

온도변화에 의한 cAMP 수용성 단백질(CRP)의 구조

주종호 · 구미자 · 강종백*

경원대학교, 화학과

Study on the structure of cAMP receptor protein(CRP) by temperature change

JongHo Joo, Mi-Ja Goo and JongBack Gang*

Department of Chemistry, Kyungwon University

Abstract

CRP (cyclic AMP receptor protein) regulate transcription of catabolite-sensitive genes in *Escherichia coli*. Wild-type and mutant CRP (S83G and S128A) proteins were used to measure the thermal stability and the temperature-dependent structural change by proteolytic digestion, UV spectrophotometer and CD spectrapolarimeter. The result indicated that wild-type CRP was more thermally stable than the mutant CRPs in the presence of cAMP. At a low temperature, wild-type CRP with cAMP was more sensitive to subtilisin than the mutant CRPs. At a high temperature, there was no difference of sensitivity to subtilisin among wild-type, S83G and S128A CRPs. CD spectra suggested that the secondary structure of CRP was destroyed partially at a high temperature.

Key words – CRP or CAP, T_m (melting temperature), thermal stability

서 론

CRP (cAMP receptor protein) 단백질은 cAMP와 결합하여 100개 이상 유전자의 전사 과정을 조절하는 단백질이다[1]. CRP 단백질은 cAMP의 결합으로 인한 cAMP binding pocket의 구조적인 변화가 다른 domain의 DNA 결합부위인 helix-turn-helix 구조에 전달되어 유전자의 조절부위에 결합 가능한 활성인 형태로 바뀐다. 이 활성인 복합체는 유전자의 조절부위에 결합하여 DNA bending 및 단백질-단백질 상호작용을 통하여 전사 과정에서 조절에

관여한다[2]. CRP 단백질은 분자량이 45kD이며 2개의 동일한 subunit으로 이루어진 dimer로 작용한다[3]. 각 subunit은 209개의 아미노산으로 이루어져 있으며 2개의 domain인 C-terminal domain과 N-terminal domain으로 이루어져 있다. N-terminal domain은 dimer 형성과 cAMP의 결합에 관여하며 cAMP binding pocket를 포함한다(아미노산 서열 1-135). C-terminal domain은 DNA와 결합하는 HTH(helix-turn-helix) 구조를 포함하여 아미노산 서열 136-209를 포함한다[4].

cAMP 결합에 따른 CRP의 구조변화에 관한 연구는 proteolytic digestion[5], chemical modification[6], cross-linking[7] 및 fluorescence[8] 등의 여러 가지 기술이 이용되었다. 이들 연구에서 cAMP의 결합에 의한 CRP의 구조

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : (031) 750-5409, Fax : (031) 750-5389
E-mail : jbgang@mail.kyungwon.ac.kr

변화가 관찰되었다. 그리고 cAMP binding pocket에서 cAMP의 결합에 중요한 아미노산을 교체한 돌연변이 CRP 단백질이 전사단계 활성화에 끼치는 영향에 관한 연구를 통하여 cAMP의 결합에 관여하는 아미노산이 CRP의 구조에 미치는 영향이 관찰되었다[9].

그리고 cAMP의 결합수에 관한 최근의 연구결과에 의하면[10], cAMP가 두 개 결합한 형태인 CRP-(cAMP)₂가 활성 형태이고 cAMP가 4개 결합된 CRP-(cAMP)₄, 즉 cAMP binding pocket에 2개와 hinge region과 helix-turn-helix 사이에 2개가 결합된 형태는 DNA 결합부위에 잘 결합하지 못하여 전사과정을 활성화하지 못한다.

본 과정은 cAMP 결합에 의한 CRP의 구조적인 변화를 관찰하기 위하여 cAMP 결합에 관여하는 중요한 아미노산인 83과 128이 치환된 돌연변이 CRP 단백질과 야생형(wild-type) CRP 단백질을 이용하였다[9]. S83G CRP는 83번 아미노산 serine이 glycine으로 치환된 형태이며 S128A CRP는 128번 serine이 alanine으로 치환된 돌연변이 단백질이다. S83G에서 83번 serine의 OH가 cAMP에서 인산의 산소와 수소결합하며 S128A에서 serine은 cAMP의 adenine ring과의 수소결합에 관여한다[3]. S83G CRP, S128A CRP 그리고 야생형 CRP의 온도에 따른 구조 변화를 알아보기 위하여 protease digestion과 온도 증가에 따른 단백질의 변성을 통하여 단백질의 열 안정성을 관찰하였다. 이를 통하여 cAMP 결합 부위의 아미노산 치환이 CRP 단백질들(wild-type, S83G 그리고 S128A)의 열 안정성과 온도에 따른 CRP 단백질의 구조에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Glycine, boric acid, lauryl sulfate (SDS), potassium phosphate, ammonium sulfate, potassium chloride, EDTA, Tris, subtilisin (protease type XXVII), sodium chloride, glycerol, sodium phosphate, CM Sephadex, Coomassie brilliant R 등은 Sigma 제품을 사용했으며, Hydroxyapatite, ammonium persulfate는 BioRad의 제품을 사용했다. Phosphocellulose resin은 Whatman 제품을 사용했으며, LB medium은 DIFCO사 제품을 사용했다. CRP 유전자는 expression vector pRE2에 클로닝된 CA8445pRK248(λ cl^{ts})

pRE2crp[11]를 배양하여 CRP 단백질을 분리하였다.

실험방법

CRP 단백질 정제

crp 유전자의 돌연변이는 Kunkel [12]이 제안한 방법인 uracil을 포함한 한 가닥의 M13crp DNA와 그리고 83번 위치와 128번 위치의 염기가 바뀐 프라이머를 사용하였다[9]. CRP 단백질 분리는 CA8445pRK248pRE2crp를 LB media (50 μ g/ml ampicillin, 10 μ g/ml tetracycline, 0.5% glucose)를 이용하여 30°C에서 항온 교반하여 배양하였다.

배양된 균체는 PC buffer (20mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7.5), 7mM β -mercaptoethanol, 1mM EDTA, 10% glycerol)에 KCl 용액이 300mM이 되게 조정된 용액에 녹인 후 lysozyme (50mg/ml)을 넣고 얼음에 30분 정도 둔다. OD 측정으로 cell이 90% 이상 깨어질 때까지 ultra sonicator를 이용해 cell을 깨 후 4°C, 15000 rpm에서 1hr 동안 원심 분리하며 그리고 4°C, 35000 rpm에서 1.5hr 동안 원심분리로 찌꺼기를 제거한다.

칼럼에 phosphocellulose 수지를 packing한 후 PCK 완충액에 KCl이 300mM로 조정된 용액으로 칼럼을 씻어준다. 위 과정에서 준비한 상등액을 3배로 희석하여 칼럼에 주입한다. 다시 칼럼을 washing한 후에 300mM KCl에서 1.2M KCl의 농도 기울기 칼럼에 걸어준다. UV 검출기의 자료를 이용하여 피크에 해당하는 fraction을 선택해서 SDS-PAGE로 확인하였다. 두 번째 단계로 hydroxylapatite 수지를 칼럼에 packing하고 PCK buffer에 KCl이 200mM 되게 조정된 buffer로 washing한 후 sample을 loading한다. 그리고 0에서 0.33M K₂HPO₄/KH₂PO₄의 기울기로 단백질 elution 한다. 각 fraction에 모인 단백질 용액을 SDS-PAGE로 확인한다. 다음으로 CM sephadex을 column에 packing하고 CM 완충용액에 NaCl이 50mM로 조정된 buffer로 씻어주고 dialysis한 sample을 loading한다. 1 bed volume의 buffer로 씻어주고 0.1M NaCl에서 0.35M NaCl의 기울기로 elution한다. 각 fraction에 모인 단백질을 SDS-PAGE로 확인한다.

분광광도계를 이용한 측정

반응용액은 40mM Tris-HCl (pH=8.0), 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 5% glycerol이 첨가된 전사 완

충액(transcription buffer)을 사용하였다. 정제한 각종의 CRP 단백질의 일정량을 사용하여 야생형, S83G 그리고 S128A에 대하여 측정하였다. 우선 400nm~190nm 범위의 파장에서 spectrum을 측정한 후, 가장 큰 흡광도를 나타내는 파장을 선택하였다. 그리고 선택한 파장에서 단백질 용액에 프로그램된 온도 조절장치를 이용하여 0.3°C/min 씩 승온하며 흡광도를 측정하였다. 이때 사용한 파장은 265nm~280nm 범위였다.

Proteolytic digestion

반응은 전사 완충액으로 실행하였으며, CRP 단백질은 각각 32µg을 사용하였다. 야생형, S83G 및 S128A CRP 단백질과 subtilisin (protease)의 무게 비율을 300대 1로 하였다[10]. cAMP의 농도는 100 µM이며 25°C, 37°C, 45°C, 55°C 및 65°C의 온도에서 30분간 incubation 한 후에 subtilisin을 가한 후 30분 동안 추가로 incubation 하였다. 이때에 PMSF(최종농도 5 µM)를 부가하여 반응을 종료시킨다. 반응시킨 용액은 12.5% SDS-PAGE에 전기영동을 실행한 다음 Coomassie blue staining하여 절단된 단백질 조각을 확인한다.

Circular dichroism

Jasco J715 CD/ORD spectropolarimeter를 사용하여 측정하였다. 0.5mg/ml의 농도로 조정된 야생형, S83G와 S128A CRP의 CD spectra는 각각 25°C와 55°C의 온도에서 측정하였으며, 파장 범위는 190nm~330nm 이었다. 측정할 때 사용한 용액은 앞에서 언급한 전사 완충액에서 실험하였다.

결 과

전사과정을 조절하는 CRP 단백질은 cAMP의 결합으로 국부적인 구조변화가 DNA 결합부위인 helix-turn-helix에 전달되어 DNA의 프로모터 영역에 결합하여 전사과정을 조절한다[2]. 본 연구에서 다양한 온도에서 야생형과 돌연변이 CRP의 cAMP에 의한 구조 변화를 protease digestion으로 관찰하였으며, 25°C와 55°C에서 단백질의 2차 구조는 CD spectropolarimeter를 이용하여 확인하였다. 그리고 일정한 온도상승에 의한 단백질의 열적 변성은 분광 광도계를 이용하여 관찰하였다.

분광광도계에 의한 측정

분광 광도계의 셀 홀더(cell holder)에 온도조절 순환장치를 부착하여 일정한 비율로 온도를 상승시켜서(0.3°C/min) 온도증가에 따른 단백질의 구조변화를 일정한 파장에서 관찰하였다. 온도가 증가할수록 CRP 변성이 일어나 구조가 변화함으로 CRP 내부의 아미노산이 밖으로 노출되는 등의 구조변화가 일어난다. 이런 점차적인 온도증가는 흡광도의 증가를 수반하며 그리고 고온에서 일정한 값, 혹은 급격히 감소하는 경향을 보인다. 고온에서 이런 급격한 흡광도의 감소는 변성에 의한 CRP 단백질의 침전에 의한 것으로 여겨진다.

본 연구에서는 야생형과 돌연변이(S83G, S128A) CRP에 대하여 cAMP가 결합한 상태와 결합하지 않은 상태에서 흡광도 변화를 관찰하였다. 그림 1-(A), 1-(B), 그리고 1-(C)

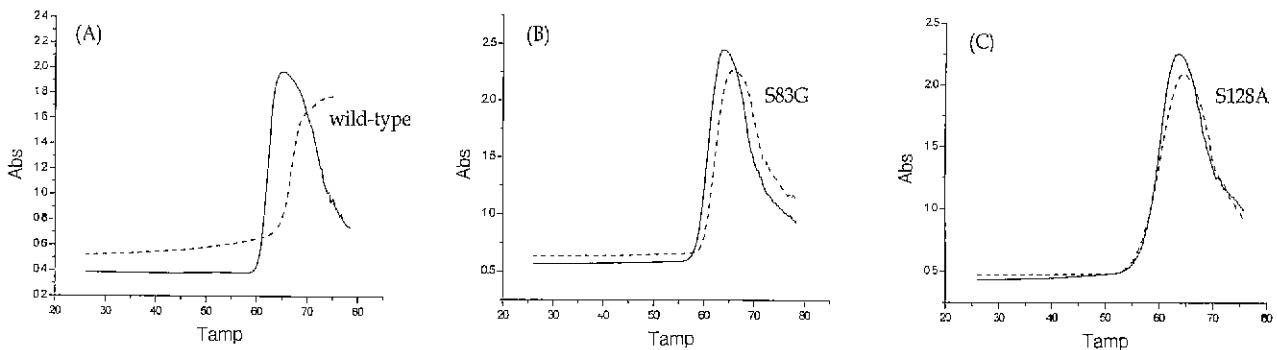


Fig. 1. UV spectroscopic measurement of wild-type (A), S83G (B) and S128A (C) CRP with or without cAMP.

Measurement was done in the transcription buffer(see materials and methods) with (—) or without (---) cAMP. Temperature was constantly elevated at 0.3°C/min. Tm was estimated as the temperature corresponding to the half of the absorbance changes between native and denatured protein. Tms of wild-type, S83G and S128A are 68.8, 60.7 and 59°C, respectively, in the presence of 50 µM cAMP and 61.7, 57.9 and 59°C, respectively, in the absence of cAMP.

에서 보듯이, 야생형 CRP의 Tm 값은 61.7°C, S83G는 57.9°C, S128A는 59.2°C인 것으로 보아 야생형 CRP와 돌연변이 CRP 사이에 열 안정성이 크게 차이를 보이지는 않았다. 그러나 cAMP가 결합한 형태에서는 야생형 CRP의 Tm 값이 68.8°C이고 변이형 S83G와 S128A는 각각 60.7°C와 59°C로서 CRP가 cAMP와 결합함으로써 열에 대한 안정성이 크게 증가했음을 알 수 있었다. S128A에서 cAMP 존재가 CRP의 열 안정성에 영향을 미치지 않는 것으로 보이며 cAMP의 binding affinity에서 야생형 CRP와 같지 않음을 알 수 있다[9]. 이는 CRP에서 아미노산 128이 cAMP의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다.

온도에 따른 CRP의 proteolytic digestion

CRP는 cAMP가 결합되지 않은 상태에서는 subtilisin에 의해서 절단되지 않지만 cAMP의 결합으로 protease에 의해 절단되어 α-CRP를 생성한다[7]. 이것은 cAMP의 결합으로 CRP의 구조가 변화되었다는 증거로 CRP의 구조적인 변화를 확인하는데 사용되는 실험 기법이다.

그림 2는 여러 온도(25°C, 37°C, 45°C, 55°C, 그리고 65°C)에서 야생형과 돌연변이 CRP의 subtilisin과의 반응결과를 보여준다. 그림 2-(A)와 (B)에서 cAMP가 없을 때 25°C와 37°C에서 야생형과 돌연변이 CRP 모두가 전혀 절단되지 않았다. 그러나 cAMP가 존재할 때 37°C에서 절단된 α-CRP band를 볼 수 있다. 그리고 절단되는 CRP량이 야생형에서 S83G 그리고 S128A의 순서로 감소하였다. 이것은 cAMP 결합에 의한 CRP의 구조가 야생형 CRP, S83G 그리고 S128A에 있어서 약간씩 다르다는 것을 의미한다. 이런 차이는 cAMP의 친화력에 의한 차이로 생각된다. 그림 2-(C)에서 cAMP가 존재하지 않을 때 야생형에서 S83G 그리고 S128A로 갈수록 subtilisin에 민감한 경향을 보였다. 이것은 돌연변이 CRP가 야생형 CRP보다 열에 의해 단백질 구조의 변성이 크게 일어나기 때문이다. cAMP가 존재할 때는 37°C에서와 같은 경향을 보인다. 그림 2-(D)는 55°C에서 cAMP가 존재할 때 앞의 경향과 다르게 S128A가 S83G보다 훨씬 subtilisin에 민감하게 반응함을 나타냈다. 이것은 cAMP의 결합에 따른 CRP의 구조적인 변화의 영향보다는 돌연변이 CRP의 열에 의한 구조적인 변성의 차이로 여겨진다. 또한 cAMP가 존재하지 않을 때도 같은 경

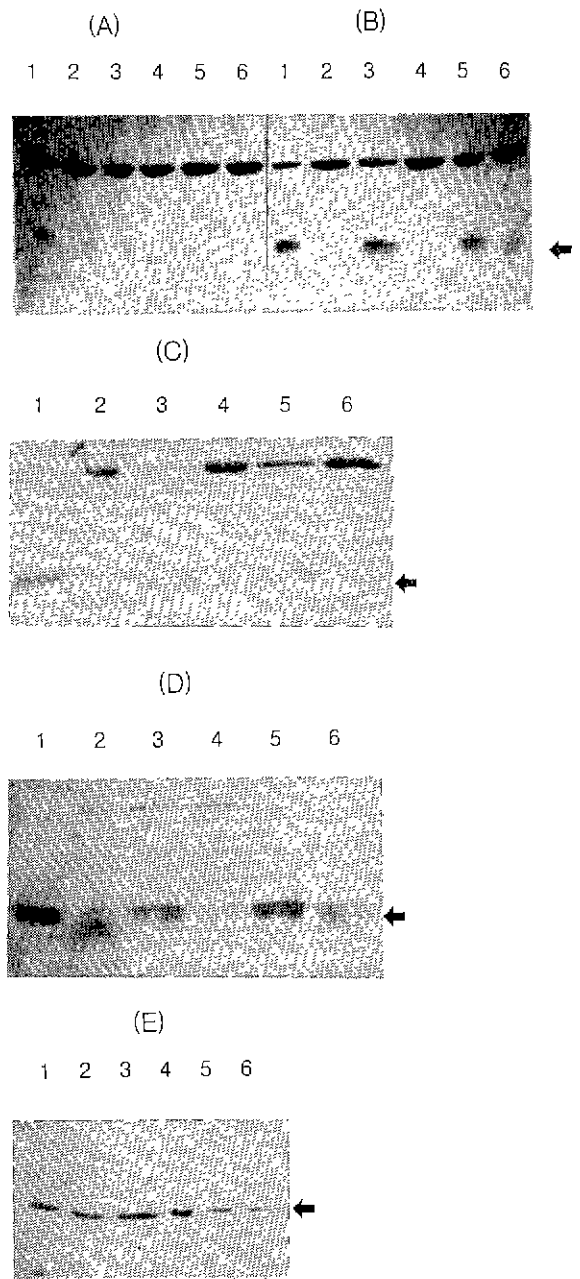


Fig. 2. Proteolysis of CRP by subtilisin in the presence of 100 μM cAMP.

Digestion reactions were performed at the various temperatures. Samples were loaded on SDS-PAGE for 1.5 hours and stained with Coomassie blue. Arrow indicates the digested CRP protein (α-CRP). Lane 1, 3 and 5 in (A) are wild-type, S83G and S128A CRP, respectively, with cAMP. Lane 2, 4 and 6 in (A) are wild-type, S83G and S128A CRP, respectively, without cAMP. Figure (A), (B), (C), (D), and (E) were the results of experiments at 25°C, 37°C, 45°C, 55°C and 65°C, respectively, with the same order of samples as (A).

향을 보였다. 그림 2-(E)에서 65°C의 결과는 55°C에서 보다 더욱 변성된 CRP로 인해 cAMP의 존재유무와 관계없이 subtilisin에 절단된 것을 볼 수 있다.

Circular dichroism(CD)에 의한 구조 관찰

단백질은 이를 구성하는 다양한 아미노산들에 의해 키랄성을 갖는 광학 활성 물질이다. 그래서 일반적으로 단백질은 2차 구조를 나타내는 α -helix, β -form, random coil 등의 특정한 구조에 해당하는 CD spectra를 갖는다.

온도 차이에 따른 야생형과 돌연변이 CRP의 구조를 관찰하기 위해 파장 190nm~330nm의 범위에서 측정했다. 그림 3-(A), (B), 그리고 (C)는 25°C와 55°C에서 각각 야생형, S83G 그리고 S128A CRP의 CD spectra를 나타낸다. 25°C에서 S83G와 S128A의 CD 스펙트럼은 야생형 CRP와 비슷한 경향을 보인다. 그러나 55°C에서 야생형 CRP와 S128A CRP는 약간의 변성된 구조를 보이지만 S83G에서 큰 변화를 나타낸다. 192nm에서 나타나는 α -helix peak와 199nm에서 보여지는 random coil 구조를 볼 때 S128A CRP가 야생형 CRP와 유사한 반면, S83G는 α -helix peak가 감소함에 따라 random coil의 증가를 나타낸다.

고 찰

본 연구는 cAMP 결합에 관여하는 CRP의 중요한 아미노산인 83번과 128번이 치환된 돌연변이 CRP들과 야생형 CRP 단백질을 이용하였다[3]. cAMP에 의한 CRP 단백질의 구조적인 변화와 열적인 안정성에 관한 자료는 단백질

구조와 기능 및 단백질의 구조와 안정성에 관한 관계를 이해하는데 도움을 줄 것이다.

야생형 CRP는 cAMP binding pocket에 cAMP의 결합으로 이루어진 구조 변화가 긴 C-helix를 통하여 hinge region에 구조변화를 거쳐 HTH(helix-turn-helix)에 전달됨으로 DNA에 specific binding을 한다[13]. 그래서 cAMP binding pocket에 위치한 아미노산의 치환은 cAMP의 결합이 정상적으로 이루어지지 않는다. 그래서 결국 정상적인 구조변화가 이루어지지 않기 때문에 DNA 결합에 영향을 주어 전사과정의 조절에 작용하지 못한다.

분광 광도계 실험에서 cAMP가 존재할 때 CRP의 열적 안정성이 야생형인 경우에 크게 향상되었지만 다른 돌연변이 CRP들의 경우는 거의 변화가 없었다. 이것은 돌연변이 CRP에서 cAMP의 약한 결합으로 인하여 야생형처럼 구조변화가 이루어지지 않았음을 알 수 있다. 전체적으로 야생형 CRP는 S83G와 S128A 보다 열에 더 안정한 구조를 취하고 있음을 알 수 있었다. Guanidine HCl을 이용한 CRP 단백질의 변성에 관한 연구[14]에 의하면 128번 아미노산이 subunit 간의 상호작용 즉 단백질의 4차 구조에 영향을 주는 것으로 확인되었다.

낮은 온도(25°C와 37°C)에서 cAMP가 존재할 때 야생형, S83G, 그리고 S128A CRP 순으로 subtilisin에 저항성을 보였다. 이것은 CRP의 cAMP 결합부위에 아미노산의 치환, 즉 Ser→Gly(S83G) 그리고 Ser→Ala(S128A)으로 cAMP 분자와 상호 작용력의 감소에 의한 결합력의 감소 때문이다. 그리고 특히 S128A CRP의 경우에 subtilisin에 거의 절단되지 않은 것은 serine 128번 아미노산이 cAMP-induced

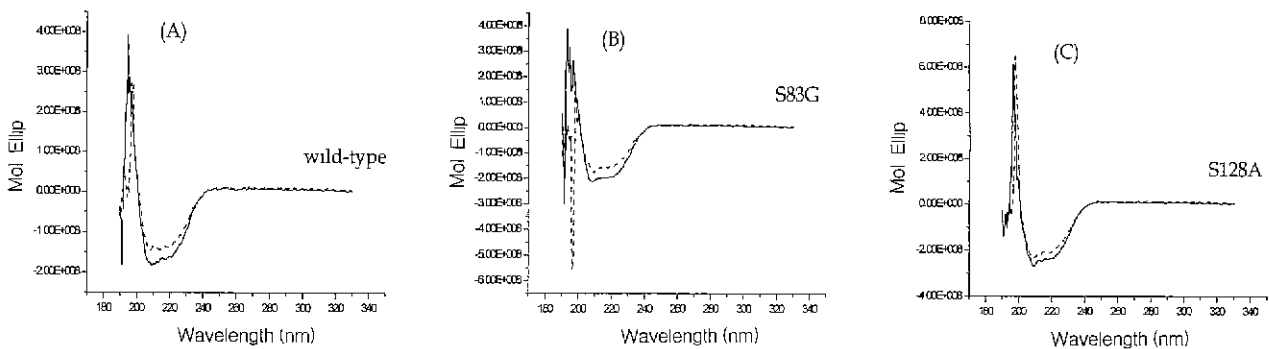


Fig. 3. CD spectra of wild-type (A), S83G (B) and S128A (C) at 25°C (—) and 55°C (---) in transcription buffer. The samples were diluted to 0.5mg/ml to obtain a good comparison of the spectra. Measurement was done with same sample at two temperature.

allosteric conformational change에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 그러나 cAMP가 존재하지 않을 때, CRP의 구조적인 차이는 알 수 없지만 CD 스펙트럼에 의하면 2차 구조에서 큰 차이가 없음을 알 수 있다.

높은 온도(55°C 이상)에서 CRP의 구조가 cAMP에 의한 영향보다 열에 의한 단백질 변성의 영향으로 모든 경우에 subtilisin에 민감함을 볼 수 있었다. 그리고 CD 스펙트럼에 의하면 55°C에서 S83G CRP의 α -helix 구조가 급격하게 파괴됨을 볼 수 있으나 전체적인 CRP 단백질 구조의 안정성에서 S128A CRP와 유사한 것으로 분광 광도계 실험의 결과에서 알 수 있다. 그러나 낮은 온도에서 S83G가 S128A 보다 cAMP에 대한 친화력이 커서 야생형에 더 가까운 구조를 가진다. 이것은 cAMP의 결합에 128번 아미노산이 더 중요하다는 것을 보여주는 결과이다.

결론적으로 야생형 CRP가 열에 가장 안정한 구조임을 알 수 있고 또한 cAMP binding pocket에 위치한 아미노산의 치환이 cAMP의 결합, CRP의 구조변화, 그리고 단백질의 열적 안정성에 영향을 준다.

최근의 연구 결과[15]에 의하면 CRP 단백질이 denaturant에 의해 변성될 때 첫 번째 단계로 dimer가 monomer로 해리되는 과정을 거쳐 두 번째 단계인 native monomer에서 변성된(unfolded) monomer로 가는 느린 과정을 따른다. 그러나 분광 광도계를 이용한 실험에서 앞에서 언급한 첫 번째 과정이 관찰되지 않았다. 이것은 dimer에서 monomer로 해리될 때 흡광도에 영향을 주는 아미노산들이 관여하지 않은 것으로 생각된다. 그래서 추가적으로 TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) 기법[16]으로 온도 기울기가 형성된 겔에서 실험한 결과에서도 확인이 어려웠다(발표되지 않은 결과).

그리고 흥미로운 것은 CRP의 cAMP 결합부위에 결합한 cAMP의 해리와 CRP dimer의 monomer로의 해리 중에서 어느 과정이 우선적인가? 하는 문제와 CRP에 두 분자의 cAMP가 결합하면 한 분자의 cAMP가 결합할 때와 CRP의 열적 안정성과 subtilisin digestion에 어떤 차이를 주는가? 하는 문제는 앞으로 해결해야 할 과제로 여겨진다.

요 약

cAMP 수용성 단백질인 CRP는 *Escherichia coli*에서 대사

와 관련된 유전자의 전사를 조절한다. 본 연구는 야생형과 돌연변이 CRP 단백질의 열적 안정성과 온도에 따른 단백질의 구조변화를 관찰하기 위하여 proteolytic digestion, UV spectrophotometer, CD spectropolarimeter 등의 방법을 사용하였다. cAMP가 없을 때는 야생형, S83G, S128A CRP가 열적 안정성에서 큰 차이를 보이지 않았지만, cAMP가 존재할 때 야생형 CRP가 다른 돌연변이 CRP보다 열적으로 더욱 안정함을 보였다. 그리고 protease digestion 실험을 통하여 높은 온도에서 cAMP의 존재와 무관하게 돌연변이 CRP에서 단백질의 변성으로 인한 절단된 단백질 띠를 관찰할 수 있었다. 그리고 55°C에서 측정된 CD 스펙트럼에서 단백질의 2차 구조인 α -helix 구조가 부분적으로 파괴되었음이 관찰되었다.

감사의 글

본 연구에서 CD 스펙트럼의 측정에 도움을 준 기초과학연구원 연구소 자기 공명실에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Makecki, J., A. Polit and Z. Wasylewski. 1993. Kinetics studies of cAMP-induced allosteric changes in cyclic AMP receptor protein from *Escherichia coli*. *J. of Biol. Chem.* **275**, 8480-8486.
2. Botsford, J. L., and J. G. Harman. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiological Reviews* **56**, 100-122.
3. Weber, I. T., and T. A. Steitz. 1987. Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **198**, 311-326.
4. Ammaerman, J. W., and F. Azam. 1987. Characteristics of cyclic AMP transport by marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2963-2966.
5. Krakow, J. S. and I. Patsan. 1973. Cyclic Adenosine monophosphate receptor: loss of cAMP-dependent DNA binding activity after proteolysis in the presence of cyclic adenosine monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 5090-5094.
6. Pampano, C., and J. S. Krakow. 1979. Cross-linking of the cAMP receptor protein of *Escherichia coli* by o-phenylenedimaleimide as a probe of conformation. *Biochemistry* **18**, 1519-1525.

7. Heyduk, T., and J. C. Lee. 1989. *Escherichia coli* cAMP receptor protein: evidence for three protein conformational states with different promoter binding affinities. *Biochemistry* **28**, 6914-6924.
8. Wu, F. Y., K. Nath and C. W. Wu. 1974. Conformational transition of cyclic adenosine monophosphate receptor protein of *Escherichia coli*. A fluorescent probe study. *Biochemistry* **13**, 2567-2572.
9. Lee, E. J., J. Glasgow, S.-F. Leu, A. O. Belduz, J. G. Harman. 1994. Mutagenesis of the cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli*: targeting position 83, 127 and 128 of the cyclic nucleotide binding pocket. *Nucleic Acids Research* **22**, 2894-2901.
10. Passner, J. M., and T. A. Steitz. 1997. The structure of a CAP-DNA complex having two cAMP molecules bound to each monomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 5090-5094.
11. Harman, J. G., K. McKenney and A. Peterkofsk. 1986. Structure-function analysis of three cAMP-independent forms of the cAMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 16332-16339.
12. Kunkel, T. A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 488-92.
13. Mukhopadhyay, J., R. Sur and P. Parrack. 1999. Functional roles of the two cyclic AMP-dependent forms of cyclic AMP receptor protein from *Escherichia coli*. *FEBS Letter* **453**, 215-218.
14. Makecki, J. and Z. Wasylewski. 1998. The effect of Ser 128 substitution on the structure and stability of cAMP receptor protein from *Escherichia coli*. *J. of Protein Chemistry* **17**, 219-228.
15. Makecki, J., and Z. Wasylewski. 1997. Stability and kinetics of unfolding and refolding of cAMP receptor protein from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **243**, 660-669.
16. Birmes, A., A. Sattler, K.-H. Maurer and D. Reisner. 1990. Analysis of the conformational transitions of proteins by temperature-gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* **11**, 795-801.