8,062
C	177,014	CD	42,480	HN	8,034	HB3	1,506
Gln 90		CB	29,368	HG3	2,376	HB2	1,506
NE2	113,558	CA	58,878	HG2	2,574	HB1	1,506
N	121,015	C	178,049	HE22	6,970	HA	4,270
HN	9,086	Ala 94		HE21	7,814	CB	17,460
HG3	2,405	N	121,015	HB3	2,505	CA	54,736

C	181,501	ND2	111,631	HB2	1,498	CB	33,509		
	Ala 101	N	120,426	HA	4,655	CA	61,466		
N	122,193	HN	9,522	CG	27,716	C	175,461		
HN	7,830	HD22	7,233	CD2	24,982		Phe 112		
HB3	1,456	HD21	8,009	CD1	24,982	N	118,070		
HB2	1,456	HB3	2,031	CB	45,935	HN	7,843		
HB1	1,456	HB2	2,632	CA	52,665	HE2	7,134		
HA	4,205	HA	4,555	C	174,770	HE1	7,134		
CB	17,460	CG	175,973		Ala 109	HD2	7,042		
CA	54,736	CB	38,769		N	123,371	HD1	7,042	
C	179,602	CA	56,289		HN	8,185	HB3	3,006	
	Leu 102	C	174,770		HB3	1,356	HB2	3,098	
N	116,303		Asn 106		HB2	1,356	HA	5,123	
HN	7,570	ND2	109,704		HB1	1,356	CB	40,240	
HG	0,782	N	111,590		HA	5,005	CA	55,771	
HD2*	0,756	HN	7,611		CB	20,049	C	174,770	
HD1*	0,756	HD22	6,945		CA	50,076		Thr 113	
HB3	1,705	HD21	8,084		C	177,704	N	109,823	
HB2	1,705	HB3	2,855			Lys 110	HN	7,516	
HA	4,270	HB2	2,855			N	118,070	HG2*	1,256
CG	22,449	HA	4,655			HN	7,106	HB	4,559
CD2	25,743	CG	176,882			HG3	1,321	HA	4,705
CD1	25,743	CB	41,793			HG2	1,321	CG2	21,700
CB	42,311	CA	52,147			HE3	2,912	CB	71,376
CA	54,218	C	173,390			HE2	2,912	CA	58,487
C	176,496		Val 107			HD3	1,650		Ile 114
	Gly 103	N	121,015			HD2	1,650	HG2*	0,956
N	103,932	HN	8,621			HB3	1,606	HG13	1,285
HN	7,611	HG2*	0,627			HB2	1,905	HG12	1,519
HA2	3,805	HG1*	0,748			HA	4,255	HD1*	0,956
HA1	4,205	HB	1,955			CG	24,435	HB	1,867
CA	45,935	HA	4,816			CE	41,467	HA	3,778
C	176,151	CG2	21,212			CD	27,417	CG2	16,779
	Ala 104	CG1	21,212			CB	32,090	CG1	29,356
N	124,550	CB	33,437			CA	53,957	CD1	16,779
HN	8,580	CA	61,466				Pro 111	CB	37,133
HB3	1,206	C	173,735				HG3	CA	65,090
HB2	1,206		Leu 108				HG2	C	177,014
HB1	1,206	N	128,673						Glu 115
HA	4,105	HN	9,686					N	119,837
CB	17,978	HG	1,396					HN	8,976
CA	52,665	HD2*	0,688					HG3	2,038
C	176,841	HD1*	0,777					HG2	2,038
	Asn 105	HB3	1,498					HB3	2,005

HB2	2,005	CD	29,437	HB3	2,055	N	109,823
HA	4,005	CB	32,474	HB2	2,055	HN	8,335
CG	36,648	CA	60,431	HA	4,305	HA2	3,705
CB	28,332	C	177,704	CG	34,278	HA1	4,305
CA	60,431	Ala 119		CB	29,033	CA	43,346
C	179,602	N	118,659	CA	58,371	C	170,801
Lys 116		HN	7,802	C	179,775	Ala 127	
N	119,837	HB3	1,506	Ala 123		N	116,892
HN	7,734	HB2	1,506	N	121,015	HN	7,707
HE3	3,003	HB1	1,506	HN	7,830	HB3	1,306
HE2	3,003	HA	4,205	HB3	1,506	HB2	1,306
HD3	1,526	CB	17,978	HB2	1,506	HB1	1,306
HD2	1,526	CA	54,736	HB1	1,506	HA	3,955
HB3	2,005	C	180,638	HA	4,106	CB	18,495
HB2	2,005	Ala 120		CB	17,460	CA	52,665
HA	4,205	N	121,015	CA	54,218	C	179,257
CG	25,729	HN	7,873	C	178,394	Leu 128	
CE	42,004	HB3	1,456	Val 124		N	122,782
CD	29,437	HB2	1,456	N	114,536	HN	9,195
CB	32,474	HB1	1,456	HN	7,202	HG	1,356
CA	58,878	HA	4,155	HG2*	0,191	HD2*	0,893
C	179,602	CB	18,495	HG1*	0,867	HD1*	0,893
Met 117		CA	54,218	HB	1,855	HB3	1,356
N	119,837	C	179,602	HA	3,837	HB2	1,805
HN	8,239	Ile 121		CG2	20,566	HA	4,155
HG3	2,094	N	118,070	CG1	21,037	CG	26,192
HG2	2,094	HN	8,130	CB	32,474	CD2	22,570
HB3	2,088	HG2*	1,150	CA	64,055	CD1	22,570
HB2	2,088	HG13	1,655	C	177,359	CB	41,793
HA	4,355	HG12	1,655	Phe 125		CA	55,253
CG	31,497	HD1*	0,682	N	115,125	C	176,496
CB	30,895	HB	1,905	HZ	6,944	Lys 129	
CA	56,807	HA	3,655	HN	8,062	N	124,550
C	177,014	CG2	19,270	HE2	7,224	HN	7,529
Lys 118		CG1	29,619	HE1	7,267	HB3	1,755
N	119,248	CD1	19,270	HD2	7,405	HB2	1,755
HN	9,072	CB	38,169	HD1	7,436	CA	57,193
HG3	1,255	CA	65,608	HB3	2,555		
HG2	1,255	C	179,257	HB2	3,287		
HB3	1,955	Glu 122		HA	4,405		
HB2	1,955	N	121,015	CB	41,275		
HA	3,655	HN	9,154	CA	59,395		
CG	24,905	HG3	2,341	C	176,151		
CE	41,386	HG2	2,341	Gly 126			

# Veröffentlichungen

## Posterpräsentationen

GDCH- Tagung 2000 Regensburg

Structural and Functional Analysis of the 14kDa Chemotactic Protein CheY2 from *Sinorhizobium meliloti*, using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.

<sup>1,2</sup>Hubert Riepl, <sup>2</sup>Birgit Scharf, <sup>1</sup>Hans Robert Kalbitzer, <sup>2</sup>Rüdiger Schmitt and <sup>1</sup>Till Maurer

<sup>1</sup> University of Regensburg, Institute of Biophysics and Physical Biochemistry, 93040 Regensburg, Germany <sup>2</sup> University of Regensburg, Institute of Genetic

GDCH- Tagung 2001 Würzburg

Active and inactive conformation of the Responsregulator Protein CheY2 from *Sinorhizobium meliloti*, studied by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.

<sup>1,2</sup>Hubert Riepl, <sup>2</sup>Birgit Scharf, <sup>1</sup>Hans Robert Kalbitzer, <sup>2</sup>Rüdiger Schmitt and <sup>1</sup>Till Maurer

<sup>1</sup> University of Regensburg, Institute of Biophysics and Physical Biochemistry, <sup>2</sup> University of Regensburg, Institute of Genetic 93040 Regensburg, Germany

## Vorträge

Rabensteiner Kolleg, 2001

CheY2: Response - Regulator from *Sinorhizobium meliloti*

## Publikationen

Riepl H., Scharf B., Schmitt R., Kalbitzer HR., Maurer T.

Sequential assignment and secondary structure of the 14 kDa chemotactic protein CheY2 from *Sinorhizobium meliloti*.

J. Biomol. NMR. 2001 Mar; 19(3):287-288.

# Danksagung

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Hans Robert Kalbitzer und Herrn Prof. Rüdiger Schmitt für die interessante Themenwahl und die Bereitstellung der Arbeitsmittel. Insbesondere bedanke ich mich auch für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit an den beiden Lehrstühlen Biophysik und physikalische Biochemie und Genetik. Im Verlauf der Arbeit waren Herr Prof. Hans Robert Kalbitzer und Herr Prof. Rüdiger Schmitt stets für Fragen offen und standen mir mit Hilfestellungen und Anregungen zur Seite.

Für die gute Betreuung und die Einführung in die für mich neuen Arbeitsgebiete der Proteinbiochemie bzw. der NMR-Spektroskopie, für viele interessante Diskussionen und ein stets offenes Ohr bei Fragen und Problemen möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Birgit Scharf und Herrn Dr. Till Maurer bedanken. Ohne sie wäre ein so reibungsloser und zügiger Verlauf meiner Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen.

Allen Mitarbeitern beider Lehrstühle möchte ich Danke sagen, für die gute Aufnahme, das nette Arbeitsklima und die mir entgegengebrachte Kollegialität.

# **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln verwendet habe.

Regensburg, im Dezember 2002

---

(Hubert Riepl)