

**Direkte Regulation der mykobakteriellen
Adenylatcyclase Rv1625c durch den Quorum-
Sensing Rezeptor CqsS von *Vibrio harveyi***

Dissertation

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

vorgelegt von
Stephanie Beltz
aus Essen

Tübingen
2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	23.06.2016
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Joachim E. Schultz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Ruth

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei allen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben:

Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Joachim E. Schultz, für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr gute Betreuung während dieser Zeit. Ebenfalls möchte ich ihm danken für seine Unterstützung und guten Ideen sowie für sein Vertrauen in meine Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Ruth bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Klaus Hantke und Herrn Prof. Dr. Harald Groß danke ich sehr für die Abnahme meiner Promotionsprüfung. Herrn Prof. Hantke danke ich außerdem für die rasche Durchführung der *in vivo* Tests und viele anregende Diskussionen.

Für die zur Verfügung gestellten CqsS- und LqsS-Klone bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Kirsten Jung bzw. Herrn Prof. Dr. Hubert Hilbi.

Herrn Dr. Werner Zimmermann und Herrn JProf. Dr. Pierre Koch danke ich für die Herstellung der Liganden CAI-1 und LAI-1 bzw. 3, 4 – Tridecandiol.

Des Weiteren danke ich Jens Baßler für die erfolgreiche und freundliche Zusammenarbeit und die vielen anregenden fachlichen Diskussionen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Anita Schultz bedanken für die tolle Zusammenarbeit und die Klonierung zahlreicher Konstrukte.

Frau Yinglan Guo danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und stets fröhliche Art.

Allen Mitarbeitern der 7. und 9. Ebene danke ich für die freundliche Atmosphäre. Ein besonderer Dank gilt hierbei den Doktorandinnen der Arbeitskreise Ruth und Lukowski für die herzliche Aufnahme und ihre Freundschaft.

Meinen Kolleginnen Ursula Kurz, Dr. Janani Natarajan, Dr. Simone Breitkopf und Miriam Ziegler danke ich für die tolle Zeit sowie für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung und Motivation im und außerhalb des Laboralltags.

Der größte Dank geht an meine Familie, die mich stets liebevoll unterstützt hat und mir immer die Möglichkeit gab meine Träume zu verfolgen. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen!

Ein ganz spezieller Dank gilt meinem Freund Benjamin, dass er in allen Lebenslagen für mich da ist und mich stets zum Lachen bringt. Vielen Dank, dass du mir immer den Rücken frei hältst. Mein Zuhause ist da, wo du bist!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Signaltransduktion	1
1.2	Adenylatcyclasen	1
1.2.1	Mammalia Adenylatcyclasen	2
1.2.2	Mykobakterielle AC Rv1625c	3
1.3	Quorum-Sensing	5
1.3.1	Homologe Quorum-Sensing Systeme	6
1.3.2	Quorum-Sensing System in <i>L. pneumophila</i>	6
1.3.3	Quorum-Sensing System in <i>V. cholerae</i> und <i>V. harveyi</i>	7
1.4	Ziel der Arbeit	9
2	Material	11
2.1	Chemikalien und Enzyme	11
2.2	Bakterienstämme	11
2.3	Plasmide	12
2.4	„Kits“	12
2.5	DNA-und Proteinmarker	12
2.6	Antikörper	12
2.7	Oligonukleotide (Primer)	13
2.7.1	Oligonukleotide zur Herstellung von Plasmid-Konstrukten	13
2.7.2	Oligonukleotide zur Sequenzierung	18
2.8	Geräte	18
2.9	Sonstige Materialien	19
2.10	Software	19
2.11	Zugangsnummern	19
3	Methoden	20
3.1	Molekularbiologische Methoden	20
3.1.1	Nährmedien und Antibiotika	20
3.1.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	20
3.1.2.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	20
3.1.2.2	Transformation von Bakterienzellen	21
3.1.3	Plasmidpräparation aus Bakterien	21
3.1.4	Sequenzspezifische Restriktion von DNA	21
3.1.5	Dephosphorylierung von DNA - Fragmenten	22
3.1.6	Auftrennung von DNA - Fragmenten	22
3.1.7	Isolierung von DNA - Fragmenten aus Agarosegelen	22

3.1.8	Ligation von DNA - Fragmenten	23
3.1.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	23
3.1.10	DNA - Sequenzierung	23
3.1.11	Herstellung von Bakterienstammkulturen	23
3.1.12	Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
3.1.12.1	„Site – directed Mutagenesis by overlap extension using PCR“	24
3.1.12.2	„QuickChange – PCR“ (site directed mutagenesis) nach Stratagene	27
3.1.13	Klonierungsplan	29
3.1.13.1	Verknüpfungsvarianten der CqsS-Rv1625c Chimäre	29
3.1.13.2	Austausch der Aminosäure an Position 166 im CqsS-Rezeptor	38
3.1.13.3	Mutationen in der 6. TM von CqsS.....	41
3.1.13.4	Mutationen hoch konservierter ASn in der 2. und 4. TM	43
3.1.13.5	Transmembranaustausch von CqsS gegen LqsS.....	43
3.1.13.6	Transmembranaustausch von Rv1625c gegen CqsS.....	49
3.1.13.7	Dimerisierungskonstrukte im pETDuet-3	50
3.1.13.8	Verknüpfungsvarianten der LqsS-Rv1625c Chimäre	55
3.1.13.9	Weitere Konstrukte	59
3.2	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	61
3.2.1	Expression.....	61
3.2.2	Zellernte.....	61
3.2.3	Zellaufschluss.....	62
3.2.4	Solubilisation.....	63
3.2.5	Proteinreinigung.....	63
3.2.6	Dialyse.....	65
3.2.7	Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration.....	66
3.2.7.1	Bradford - Test.....	66
3.2.7.2	Proteinbestimmung nach Warburg und Christian	66
3.2.8	SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE).....	67
3.2.9	Immundetektion von Proteinen („Western - Blotting“).....	69
3.2.9.1	Proteintransfer	69
3.2.9.2	Immundetektion	70
3.2.10	Adenylatcyclase Test.....	71
3.2.11	Statistik	74
4	Ergebnisse	75
4.1	Die direkte Regulation einer bakteriellen Klasse IIIa Adenylatcyclase.....	75
4.1.1	Verknüpfung von CqsS _{Vh} an Rv1625c ₂₀₁₋₄₄₃ , L ₂₀₂₋₄₄₃ oder R ₂₀₃₋₄₄₃	76
4.1.2	Verknüpfung von CqsS _{Vh} an Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃	77
4.2	Optimierung der Expressionsbedingungen.....	79
4.2.1	Proteinexpression in Abhängigkeit von IPTG-Konzentration und Zeit	79
4.2.2	Proteinexpression in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit.....	80
4.3	Signaltransduktion erfordert Homodimerisierung des Membranankers.....	81

4.4	Position 166 in CqsS_{vh} beeinflusst die Stärke des Liganden-	
	vermittelten Signals	85
4.5	Kinetische Charakterisierung von CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃	89
4.5.1	Substratkinetik	89
4.5.2	Proteinabhängigkeit	91
4.5.3	Zeitabhängigkeit	91
4.5.4	Temperaturabhängigkeit	92
4.5.5	pH-Abhängigkeit	92
4.6	Eigenschaften der Aminosäuren und deren Position in der 6. TM für die	
	Signalweiterleitung entscheidend	93
4.7	Alle Transmembranhelices sind für die Signaltransduktion notwendig	94
4.8	Die Aktivierung der Chimäre CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ durch CAI-1	
	ist irreversibel	98
4.9	Versuche einer Solubilisation und Reinigung von	
	CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃.....	102
5	Diskussion	106
5.1	Bioinformatische Analysen stützen Rezeptorfunktion – Eine Hypothese	110
6	Zusammenfassung	115
7	Anhang	116
7.1	Anhang 1.....	116
7.2	Anhang 2.....	121
7.3	Anhang 3.....	122
8	Literaturverzeichnis.....	123

Abkürzungsverzeichnis

AC(n)	Adenylatcyclase(n)
AI	Autoinducer
As-Primer	Antisense-Primer
AS(n)	Aminosäure(n)
A _x	Absorption bei x nm
C1, C2	Katalytische Domänen in Mammalia-ACn
CAI-1	<i>Cholera</i> Autoinducer-1
CHD	Cyclase Homology Domain
CqsS	<i>Cholera</i> Quorum-Sensing Sensor
C-terminal	Carboxyterminal
GPCR(s)	G-Protein gekoppelte(r) Rezeptor(en)
HisK	Histidinkinasen
LAI-1	<i>Legionella</i> Autoinducer-1
LqsS	<i>Legionella</i> Quorum-Sensing Sensor
M1, M2	Membrananker (hier in Mammalia-ACn)
MP	Membranpräparation
N-terminal	Aminoterminal
OD _x	Optische Dichte bei x nm
QS	Quorum-Sensing
s-Primer	Sense-Primer
T _m	Anlagerungstemperatur für Primer (melting temperature)
TM	Transmembranhelix

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Zellen aus allen Phyla kommunizieren untereinander und miteinander und ermöglichen so eine Anpassung und Reaktion auf unterschiedliche Umweltfaktoren wie Temperatur, pH-Wert, Verfügbarkeit von Sauerstoff, Nährstoffe oder Veränderungen in der Zelldichte. Hierbei kommt es zu Wechselwirkungen innerhalb eines Zellverbandes, zwischen Bakterien und ihrer Wirtszelle oder zwischen Bakterien selbst. Die Aufnahme eines externen oder internen Signals, dessen biochemische Umsetzung und die angestrebte Adaptation des Metabolismus werden dabei über verschiedene Signalwege vermittelt. Ein Prototyp eines solchen Signalwegs ist die Bindung von primären Botenstoffen wie beispielsweise Hormone an einen in der Zellmembran verankerten Rezeptor, welcher über eine Konformationsänderung die Biosynthese eines sekundären Botenstoffs (z.B. cAMP oder cGMP) stimuliert. Letzterer bindet verschiedene Zielmoleküle, unter anderem cAMP-abhängige Proteinkinasen (1,2) oder Ionenkanäle (3). Abhängig von der Konzentration des sekundären Botenstoffs werden unterschiedliche Prozesse wie die Transkription, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung (4), der Stoffwechsel, Entzündungsprozesse oder Ionenkanäle reguliert. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, derartige Signalwege und die Rolle sekundärer Botenstoffe im Detail zu verstehen.

1.2 Adenylatcyclasen

Adenylatcyclasen (ACn) wandeln in beinahe allen Zellen verschiedene externe Stimuli in ein einheitliches intrazelluläres cAMP-Signal um. Hierbei wird Adenosintriphosphat (ATP) unter Abspaltung von Pyrophosphat zu zyklischem 3', 5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) umgebaut. Die dadurch angestoßene Signalkaskade führt in Eukaryoten zur Bindung von cAMP an Proteinkinasen oder Ionenkanälen und aktiviert in Prokaryoten unter anderem die Transkription (5). Der Abbau von cAMP zu AMP erfolgt durch Phosphodiesterasen (6).

Die bisher identifizierten ACn wurden aufgrund ihrer Sequenz- und Strukturunterschiede in sechs AC-Klassen eingeteilt (7). Hierbei zählen ACn aus

Enterobakterien (z.B. *Escherichia coli* und *Yersinia enterocolitica*) zur Klasse I. Die Klasse II ACn bilden sezernierte Toxine u.a. von Vertretern wie *Pseudomonas aeruginosa* (8), *Bacillus anthracis* (9) und *Bordetella pertussis* (10). Die Klassen IV-VI beschränken sich, mit wenigen Isoformen, ausschließlich auf Bakterien (7,11). Eine universelle, gleichzeitig jedoch sehr heterogene Gruppe von ACn sind Klasse III – Isoformen. Die bakteriellen Klasse III ACn weisen eine hohe Domänendiversität innerhalb ihrer meist N-terminal lokalisierten, regulatorischen Domänen auf (11). Aufgrund von Sequenzeigenheiten innerhalb der katalytischen Domänen werden AC-Klasse III Isoenzyme in vier Unterklassen, a bis d, unterteilt (11). Ein Beispiel hierfür ist die spezifische Variante der Substraterkennung der Klasse IIIb ACn, bei der ein Substrat-bindendes Aspartat durch Serin oder Threonin ersetzt ist (11).

Die Omnipräsenz der ACn, ihre strukturelle Divergenz sowie deren Domänenvielfalt sowohl zwischen den Arten als auch innerhalb eines Bakteriums legen die Vermutung nahe, dass ACn evolutionär bedingt speziellen regulatorischen Anforderungen entsprechen.

1.2.1 Mammalia Adenylatcyclasen

Die am besten untersuchten ACn stammen aus Säugetieren. Neun von zehn Isoformen der Mammalia-ACn werden der Unterklasse IIIa zugeordnet. Davon kommen neun an die Membran gebunden (I-IX) und eine löslich (X, Klasse IIIb) vor (12). Die membranständigen Mammalia ACn weisen einen pseudoheterodimeren Aufbau auf. Diese durchgehende Proteinkette besteht aus zwei Membranankern (M1 oder M2) und zwei komplementären katalytischen Einheiten (C1a oder C2a), welche über einen Linker (C1b) verbunden sind (13), M1-C1a-C1b-M2-C2a-C2b. Der Membrananker besteht aus 2 x 6 die Membran durchspannenden α -Helices. Dies entspricht in etwa 40% des Proteins. Anlass für Spekulationen gab der Umfang des Membranankers hinsichtlich einer möglichen Funktion als Transporter oder Ionenkanal (13). Sequenzähnlichkeiten lassen eine weitere Unterteilung in vier Gruppen zu: ACn 1, 3 und 8 (Gruppe 1); ACn 2, 4 und 7 (Gruppe 2); ACn 5 und 6 (Gruppe 3). AC 9 bildet die vierte Gruppe. Die AS-Sequenz der katalytischen Domänen C1a und C2a sind sowohl untereinander als auch zwischen den unterschiedlichen AC-Isoformen hoch konserviert (14). Mammalia ACn besitzen nur eine katalytisch aktive ATP-Bindungstasche (15), während homodimere bakterielle

ACn zwei aktive Taschen aufweisen (Abb. 1B). Das katalytische Zentrum wird an der Grenzfläche der Monomere gebildet. Sechs für die Katalyse verantwortliche Aminosäuren (ASn) wurden identifiziert. Hierbei handelt es sich um zwei Aspartatreste in C1a, welche ein Me^{2+} - Ion binden. Zur Purinidentifizierung dienen Lysin- und Aspartat - Reste in C2a. Arginin und Asparagin in der C2a-Domäne dienen der Stabilisierung des Übergangszustandes von ATP zu cAMP (11). Eine physiologische Rolle der „inaktiven“ Bindungstasche in Mammalia ACn ist unbekannt. Sie dient als Bindungsstelle für das pflanzliche Diterpen Forskolin (15-19). Die Regulation der neun membranständigen ACn erfolgt indirekt über GPCRs. Eine gleichartige Regulation ist für bakterielle AC-Isoformen unbekannt.

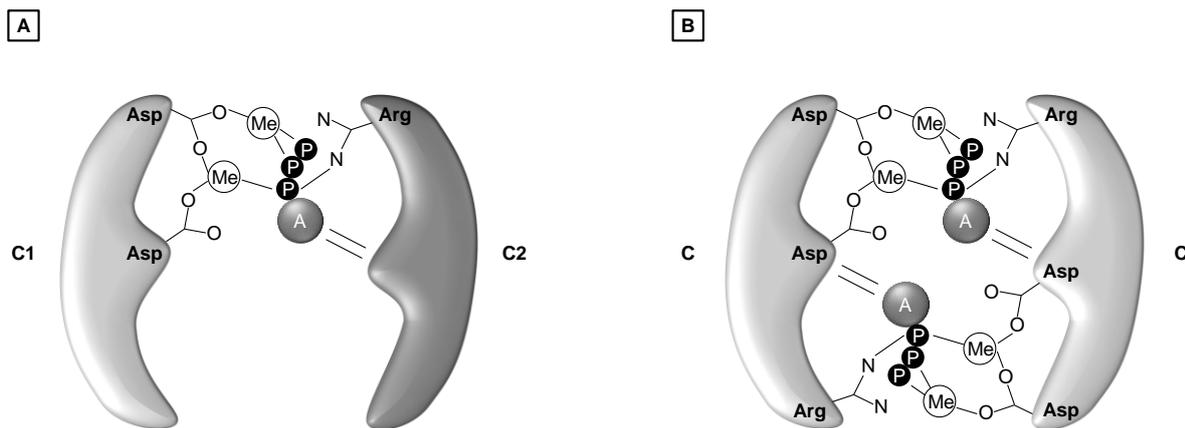


Abb. 1: Dimerisierung der katalytischen Domänen der Klasse III ACn (modifiziert nach (20))

[A] Heterodimerisierung der Cyclase Homology Domain (CHD) mit einem katalytischem Zentrum.

[B] Homodimerisierung der CHD mit zwei katalytischen Zentren.

Me: Metallionen; P: Phosphatgruppe; A: Adenosin; Asp: Aspartat; Arg: Arginin.

1.2.2 Mykobakterielle AC Rv1625c

Mycobacterium tuberculosis, der Erreger der Tuberkulose, ist ein grampositives Bakterium. Dies ist weltweit eine der tödlichsten Infektionskrankheiten (Global Tuberculosis Report 2015, 20th edition World Health Organization = WHO). Ein Charakteristikum von *M. tuberculosis* ist die in der wachsartigen Zellwand enthaltene Mykolsäure. Sie ermöglicht der stäbchenförmigen Zelle eine erhöhte Säuretoleranz und somit ein Überleben im Lysophagosom.

Das Genom von *M. tuberculosis* H37Rv codiert für insgesamt 15 ACn (21) sowie für ein Pseudogen (Rv1120c (22)). Darunter befinden sich fünf ACn mit einem 6TM-Membrananker (Rv1625c, Rv1318, Rv1319, Rv1320 und Rv3645). Zu den ACn

zählen sowohl membrangebundene (Rv1625c, Rv2435c, Rv1318, Rv1319, Rv1320 und Rv3645) als auch lösliche ACn (wie z.B. Rv1264, Rv1900c, Tab. 1). Einige wurden biochemisch und teilweise auch strukturell charakterisiert (20,23-28).

Klasse	AC	Aminosäuren					
		Metall- bindung		Substrat- bindung		Stabilisierung	
IIIa	Rv1625c *	D	D	K	D	N	R
	Rv2435c	+	N	R	+	S	Q
IIIb	Rv1318c *	+	+	+	T	+	+
	Rv1319c *	+	+	+	T	+	+
	Rv1320c *	+	+	+	T	+	+
	Rv3645 *	+	+	+	T	+	+
IIIc	Rv0386 *	+	+	Q	N	+	+
	Rv0891c	+	+	R	L	+	+
	Rv1264 *	+	+	+	+	+	+
	Rv1358	+	S	Q	T	+	C
	Rv1359	G	+	Q	I	+	E
	Rv1647 *	+	+	+	+	+	+
	Rv1900c *	+	+	N	+	H	+
	Rv2212 *	+	+	+	+	+	+
	Rv2488c	+	+	Q	N	D	R

Tab. 1: Einteilung der 15 ACn aus *Mycobacterium tuberculosis* Stamm H37Rv (modifiziert nach (11))

(+) Kennzeichnet hierbei die konservierten ASn. Mit einem Stern (*) markiert wurden ACn, die nach einer Expression in *E. coli* eine enzymatische Aktivität aufwiesen (20,22-31). Rv2435c, Rv1358, Rv1359, Rv2488c hatten als exprimierte Proteine keine nennenswerte AC-Aktivität (persönliche Mitteilung durch J. E. Schultz).

Die Adenylatcyclase Rv1625c entspricht der Hälfte einer membrangebundenen Säuger-AC und gehört in die Klasse IIIa. Die mykobakteriellen ACn der Klasse IIIb besitzen zwischen ihrem 6TM-Membrananker und der katalytischen Domäne eine Signaltransduktionseinheit, eine HAMP-Domäne. Die Abkürzung entspricht dem Vorkommen in **H**istidin-Kinasen, **A**denylatcyclasen, **M**ethyl-akzeptierenden Chemotaxisrezeptoren und **P**hosphatasen (32). In allen Fällen wird an der Grenzfläche beider Monomere das katalytische Zentrum gebildet. Durch die Bildung von funktionellen Homodimeren werden, im Gegensatz zu Mammalia-ACn, zwei katalytisch aktive ATP-Bindungstaschen erzeugt (11).

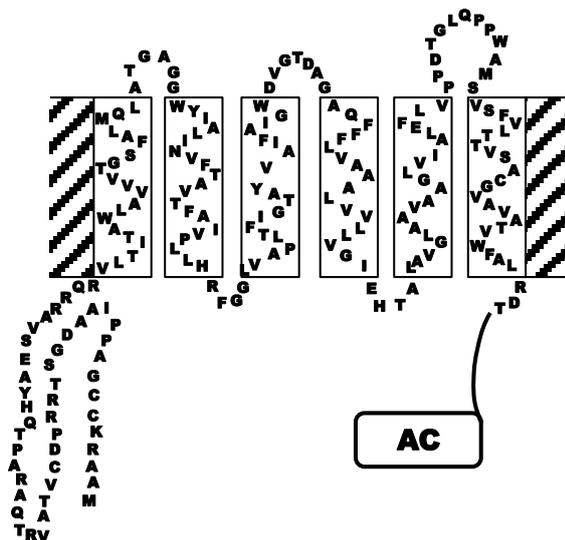


Abb. 2: Vorhergesagte Sekundärstruktur der Rv1625c AC (33)

Angegeben sind die ASn der Transmembrandomäne.

Bakterien haben viele spezifische Mechanismen zur Vermehrung in ihrem Wirt entwickelt. Ein häufig verwendeter Mechanismus ist die Injektion von Enzymen in die Wirtszelle, welche die Bildung von sekundären Botenstoffen, wie zum Beispiel cAMP, regulieren und somit die Signaltransduktion stören. Nach dem Eindringen in den Wirtsorganismus wird *M. tuberculosis* von den sogenannten Fresszellen des Immunsystems, den Makrophagen, erkannt und durch Phagozytose aufgenommen. Durch die Verschmelzung des Phagosoms mit einem Lysosom zum Phagolysosom werden die Bakterien in der Regel neutralisiert. Diesen Schritt unterbindet *M. tuberculosis*. Ob dabei das cAMP-Signaltransduktionssystem eine Rolle spielt ist Gegenstand vielfältiger Spekulationen (21,30,31,34). Die cAMP-Konzentration in *in vitro* wachsenden Mykobakterien überstieg die anderer Bakterien um ein hundertfaches (30,35). Ebenso wiesen mit *M. tuberculosis* infizierte Makrophagen *in vitro* erhöhte cAMP-Werte auf (36-38). Daher wird die erhöhte cAMP-Konzentration innerhalb der Wirtszelle mit der Virulenz des Pathogens in Verbindung gebracht (36,39). Welche physiologische Rolle das cAMP für das Pathogen genau einnimmt, ist unklar.

1.3 Quorum-Sensing

Quorum-Sensing (QS) ist eine Form der Zell-Zell-Kommunikation, welche Bakterien befähigt ihre lokale Populationsdichte durch Bindung extrazellulärer Signalmoleküle

zu evaluieren und ihre Genexpression daraufhin anzupassen (40-43). Diese Signalmoleküle, genannt Autoinducer, werden von den Zellen synthetisiert und sezerniert. Wird eine Schwellenkonzentration der Autoinducer überschritten, werden entsprechende Gene, wie etwa für Biolumineszenz, Biofilmproduktion, Antibiotikaproduktion, Sporenbildung und Virulenzgene (44) reprimiert oder induziert. Damit stellt das QS ein wichtiges Signaltransduktionssystem in Prokaryoten dar (45).

1.3.1 Homologe Quorum-Sensing Systeme

Bioinformatische Analysen des Genoms zeigten, dass der Choleraerregers *V. cholerae* und der Erreger der Legionärskrankheit, *L. pneumophila*, Homologe QS-Gencluster, bekannt als *cqs* (46) und *lqs* (47), besitzen. *Cholera* Quorum-Sensing (*cqs*) und *Legionella* Quorum-Sensing (*lqs*) kodieren für verwandte AI-Synthasen und Sensorhistidinkinasen (CqsA/CqsS und LqsA/LqsS). Sie produzieren und detektieren die nahezu identischen α -Hydroxyketone 3-hydroxytridekan-4-on (CAI-1) und 3-hydroxypentadekan-4-on (LAI-1) (48,49). Beide AI-Synthasen stimmen in ihrer AS-Sequenz zu 45% und die sechs Transmembranhelices der Sensorhistidinkinasen zu 29% überein (49). Über die N-terminale Rezeptordomäne, CqsS bzw. LqsS, welche sich in der Cytoplasmamembran befinden, werden die Autoinducer detektiert (50).

1.3.2 Quorum-Sensing System in *L. pneumophila*

Quorum-Sensing Systeme (QSS) sind Zweikomponenten-Systeme (TCS = two component system), bestehend aus einer Histidinkinase und einem Antwortregulator. Ein Beispiel für eine derartige orthodoxe Histidinkinase (HK) ist das QSS aus dem gramnegativen Bakterium *Legionella pneumophila*. Es setzt sich aus dem LqsA-abhängigen *Legionella* Autoinducer-1 (LAI-1) und dessen Sensor LqsS zusammen. Durch die Bindung des extrazellulären Signalmoleküls (LAI-1) an LqsS wird der konservierte Histidinrest innerhalb der Sensorkinase autophosphoryliert und die Phosphatgruppe auf den Antwortregulator LuxR übertragen. LuxR spielt eine Rolle in der Genexpression für die Zellteilung, die Virulenz, die Beweglichkeit und kontrolliert den Übergang vom stationären zum virulenten Zyklus (47,51). Ebenso scheint LuxR in die Interaktion von *L. pneumophila* mit Phagozyten involviert zu sein (47).

1.3.3 Quorum-Sensing System in *V. cholerae* und *V. harveyi*

Neben der prototypischen Sensorkinase im TCS (einmalige His-Asp-Abfolge s. 1.3.2), existiert auch ein erweitertes System, mit zusätzlicher Regulator- und Histidin-Phosphotransferdomäne (His-Asp-His-Asp-Abfolge) (52,53). Aufgrund der zusätzlichen Empfängerdomäne des Antwortregulators (AR) werden die membranständigen Sensorkinasen zu der Familie der Hybridsensorkinasen gezählt. Vertreter hierfür sind das LuxQ/CqsS-LuxU-LuxO System in *V. cholerae* und das LuxN/LuxQ/CqsS-LuxU-LuxO System in *V. harveyi*, welches im Vergleich zu *V. cholerae* eine zusätzliche Sensorkinase (LuxN) enthält (54,55). Jede dieser membranständigen Hybridsensorkinasen detektiert einen spezifischen AI. Das intraspezifische HAI-1 (**H**arveyi **A**utoinducer-1) wird von LuxN erkannt und bildet das System 1. Als System 2 wird das Protein LuxQ im Zusammenwirken mit dem periplasmatischen Bindeprotein LuxP bezeichnet, welches den AI-2 (**A**utoinducer-2) bindet. Das **Q**uorum-**S**ensing **S**ystem (QSS) CqsS wurde zuerst in dem humanen Pathogen *V. cholerae* entdeckt und danach benannt. Es detektiert den Autoinducer CAI-1 (**C**holera **A**utoinducer-1) (46).

Die *V. cholerae* Quorum-Sensing Kaskade sowie die stromabwärts liegenden Regulatoren LuxU, LuxO, sRNA, Hfq und HapR (welches ein Homolog zum LuxR in *V. harveyi* ist) sind analog zu *V. harveyi* (46,56). Jedoch unterscheiden sich beide Organismen in den Funktionen, die durch das QSS kontrolliert werden. Beispiele hierfür sind die Virulenz in *V. cholerae* oder die Biolumineszenz (57,58) und die Typ-III-Sekretion (54) in *V. harveyi*.

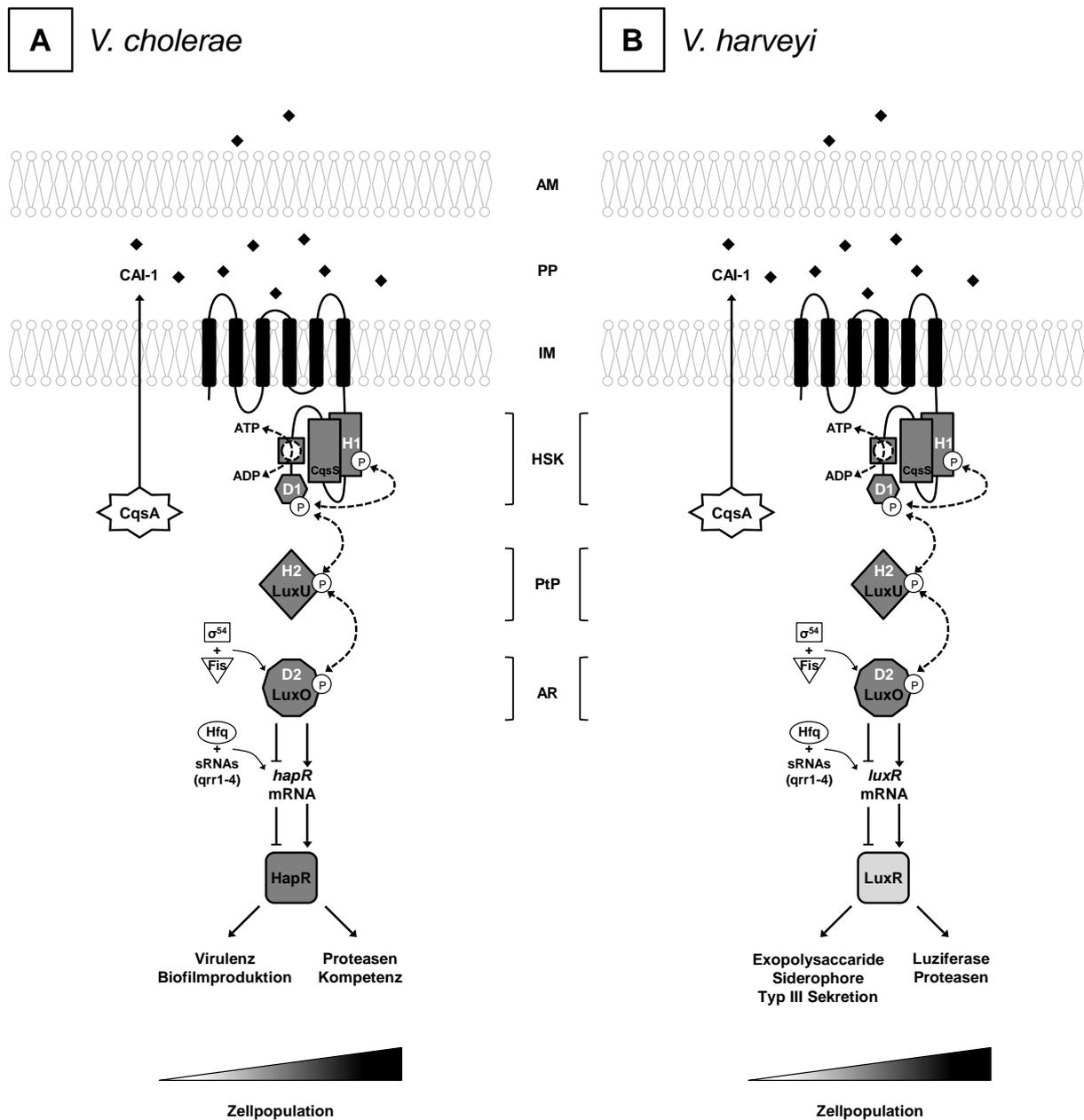


Abb. 3: Signaltransduktion in [A] *V. cholerae* und [B] *V. harveyi* abhängig von der Autoinducer-Konzentration (adaptiert nach (50,59))

Bei geringer Zelldichte und somit bei Abwesenheit der Autoinducer liegen die Rezeptoren bzw. Sensoren als Kinase vor und phosphorylieren mittels des Phosphotransferproteins (PtP) LuxU das Empfängerprotein LuxO (60-62). Zusammen mit dem Sigmfaktor RpoN (σ^{54}) und dem Phospho-LuxO (LuxO~P) wird die Expression von vier regulatorischen sRNAs (qrr1-4) induziert. Diese sRNAs destabilisieren zusammen mit dem RNA Chaperon Hfq die hapR mRNA (in *V. cholerae*) bzw. luxR mRNA (in *V. harveyi*) (56,63). Dies führt zu einer Abnahme von HapR bzw. LuxR. Geringe Mengen an HapR fördern die Biofilmproduktion sowie die Expression von Virulenzfaktoren. Ohne den Masterregulator LuxR in *V. harveyi* können die Luziferasegene nicht transkribiert werden (54,56,64,65).

Nach erfolgreicher Kolonisierung des Bakteriums kommt es durch die erhöhte Zelldichte zu einer

Akkumulation der sezernierten Autoinducer. Dies resultiert in einer Funktionsänderung des Sensor-Komplexes, der nun als Phosphatase agiert (62). Die Phosphorylierungskaskade verläuft fortan umgekehrt und führt durch die Dephosphorylierung von LuxO~P zu einem inaktiven LuxO (60), welches den Transkriptionsfaktor der sRNAs qrr1-4 nicht länger aktivieren kann. Die Translation der mRNAs hapR (*V. cholerae*) und luxR (*V. harveyi*) (56) sowie der damit verbundene zelluläre Anstieg von HapR bzw. LuxR sind die Folge. Durch eine erhöhte Konzentration des jeweiligen Proteins in der Zelle werden die Gene für Virulenz und Biofilmproduktion im Falle von HapR (*V. cholerae*) inhibiert und in *V. harveyi* durch die Zunahme an LuxR z.B. die Biolumineszenzgene induziert.

AM = äußere Membran; PP = Periplasma; IM = innere Membran; HSK = Hybridsensorkinase; PtP = Phosphotransferprotein; Fis = DNA bindendes Protein; AR = Antwortregulator; H1 / H2 = Histidinreste, D1 / D2 = Aspartatreste, die phosphoryliert bzw. dephosphoryliert werden.

1.4 Ziel der Arbeit

Alfred G. Gilman publizierte 1989 die Primärsequenz einer Säugetier-AC (13). Unter der Prämisse, dass die Adenylatcyclasen (AC) ausschließlich über G-Proteine reguliert werden, erschien die Größe des Membranankers mit 2 x 6TMs überdimensioniert und gab Anlass für Spekulationen hinsichtlich möglicher ATP-getriebener Transporter- oder Ionenkanalfunktionen (13). Ebenso auffällig ist die Tatsache, dass die katalytischen Domänen im Gegensatz zu den Membranankern durchgängig konserviert sind. Dies spricht für einen katalytischen Mechanismus, welcher im Falle einer Rezeptorfunktion einer direkten Regulation durch unterschiedliche Liganden zugänglich wäre.

Die direkte Regulation einer kanonischen Klasse IIIa AC über ihren eigenen Membrananker / Rezeptor wurde bislang nicht gezeigt. Zur Untersuchung der Klasse IIIa ACn bat sich die mykobakterielle AC Rv1625c an, welche der Hälfte einer tierischen AC (20,66) entspricht und sich, im Gegensatz zu diesen, problemlos exprimieren lässt.

In dieser Arbeit sollte der Membrananker der Rv1625c AC durch die baugleiche Membrandomäne des QS-Rezeptors aus *V. harveyi*, CqsS, ersetzt und eine direkte Regulation durch den spezifischen Liganden CAI-1 angestrebt werden. Dieser Rezeptor verfügt ebenso wie die AC Rv1625c über kurze transmembrane α -Helices und außergewöhnlich kurze Schlaufen, die diese verknüpfen.

In diesem Zusammenhang sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Ist der Membrananker einer Klasse IIIa AC austauschbar gegen einen QS-Rezeptor gleicher Bauart?
- Besitzt der Membrananker eine Funktion, die über die schlichte Ankerfunktion hinaus geht?
- Von der katalytischen Domäne ist bereits bekannt, dass sie um eine enzymatische Aktivität zu erhalten dimerisieren muss. Gilt dies ebenso für den Membrananker, der auch Bestandteil jedes Monomers ist (2 x 6TMs)?
- Sollte sich dies bestätigen, stellt sich die Frage, ob beide TM-Monomere für die Ligandenbindung und die anschließende Signaltransduktion erforderlich sind und diese Reaktion reversibel ist?

Die direkte Regulation einer Klasse IIIa AC durch extrazelluläre Signale, wie zum Beispiel Liganden, würde nicht nur die Hypothese einer Rezeptorfunktion stärken, sondern ebenso für die Entdeckung eines weiteren Regulationsmechanismus neben der indirekt-vermittelten GPCR-Regulation sprechen.

2 Material

2.1 Chemikalien und Enzyme

Standardchemikalien wurden von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich und Merck bezogen. DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsenzyme stammten von den Firmen Roche Diagnostics und New England Biolabs. dNTPs und KAPAHiFi-Polymerase waren von PEQLAB. Davon abweichende Bezugsquellen werden im Text gesondert vermerkt. Kommerzielle Kits sowie die Zusammensetzung von verwendeten Lösungen und Puffern sind zusammen mit den entsprechenden Methoden im Methodenteil aufgeführt.

Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit demineralisiertem oder Reinstwasser (18,3 MΩ/cm) angesetzt. Dieses wurde mit einer MilliQ-Filtrationsanlage hergestellt.

[α - ³²P]-ATP wurde von Hartmann Analytik, [2,8 - ³H]-cAMP (Ammoniumsalz) und LSC-Szintillator Cocktail Ultima Gold XR von Perkin Elmer bezogen.

2.2 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> Stamm	Genotyp	Verwendungszweck	Herkunft
BL-21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm(DE3)</i>	Klonierung und Proteinexpression	Novagen
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Klonierung	Invitrogen
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Klonierung	Stratagene

Tab. 2: Verwendete *E.coli* Stämme

2.3 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Hersteller
pBluescript II SK (-)	Klonierungsvektor, <i>lacZa</i> , ColE1-origin, f1(-)-origin, Amp ^R	Stratagene
pETDuet-3	pETDuet: MCS1 von pQE30; modifiziert durch Anita Schultz	
pQE30	Expressionsvektor, N-terminal (His) ₆ -tag	Qiagen
pQE80 _L	Expressionsvektor, N-terminal (His) ₆ -tag	Qiagen

Tab. 3: Verwendete Plasmide

2.4 „Kits“

Kit	Verwendungszweck	Hersteller
KAPAHiFi PCR Kit	Zur DNA-Amplifizierung	PEQLAB
Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder aus einem PCR-Ansatz	Süd-Laborbedarf
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	Promega
Rapid DNA Ligation Kit	Ligation von DNA mit "blunt" oder "sticky" Enden	Roche

Tab. 4: Verwendete „Kits“

2.5 DNA-und Proteinmarker

Marker	Verwendungszweck	Hersteller
λ-DNA	DNA-Längenstandard	Roche
Proteinmarker I	"Unstained" Proteinmarker	PEQLAB
peqGOLD Protein-Marker IV	"Prestained" Proteinmarker	PEQLAB

Tab. 5: Verwendete DNA-und Proteinmarker

2.6 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Hersteller
Primärer AK	monoklonaler Maus-anti-RGS-His ₄ Antikörper	Qiagen
Primärer AK	S-tag monoklonaler Antikörper	Merck
Sekundärer AK	ECL Plex Ziege-anti-Maus IgG-Cy3 Sekundärantikörper	VWR

Tab. 6: Verwendete Antikörper

2.7 Oligonukleotide (Primer)

2.7.1 Oligonukleotide zur Herstellung von Plasmid-Konstrukten

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net GmbH, Ulm bezogen.

CqsS-Konstrukte Primer-Nr. / Herkunft	Verwendung für Konstrukt/e	Orientierung	Sequenz 5'→3'	Restriktions- schnittstelle
1	N-terminal (Anfang) CqsS	s	aaaggatccatggacgcgattcgcaaa	BamHI
2	CqsS ₁₋₁₇₂ -Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	as	agtatcacgtacctggtttcggaagta	
3	CqsS ₁₋₁₇₂ -Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	s	aaccaggtacgtgatactgctcgagcg	XhoI
4	C-terminal (Ende) Rv1625c (ΔXhoI)	as	aaaaagcttctagaccctgccgtgcgggg	HindIII
5	CqsS ₁₋₁₆₈ -Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	as	agtatcacggaagttagaacaagttaccaa	
6	CqsS ₁₋₁₆₈ -Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	s	ttctacttcggtgatactgctcgagcg	XhoI
9	CqsS ₁₋₁₉₆ -Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	s	aaccactccgtgatactgctcgagcggag	XhoI
10	CqsS ₁₋₁₉₅ -Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	s	cgaaaccacgtgatactgctcgagcggag	XhoI
11	CqsS ₁₋₁₉₀ -Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	s	atcgcccatcggtgatactgctcgagcggag	
12	CqsS ₁₋₁₉₆ -Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	as	agtatcacggagtgggtttcgcatttc	
13	CqsS ₁₋₁₉₅ -Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	as	agtatcacgtgggtttcgcatttcg	
14	CqsS ₁₋₁₉₀ -Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	as	agtatcacgatgggcgataccgcccc	
U. Kurz 1	CqsS _{1-168/172/181/190/195/196} F166C-Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	s	ggtaacttggtgctacttccg	
U. Kurz 2	CqsS _{1-168/172/181/190/195/196} F166C-Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	as	cggaagtagcacaagttacc	
15	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166C-Rv1625C ₂₀₁₋₄₄₃	s	tgctacttcgcgctgctgatactgct	
16	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166C-Rv1625C ₂₀₁₋₄₄₃	as	acgcagcgcgaagtagcacaagttacc	
17	CqsS ₁₋₁₇₂ :F166C-Rv1625C ₂₀₁₋₄₄₃	s	aaccaggtagcgcgtgctgatactgct	AfeI
18	CqsS ₁₋₁₇₂ :F166C-Rv1625C ₂₀₁₋₄₄₃	as	acgcagcgcctacctggtttcggaagta	AfeI
19	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166C-Rv1625C ₂₀₂₋₄₄₃	s	tgctacttcctgctgatactgctcga	
20	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166C-Rv1625C ₂₀₂₋₄₄₃	as	atcacgcaggaagtagcacaagttacc	
21	CqsS ₁₋₁₇₂ :F166C-Rv1625C ₂₀₂₋₄₄₃	s	aaccaggtactgctgatactgctcga	
22	CqsS ₁₋₁₇₂ :F166C-Rv1625C ₂₀₂₋₄₄₃	as	atcacgcagtagacctggtttcggaagta	

CqsS-Konstrukte				
Primer-Nr. / Herkunft	Verwendung für Konstrukt/e	Orientierung	Sequenz 5'→3'	Restriktions-schnittstelle
23	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	tgctacttccgctccgaagcactgctg	
24	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ttcggagcggagtagcacaagttacc	
25	CqsS ₁₋₁₇₂ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	aaccaggtagcgtccgaagcactgctg	
26	CqsS ₁₋₁₇₂ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ttcggagcgtacctggtttcggaaagta	
27	CqsS ₁₋₁₈₁ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	tcaatcgcacgctccgaagcactgctg	
28	CqsS ₁₋₁₈₁ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ttcggagcgtgcgattgagacttttgc	
29	Rv1625C ₂₁₈	s	aaaggatccagatctgaagcactgctggccaac	BamHI; BgIII
30	CqsS ₁₋₁₉₆ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	aaaagatctgagtggtttcgcatttc	BgIII
31	CqsS ₁₋₁₉₅ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	aaaagatcttggtttcgcatttc	BgIII
32	CqsS ₁₋₁₉₀ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	aaaagatctatgggatacccgcccc	BgIII
A. Schultz 1	CqsS ₁₋₁₈₁ +BgIII	s	gtctcaatcgcagatctcgaagcactgctg	
A. Schultz 2	CqsS ₁₋₁₈₁ +BgIII	as	cagcagtgcttcgagatctgcgattgagac	
33	CqsS ₁₋₁₈₈ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	aaaagatctgatccccgccccaaaaga	BgIII
34	CqsS ₁₋₁₈₇ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	aaaagatctaccgccccaaaagactt	BgIII
35	CqsS ₁₋₁₈₅ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	aaaagatctccaaaagactttgcat	BgIII
36	CqsS ₁₋₁₈₃ :F166C-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	aaaagatctagactttgcgattgagac	BgIII
A. Schultz 3	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166A-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ctggtttcggaagtaggccaagttaccaagag	
A. Schultz 4	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166G-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ctctttgtaacttggtacttccgaaaccag	
A. Schultz 5	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166M-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ctggtttcggaagtacatcaagttaccaagag	
A. Schultz 6	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166S-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ctctttgtaacttgctacttccgaaaccag	
37	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166P-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ctctttgtaacttgccacttccgaaaccag	
38	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166W-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ctctttgtaacttggtacttccgaaaccag	
39	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166W-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ctggtttcggaagtaccacaagttaccaagag	
40	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166E-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ctctttgtaacttggaatacttccgaaaccag	
41	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166K-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ctggtttcggaagtatttcaagttaccaagag	
42	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166L-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ctggtttcggaagtagagcaagttaccaagag	
43	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166I-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ctctttgtaacttgatctacttccgaaaccag	
44	CqsS ₁₋₁₆₈ :F166V-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ctggtttcggaagtagaccaagttaccaagag	

CqsS-Konstrukte	Primer-Nr. / Herkunft	Verwendung für Konstrukt/e	Orientierung	Sequenz 5'→3'	Restriktions-schnittstelle
45		CqsS ₁₋₁₆₈ :F166H-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ctctttggtaacttgcaacttccgaaaccag	
46		CqsS ₁₋₁₆₈ :F166H-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ctggtttcggaagtagtgcaagttaccaagag	
47		CqsS ₁₋₁₈₁ :FYF168LNY-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ctctttggtaacttgtaaattatcgaaaccaggtagaa	
48		CqsS ₁₋₁₈₁ :FYF168LNY-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ttctacctggtttcgataaatttaacaagttaccaagag	
49		CqsS ₁₋₁₈₁ :6TM CqsS ₁₅₀₋₁₆₈ 6TM LqsS ₁₆₀₋₁₇₈ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	gtgatcatatattaccattattgcaggttctactttaattatcgaaaccaggtagaa	
50		CqsS ₁₋₁₈₁ :6TM CqsS ₁₅₀₋₁₆₈ 6TM LqsS ₁₆₀₋₁₇₈ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	acctgcaataatggtaaataatgatccaatgtcatttgtatatccatgggtgagttc	
51		CqsS ₁₋₁₇₇ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	tttttcagatctttttgcttcatgttctac	BgIII
56		Rv1625C ₁₋₄₄₃ :6TM Rv1625C ₁₈₃₋₂₀₁ 6TM CqsS ₁₅₀₋₁₆₈	s	atcttcttgtttatctctttggtaacttgctctacttctgctgatactgctcga	
57		Rv1625C ₁₋₄₄₃ :6TM Rv1625C ₁₈₃₋₂₀₁ 6TM CqsS ₁₅₀₋₁₆₈	as	aaagagataaataaacaagaagatcggtacgtgctccaacttacggacatggccca	
58		Rv1625C ₁₋₄₄₃ : 5/6TM loop+6TM Rv1625C ₁₆₈₋₂₀₁ 5/6TM loop+6TM CqsS ₁₄₀₋₁₆₈	s	caggggtttcacctcgaactcaccatggattggacgcacgtaccgatc	
59		Rv1625C ₁₋₄₄₃ : 5/6TM loop+6TM Rv1625C ₁₆₈₋₂₀₁ 5/6TM loop+6TM CqsS ₁₄₀₋₁₆₈	as	ggtgagttcgaggtgaaaccctggaccaggaactccagggc	
60		Rv1625C ₁₋₄₄₃ : 5+6TM Rv1625C ₁₅₀₋₁₆₇₊₁₈₃₋₂₀₁ 5+6TM CqsS ₁₂₀₋₁₃₉₊₁₅₀₋₁₆₈	s	tttggtgggaattggctcttgcgacgttttttggcttgggtagcaccgcccatactgggctt	
61		Rv1625C ₁₋₄₄₃ : 5+6TM Rv1625C ₁₅₀₋₁₆₇₊₁₈₃₋₂₀₁ 5+6TM CqsS ₁₂₀₋₁₃₉₊₁₅₀₋₁₆₈	as	cgtcgcaagaccaattcccacaaatgtctgaacaaacatcaccgctaaccgggtgtgttc	
62		CqsS ₁₋₁₈₁ : 5/6TM loop+6TM CqsS ₁₄₀₋₁₆₈ 5/6TM loop+6TM LqsS ₁₅₁₋₁₇₈ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ccgcaaatgtattttggagaagagcatatacaaatgacattgggtgatcata	
63		CqsS ₁₋₁₈₁ : 5/6TM loop+6TM CqsS ₁₄₀₋₁₆₈ 5/6TM loop+6TM LqsS ₁₅₁₋₁₇₈ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	atgctcttctccaaaatacatttgcggtgctaccaagcaaaaa	
69		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166Y-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	tttggttaacttgattacttccgaaaccaggta	
70		CqsS ₁₋₁₈₁ :FY167YF-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ctggtttcggaagaaatacaagttaccaagagata	
71		CqsS ₁₋₁₈₁ :FYF168LFY-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ggtaacttgctcttttaccgaaaccaggtagaacat	
72		CqsS ₁₋₁₈₁ :FY167LL-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ctggtttcggaagagcaagttaccaagagata	

CqsS-Konstrukte	Primer-Nr. / Herkunft	Verwendung für Konstrukt/e	Orientierung	Sequenz 5'→3'	Restriktions-schnittstelle
73		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166D-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	tttggttaacttgattacttccgaaaccaggta	
74		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166R-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	gtttcggagtagcgcaagttaccaagagata	
75		CqsS ₁₋₁₈₁ :G163A;F166L-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	atztatctctttgctaacttgctctacttccga	
76		CqsS ₁₋₁₈₁ :FGN164AGS; F166L-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	gaagtagagcaaactaccgcgagataaataaacaagaa	
77		CqsS ₁₋₁₈₁ :1TM CqsS ₁₄₋₃₃ 1TM LqsS ₂₅₋₄₄ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	gcgatagcttttgtgggatttccctttatttatggtatttgggagttcatggtcccgag	
78		CqsS ₁₋₁₈₁ :1TM CqsS ₁₄₋₃₃ 1TM LqsS ₂₅₋₄₄ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	aggaaatcccacaaaagctatcgcgctactgcaaccaattgggggttctgcgtactgata	
79		CqsS ₁₋₁₈₁ :2TM CqsS ₄₁₋₅₉ 2TM LqsS ₅₂₋₇₀ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ctccgtcttattggaagccttttaggttgggattgatgcttcgtaatcgtagccat	
80		CqsS ₁₋₁₈₁ :2TM CqsS ₄₁₋₅₉ 2TM LqsS ₅₂₋₇₀ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	acctaaaaggcttccaataagacggagtggcagggtttcatatggctgcggaacaatgaa	
81		CqsS ₁₋₁₈₁ :1TM CqsS ₁₃₋₃₃ 1TM LqsS ₂₄₋₄₄ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	cagtacgcagaacaccaattgggttgcagtaggt	
82		CqsS ₁₋₁₈₁ :1TM CqsS ₁₃₋₃₃ 1TM LqsS ₂₄₋₄₄ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	tgcaaccaattgggtgttctgcgtactgatatac	
83		CqsS ₁₋₁₈₁ :2TM CqsS ₄₁₋₆₃ 2TM LqsS ₅₂₋₇₄ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ggattgatgcttactccttattggccatttgagtggcgtgga	
84		CqsS ₁₋₁₈₁ :2TM CqsS ₄₁₋₆₃ 2TM LqsS ₅₂₋₇₄ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	ccactcaaatggccaataaggagtaagcatcaatcccaaac	
85		CqsS ₁₋₁₈₁ :S97A;F166L-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	atgaacaattgggcgaatgtttgggtgatgtcg	
86		CqsS ₁₋₁₈₁ :S97A;F166L-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	cacccaaacattcgcccaattggttcatcagcaa	
87		CqsS ₁₋₁₈₁ :3TM CqsS ₇₄₋₉₄ 3TM LqsS ₈₅₋₁₀₅ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	tttactttgcatatTTTTTTTactTTTTTatTTTTaatgaataattggtcgaatgtttgg	
88		CqsS ₁₋₁₈₁ :3TM CqsS ₇₄₋₉₄ 3TM LqsS ₈₅₋₁₀₅ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	aaaaaaaaatggcaaagtaaaaaagagtaaaaaaccaataggcgggtaaaaaatccacg	
89		CqsS ₁₋₁₈₁ :4TM CqsS ₉₇₋₁₁₆ 4TM LqsS ₁₀₈₋₁₂₇ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	ttgttgtgtggtgtatTTTTTacttgtattgctcgttgatttaacatcgtgatgtttgtt	
90		CqsS ₁₋₁₈₁ :4TM CqsS ₉₇₋₁₁₆ 4TM LqsS ₁₀₈₋₁₂₇ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	taaaaatacaccacacacaaaagacatcgagaaataacgctccaattgttcatcagcaa	
91		CqsS ₁₋₁₈₁ :5TM CqsS ₁₂₀₋₁₄₀ 5TM LqsS ₁₃₁₋₁₅₁ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	gggtttagtttagcccttgaagttatattcttgtttctccggggtttcacctcgaactc	
92		CqsS ₁₋₁₈₁ :5TM CqsS ₁₂₀₋₁₄₀ 5TM LqsS ₁₃₁₋₁₅₁ -Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	tacaagggttaaactaaacccagtatcaacacaatggataacgatgtgatatgcacgag	
93		CqsS ₁₋₁₈₁ :R47A;F166L-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	aacctaccgcttgctattctttgctcagtctta	
94		CqsS ₁₋₁₈₁ :R47A;F166L-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	tgagcaaagaatagcaagcggtaggttttcgta	
95		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166N-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	tttggttaacttgaactacttccgaaaccaggta	
96		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166Q-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	as	gtttcggagtagtattgcaagttaccaagagata	
97		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166T-Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	s	tttggttaacttgacctacttccgaaaccaggta	
MZ54 von M. Ziegler		pETDuet-3 MCS2	as	<u>ggtagccgccgatatcgacccctgccgtgccccg</u>	EcoRV; ACC65; KpnI

LqsS-Primer-Nr. / Verwendung für Konstrukt/e	Orientierung	Sequenz 5'→3'	Restriktions-
L1 LqsS	s	aaaggatccatggtcacaactaaaaaaaaatag	BamHI
L2 LqsS _{1-182-RV1625C} ₂₀₃₋₄₄₃	s	cagccatgctgatactgctcgag	XhoI
L3 LqsS _{1-182-RV1625C} ₂₀₃₋₄₄₃	as	gcagtatcacgcatggctgttttataatttaaag	
L4 LqsS _{1-178-RV1625C} ₂₀₃₋₄₄₃	s	ttaaattatcgtgatactgctcgag	XhoI
L5 LqsS _{1-178-RV1625C} ₂₀₃₋₄₄₃	as	gcagtatcacgataatttaaagtagaacc	
L6 LqsS _{1-205-RV1625C} ₂₀₃₋₄₄₃	s	gcgttcaccacgtgatactgctcgag	XhoI
L7 LqsS _{1-205-RV1625C} ₂₀₃₋₄₄₃	as	gcagtatcacgtgggtaacgcaattcatgg	
L8 LqsS _{1-206-RV1625C} ₂₀₃₋₄₄₃	s	ttcaccattgctgatactgctcgag	XhoI
L9 LqsS _{1-206-RV1625C} ₂₀₃₋₄₄₃	as	gcagtatcacgcaatgggtaacgcaattc	
L10 LqsS _{1-200-RV1625C} ₂₀₃₋₄₄₃	s	gattgcccatcgtgatactgctcgag	XhoI
L11 LqsS _{1-200-RV1625C} ₂₀₃₋₄₄₃	as	gcagtatcacgatgggcaatcatgcctgc	
L12 LqsS _{1-178-RV1625C} ₂₁₈₋₄₄₃	as	tttagatctataatttaaagtagaacctgc	BglII
L13 LqsS _{1-182-RV1625C} ₂₁₈₋₄₄₃	as	tttagatctcatggctgttttataatt	BglII
L14 LqsS _{1-191-RV1625C} ₂₁₈₋₄₄₃	as	tttagatctcatgccagccaatttttg	BglII
L15 LqsS _{1-200-RV1625C} ₂₁₈₋₄₄₃	as	tttagatctatgggcaatcatgcctgc	BglII
L16 LqsS _{1-205-RV1625C} ₂₁₈₋₄₄₃	as	tttagatcttgggtaacgcaattcatg	BglII
L17 LqsS _{1-206-RV1625C} ₂₁₈₋₄₄₃	as	tttagatctcaatgggtaacgcaattc	BglII

Tab. 7: Primer zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Alle Oligonukleotidsequenzen sind in 5'→3'-Orientierung angegeben. Die unterstrichenen Nukleotide stellen die Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme dar, die über die Primer eingeführt wurden. Lücken in der Primer-Liste ergaben sich durch Streichungen während der Arbeit. Diese Primer existieren, fanden aber hier keine Verwendung.

2.7.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Die Plasmid-DNA wurde zum Sequenzieren zur Firma GATC, Konstanz, geschickt.

Primer-Name	Verwendung	Orientierung	Sequenz 5'→3'
U-pQE		s	gaattcattaaagaggagaaa
R-pQE		as	cattactggatctatcaacagg
pETDuet-3 MCS-1	MCS1	s	atgCGTccggcgtaga
DuetDown1	MCS1	as	gattatgCGGccgTgtacaa
DuetUp2	MCS2	s	ttgtacacggccgcataatc
RpET	MCS2	as	accctcaagaccCGtttaga

Tab. 8: Sequenzierprimer

2.8 Geräte

Gerät	Hersteller (Firmensitz)
Brutschränke	Binder GmbH (Tuttlingen, DEU)
Elektrophoresekammern	Mighty Small II SE 250/SE260, Hoefer Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, USA)
French® Pressure Cells and Press	FA-078-E1, SLM Aminco, SLM instruments, Inc. (Urbana, USA)
Gelelektrophorese-Kammern und Zubehör	Eberhard-Karls-Universität (Tübingen, DEU)
Horizontalschüttler	Kombischüttler KL2, Edmund Bühler (Tübingen, DEU)
Inkubationsschüttler (30°C)	Rotary shaker KS10 swip + TH10, Edmund Bühler (Tübingen, DEU)
Magnetrührer	Combimag RCH, IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, DEU)
Netzgeräte	LKB-Bromma 2197 Power Supply (Bromma, SWE) Electrophoresis Power Supply EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, (Nürnberg, DEU)
pH-Meter	pH-Meter 761 Calimatic, Knick (Berlin, DEU)
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf (Hamburg, DEU)
Szintillationszähler	1209 Rackbeta, LKB Wallac (Turku, FIN)
Thermocycler	T3000 Thermocycler, Biometra (Göttingen, DEU)
Thermoblock	Dri-Block® DB2D, Techne (UK)
Thermomagnetrührer	Retbasic, IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, DEU)
Thermomixer	Thermomixer compact und 5436, Eppendorf (Hamburg, DEU)
Tischschüttler	Vortex-Genie 2, Bender & Hobein AG (Zurich, CH)
Tischzentrifuge	Minispin und 5415D, Eppendorf (Hamburg, DEU)
Transilluminator	UV-star 312nm, Biometra (Göttingen, DEU)
Überkopfschüttler	GFL 3025, GFL (München, DEU)
Ultrazentrifuge	Beckmann L-60 mit Rotor Type 50.2 Ti, Beckman Coulter GmbH (Krefeld, DEU)
Vakuumentrifuge	Concentrator 5301, Eppendorf (Hamburg, DEU)

Gerät	Hersteller (Firmensitz)
Waagen	Sartorius AG (Goettingen, DEU)
„Western Blot“-Apparatur	Blotting Apparat Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell, BIO-RAD (München, DEU)
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R und Sorvall RC5B Plus, Thermo Fisher Scientific Inc. (Langenselbold, DEU)

Tab. 9: Verwendete Geräte

2.9 Sonstige Materialien

Gerät	Hersteller (Firmensitz)
Nitrozellulosemembran	Porablot PDVF Membran (2 µm Porengröße), Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, (Düren, DEU)
Sterilfilter	0,22 µm Syringe Filter, Fisher Scientific GmbH (Schwerte, DEU)
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Corning® (Wiesbaden, DEU)

Tab. 10: Sonstige Materialien

2.10 Software

DNA 5	https://pga.mgh.harvard.edu/web_apps/web_map/start
Lasergene® Software, DNASTAR (USA)	
PrimerX	http://bioinformatics.org/primerx/cgi-bin/DNA_1.cgi
PyMol	https://www.pymol.org/
Quick2D	http://toolkit.tuebingen.mpg.de/
Sequence Scanner v1.0, Applied Biosystems (USA)	
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/
TopPred	http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred

2.11 Zugangsnummern

CqsS	gi:167009128
LqsS	gi:499250892
Rv1625c	gi:614134238

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Nährmedien und Antibiotika

- **LB Medium**

20 g/l LB Nährmedium; autoklavieren

- **Konzentrationen der Antibiotika**

Ampicillin (Amp):

Stammlösung: 100 mg/ml in H₂O

Endkonzentration: 100 µg/ml

Kanamycin (Kan):

Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O

Endkonzentration: 50 µg/ml

Chloramphenicol (Cam):

Stammlösung: 34 mg/ml in H₂O

Endkonzentration: 34 µg/ml

3.1.2 Transformation von *Escherichia coli*

3.1.2.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Ein Aliquot einer Bakterienstammkultur wurde in 5 ml LB - Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Anschließend wurden die 5 ml Kultur in einen 1 Liter Kolben mit 100 ml LB - Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 - 0,4 bei 37°C und 150 UpM geschüttelt. Der Kolben wurde für 10 min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden in eisgekühlten Zentrifugenröhrchen 10 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Weitere Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 ml sterilem, eiskaltem 0,1 M CaCl₂ suspendiert, 20 min auf Eis gestellt und anschließend, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Die

Zellen wurden in 10 ml sterilem, eiskaltem 0,1 M CaCl₂ / 20% Glycerin suspendiert und für 2 - 4 Std. auf Eis, unter gelegentlichem Schwenken, gehalten. Die Bakterienzellen wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert (je 100 µl) und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei - 80°C gelagert.

3.1.2.2 Transformation von Bakterienzellen

Kompetente Bakterien (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 - 20 µl Ligationsansatz oder 1 ng DNA versetzt. Nach 30 min bei 0°C folgte ein Hitzeschock für genau 1 min bei 42°C. Der Ansatz wurde weitere 10 min auf Eis gehalten. Pro Ansatz wurden 500 µl LB zugegeben und bei 37°C für 45 - 60 min geschüttelt (150 UpM). Anschließend wurde die Zellsuspension 2 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgekippt, die Zellen im Rest (ca. 100 µl) suspendiert und auf einer Agarplatte, mit den entsprechend notwendigen Antibiotika, ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und bei 4°C gelagert. Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte gepickt und zur Plasmidpräparation in 5 ml Flüssigkultur hochgezogen.

3.1.3 **Plasmidpräparation aus Bakterien**

Von einer 5 ml Übernachtskultur des zu untersuchenden Bakterienklons wurden 1,5 - 3 ml entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden für 2 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der dadurch entstandene Überstand verworfen. Der Zelniederschlag wurde mittels Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System isoliert. Die DNA wurde mit 50 - 100 µl sterilem H₂O eluiert.

3.1.4 **Sequenzspezifische Restriktion von DNA**

Die Plasmid - DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen mit den empfohlenen Puffern nach Angaben des Herstellers verdaut. Hierfür wurde 100 - 300 ng Plasmid - DNA in einem Endvolumen von 20 µl mit jeweils 2 Units Enzym für mindestens 30 - 45 min bei 37°C inkubiert.

3.1.5 Dephosphorylierung von DNA - Fragmenten

Hier werden die terminalen Phosphatgruppen (5´ - Ende) abgespalten und somit eine Re-Ligation des verdauten DNA - Fragments (z.B. Plasmid - DNA) verhindert. Hierfür wurde dem Reaktionsansatz der verdauten Plasmid - DNA (3.1.4) 1 µl alkalische Phosphatase zugesetzt und 1 Std. bei 37°C inkubiert.

3.1.6 Auftrennung von DNA - Fragmenten

Die Auftrennung von DNA - Fragmenten erfolgte in einem 1 - 1,5% Agarosegel durch Gelelektrophorese. Dazu wurde die Agarose in 1 x TAE - Puffer unter Erhitzen gelöst und zum Erstarren in einen Gelschlitten mit Kamm überführt. Die Proben wurden mit BX - Puffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei 80 bis 100 V, 150 mA, 15 W. Für die spätere UV - Detektion der DNA wurde das Agarosegel nach 20 - 30 min für 5 min in ein Ethidiumbromidbad (10 mg/l) gelegt und anschließend erneut für 10 - 20 min elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen der DNA - Banden wurde ein Größenstandard (EcoRI - HindIII - verdaute λ - DNA) bei jedem Lauf mit auf das Gel aufgetragen.

- **TAE - Puffer**
40 mM Tris - Acetat (pH 8,0)
1 mM EDTA

- **BX - Puffer**
1 x TAE
0,5% Bromphenolblau
0,5% Xylencyanol
50% Glycerin

3.1.7 Isolierung von DNA - Fragmenten aus Agarosegelen

Für Klonierungszwecke wurden 10 - 20 µg DNA verdaut und mittels Agarosegel getrennt (3.1.6). Die Banden wurden unter UV - Licht ausgeschnitten. Die Isolierung der gewünschten DNA - Fragmente erfolgte mit dem HiYield® Gel/PCR DNA

Fragment Extraction Kit (2.4) nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 30 - 50 µl Nuklease freiem Wasser eluiert und bei - 20°C gelagert.

3.1.8 Ligation von DNA - Fragmenten

Die Ligation der DNA - Fragmente („Inserts“) und dem Plasmid erfolgte mit dem Rapid DNA Ligation Kit. Hierbei wird eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphat - und dem 3'-Hydroxylende doppelsträngiger DNA - Moleküle katalysiert. Für die Ligation wurden die Plasmid - und Fragment - DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die hierbei eingesetzte Menge der Plasmid - DNA betrug 50 - 60 ng. Die Ligation erfolgte bei RT für 15 - 30 min. Der Ligationsansatz wurde direkt zur Transformation in *E. coli* (3.1.2.2) verwendet.

3.1.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung gereinigter DNA wurde 1 µl in 49 µl Nuklease freiem Wasser aufgenommen und in eine UVette[®] (Eppendorf, Hamburg) überführt (Referenz = 50 µl H₂O). Die Konzentration wurde über den Quotienten 260nm / 280nm ermittelt. Dabei ist der Faktor 2 erstrebenswert, da er eine nicht durch Proteine verunreinigte DNA widerspiegelt.

3.1.10 DNA - Sequenzierung

Die Proben wurden zur Sequenzierung an GATC Biotech AG geschickt. Hierfür wurden zu 5 µl gereinigter DNA (400 - 500 ng) 5 µl Sequenzierprimer (5 µM) pipettiert.

3.1.11 Herstellung von Bakterienstammkulturen

Um Kulturen länger zu lagern, wurden 800 µl einer frisch hochgezogenen Übernacht - Flüssigkultur mit 200 µl sterilem Glycerin (87%) vermischt und in ein Reaktionsgefäß mit Schraubverschluß bei - 80°C eingefroren.

3.1.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifizierung definierter DNA - Sequenzen. Die Amplifikation der DNA - Fragmente erfolgt in aufeinander folgenden Zyklen mit der KAPAHiFi-Polymerase und synthetisch hergestellten Oligonukleotiden (Primern).

Im ersten Schritt wurden die DNA - Doppelstränge bei 95°C getrennt (denaturiert). An die Einzelstränge lagerten sich die Primer an („Annealing“). In der Elongationsphase wurden beide Einzelstränge mit dNTPs (250 µM je dNTP) bei 72°C aufgefüllt. Anschließend begann ein neuer Zyklus. Die Elongationszeit wurde entsprechend der Produktlänge gewählt. Die Schmelztemperatur der DNA (T_m) wurde nach der Wallace - Regel berechnet und für die Primer - Anlagerung verwendet:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

(G,C,A,T = Anzahl der bindenden Basenpaare (GC - bzw. AT) im Primer)

Unterschied sich die T_m zweier Primer, wurde die Durchschnittstemperatur gewählt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne DNA.

Alle Ansätze wurden auf Eis in dünnwandige 0,2 ml PCR - Reaktionsgefäße pipettiert. Die Reaktionen wurden im Thermocycler mit den Programmen in Tab. 12, 14 und 16 durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde über eine Agarosegelelektrophorese (3.1.6) aufgetrennt. Für eine eventuell anschließende Klonierung wurden die Amplifizierungsprodukte aus der Gelmatrix eluiert.

3.1.12.1 “Site – directed Mutagenesis by overlap extension using PCR” (67)

Um Punktmutationen in die DNA einzubauen, wurden vier verschiedene Primer entworfen. Zwei der Primer (P1 und P4) sind komplementär zu den Enden des Fragments und begrenzen es somit. Die beiden Primer P2 und P3 sind mutagene Primer und binden zueinander komplementär innerhalb des Fragments. Zunächst wurde das DNA – Fragment AB, flankiert von P1 und P2, welches die Mutation am Ende trägt, mittels PCR erzeugt. Hierzu wurde in einem Reaktionsansatz ein 5´ - Primer (P1) und ein 3´ - Primer (P2), der innerhalb des Fragments bindet und die Mutation trägt, verwendet. In einem zweiten PCR - Ansatz, mit dem 5´ - Primer (P3)

und dem 3′ - Primer (P4), wurde das zweite PCR - Produkt (Fragment CD) amplifiziert. Dadurch entstehen zwei Fragmente deren 3′ - Enden überlappen und in einer Fusions - PCR hybridisieren (Abb. 4). Hierbei dienen die 3′ - überlappenden Enden als Primer für die 3′ - Verlängerung durch die KAPAHiFi - DNA Polymerase für den komplementären Strang (Fragment AD). Die mutierte DNA wird durch die Primer P1 und P4 amplifiziert. Die PCR wurde durchgeführt wie in 3.1.12 beschrieben.

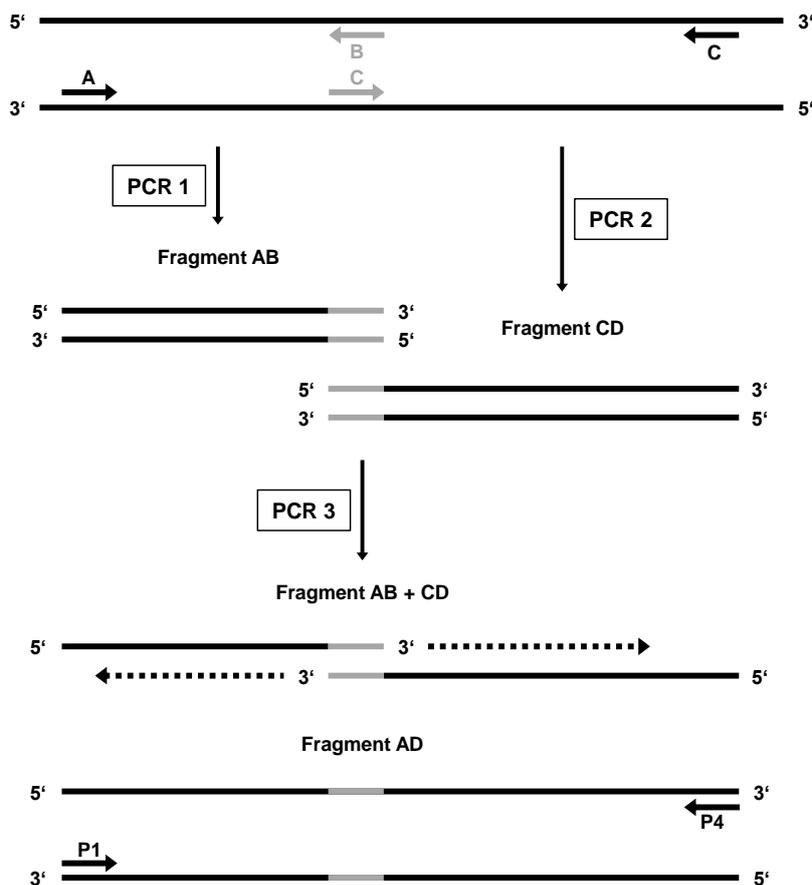


Abb. 4: Schematische Darstellung der zielgerichteten Mutagenese durch „Overlap Extension PCR“ (adaptiert nach (67))

Menge	Reagenz
1 µl	„template“ DNA (ca. 50 ng)
10 µl	5 x KAPAHiFi - Puffer mit 2 mM MgCl ₂
0,5 µl	25 mM dNTPs
1 µl	20 µM Primer 5'
1 µl	20 µM Primer 3'
0,5 µl	KAPAHiFi - Polymerase (1U/µl)
36 µl	H ₂ O
50 µl	Endvolumen

Tab. 11: 1 x Reaktionsansatz für PCR1 und PCR2

Schritt	T [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung	95	120	
Denaturierung	98	20	
Primeranlagerung	T _m var.	15	24
Elongation	68	30	
Elongation	68	300	
Kühlen	4	∞	

Tab. 12: Programm für PCR1 und PCR2

Die variablen (var.) Angaben für die Temperatur der Primeranlagerung sind abhängig von der optimalen Anlagerungstemperatur des Primerpaares.

Bei der Fusions - PCR (PCR3) gab es zwei verschiedene Anlagerungstemperaturen, T_{m1} und T_{m2}. Die errechnete Temperatur entspricht dem Mittel beider Temperaturen (T_{m3}). Für die ersten 5 Amplifizierungszyklen wurde eine um 5°C niedrigere Temperatur gewählt. Die darauffolgenden 25 Zyklen wurden mit der T_{m3} durchgeführt.

Menge	Reagenz
1,5 µl	gereinigte „template“ DNA von PCR1
1,5 µl	gereinigte „template“ DNA von PCR2
10 µl	5 x KAPAHiFi - Puffer mit 2 mM MgCl ₂
0,5 µl	25 mM dNTPs
1,25 µl	20 µM Primer 5'
1,25 µl	20 µM Primer 3'
0,8 µl	KAPAHiFi - Polymerase (1U/µl)
33,2 µl	H ₂ O
50 µl	Endvolumen

Tab. 13: 1 x Reaktionsansatz für PCR3

Schritt	T [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung	95	120	
Denaturierung	98	20	
Primeranlagerung	T _m 1 var.	15	5
Elongation	68	60	
Denaturierung	98	20	
Primeranlagerung	T _m 2 var.	15	25
Elongation	68	60	
Elongation	68	300	
Kühlen	4	∞	

Tab. 14: Reaktionsschritte der Fusions - PCR (PCR3)

Die variablen (var.) Temperaturangaben bzw. die Dauer der Zweitstrangsynthese (Elongation) sind abhängig von der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer bzw. der Länge des zu amplifizierenden DNA - Fragmentes (30 s/kb).

3.1.12.2 „QuickChange – PCR“ (site directed mutagenesis) nach Stratagene

Um Mutationen in der PCR zu minimieren, wurde sie mit dem KAPAHiFi PCR Kit durchgeführt. Die KAPAHiFi - Polymerase besitzt eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität („proofreading“) und verringert somit die Fehlerrate (ein Fehler pro $3,6 \times 10^{-6}$) deutlich.

Diese PCR eignet sich besonders gut zur Erzeugung von Punktmutationen, zum Austausch sowie zur Deletion oder Insertion von einzelnen ASn.

Dazu mussten jeweils ein 5' - und 3' - Primer mit der enthaltenen Mutation verwendet werden. Beide Primer binden an dieselbe Sequenz an den komplementären Strängen des DNA - Templates. Die Länge der Primer konnte zwischen 20 - 60 Basenpaaren variieren. Die Verwendung von sense - und antisense Primern mit unterschiedlichen Mutationen wurde ebenso durchgeführt.

Menge	Reagenz
1 µl	„template“ DNA (ca. 50 ng)
10 µl	5 x KAPAHiFi - Puffer mit 2 mM MgCl ₂
0,5 µl	25 mM dNTPs
1 µl	20 µM Primer 5'
1 µl	20 µM Primer 3'
0,5 µl	KAPAHiFi- Polymerase (1U/µl)
36 µl	H ₂ O
50 µl	Endvolumen

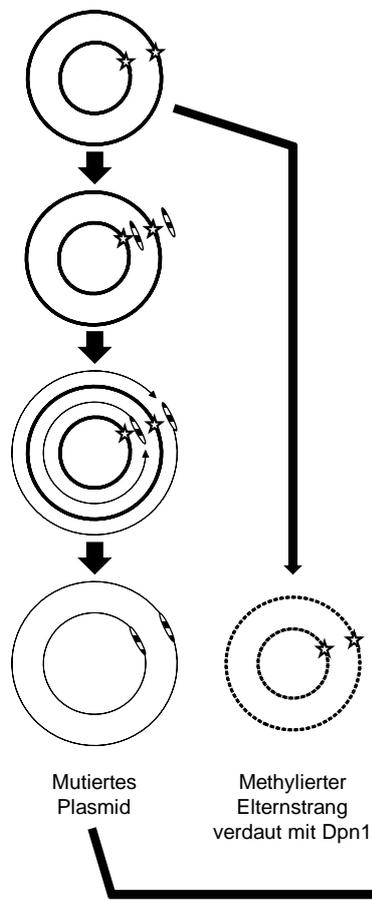
Tab. 15: 1 x Reaktionsansatz für die KAPAHiFi - Polymerase

Schritt	T [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung	95	120	
Denaturierung	98	20	
Primeranlagerung	T _m var.	15	15
Elongation	68	210	
Elongation	68	300	
Kühlen	4	∞	

Tab. 16: Reaktionsschritte der „QuickChange – PCR“ (QC - PCR)

Die Temperaturangaben (T_m var.) variierte zwischen 65 - 68°C.

Nach der PCR wurde 1 µl des Restriktionsenzym DpnI zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Dies sorgt dafür, dass der methylierte DNA - Elternstrang, welcher nicht die gewünschte Mutation trägt, verdaut wird. 5 µl des verdauten PCR - Ansatzes wurden zur Transformation zu 50 µl kompetenten *E. coli* XL1 - Blue gegeben (3.1.2.2).



Vorbereitung des Plasmids:

Zu mutierende Bereiche sind durch folgendes Symbol ★ gekennzeichnet.

Durchführung der PCR mit verschiedenen Temperatur-Zyklen:

Das Plasmid-Template wird denaturiert und die Primer, die die Mutationsstelle enthalten, lagern sich an das Plasmid an.



Mutagene Primer

Mittels DNA-Polymerase wird eine PCR durchgeführt, die in einem veränderten Plasmid resultiert.

Verdau des methylierten DNA – Elternstrangs:

Die Plasmide werden mit DpnI verdaut, sodass das alte Plasmid-Template entfernt werden kann.

Transformation:

Kompetente *E. coli* - Zellen (XL1 - Blue) reparieren Brüche in der DNA („nicks“).

Abb. 5: Schematische Darstellung der „QuickChange – PCR“ nach Stratagene (adaptiert nach (68,109)

3.1.13 Klonierungsplan

Alle Konstrukte wurden, mit Ausnahme der Konstrukte Nr. 73 - 84, welche in pETDuet-3 kloniert wurden, in das Plasmid pQE80_L ligiert. Die His-tag-Sequenz (MRGSHHHHHHGS = 1,4 kDa) befand sich N-terminal. Zur unabhängigen Immundetektion der Expressionsprodukte beider MCSs enthält die MCS1 von pETDuet-3 N-terminal ein His-tag und C-terminal der MCS2 die Sequenz DIGGTLESGKETAAAKFERQHMSSTSA (3,0 kDa) mit einem S-tag (unterstrichen).

Im Folgenden wird die Klonierung der Einzelkonstrukte dargestellt. Fehlende Konstrukt-Nummern wurden gestrichen und sind nicht mehr Gegenstand der Arbeit. Dargestellt sind Ausschnitte der AS-Sequenz der jeweiligen Membrananker (CqsS, LqsS oder Rv1625c) bzw. der katalytischen Domänen der AC Rv1625c. Dick gedruckt und unterstrichen sind die eingeführten Mutationen. Durch Mutagenese eingefügte Restriktionsschnittstellen sind kursiv dargestellt.

3.1.13.1 Verknüpfungsvarianten der CqsS-Rv1625c Chimäre

CqsS₁₋₁₉₆	M ₁ DAIRKVVYQYAEPNLSLVGWMGFIFGPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCS VLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVM SFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV PIFLFIYLFGNLFYFRNQVEHEAKVSIKSFSGAGIAHEMRNPL ₁₉₆
Rv1625c₂₀₁₋₄₄₃	A ₂₀₁ LRDTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIADKYDE ASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSADFDELVDQHGLEKIKVSGD SYMVVSQVPRPRPDHTQALADFDALDMTNVAAQLKDPGRNPVPLRVGLATGP VVAGVVGSRRFFYDVWGDVAVNVASRMESTDSVGGIQVPDEVYERLKDDFVL RERGHINVKGGKVMRTWYLIGRKVAADPGEVARGAEPRTAGV ₄₄₃

Nr. 1: **CqsS₁₋₁₆₈-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃**

CqsS	<u>F₁₆₆</u> YF ₁₆₈	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	--	---------------------------------------	----------------

Fusions-PCR:

PCR 1

Template: pKK322-3: CqsS (von Prof. Jung, München)
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 5 (as)

PCR 2

Template: pQE30: Rv1625c (von Anita Schultz)
Primer-Nr. (s/as): 6 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)

Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 2: CqsS₁₋₁₇₂-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	F ₁₆₆ YFRNQV ₁₇₂	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	--	---------------------------------------	----------------

Fusions-PCR:

PCR 1

Template: pKK322-3: CqsS (von Prof. Jung, München)
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 2 (as)

PCR 2

Template: pQE30: Rv1625c (von Anita Schultz)
Primer-Nr. (s/as): 3 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 3: CqsS₁₋₁₉₀-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	F ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIKSFSGAGIAH ₁₉₀	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	--	---------------------------------------	----------------

Fusions-PCR:

PCR 1

Template: pKK322-3: CqsS (von Prof. Jung, München)
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 12 (as)

PCR 2

Template: pQE30: Rv1625c (von Anita Schultz)
Primer-Nr. (s/as): 9 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 4: CqsS₁₋₁₉₅-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	F ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIKSFSGAGIAHEMRNP ₁₉₅	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	---	---------------------------------------	----------------

Fusions-PCR:

PCR 1

Template: pKK322-3: CqsS (von Prof. Jung, München)
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 13 (as)

PCR 2

Template: pQE30: Rv1625c (von Anita Schultz)
Primer-Nr. (s/as): 10 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 5: CqsS₁₋₁₉₆-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	F ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIAKSFGAGIAHEMRNPL ₁₉₆	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	--	---------------------------------------	----------------

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: pKK322-3: CqsS (von Prof. Jung, München)
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 14 (as)

PCR 2

Template: pQE30: Rv1625c (von Anita Schultz)
Primer-Nr. (s/as): 11 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 8: CqsS₁₋₁₆₈F166C-Rv1625c₂₀₁₋₄₄₃

CqsS	C ₁₆₆ YF ₁₆₈	A ₂₀₁ LRDTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	------------------------------------	---	----------------

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 10
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 16 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 98
Primer-Nr. (s/as): 15 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 9: CqsS₁₋₁₆₈F166C-Rv1625c₂₀₂₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ ^{YF} ₁₆₈	L ₂₀₂ RDTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	--	--	----------------

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 10
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 20 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 98
Primer-Nr. (s/as): 19 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 10: CqsS₁₋₁₆₈F166C-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ ^{YF} ₁₆₈	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	--	---------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 23
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); U. Kurz 2 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 1
Primer-Nr. (s/as): U. Kurz 1 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 11: CqsS₁₋₁₆₈F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ ^{YF} ₁₆₈	R ₂₁₈ SEALL	Rv1625c
-------------	--	------------------------	----------------

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 10
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 24 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 98
Primer-Nr. (s/as): 23 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 12: CqsS₁₋₁₇₂F166C-Rv1625c₂₀₁₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQV ₁₇₂	A ₂₀₁ L (=AfeI) RDTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	---	--	----------------

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 14
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 18 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 98
Primer-Nr. (s/as): 17 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 13: CqsS₁₋₁₇₂F166C-Rv1625c₂₀₂₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQV ₁₇₂	L ₂₀₂ RDTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	---	---	----------------

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 14
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 22 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 98
Primer-Nr. (s/as): 21 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 14: CqsS₁₋₁₇₂F166C-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQV ₁₇₂	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	---	---------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 23
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); U. Kurz 2 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 2
Primer-Nr. (s/as): U. Kurz 1 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 15: CqsS₁₋₁₇₂F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQV ₁₇₂	R ₂₁₈ SEALL	Rv1625c
-------------	---	------------------------	----------------

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 14
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 26 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 98
Primer-Nr. (s/as): 25 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 16: CqsS₁₋₁₈₁F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSI ₁₈₁	R ₂₁₈ SEALL	Rv1625c
-------------	---	------------------------	----------------

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 21
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 28 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 98
Primer-Nr. (s/as): 27 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 17: CqsS₁₋₁₈₃F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIAKS ₁₈₃	<i>R</i> ₂₁₈ <i>S</i> (=Bg111)EALL	Rv1625c
-------------	--	---	----------------

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 25
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 36 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 98 (EcoRI + BgIII)

Nr. 18: CqsS₁₋₁₈₅F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIAKSFG ₁₈₅	<i>R</i> ₂₁₈ <i>S</i> (=Bg111)EALL	Rv1625c
-------------	--	---	----------------

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 25
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 35 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 98 (EcoRI + BgIII)

Nr. 19: CqsS₁₋₁₈₇F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIAKSFGAG ₁₈₇	<i>R</i> ₂₁₈ <i>S</i> (=Bg111)EALL	Rv1625c
-------------	--	---	----------------

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 25
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 34 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 98 (EcoRI + BgIII)

Nr. 20: CqsS₁₋₁₈₈F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIAKSFGAGI ₁₈₈	<i>R</i> ₂₁₈ <i>S</i> (=Bg111)EALL	Rv1625c
-------------	---	---	----------------

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 25
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 33 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 98 (EcoRI + BgIII)

Nr. 21: CqsS₁₋₁₉₀F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIKSFSGAGIAH ₁₉₀	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	---	---------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 23
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); U. Kurz 2 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 3
Primer-Nr. (s/as): U. Kurz 1 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 22: CqsS₁₋₁₉₀F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIKSFSGAGIAH ₁₉₀	R ₂₁₈ S (=BgIII)EALL	Rv1625c
-------------	---	---------------------------------	----------------

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 25
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 32 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 98 (EcoRI + BgIII)

Nr. 23: CqsS₁₋₁₉₅F166C-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIKSFSGAGIAHEMRNP ₁₉₅	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	--	---------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 23
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); U. Kurz 2 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 4
Primer-Nr. (s/as): U. Kurz 1 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 24: CqsS₁₋₁₉₅F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIKSFSGAGIAHEMRNP ₁₉₅	<i>R</i> ₂₁₈ <i>S</i> (=Bg ₁ III)EALL	Rv1625c
-------------	--	---	----------------

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 25
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 31 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 98 (EcoRI + BgIII)

Nr. 25: CqsS₁₋₁₉₆F166C-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIKSFSGAGIAHEMRNPL ₁₉₆	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	---	---------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 23
Primer-Nr. (s/as): 1 (s); U. Kurz 2 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 5
Primer-Nr. (s/as): U. Kurz 1 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 26: CqsS₁₋₁₉₆F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIKSFSGAGIAHEMRNPL ₁₉₆	<i>R</i> ₂₁₈ <i>S</i> (=Bg ₁ III)EALL	Rv1625c
-------------	---	---	----------------

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 25
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 30 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 98 (EcoRI + BgIII)

Nr. 27: CqsS₁₋₁₇₇-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>F</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAK ₁₇₇	<i>R</i> ₂₁₈ <i>S</i> (=Bg ₁ III)EALL	Rv1625c
-------------	--	---	----------------

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 43
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 51 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 43
Primer-Nr. (s/as): 29 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 43 (BamHI + HindIII)

3.1.13.2 Austausch der Aminosäure an Position 166 im CqsS-Rezeptor**CqsS₁₋₁₈₁F166X-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

CqsS	<u>X</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSI _{A181}	R ₂₁₈ SEALL	Rv1625c
-------------	--	------------------------	----------------

Nr. 28: CqsS₁₋₁₈₁F166G-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 16
Primer-Nr. (s/as): A. Schultz 4 (s); A. Schultz 3 (as)

Nr. 29: CqsS₁₋₁₈₁F166A-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 16
Primer-Nr. (s/as): A. Schultz 4 (s); A. Schultz 3 (as)

Nr. 30: CqsS₁₋₁₈₁F166S-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 16
Primer-Nr. (s/as): A. Schultz 6 (s); A. Schultz 5 (as)

Nr. 31: CqsS₁₋₁₈₁F166P-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 16
Primer-Nr. (s/as): 37 (s); 42 (as)

Nr. 32: CqsS₁₋₁₈₁F166D-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 73 (s); 74 (as)

Nr. 33: CqsS₁₋₁₈₁F166I-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 97 (s); 96 (as)

Nr. 34: CqsS₁₋₁₈₁F166N-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 95 (s); 96 (as)

Nr. 35: CqsS₁₋₁₈₁F166V-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 16
Primer-Nr. (s/as): 43 (s); 44 (as)

Nr. 36: CqsS₁₋₁₈₁F166E-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 16
Primer-Nr. (s/as): 40 (s); 41 (as)

Nr. 37: CqsS₁₋₁₈₁F166Q-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 95 (s); 96 (as)

Nr. 38: CqsS₁₋₁₈₁F166H-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**QC-PCR****Template:** Konstrukt-Nr. 16**Primer-Nr. (s/as):** 45 (s); 46 (as)**Nr. 39: CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃****QC-PCR****Template:** Konstrukt-Nr. 16**Primer-Nr. (s/as):** 37 (s); 42 (as)**Nr. 40: CqsS₁₋₁₈₁F166I-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃****QC-PCR****Template:** Konstrukt-Nr. 16**Primer-Nr. (s/as):** 43 (s); 44 (as)**Nr. 41: CqsS₁₋₁₈₁F166M-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

QC-PCR**Template:** Konstrukt-Nr. 16**Primer-Nr. (s/as):** A. Schultz 6 (s); A. Schultz 5 (as)**Nr. 42: CqsS₁₋₁₈₁F166K-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃****QC-PCR****Template:** Konstrukt-Nr. 16**Primer-Nr. (s/as):** 40 (s); 41 (as)**Nr. 43: CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

CqsS	F ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSI _{A181}	<i>R₂₁₈S (=Bg111)</i> EALL	Rv1625c
-------------	---	---------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

PCR**Template:** pKK322-3: CqsS (von Prof. Jung, München)**Primer-Nr. (s/as):** 1 (s); A. Schultz 2 (as)**Eingefügt über:** BamHI + BglII**Eingefügt in:** Konstrukt-Nr. 95 (BamHI + BglII)

Nr. 44: CqsS₁₋₁₈₁F166Y-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**QC-PCR**

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 69 (s); 70 (as)

Nr. 45: CqsS₁₋₁₈₁F166R-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**QC-PCR**

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 73 (s); 74 (as)

Nr. 46: CqsS₁₋₁₈₁F166W-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**QC-PCR**

Template: Konstrukt-Nr. 16
Primer-Nr. (s/as): 38 (s); 39 (as)

3.1.13.3 Mutationen in der 6. TM von CqsS

CqsS	W ₁₅₀ THVPIFLFIYLFGNLFYFRNQVEHEAKVSI _{A181}	<i>R₂₁₈</i> SEALL	Rv1625c
-------------	---	------------------------------	----------------

Nr. 47: CqsS₁₋₁₈₁FY167YF-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	W ₁₅₀ THVPIFLFIYLFGNLY _{E167} F
-------------	---

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 69 (s); 70 (as)

Nr. 48: CqsS₁₋₁₈₁FYF168LYF-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	W ₁₅₀ THVPIFLFIYLFGNLL _{FY168}
-------------	--

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 71 (s); 72 (as)

Nr. 49: CqsS₁₋₁₈₁FY167LL-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	W ₁₅₀ THVPIFLFIYLFGNLL _{LL167} F
-------------	--

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 71 (s); 72 (as)

Nr. 50: CqsS₁₋₁₈₁FYF168LNY-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	W ₁₅₀ THVPIFLFIYLF GNL <u>LNY</u> ₁₆₈	<i>R_{218S} (=BgIII)EALL</i>	Rv1625c
-------------	--	---	----------------

QC-PCR

Template: Konstrukt-Nr. 43
Primer-Nr. (s/as): 47 (s); 48 (as)

Nr. 51: CqsS₁₋₁₈₁G163A;F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	W ₁₅₀ THVPIFLFIYLF A ₁₆₃ <u>NLL</u> ₁₆₆ YF ₁₆₈
-------------	---

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 76 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 75 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 52: CqsS₁₋₁₈₁FGN164AGS;F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	W ₁₅₀ THVPIFLFIYLF AGS ₁₆₄ <u>LL</u> ₁₆₆ YF ₁₆₈
-------------	--

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 76 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 75 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

3.1.13.4 Mutationen hoch konservierter ASn in der 2. und 4. TM**Nr. 53: CqsS₁₋₁₈₁R47A;F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

CqsS			
2.TM:	N ₄₃ LPLA ₄₇ ILCSVLFFGIIYRNRT ₆₃		
6.TM:	W ₁₅₀ THVPIFLFIYLFGNLL ₁₆₆ YF ₁₆₈	R ₂₁₈ SEALL	Rv1625c

QC-PCR**Template:** Konstrukt-Nr. 39**Primer-Nr. (s/as):** 93 (s); 94 (as)**Nr. 54: CqsS₁₋₁₈₁S97A;F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

CqsS			
4.TM:	A ₉₇ NVWVMSFMSAIFLHILLVHI ₁₁₇		
6.TM:	W ₁₅₀ THVPIFLFIYLFGNLL ₁₆₆ YF ₁₆₈	R ₂₁₈ SEALL	Rv1625c

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1****Template:** Konstrukt-Nr. 39**Primer-Nr. (s/as):** U-pQE (s); 86 (as)**PCR 2****Template:** Konstrukt-Nr. 39**Primer-Nr. (s/as):** 85 (s); R-pQE (as)**PCR 3****Template:** PCR 1- und PCR 2-Fragment**Primer-Nr. PCR 3:** U-pQE (s); R-pQE (as)**Eingefügt über:** BamHI + HindIII**Eingefügt in:** Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)3.1.13.5 Transmembranaustausch von CqsS gegen LqsS

CqsS₁₋₁₈₁;F166L	M ₁ DAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIFGPIIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSV LFFGIIYRNRTPF EW RGF LPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSF MSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHVPI FLFIYLFGNLL ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSI ₁₈₁
Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃	R ₂₁₈ SEALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVLFADIVGFTERASS TAPADLVRFLDRLYSADFELVDQHGLEKIKVSGDSYVVSGVPRPRPDHTQ ALADFALDMTNVAAQLKDP RGNP VPLRVGLATGPVAVGVSRRFFYDVWG DAVNVASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKD D FVLRERGHINVKGKGMRTW YLIGRKVAADPGEV RGAEPRTAGV ₄₄₃

Nr. 55: CqsS₁₋₁₈₁: F166L;1TM CqsS₁₃₋₃₃1TM LqsS₂₄₋₄₄-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

V_h:1TM:	P ₁₃ NLSLVGWMGFIFGFIYYIVW ₃₃
L_p:1TM:	H ₂₄ QLVAVGAI A FVGF P LFYIVW ₄₄

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 56
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 82 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 56
Primer-Nr. (s/as): 81 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 56: CqsS₁₋₁₈₁: F166L;1TM CqsS₁₄₋₃₃1TM LqsS₂₅₋₄₄-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

V_h:1TM:	P ₁₃ NLSLVGWMGFIFGFIYYIVW ₃₃
L_p:1TM:	H ₂₅ LVAVGAI A FVGF P LFYIVW ₄₄

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 78 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 77 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 57: CqsS₁₋₁₈₁: F166L;2TM CqsS₄₃₋₆₃2TM LqsS₅₄₋₇₄-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

V_h:2TM:	N ₄₃ LPLRILCSVLF F GIIYRNRT ₆₃
L_p:2TM:	N ₅₄ LPLRLIGSLLGLGLMLTPYW ₇₄

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 58
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 84 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 58
Primer-Nr. (s/as): 83 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 58: CqsS₁₋₁₈₁: F166L;2TM CqsS₄₃₋₅₉2TM LqsS₅₄₋₇₀-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

V_h:2TM:	N ₄₃ LPLRILCSVLFFGIYRNRT ₆₃
L_p:2TM:	N ₅₄ <u>LPLRLIGSLLGLGLML</u> ₇₀ TPYW ₇₄

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 80 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 79 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 59: CqsS₁₋₁₈₁: F166L;3TM CqsS₇₄₋₉₄3TM LqsS₈₅₋₁₀₅-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

V_h:3TM:	Y ₇₄ YQVVTTLCCLPCFFFYMLLMN ₉₄
L_p:3TM:	Y ₈₅ <u>WFLTLLFTLPYFFTFLEFLMN</u> ₁₀₅

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 88 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 87 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 60: CqsS₁₋₁₈₁: F166L;4TM CqsS₉₇₋₁₁₇4TM LqsS₁₀₈₋₁₂₈-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

V_h:4TM:	S ₉₇ NVWVMSFMSAIFLHILLVHI ₁₁₇
L_p:4TM:	S ₁₀₈ <u>VISAMSLLCGVFLLVLLVDL</u> ₁₂₈

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 90 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 89 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 61: CqsS₁₋₁₈₁: F166L;5TM CqsS₁₂₀₋₁₄₀5TM LqsS₁₃₁₋₁₅₁-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

V_h:5TM:	V ₁₂₀ MFVQTFVGI GLATFFAWVAQ ₁₄₀
L_p:5TM:	L ₁₃₁ <u>SIVLILGFSLALVSYLVSP</u> ₁₅₁

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 92 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 39
Primer-Nr. (s/as): 91 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)

Eingefügt über: BamHI + HindIII
 Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 62: CqsS₁₋₁₈₁: F166L;6TM CqsS₁₅₀₋₁₆₈6TM LqsS₁₆₀₋₁₇₈-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

V_h:6TM:	W ₁₅₀ THVPIFLFIYLFGNL L ₁₆₆ YF ₁₆₈
L_p:6TM:	I ₁₆₀ <u>QMTLVIIIFTIIAGSTLNY</u> ₁₇₈

Fusions-PCR:

PCR 1

Template: Konstrukt-Nr. 43
 Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 50 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 43
 Primer-Nr. (s/as): 49 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
 Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
 Eingefügt über: BamHI + HindIII
 Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

**Nr. 63: CqsS₁₋₁₈₁:5/6TM loop + 6TM CqsS₁₄₀₋₁₆₈
 5/6TM loop + 6TM LqsS₁₅₁₋₁₇₈-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

V_h:5/6TM loop + 6TM:	Q ₁₄₀ GFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNL L ₁₆₆ YF ₁₆₈
L_p:5/6TM loop + 6TM:	P ₁₅₁ <u>QMYFGEEHIQMTLVIIIFTIIAGSTLNY</u> ₁₇₈

Fusions-PCR:

PCR 1

Template: Konstrukt-Nr. 62
 Primer-Nr. (s/as): 1 (s); 63 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 43
 Primer-Nr. (s/as): 62 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
 Primer-Nr. PCR 3: 1 (s); 4 (as)
 Eingefügt über: BamHI + HindIII
 Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 64: CqsS₁₋₁₈₁: F166L;1+2TM CqsS₁₄₋₃₃₊₄₃₋₅₉1+2TM LqsS₂₅₋₄₄₊₅₄₋₇₀-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

V_h:1+2TM:	P ₁₃ NLSLVGWMGFIFPIIYIVW ₃₃ + N ₄₃ LPLRILCSVLFFGIIY ₅₉ RNRT ₆₃
L_p:1+2TM:	HQ ₂₅ <u>LVAVGAIAFVGFPLFYVIW</u> ₄₄ + N ₅₄ <u>LPLRLIGSLLGLGLML</u> ₇₀ TPYW ₇₄

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 56
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 80 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 56
Primer-Nr. (s/as): 79 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

**Nr. 65: CqsS₁₋₁₈₁: F166L;2+6TM CqsS₄₃₋₆₃₊₁₅₀₋₁₆₈
 2+6TM LqsS₅₄₋₇₄₊₁₆₀₋₁₇₈-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

V_h:2+6TM:	N ₄₃ LPLRILCSVLFFGGIYRNRT ₆₃ + W ₁₅₀ THVPIFLFIYLFGNLL ₁₆₆ YF ₁₆₈
L_p:2+6TM:	<u>N₅₄LPLRLIGSLLGLGLMLTPYW₇₄</u> + <u>I₁₆₀QMTLVIIIFTIIAGSTLNY₁₇₈</u>

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Insert: Konstrukt-Nr. 57
Eingefügt über: BamHI + AleI
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 62 (BamHI + AleI)

**Nr. 66: CqsS₁₋₁₈₁: F166L;2+6TM CqsS₄₃₋₅₉₊₁₅₀₋₁₆₈
 2+6TM LqsS₅₄₋₇₀₊₁₆₀₋₁₇₈-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

V_h:2+6TM:	N ₄₃ LPLRILCSVLFFGGIY ₅₉ RNRT ₆₃ + W ₁₅₀ THVPIFLFIYLFGNLL ₁₆₆ YF ₁₆₈
L_p:2+6TM:	<u>N₅₄LPLRLIGSLLGLGLML₇₀TPYW₇₄</u> + <u>I₁₆₀QMTLVIIIFTIIAGSTLNY₁₇₈</u>

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Insert: Konstrukt-Nr. 58
Eingefügt über: BamHI + AleI
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 62 (BamHI + AleI)

3.1.13.6 Transmembranaustausch von Rv1625c gegen CqsS

Rv1625c₁₋₄₄₃ :	M ₁ AARKCGAPPPIAADGSTRPDCVTAVRTQARAPTQHVAESVARRQR VLTITAWLAVVVTGSFALMQLATGAGGWYIALINVFTAVTFIVPPLL HRFGGLVAPLTFIGTAYVAIFAIGWDVGTDAGAQQFFFLVAAALVVLL VGIEHTALAVGLAAVAAGLVIALEFLVPPDTGLQPPWAMSVSFVLT VSACGVAVATVWFALRDTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAER LKEPERNIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYS AFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTN VAAQLKDPGRNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNAS RMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLI GRKVAADPGEVRGAEPRTAGV ₄₄₃
----------------------------------	--

Nr. 67: Rv1625c₁₋₂₁₇:6TM Rv1625c₁₈₃₋₂₀₁6TM CqsS₁₅₀₋₁₆₈F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

Rv:6TM:	F ₁₈₃ VLTTVSACGVAVATVWFA ₂₀₁
V_h:6TM:	<u>W₁₅₀THVPIFLFIYLFGNLLYF₁₆₈</u>

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 98
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 57 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 98
Primer-Nr. (s/as): 56 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: EcoRI+ HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 68: Rv1625c₁₋₂₁₇:5/6TM loop + 6TM Rv1625c₁₆₈₋₂₀₁**5/6TM loop + 6TM CqsS₁₄₀₋₁₆₈F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

Rv:5/6TM loop + 6TM:	P ₁₆₈ PDTGLQPPWAMSVSFVLTTVSACGVAVATVWFA ₂₀₁
V_h:5/6TM loop + 6TM:	<u>Q₁₄₀GFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLLYF₁₆₈</u>

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 67
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 59 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 67
Primer-Nr. (s/as): 58 (s); R-pQE (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: EcoRI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 69: Rv1625c₁₋₂₁₇:5+6TM Rv1625c₁₅₀₋₁₆₇₊₁₈₃₋₂₀₁

5+6TM CqsS₁₂₀₋₁₃₉₊₁₅₀₋₁₆₈F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

Rv:5+6TM:	V ₁₅₀ GLAAVAAGLVIALEFLV ₁₆₇ + F ₁₈₃ VLTTVSACGVAVATVWFA ₂₀₁
V_n:5+6TM:	<u>V₁₂₀MFVQTFVGI GLATFFAWVA₁₃₉</u> + <u>W₁₅₀THVPIFLFIYLFGNLL₁₆₆YF₁₆₈</u>

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: Konstrukt-Nr. 67
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); 61 (as)

PCR 2

Template: Konstrukt-Nr. 67
Primer-Nr. (s/as): 60 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: U-pQE (s); R-pQE (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

3.1.13.7 Dimerisierungskonstrukte im pETDuet-3

Nr. 73: MCS1: CqsS₁₋₁₈₁:F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

MCS2: CqsS₁₋₁₈₁:F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	<u>C₁₆₆YFRNQVEHEAKVSI_{A181}</u>	R ₂₁₈ SEALL	Rv1625c
-------------	---	------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 16
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); MZ54 (von Miriam Ziegler) (as)

1. Ligation:

Eingefügt über: BamHI + EcoRV
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 102 MCS2 (BglIII + EcoRV)

2. Ligation:

Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 102 MCS1 (BamHI + HindIII)

Nr. 74: MCS1: CqsS₁₋₁₈₁:F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**MCS2: CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIA ₁₈₁	R ₂₁₈ SEALL	Rv1625c
CqsS	F ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIA ₁₈₁	R ₂₁₈ S (=BgIII) EALL	Rv1625c

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

1. PCR

Template: Konstrukt-Nr. 43
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); MZ54 (von Miriam Ziegler) (as)
Eingefügt über: BamHI + EcoRV
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 102 MCS2 (BgIII + EcoRV)

2. PCR

Template: Konstrukt-Nr. 16
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); MZ54 (von Miriam Ziegler) (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 102 MCS2 (BgIII + HindIII)

Nr. 75: MCS1: CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**MCS2: CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

CqsS	F ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIA ₁₈₁	R ₂₁₈ S (=BgIII) EALL	Rv1625c
-------------	---	----------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 43
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); MZ54 (von Miriam Ziegler) (as)

1. Ligation:

Eingefügt über: BamHI + EcoRV
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 102 MCS2 (BgIII + EcoRV)

2. Ligation:

Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 102 MCS1 (BamHI + HindIII)

Nr. 76: MCS1: Rv1625c₁₋₄₄₃**MCS2: --**

Von Miriam Ziegler zur Verfügung gestellt.

Nr. 77: MCS1: Rv1625c₁₋₄₄₃

MCS2: Rv1625c₁₋₄₄₃

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 98
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); MZ54 (von Miriam Ziegler) (as)
Eingefügt über: BamHI + EcoRV
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 76 (BglII + EcoRV)

Nr. 78: MCS1: Rv1625c₁₋₄₄₃

MCS2: CqsS₁₋₁₈₁:F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

Rv1625c₁₋₄₄₃

CqsS	<u>C</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIA ₁₈₁	R ₂₁₈ SEALL	Rv1625c
-------------	--	------------------------	----------------

Insert: Konstrukt-Nr. 73
Eingefügt über: AclII + NotI
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 76 (AclII + NotI)

Nr. 79: MCS1: Rv1625c₁₋₄₄₃

MCS2: CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

Rv1625c₁₋₄₄₃

CqsS	<u>F</u> ₁₆₆ YFRNQVEHEAKVSIA ₁₈₁	R ₂₁₈ S (=BglIII) EALL	Rv1625c
-------------	--	-----------------------------------	----------------

Insert: Konstrukt-Nr. 75
Eingefügt über: AclII + NotI
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 76 (AclII + NotI)

Nr.80	<u>MCS1</u> --	
	<u>MCS2</u> CqsS₁₋₁₈₁:	M ₁ DAIRKVVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPL RILCSVLFFGIIYRNRTPFWRGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLM NNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQ GFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLFYFRNQVEHEAKVSIA ₁₈₁
	Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃: D300A	R ₂₁₈ S (=BglIII) EALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVL FADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSG <u>A</u> ₃₀₀ SYMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLR VGLATGPVVAGVVGSRFFYDVWGDVNVASRMESTDSVGQIQVPDE VYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLI GRKVAADPGEVGAEP RTAGV ₄₄₃

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 105
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); MZ54 (von Miriam Ziegler) (as)

Eingefügt über: BamHI + EcoRV
 Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 102 MCS2 (BgIII + EcoRV)

Nr.81	MCS1 CqsS ₁₋₁₈₁ :	M ₁ DAIRKQVYQYAEPNLSLVGWMGFIFGPIYYIVWEFMFPQPYENLPL RILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLM NNWSNVVWMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVIGIGLATFFAWVAQ GFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLFYFRNQVEHEAKVSI _{A181}
	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ : D300A	R_{218S} (=BgIII) EALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVL FADIVGFTERASSTAPADLVRFDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSG A₃₀₀ SYMVVSQVPRPRPDHTQALADFALDNTNVAQAQLKDPGRNPVPLR VGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDVAVNASRMESTDSVQIQVPDE VYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLI GRKVAADPGEVRGAEP RTAGV ₄₄₃
	MCS2 CqsS ₁₋₁₈₁ :	M ₁ DAIRKQVYQYAEPNLSLVGWMGFIFGPIYYIVWEFMFPQPYENLPL RILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLM NNWSNVVWMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVIGIGLATFFAWVAQ GFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLFYFRNQVEHEAKVSI _{A181}
	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ : D300A	R_{218S} (=BgIII) EALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVL FADIVGFTERASSTAPADLVRFDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSG A₃₀₀ SYMVVSQVPRPRPDHTQALADFALDNTNVAQAQLKDPGRNPVPLR VGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDVAVNASRMESTDSVQIQVPDE VYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLI GRKVAADPGEVRGAEP RTAGV ₄₄₃

Insert: Konstrukt-Nr. 105
 Eingefügt über: BamHI + HindIII
 Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 80 MCS1 (BamHI + HindIII)

Nr.82	MCS1 CqsS ₁₋₁₈₁ :	M ₁ DAIRKQVYQYAEPNLSLVGWMGFIFGPIYYIVWEFMFPQPYENLPL RILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLM NNWSNVVWMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVIGIGLATFFAWVAQ GFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLFYFRNQVEHEAKVSI _{A181}
	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ : R376A	R_{218S} (=BgIII) EALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVL FADIVGFTERASSTAPADLVRFDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGD SYMVVSQVPRPRPDHTQALADFALDNTNVAQAQLKDPGRNPVPLRVGL ATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDVAVNAS _{A376} MESTDSVQIQVPDEV YERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLI GRKVAADPGEVRGAEP TAGV ₄₄₃
	MCS2 CqsS ₁₋₁₈₁ :	M ₁ DAIRKQVYQYAEPNLSLVGWMGFIFGPIYYIVWEFMFPQPYENLPL RILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLM NNWSNVVWMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVIGIGLATFFAWVAQ GFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLFYFRNQVEHEAKVSI _{A181}
	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ : D300A	R_{218S} (=BgIII) EALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVL FADIVGFTERASSTAPADLVRFDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSG A₃₀₀ SYMVVSQVPRPRPDHTQALADFALDNTNVAQAQLKDPGRNPVPLR VGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDVAVNASRMESTDSVQIQVPDE VYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLI GRKVAADPGEVRGAEP RTAGV ₄₄₃

Insert: Konstrukt-Nr. 106
 Eingefügt über: BamHI + HindIII
 Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 80 MCS1 (BamHI + HindIII)

Nr.83	MCS1 LqsS₁₋₁₉₁ :	M ₁ SQLKKIVKHLDESMQRSLNSNSAHQLVAVGAIAFVGFPLFYVIWAFW LPQPYENLPLRLIGSLLGLGLMLTPYWPLKWKQYLSWYWFLLTLLFTLP YFFTFLLFMNQASVISAMSLLCGVFLLVLLVDLLSLSIVLILGFSLAL VSYYLVSPQMYFGEEHIQMTLVIIFTI IAGSTLNYKTAMLQQQKLAG M ₁₉₁
	Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ R376A	R ₂₁₈ SEALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVLFADIVGFTER ASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMVVSGVPRP RPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGS RRFFYDVWGDAVNVAS A₃₇₆ MESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRER GHINVKGKGV MRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV ₄₄₃
	MCS2 CqsS₁₋₁₈₁ :	M ₁ DAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGF IGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLR ILCSVLFFGI IYRNRTPF EW RGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLMNN WSNVVWMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVIGLATFFAWVAQGFH LELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLFYFRNQVEHEAKVSI A₁₈₁
	Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ D300A	R₂₁₈S (=Bg1II) EALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVLF ADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSG A₃₀₀ S YMVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLAT GPVVAGVVGSRRFFYDVWGDAVNVASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLK DDFVLRERGHINVKGKGV MRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV ₄₄₃

Insert: Konstrukt-Nr. 107
 Eingefügt über: BamHI + HindIII
 Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 80 MCS1 (BamHI + HindIII)

Nr.84	MCS1 Rv1625c₁₋₄₄₃ R376A	M ₁ AARKCGAPPIAADGSTRRPDCVTAVRTQARAPTQHYAESVARRQR VLTITAWLAVVVTG SFALMQLATGAGGWYIALINVFTAVTFAIVPLL HRFGGLVAPLTFIGTAYVAIFAIGWDVGT DAGA QFFFLVAAAALVLL VGIEHTALAVGLAAVAAGLVIALEFLVPPDTGLQPPWAMSVSFLVTT VSACGVAVATVWFALRDTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAER LKEPERNI IADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYS AFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTN VAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDAVNVAS A₃₇₆ MESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGV MRTWY LIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV ₄₄₃
	MCS2 CqsS₁₋₁₈₁ :	M ₁ DAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGF IGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPL RILCSVLFFGI IYRNRTPF EW RGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLM NNWSNVWMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVIGLATFFAWVAQ GFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLFYFRNQVEHEAKVSI A₁₈₁
	Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ D300A	R₂₁₈S (=Bg1II) EALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASV L FADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSG A₃₀₀ SYMVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLR VGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDAVNVASRMESTDSVGQIQVPDE VYERLKDDFVLRERGHINVKGKGV MRTWYLIGRKVAADPGEVRGAE PRTAGV ₄₄₃

Insert: Konstrukt-Nr. 104
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 80 MCS1 (BamHI + HindIII)

3.1.13.8 Verknüpfungsvarianten der LqsS-Rv1625c Chimäre

LqsS₁₋₂₀₆	M ₁ SQLKKIVKHLDESMQRSLNSAHQLVAVGAIAFVGFPLFYVIWAFWLPQPYENLPLRLIGSLLGLMLTPYWPLKWKQYLSWYWFLLTLLFTLPYFFTFLELMNQASVISAMSLLCGVFLLVLLVDLLSLSIVLILGFSLALVSYYLVSPQMYFGEEHIQMTLVIIIFTIIAGSTLNYKTAMLQQQKLAGMAAAAGMIAHELRS PL ₂₀₆
Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSY MVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVV AGVVGSRRFFYDVWGDVAVNVASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRE RGHINVKGKGMRTWYLI GRKVAADPGEVRGAEPRTAGV ₄₄₃

Nr. 85: LqsS₁₋₁₇₈-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	L ₁₇₆ NY ₁₇₈	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	------------------------------------	---------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:

PCR 1

Template: pUS-1: LqsS (von Prof. Hilbi, München)
Primer-Nr. (s/as): L1 (s); L5 (as)

PCR 2

Template: pQE30: Rv1625c (von Anita Schultze)
Primer-Nr. (s/as): L4 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: L1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 86: LqsS₁₋₁₈₂-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	L ₁₇₆ NYKTAM ₁₈₂	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	--	---------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:

PCR 1

Template: pUS-1: LqsS (von Prof. Hilbi, München)
Primer-Nr. (s/as): L1 (s); L3 (as)

PCR 2

Template: pQE30: Rv1625c (von Anita Schultz)
Primer-Nr. (s/as): L2 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: L1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 87: LqsS₁₋₂₀₀-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	L ₁₇₆ NYKTAMLQQQKLAGMAAAAGMIAH ₂₀₀	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	--	---------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: pUS-1: LqsS (von Prof. Hilbi, München)
Primer-Nr. (s/as): L1 (s); L11 (as)

PCR 2

Template: pQE30: Rv1625c (von Anita Schultz)
Primer-Nr. (s/as): L10 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: L1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 88: LqsS₁₋₂₀₅-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	L ₁₇₆ NYKTAMLQQQKLAGMAAAAGMIAHELRSP ₂₀₅	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	---	---------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: pUS-1: LqsS (von Prof. Hilbi, München)
Primer-Nr. (s/as): L1 (s); L7 (as)

PCR 2

Template: pQE30: Rv1625c (von Anita Schultz)
Primer-Nr. (s/as): L6 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: L1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 89: LqsS₁₋₂₀₆-Rv1625c₂₀₃₋₄₄₃

CqsS	L ₁₇₆ NYKTAMLQQQKLAGMAAAAGMIAHELRSP _{L206}	R ₂₀₃ DTARAEAVMEAEHDRSEALL	Rv1625c
-------------	--	---------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Ursula Kurz durchgeführt.

Fusions-PCR:**PCR 1**

Template: pUS-1: LqsS (von Prof. Hilbi, München)
Primer-Nr. (s/as): L1 (s); L9 (as)

PCR 2

Template: pQE30: Rv1625c (von Anita Schultz)
Primer-Nr. (s/as): L8 (s); 4 (as)

PCR 3

Template: PCR 1- und PCR 2-Fragment
Primer-Nr. PCR 3: L1 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 90: LqsS₁₋₁₇₈-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	L ₁₇₆ NY ₁₇₈	R ₂₁₈ S (=Bg ₁ III) EALL	Rv1625c
-------------	------------------------------------	--	----------------

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

PCR

Template: pUS-1: LqsS (von Prof. Hilbi, München)
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); L12 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 43 (EcoRI + BgIII)

Nr. 91: LqsS₁₋₁₈₂-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	L ₁₇₆ NYKTAM ₁₈₂	R ₂₁₈ S (=Bg ₁ III) EALL	Rv1625c
-------------	--	--	----------------

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

PCR

Template: pUS-1: LqsS (von Prof. Hilbi, München)
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); L13 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 43 (EcoRI + BgIII)

Nr. 92: LqsS₁₋₁₉₁-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	L ₁₇₆ NYKTAMLQQQKLAGM ₁₉₁	R ₂₁₈ S (=Bg ₁ III) EALL	Rv1625c
-------------	---	--	----------------

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

PCR

Template: pUS-1: LqsS (von Prof. Hilbi, München)
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); L14 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 43 (EcoRI + BgIII)

Nr. 93: LqsS₁₋₂₀₀-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	L ₁₇₆ NYKTAMLQQQKLAGMAAAAAGMIAH ₂₀₀	<i>R₂₁₈S (=BgIII)EALL</i>	Rv1625c
-------------	---	--------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

PCR

Template: pUS-1: LqsS (von Prof. Hilbi, München)
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); L15 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 43 (EcoRI + BgIII)

Nr. 94: LqsS₁₋₂₀₅-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	L ₁₇₆ NYKTAMLQQQKLAGMAAAAAGMIAHELRSP ₂₀₅	<i>R₂₁₈S (=BgIII)EALL</i>	Rv1625c
-------------	--	--------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

PCR

Template: pUS-1: LqsS (von Prof. Hilbi, München)
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); L16 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 43 (EcoRI + BgIII)

Nr. 95: LqsS₁₋₂₀₆-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

CqsS	L ₁₇₆ NYKTAMLQQQKLAGMAAAAAGMIAHELRSP ₂₀₆	<i>R₂₁₈S (=BgIII)EALL</i>	Rv1625c
-------------	--	--------------------------------------	----------------

Die Klonierung wurde von Anita Schultz durchgeführt.

PCR

Template: pUS-1: LqsS (von Prof. Hilbi, München)
Primer-Nr. (s/as): U-pQE (s); L17 (as)
Eingefügt über: EcoRI + BgIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 43 (EcoRI + BgIII)

3.1.13.9 Weitere Konstrukte

Nr.98	Rv1625c₁₋₄₄₃	M ₁ AARKCGAPPAAADGSTRRPDCVTAVRTQARAPTQH _Y AESVARRQR VLTITAWLAVVVTG _S FALMQLATGAGGWYIALINVFTAVTFAIVPLL HRFGGLVAPLTFIGTAYVAIFAIGWDVGTDAGAQFFFLVAAALVVLL VGIEHTALAVGLAAVAAGLVIALEFLVPPDTGLQPPWAMSVSFVLT VSACGVAVATVWFALRDTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAER LKEPERNI IADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYS AFDELVDQHGLEKIKVSGDSY _M VVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTN VAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDAVNVAS RMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGV _M RTWYLI GRKVAADPGEV _R GAEPRTAGV ₄₄₃
--------------	--------------------------------	---

Insert: pQE30: Rv1625c (von Anita Schultz)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr.99	Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃	R_{218S} (=Bg111) EALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVLF ADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDS YMVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLA TGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDAVNVASRMESTDSVGQIQVPDEVYER LKDDFVLRERGHINVKGKGV _M RTWYLI GRKVAADPGEV _R GAEPRTAG V ₄₄₃
--------------	----------------------------------	--

PCR

Template: Konstrukt-Nr. 25
Primer-Nr. (s/as): 29 (s); 4 (as)
Eingefügt über: BamHI + HindIII
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 101 (BamHI + HindIII)

Nr. 101	pQE80_L	
----------------	--------------------------	--

Nr. 102	pETDuet-3	
----------------	------------------	--

Nr. 103	Rv1625c₁₋₄₄₃: D300A	M ₁ AARKCGAPPAAADGSTRRPDCVTAVRTQARAPTQH _Y AESVARRQR VLTITAWLAVVVTG _S FALMQLATGAGGWYIALINVFTAVTFAIVPLL HRFGGLVAPLTFIGTAYVAIFAIGWDVGTDAGAQFFFLVAAALVVLL VGIEHTALAVGLAAVAAGLVIALEFLVPPDTGLQPPWAMSVSFVLT VSACGVAVATVWFALRDTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAER LKEPERNI IADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYS AFDELVDQHGLEKIKVSGA ₃₀₀ SY _M VVSGVPRPRPDHTQALADFALDM TNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDAVNV ASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGV _M RTWY LIGRKVAADPGEV _R GAEPRTAGV ₄₄₃
----------------	---------------------------------------	---

Von Yinglan Guo zur Verfügung gestellt. Dieses Konstrukt befindet sich im Plasmid pQE30 mit N-terminalen RGS(His)₆-tag.

Nr. 104	Rv1625c₁₋₄₄₃: R376A	M ₁ AARKCGAPPIAADGSTRPDCVTAVRTQARAPTQHYAESVARRQR VLTITAWLAVVVTGFSALMQLATGAGGWYIALINVFTAVTFIAIVPLL HRFGGLVAPLTFIGTAYVAIFAIGWDVGTDAGAQFFFLVAAALVVLL VGIEHTALAVGLAAVAAGLVIALEFLVPPDTGLQPPWAMSVSFLTT VSACGVAVATVWFALRDTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAER LKEPERNI IADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYS AFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTN VAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDAVNVAS A₃₇₆ MESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGV MRTWY LIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV ₄₄₃
-------------------	---	---

Von Yinglan Guo zur Verfügung gestellt. Dieses Konstrukt befindet sich im Plasmid pQE30 mit N-terminalen RGS(His)₆-tag.

Nr. 105	CqsS₁₋₁₈₁:	M ₁ DAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMPQPYENLPL RILCSVLFFGIIYRNRTPF EW RGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLM NNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVIGIGLATFFAWVAQ GFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLFYFRNQVEHEAKVSI A ₁₈₁
	Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃: D300A	R₂₁₈S (=Bg111) EALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVL FADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYS AFDELVDQHGLEKIKVSG A₃₀₀ SYMVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLR VGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDAVNVASRMESTDSVGQIQVPDE VYERLKDDFVLRERGHINVKGKGV MRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEP RTAGV ₄₄₃

Insert: Konstrukt-Nr. 43
Eingefügt über: EcoRI + Stul
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 103 (EcoRI + Stul)

Nr. 106	CqsS₁₋₁₈₁:	M ₁ DAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMPQPYENLPL RILCSVLFFGIIYRNRTPF EW RGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLM NNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVIGIGLATFFAWVAQ GFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLFYFRNQVEHEAKVSI A ₁₈₁
	Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃: R376A	R₂₁₈S (=Bg111) EALLANMLPASIAERLKEPERNI IADKYDEASVL FADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYS AFDELVDQHGLEKIKVSGD SYMVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGL ATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDAVNVAS A₃₇₆ MESTDSVGQIQVPDEV YERLKDDFVLRERGHINVKGKGV MRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEP TAGV ₄₄₃

Insert: Konstrukt-Nr. 43
Eingefügt über: EcoRI + Stul
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 104 (EcoRI + Stul)

Nr. 107	LAGM₁₋₁₉₁:	M ₁ SQLKKIVKHLDESMQRSLNSAHQLVAVGAIAFVGFPLFYVIWAF WLPQPYENLPLRLIGSLLGLGLMLTPYWPLKWKQYLSWYWFLLFT LPYFFTFLLMNQASVISAMSLLCGVFLLVLLVDLLSLSIVLILGFS LALVSYYLVSPQMYFGEEHIQMTLVIIFTIIAGSTLNYKTAMLQQQK LAGM ₁₉₁
	Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ R376A	R ₂₁₈ SEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTE RASSTAPADLVRFDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMVVSGVP RPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGV VGSRRFFYDVWGDVAVNAS _{A376} MESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFV LRERGHINVKGKGV MRTWYLI GRKVAADPGEVRGAEPRTAGV ₄₄₃

Insert: Konstrukt-Nr. 91
Eingefügt über: EcoRI + Stul
Eingefügt in: Konstrukt-Nr. 104 (EcoRI + Stul)

3.2 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

3.2.1 Expression

Ein Kolben mit 200 ml LB - Medium und 100 µg/ml Ampicillin wurden mit Hilfe einer Übernachtskultur des gewünschten Plasmids in einem Expressionsstamm (hier BL - 21 Δ pREP4) auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 - 0,3 wurde die Kultur unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Kultur auf 22°C abgekühlt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 erfolgte die Zugabe von IPTG. Die hier verwendete Konzentration von 500 µM IPTG hob die Wirkung des *lac* - Repressors auf und induzierte die Proteinexpression. Abhängig vom Wachstumsverhalten wurden die Zellen nach 2,5 - 5 Std. geerntet (3.2.2). Wenn nicht anders beschrieben, handelt es sich um diese Expressionsbedingungen.

3.2.2 Zellernte

Die Kulturen wurden bei 3200 x g, 4°C und für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Der Niederschlag wurde in 25 ml 4°C kaltem Waschpuffer suspendiert und erneut zentrifugiert (4300 x g, 4°C, 30 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen bei - 80°C gelagert.

- **Waschpuffer**
50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA

3.2.3 Zellaufschluss

Die gefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 25 ml Zellsuspensionspuffer suspendiert. Sollten die Proteine später gereinigt werden, wurde statt dem Zellsuspensionspuffer 25 ml Lysepuffer verwendet. Anschließend wurden die Zellen in zwei Durchgängen mit der French Press mechanisch (Druck 1200 psi) aufgebrochen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Proben fortwährend gekühlt wurden. Durch eine 30 - minütige Zentrifugation bei 4300 x g und 4°C wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen, in ein Ultrazentrifugen - Röhrchen überführt und bei 100.000 x g, 4°C für 60 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert war, wurde der Zelleniederschlag abhängig von dessen sichtbarer Größe in 1 - 2 ml Membranpuffer oder im Falle einer anschließenden Proteinreinigung in Membransuspensionspuffer aufgenommen und einem Dounce - Homogenisator homogenisiert. Die Proteinkonzentration der Membransuspension wurde entweder sofort bestimmt (3.2.7.1) für einen anschließenden Aktivitätstest der AC (3.2.10) oder die Präparation wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

- **Zellsuspensionspuffer**

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

2 mM Thioglycerin (0,02%)

50 mM NaCl

1 Tablette Complete EDTA - free Protease Inhibitor/50 ml Puffer

- **Lysepuffer**

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

1mM EDTA

10 mM β - Mercaptoethanol (0,71 μ l/ml Puffer)

1 Tablette Complete EDTA - free Protease Inhibitor/50 ml Puffer

- **Membranpuffer**
 - 40 mM Tris/HCl (pH 8,0)
 - 1,6 mM Thioglycerin (0,16%)
 - 20% Glycerin (87%)
- **Membransuspensionspuffer**
 - 50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
 - 250 mM NaCl
 - 20% Glycerin (87%)
 - 15 mM β - Mercaptoethanol (0,71 μ l/ml Puffer)

3.2.4 Solubilisation

Die durch den Zellaufschluss (3.2.3) erhaltenen membranassoziierten Proteine wurden mit 0,8 – 1,2% DDM aus der Membran gelöst. Das DDM wurde in 25 ml Membransuspensionspuffer gelöst. Dieser Ansatz sollte stets frisch angesetzt und tropfenweise unter ständigem Schwenken auf Eis zur Membranpräparation pipettiert werden. Nachdem die Suspension für 1 – 2 Std. auf Eis geschüttelt wurde, wurde sie für 1 Std. bei 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend folgten drei Bindungsschritte. In jedem Schritt wurde der Überstand mit 200 μ l Ni - NTA - Agarose versetzt und für bestimmte Zeit (1. Bindung: 16 Std.; 2. Bindung: 8 Std. und die 3. Bindung: 16 Std.) auf Eis und unter ständigem Schwenken inkubiert. Der jeweilige Bindungsschritt wurde durch die 5 - minütige Zentrifugation bei 1500 x g (4°C) und das anschließende Überführen des Überstandes in ein neues Zentrifugenröhrchen beendet.

3.2.5 Proteinreinigung

Die hier verwendete Immobilisierte - Metallionen - Affinitätschromatographie IMAC (69) nutzt die Wechselwirkung der Nitrilotriessigsäure (NTA) mit zweiwertigen Metall - Ionen, hier Ni^{2+} , aus und führt zur Bildung stabiler oktaedrischer Ni^{2+} -Chelatkomplexe mit den Histidin-Resten in den Proteinen. Proteine ohne His - tag laufen somit in den Waschschritten durch. Das gebundene Protein hingegen wird mit Hilfe von Imidazol eluiert. Die Ni - NTA Agarose wird als 50% - Suspension mit Ethanol gelagert und

muss vor Gebrauch geschüttelt und mit Puffer gewaschen werden. Die an das Affinitätsmaterial gebundenen Proteine wurden in 3 ml Waschpuffer A aufgenommen und in eine Minispin - Säule mit Filter (aus dem Wizard[®] Plasmid Purification Kit) mit aufgeschraubter Spitze überführt. Die Säulen wurden ebenfalls mit 3 ml Waschpuffer B und C gewaschen und anschließend die gewünschten Proteine mit 350 µl Elutionspuffer abgelöst. Um die Ausbeute an gereinigtem Protein zu erhöhen, wurde das Eluat erneut auf die Säule transferiert und mit weiteren 200 µl Elutionspuffer eluiert. Das vereinte Eluat wurde für 2 – 3 Std. bei 4°C dialysiert (3.2.6). Alle Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert. Nun konnte die Menge an solubilisierten Proteinen und deren Reinheit per SDS - PAGE untersucht und die AC - Aktivität getestet werden. Konnte nur eine geringe Konzentration an gereinigtem Protein verzeichnet werden, wurde kein Imidazol den Waschpuffern zugegeben und die Waschschrte auf die Puffer A und C beschränkt.

- **Wasch - Puffer A**

- 50 mM HEPES (pH 7,6)
- 400 mM NaCl
- 40 mM Imidazol
- 20% Glycerol
- vor Gebrauch zugeben:
- 10 mM β - Mercaptoethanol
- 0,05% DDM

- **Wasch - Puffer B**

- 50 mM HEPES (pH 7,6)
- 400 mM NaCl
- 75 mM Imidazol
- 20% Glycerol
- vor Gebrauch zugeben:
- 10 mM β - Mercaptoethanol
- 0,05% DDM

- **Wasch - Puffer C**
 - 50 mM HEPES (pH 7,6)
 - 10 mM NaCl
 - 300 mM Imidazol
 - 20% Glycerol
 - vor Gebrauch zugeben:
 - 10 mM β - Mercaptoethanol
 - 0,05% DDM

- **Eluationspuffer**
 - 50 mM HEPES (pH 7,6)
 - 400 mM NaCl
 - 75 mM Imidazol
 - 20% Glycerol
 - vor Gebrauch zugeben:
 - 10 mM β - Mercaptoethanol
 - 0,05% DDM

3.2.6 Dialyse

Um das für die Eluation der Proteine benötigte Imidazol zu entfernen, wurde die Probe in zuvor in destilliertem Wasser eingeweichte Dialyseschläuche (Visking Dialyse Schlauch) pipettiert und mit Klammern sorgfältig verschlossen. Die Dialyse erfolgte für 2 - 3 Std. bei 4°C auf einem Magnetrührer in 500 - 1000 ml Dialysepuffer.

- **Dialysepuffer**
 - 50 mM HEPES oder Tris (pH 7,6)
 - 10 mM NaCl
 - 20% Glycerol
 - vor Gebrauch zugeben:
 - 10 mM β - Mercaptoethanol

3.2.7 Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration

3.2.7.1 Bradford - Test

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt (70). Dabei handelt es sich um eine photometrische Methode, bei der der Farbstoff Coomassie - Brillant Blau mit den Seitenketten der ASn Komplexe eingeht. Mit zunehmender Konzentration an Protein - Farbstoff - Komplexen erhöht sich der Extinktionskoeffizient und ermöglicht so eine quantitative Ermittlung der Proteinkonzentration. Für die Durchführung des Tests wurde das BIO - RAD Protein Assay Reagenz verwendet. Zur Kalibrierung diente BSA (0,1 mg/ml).

3.2.7.2 Proteinbestimmung nach Warburg und Christian

Diese Methode der Proteinbestimmung misst die Adsorption der Tyrosin- und Tryptophanreste bei einer Wellenlänge von 280 nm. Da die Kontamination mit Nukleinsäuren die Bestimmung der Proteinkonzentration beeinflusst, bestimmten Warburg und Christian den Fehler, der bei besagter Verunreinigung auftritt und erstellten eine Korrekturtabelle. Hierbei machten sie sich die Tatsache zunutze, dass Nukleinsäuren eine stärkere Absorption bei 260 nm aufweisen als bei 280 nm.

Die Proteinmenge der Proteinlösung wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$(A_{280}) \times F = \text{mg/ml Protein}$$

F entspricht dem Korrekturfaktor. Dieser lässt sich mit dem berechneten Verhältnis aus A_{280}/A_{260} der Tabelle 17 entnehmen.

A_{280}/A_{260}	Korrekturfaktor F	Nukleinsäure (%)
1,75	1,12	0
1,63	1,08	0,25
1,52	1,05	0,50
1,40	1,02	0,75
1,36	0,99	1,00
1,30	0,97	1,25
1,25	0,94	1,50
1,16	0,90	2,00
1,09	0,85	2,50
1,03	0,81	3,00
0,98	0,78	3,50
0,94	0,74	4,00
0,87	0,68	5,00
0,85	0,66	5,50
0,82	0,63	6,00
0,80	0,61	6,50
0,78	0,59	7,00
0,77	0,57	7,50
0,75	0,55	8,00
0,73	0,51	9,00
0,71	0,48	10,00
0,67	0,42	12,00
0,64	0,38	14,00
0,62	0,32	17,00
0,60	0,29	20,00

Tab. 17: Korrekturfaktoren für die Proteinbestimmung nach Warburg - Christian (110)

3.2.8 SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE)

Die Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS - PAGE nach Laemmli (71) aufgetrennt. Anhand eines zusätzlich aufgetragenen Größenstandards wurde das relative Molekulargewicht zugeordnet. Für die anschließende Coomassiefärbung des Gels wurde der Proteinmarker I (10 μ l) und für einen spezifischen Proteinnachweis in einer späteren Immundetektion der „prestained“ Proteinmarker IV (3 μ l) verwendet. Das Gel besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Zunächst wird das Trenngel zwischen eine Glas - und eine Aluminiumoxidplatte gegossen, welche durch 1,5 mm Stege getrennt sind und durch eine Vorrichtung zusammen gepresst werden. Das Trenngel wird mit 100% Isopropanol überschichtet und bei RT stehen gelassen. Nach der Polymerisation des Gels wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit destilliertem Wasser 3 x überspült. Nachdem der Probenkamm eingefügt wurde, wurde das Sammelgel darüber geschichtet. Der Kamm wurde nach

der Polymerisation des Sammelgels entfernt. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1 x Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben wurden mit SDS - Probenpuffer im Verhältnis 4:1 verdünnt und für 30 – 60 min bei RT inkubiert. Ein Endvolumen bis zu 20 µl wurde pro Tasche aufgetragen. Hierbei lag die Menge des aufzutragenden Proteins in der Regel bei 2,5 µg Protein. Die Elektrophorese dauerte bei einem Gel 1 Std. bei 200 V und 20 mA. Handelte es sich bei den aufzutragenden Proben um Bakterienzellen, wurde die entsprechende Menge an Kultur für 2 min zentrifugiert (16700 x g) und der Zelniederschlag mit 50 µl SDS - Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Zellen durch die Verwendung von Kanülen (Sterican®, Größe 2 und 18, Melsungen) geschert, erneut in einer Tischzentrifuge für 10 min zentrifugiert und 20 µl des Überstandes in die Taschen des Gels aufgetragen. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Gele für den Western Blot (3.2.9) verwendet oder mit Coomassie - Färbelösung gefärbt, ca. 30 min mit Entfärberlösung behandelt und in Wasser gelagert.

- **Trenngelpuffer (4 - fach)**

- 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)

- 0,4% SDS

- **Sammelgelpuffer (4 - fach)**

- 500 mM Tris/HCl (pH 6,8)

- 0,4% SDS

- **Laufpuffer**

- 25 mM Tris

- 192 mM Glycin

- 0,1% SDS

- **SDS - Probenpuffer (4 - fach)**

- 130 mM Tris/HCl (pH 6,8)

- 10% SDS

- 10% β - Mercaptoethanol

- 20% Glycerin

- 0,06% Bromphenolblau

- **Coomassie - Färbelösung**

0,2% Coomassie Brilliant Blue R - 250, 10% Essigsäure, 40% Methanol

- **Entfärbelösung**

10% Essigsäure, 30% Ethanol

Vor dem Gießen des Gels wurden folgende Lösungen frisch angesetzt:

	Trenngel			
kDa	36-94	16-68	14-56	12-43
Dichte [%]	7,5	10	12,5	15
H ₂ O [ml]	6	5	4	3
Trenngelpuffer [ml]	3	3	3	3
Acrylamid [ml]	3	4	5	6
TEMED [μ l]	10	10	10	10
10% APS [μ l]	80	80	80	80

	Sammelgel
H ₂ O [ml]	2,4
Sammelgelpuffer [ml]	1
Acrylamid [ml]	0,6
TEMED [μ l]	10
10% APS [μ l]	40

Tab. 18: Trenn- / Sammelgel Zusammensetzung

3.2.9 Immundetektion von Proteinen („Western - Blotting“)

3.2.9.1 Proteintransfer

Die Proteine wurden nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (Porablot PVDF, Porengröße 0,2 μ m, Macherey - Nagel, Düren) mit Antikörpern nachgewiesen. Hierfür wurde die Methode nach Towbin (72) angewendet. Nach durchgeführter SDS - PAGE wurde das Sammelgel entfernt. Der Blot wurde wie folgt in einer Semi-Dry-Elektrotransferzelle aufgebaut:

Kathode (-)

3 Schichten Rotilabo[®] - Blottingpapier (Dicke 0,35 mm, Carl Roth, Karlsruhe)

Polyacrylamidgel (Trenngel)

Nitrozellulosemembran

3 Schichten Rotilabo[®] - Blottingpapier (Dicke 0,35 mm, Carl Roth, Karlsruhe)

Anode (+)

Alle obengenannten Bestandteile des Blots wurden vor dem Zusammenbau in Towbinpuffer getränkt. Nur die Nitrozellulosemembran wurde zuvor in Methanol aktiviert und danach erst in Wasser und anschließend in Towbinpuffer gebadet. Die Proteine wurden 3 Std. bei 25 V / 200 mA pro Blot ($2,5 \text{ mA/cm}^2$) auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

- **Towbinpuffer**

25 mM Tris

192 mM Glycin

20% Methanol

3.2.9.2 Immundetektion

Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran in 50 ml 1%iger Milchpulverlösung (fettfrei) für mindestens 1 Std. oder über Nacht bei RT inkubiert. Die Antigen-Epitope wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Der primäre Antikörper ist gegen das nachzuweisende Protein gerichtet und der sekundäre Antikörper gegen den primären Antikörper. Die blockierte Membran wurde 3 x 10 min in TBS - T gewaschen. Der erste Antikörper (RGS - (His)₄ oder S - tag) wurde 1:2500 in 5 ml 1. Antikörperlösung verdünnt und die Membran für 1 – 1,5 Std. auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Hybridisierung des Proteins mit dem Antikörper wurde die Membran wie oben beschrieben gewaschen und danach mit dem in TBS - T 1:2500 verdünnten zweiten Antikörper, ECL Plex Cy3 Anti - Maus, inkubiert. Dabei war der Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carbocyanin 3 (Cy3) gekoppelt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des zweiten Antikörpers wurde die Exposition der Membran gegenüber Licht auf das Nötigste reduziert. Nach einer 1 – 1,5 stündigen Inkubationszeit und wiederholtem Waschen der Membran in TBS - T (3 x 10 min) wurde die Membran im Dunklen getrocknet. Die Proteinbanden wurden

mit dem Ettan DIGE Imager detektiert und mit Hilfe des Programms ImageQuant TL analysiert und quantifiziert.

- **Blockierungslösung**
5% Magermilchpulver
in TBS - T
- **TBS**
20 mM Tris/HCl pH 7,6
140 mM NaCl
- **TBS - T**
1 ml Tween 20 auf 1L TBS
filtriert
- **1. Antikörperlösung**
TBS - T
5% BSA
0,05% NaN₃
sterilfiltriert

3.2.10 Adenylatcyclase Test

Die Messung der AC - Aktivität wurde nach Salomon (73) durchgeführt. Hierbei wird die Menge von enzymatisch umgesetztem [α - ³²P] - ATP zu radioaktiv markiertem cAMP bestimmt. Mittels zwei hintereinander geschalteten Säulen wurde das nicht umgesetzte ATP vom gebildeten cAMP abgetrennt. Zur Ausbeutebestimmung diente [2,8 - ³H] - cAMP als interner Standard. Als Leerwert wurden zwei Ansätze ohne Protein angesetzt.

Die nachfolgend beschriebenen Schritte wurden in Eiswasser durchgeführt. In jedes Reaktionsgefäß wurden 50 µl 2 x Cocktail (siehe S. 73) vorgelegt. Handelte es sich bei den zu testenden Proben um Membranpräparationen, musste dem Cocktail zusätzlich ein ATP - regenerierendes System, bestehend aus Kreatinkinase und –phosphat, zugegeben werden. Bei löslichen, angereicherten ACn war dies nicht

nötig. Um die Regulierbarkeit der AC zu testen, wurde 1 µl Ligand (CAI - 1 oder LAI - 1) zugesetzt. Nachdem 40 µl Proteinlösung (5 µg) und 10 µl radioaktiv markiertes [α - ^{32}P] - ATP (750 µM) dazu pipettiert wurden, wurden die Ansätze unter leichtem Schwenken bei 37°C für 10 min inkubiert. Von jedem Testpunkt wurden Doppelwerte erhoben. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Reaktionsansätze in Eiswasser zurückgestellt und 150 µl AC - Stopp - Puffer dazu gegeben. Dann wurde mit weiteren 800 µl H₂O aufgefüllt und der Ansatz auf die Dowex - Säulen (9 x 1 cm Glassäule mit 1,2 g Dowex - 50WX4 - 400) überführt. Nachdem die Flüssigkeit das Säulenmaterial passiert hatte, wurde die Säule mit 3,5 ml destilliertem Wasser gewaschen. Durch das Übereinanderstellen der Dowex - auf die Alox - Säulen (10 x 0,5 cm Plastiksäule mit 1,0 g Al₂O₃ 90% aktiv, neutral) und der Zugabe von 5 ml Wasser, wurde das ^{32}P - cAMP auf die Alox - Säulen gewaschen. Parallel dazu wurden 4 ml Ultima Gold XR Szintillationsflüssigkeit in Szintillationsgefäße vorgelegt und das in den Alox - Säulen verbliebene ^{32}P - cAMP mit 4,5 ml Elutionspuffer in die Behälter eluiert. Der Inhalt wurde gemischt und die Radioaktivität im Liquid Szintillation Counter gemessen. Als Referenz für Enzymaktivität galt als Mindestmaß der dreifache Leerwert. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde die Gesamtmenge (Total) an eingesetztem [2,8 - ^3H] - cAMP und [α - ^{32}P] - ATP bestimmt. Dazu wurde wie in jedem Ansatz 50 µl Cocktail bzw. 10 µl [α - ^{32}P] - ATP (1:10) zu 4,5 ml Elutionspuffer mit 4,5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben (^3H - und ^{32}P - Total).

Die Enzymaktivität A [pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹] wurde nach folgender Formel berechnet:

$$A \left[\frac{\text{pmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \right] = \frac{\text{cpm} [^3\text{H}]_{\text{Total}}}{\text{cpm} [^3\text{H}]_{\text{Probe}} - 3\% \text{cpm} [^{32}\text{P}]_{\text{Probe}}} \cdot \frac{\text{cpm} [^{32}\text{P}]_{\text{Probe}} - \text{cpm} [^{32}\text{P}]_{\text{Leerwert}}}{\text{cpm} [^{32}\text{P}]_{\text{Total}}} \cdot \frac{\text{Substrat} [\mu\text{M}] \cdot 100 \mu\text{l}}{t_{\text{Inkubation}} [\text{min}]} \cdot \frac{1000}{\text{Proteinmenge} [\mu\text{g}]}$$

Da ^{32}P im Gegensatz zu ^3H ein starker β - Strahler ist und es aus diesem Grund zu einem Überstrahl vom ^{32}P - Zählkanal in den ^3H - Kanal kommt, werden 3% der gemessenen ^{32}P - Counts (counts per minute; cpm) vom jeweiligen ^3H - Count subtrahiert.

Nach Beendigung des Tests wurden die Dowex - Säulen mit 5 ml HCl (2 N) und insgesamt 15 ml Wasser regeneriert und gewaschen. Bei den Alox - Säulen erfolgte dies durch zweimaliges Waschen mit 4,5 ml 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5).

Verschlechterte sich die Ausbeute der Dowex - Säulen, wurden dem 5 ml HCl - Waschriff die Waschriffte mit 2 ml 5 N NaOH und anschließendes Spülen mit 30 ml Wasser vorgeschaltet.

AC - Cocktail (2x)

50% Glycerin (87%)

0,1 M Tris/HCl (pH 8,0)

6 mM MnCl₂

4 mM [2,8 - ³H] - cAMP (1,64x 10⁶ Bq/mmol)

Regenerierendes System

6 mM Kreatinphosphat (Stammlösung in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5)

0,46 mg/ml Kreatinkinase (Stammlösung in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5)

³H - cAMP - Stammlösung

40 mM cAMP mit Tris - Lösung auf pH 7,5 einstellen

inklusive 10 - 20 kBq/ml [2,8 - ³H] - cAMP (NH⁴⁺ - Salz)

ATP - Substratlösung (10x pH 7,5)

750 µM ATP

inklusive 16 - 30 kBq [α - ³²P] - ATP

pH 7,5

AC - Stopp - Puffer (1,5x)

3 mM ATP

1,5% SDS

mit gesättigter Tris - Lösung auf pH 7,5

Elutionspuffer

(0,1 M Tris/HCl, pH 7,5)

3.2.11 Statistik

Die Zahl (n) ergibt sich aus der Anzahl der Expressionen. Wurden mehrere Messpunkte einer Expression erhoben, wurde daraus das Mittel berechnet. Zur internen Überprüfung der Pipettiergenauigkeit wurde in jedem Test für jeden Messpunkt eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Aktivitäten wurden aufgrund der Vergleichbarkeit unterschiedlicher Expressionen und Konstrukte normalisiert. Hierbei wurde die Aktivität des jeweiligen Messpunktes innerhalb der Wirkungskurve ins Verhältnis zum jeweiligen Basalwert (100%) gesetzt. Die Abweichungen des Probenmittelwertes werden als „standard error of the mean“ (SEM) angegeben. Die Signifikanz unterschiedlicher Messgrößen wurde mit Hilfe des ungepaarten t - Tests ermittelt (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

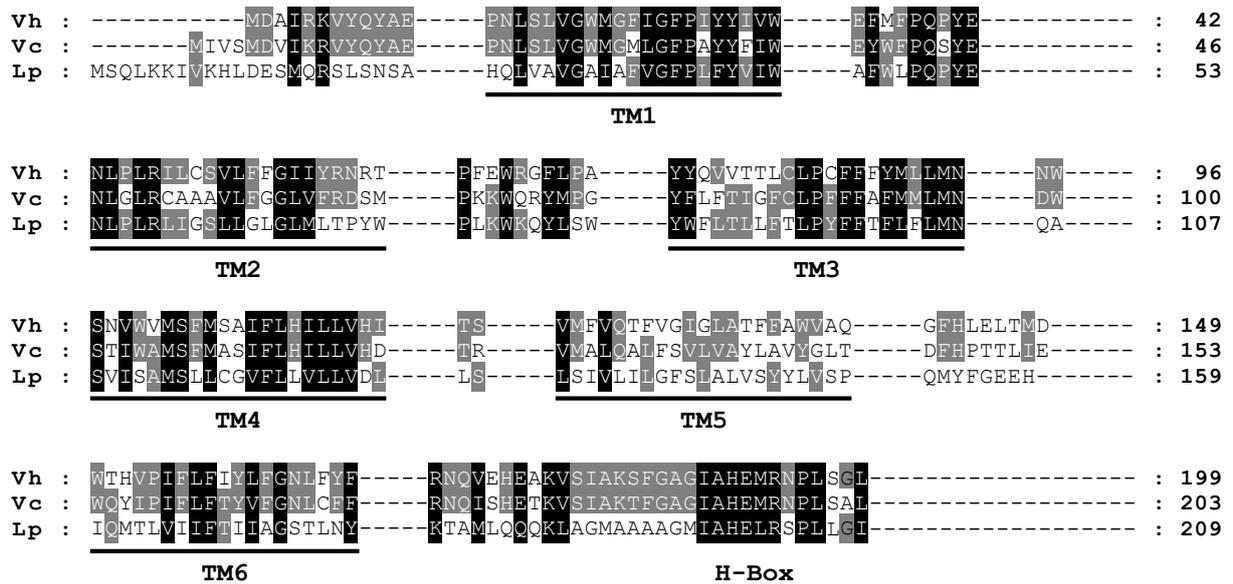


Abb. 7: „Alignment“ der homologen 6TMs der QS-Rezeptoren CqsS von *V. harveyi* (Vh), *V. cholerae* (Vc) sowie LqsS von *L. pneumophila* (Lp)

Unterstrichen sind die α -Helices 1-6 (TM1-6). Angezeigt ist der Grad der Konservierung der entsprechenden AS. Je dunkler der Hintergrund, desto konservierter die AS.

4.1.1 Verknüpfung von CqsS_{Vh} an Rv1625c₂₀₁₋₄₄₃, L₂₀₂₋₄₄₃ oder R₂₀₃₋₄₄₃

Der zytosolische Bereich von Rv1625c umfasst 240 ASn (AS₂₀₃₋₄₄₃), wahrscheinlich beginnend mit Arg₂₀₃. Es wurden insgesamt 15 unterschiedliche Verknüpfungspunkte beider Proteine getestet. Die Fusionsproteine, bei denen der Verknüpfungspunkt von CqsS_{Vh} unmittelbar am TM-Ausgang (Phe₁₆₈) oder an V₁₇₂ und bei Rv1625c innerhalb des Membranankerausgangs (Ala₂₀₁ bzw. Leu₂₀₂) gewählt wurde, resultierten in aktiven, jedoch nicht durch CAI-1 regulierbaren Chimären (Anhang 1 Konstrukt-Nr. 8-9 und 12-13). Erst unter Verwendung des konservierten Arginins am jeweiligen Membranausgang beider Proteine (Abb. 6) als Verknüpfungspunkt wurde ein aktives und regulierbares Konstrukt erzielt (Anhang 1 Konstrukt-Nr. 10). Ebenso wurden die Verknüpfungspunkte seitens des QS-Rezeptors V₁₇₂, H₁₉₀, P₁₉₅ und L₁₉₆ an R₂₀₃ von Rv1625c getestet. Da CAI-1 keines der Konstrukte mehr als 10% stimulierte (Anhang 1 Konstrukt-Nr. 1-5, 10, 14, 21, 23, 25), wurde nach einer optimaleren Kopplung beider Proteine gesucht. Auch die Mutation der AS F166C innerhalb des QS-Rezeptors CqsS_{Vh} zu dessen Homolog CqsS_{Vc} brachte nicht die erwünschte Steigerung der Stimulation des Ausgangssignals durch CAI-1 (Anhang 1 Konstrukt-Nr. 8-10, 12-14, 21, 23, 25). Dieser AS - Position, die sich am Ausgang der sechsten TM befindet, wird eine bedeutende Rolle bei der Ligandenbindung

zugesprochen (59,74,77). Mit dem LqsS-Rezeptor wurden homologe Konstrukte getestet (Anhang 1 Konstrukt-Nr. 85-89).

4.1.2 Verknüpfung von CqsS_{vh} an Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

Innerhalb des zytosolischen Bereichs der AC Rv1625c stach ein hoch konserviertes AS-Motiv hervor, das sich bereits in vorangegangenen Arbeiten als erfolgreicher Verknüpfungspunkt zwischen der katalytischen Domäne der CyaG AC (*Arthrospira maxima*) und den N-terminalen regulatorischen Modulen herausstellte (78). Beide ACn wiesen die AS-Sequenz R₄₅₆SEELL (CyaG) bzw. R₂₁₈SEALL (Rv1625c) auf. In Rv1625c befindet sich das Arg₂₁₈, welches den Beginn eines „cyclase transducer elements“ (CTE) markiert, 38 Aminosäuren vor der ersten katalytischen AS D₂₅₆. Bei dem CTE handelt es sich um einen 19 AS langen, hoch konservierten Bereich (Rv1625c₂₁₈₋₂₃₆, Abb. 9) sowohl in Vertebraten als auch in bakteriellen ACn, welcher eine entscheidende Rolle bei der AC Aktivität spielt (Ziegler et al. 2016 in Vorbereitung). Eine reproduzierbare Regulierbarkeit wurde durch die Fusion jenes hoch konservierten Arg₂₁₈ der Rv1625c an den Ausgang der TM von CqsS erreicht. Wurde der Fusionspunkt von CqsS mehr in Richtung H-Box verlagert, wurde teilweise eine erhöhte Stimulation der Chimäre erzielt. Vom CqsS TM-Ausgang bis zum His₁₉₀ der H-Box (Abb. 8) wurden 8 Verknüpfungspunkte getestet. Jedes dieser Konstrukte wurde durch CAI-1 aktiviert. Damit schien der kritische Punkt bei der Zusammenführung beider Proteine auf Seiten der katalytischen Domäne zu liegen. Fusionspunkte innerhalb der H-Box (Konstrukt-Nr. 22, 24, 26) erwiesen sich, hinsichtlich der Basalaktivität und Stimulierbarkeit, als untauglich (Abb. 8).

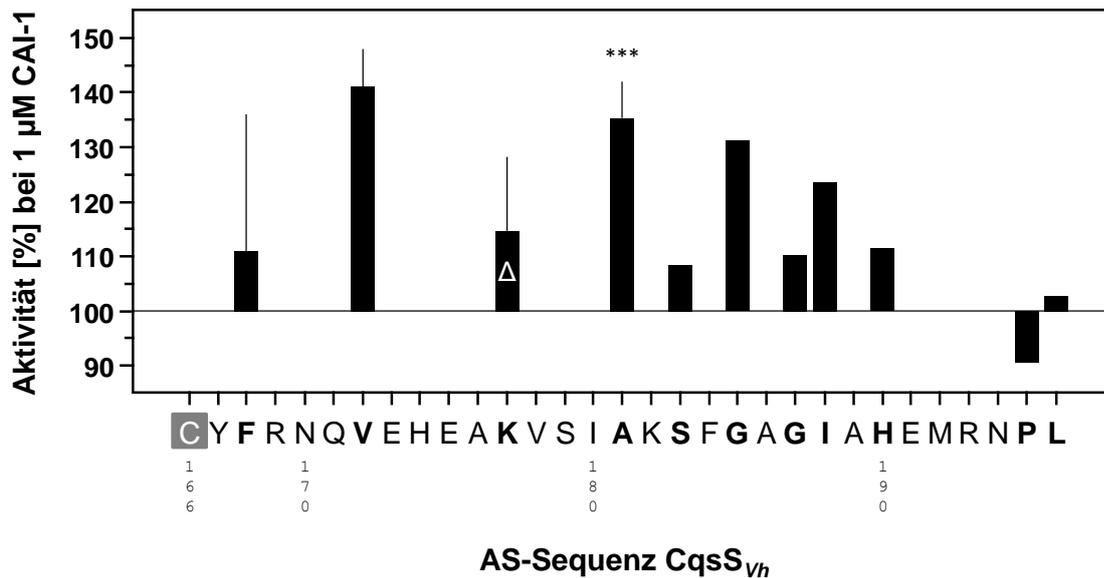


Abb. 8: Diagramm der Verknüpfungspunkte der Chimäre CqsS_{1-X}F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

Die variable AS, bis zu der die AS-Sequenz von CqsS verlängert wurde, ist durch ein X im Konstruktnamen verzeichnet. Die X-Achse gibt die CqsS-Verknüpfungspunkte wieder. Grau unterlegt ist die AS an Position 166, welche die Mutation F166C widerspiegelt. Eine Ausnahme stellt das Konstrukt CqsS₁₋₁₇₇-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ dar, welchem diese Mutation fehlt und die Wildtyp-Sequenz mit F166 von *V. harveyi* enthält (Δ). Dick gedruckt dargestellt ist jeweils die letzte AS des CqsS-Rezeptors, welche an R₂₁₈ von Rv1625c fusioniert wurde. Die Y-Achse gibt die prozentuale Aktivierung des Konstrukts bei der Zugabe von 1 µM CAI-1 an, dargestellt als schwarze Säulen. *** = $p < 0,001$. Die Konstrukte mit den CqsS-Verknüpfungspunkten: F₁₆₈ und V₁₇₂ wurden zweimal, K₁₇₇ dreimal und A₁₈₁ zwölfmal getestet. Alle weiteren Verknüpfungspunkte wurden einmal getestet. Die jeweilige basale Aktivität kann dem Anhang 1 entnommen werden.

Homologe Konstrukte wurden auch mit dem LqsS-Rezeptor durchgeführt (Anhang 1). Auch in diesem Fall wurden signifikante Stimulierungen bzw. Inhibierungen durch den Anschluss des QS-Rezeptors an R₂₁₈ von Rv1625c erzielt (Anhang 1 Konstrukt-Nr. 90-95, Ziegler et al., 2016 in Vorbereitung).

Mit einer basalen Aktivität von $7,1 \pm 0,9 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und der prozentualen Stimulation der Chimäre CqsS₁₋₁₈₁F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ um 35% (1 µM CAI-1), wurden die AS₁₋₁₈₁ von CqsS, angeknüpft an die katalytische Domäne von Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃, als optimaler Verbindungspunkt beider Proteine bestimmt (Abb. 9) und für weitere Konstrukte verwendet.

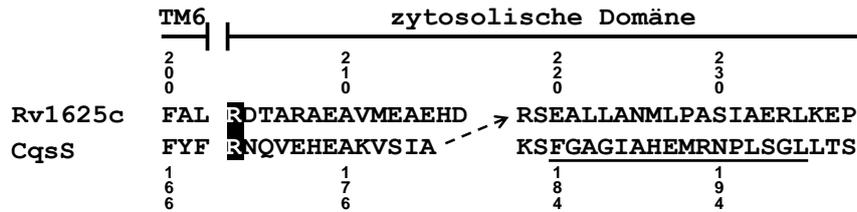


Abb. 9: „Alignment“ der Aminosäuresequenz des TM-Ausgangs der Proteine Rv1625c und CqsS (modifiziert nach (33)).

Der beste Verknüpfungspunkt beider Proteine ist durch den Pfeil markiert. Die H-Box der Histidinkinase - Domäne ist unterstrichen (75). Die Nummerierung der ASn des jeweiligen Proteins wurde ober - oder unterhalb der entsprechenden Sequenz angegeben.

4.2 Optimierung der Expressionsbedingungen

4.2.1 Proteinexpression in Abhängigkeit von IPTG-Konzentration und Zeit

Ziel war, die optimalen Expressionsbedingungen für die CqsS₁₋₁₈₁F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ Chimäre in pQE80_L zu ermitteln. Die Proteinexpression wird durch Zugabe von IPTG aktiviert. Es wurden 6 IPTG-Konzentrationen (30 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM 750 µM und 1 mM) getestet. Sowohl unmittelbar vor als auch 2,5 und 5 Std. nach der Induktion wurden Proben genommen und mittels Western Blot analysiert. Wie erwartet wurde kein chimäres Protein vor der Induktion exprimiert. Mit zunehmender IPTG-Konzentration (30 µM – 500 µM) stieg die Menge an exprimiertem Protein an, stagnierte jedoch ab 500 µM. Die Erhöhung der Inkubationszeit führte nur bei den niedrigen IPTG-Konzentrationen zu einer Steigerung der Proteinmenge (Abb. 10). Diese Versuche wurden bei 22°C durchgeführt.

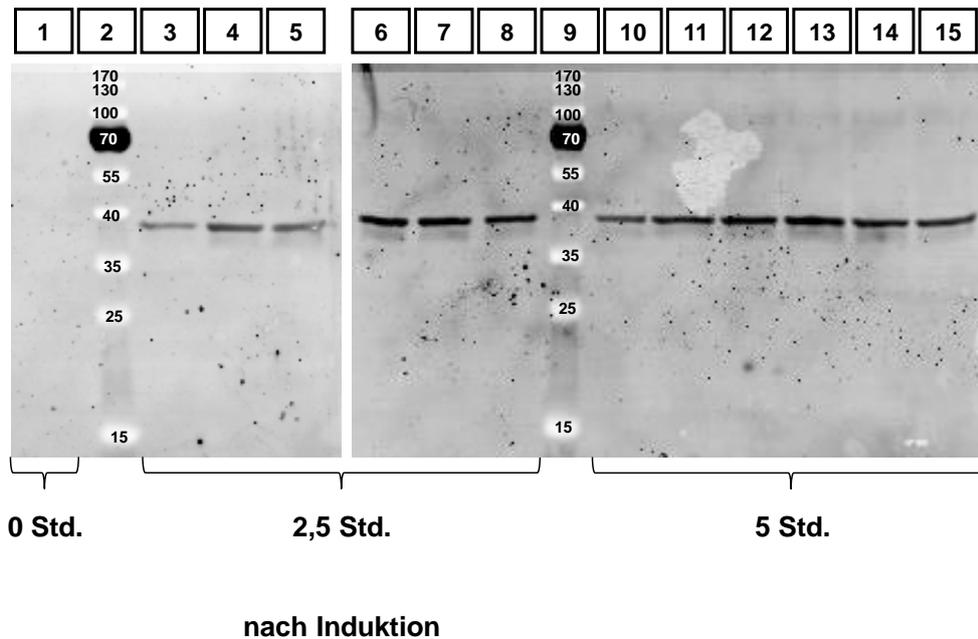


Abb. 10: Western Blot Analyse: Exprimierte Proteinmenge in Abhängigkeit der IPTG-Konz. und Zeit

Das Konstrukt CqsS₁₋₁₈₁F166C-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ wurde mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen induziert. Spur 1 stellt die Probe vor der Induktion, Spur 3-8 2,5 Std. und Reihe 10-15 5 Std. nach der Induktion dar. Die Anordnung der Linien entspricht von links nach rechts 30 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM und 1 mM IPTG. Als interner Größenstandard wurden in die Taschen 2 und 9 je 3 µl pefGOLD Proteinmarker IV (2.5) aufgetragen.

4.2.2 Proteinexpression in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

Es wurde die optimale Temperatur der Expression untersucht. Das Protein wurde bei 18°C über Nacht (15 Std.) oder bei 22°C und 30°C für 5 Std. exprimiert. Nach 2,5 und 5 Std. wurden von den Kolben, die bei 22°C und 30°C schüttelten, Proben genommen, die anschließend auf eine 15% SDS-PAGE aufgetragen und mittels RGS(His)₄-Antikörper detektiert wurden. Der Western Blot ergab keine Expression ohne IPTG-Zusatz. Zwar war die erzielte Proteinmenge bei 30°C höher als bei 22°C, dies traf jedoch auch auf den Proteinabbau zu (Abb. 11). Da die Expression bei 18°C über Nacht ebenso wie die Expression für 2,5 – 5 Std. bei 22 bzw. 30°C keine bis wenige Abbauprodukte aufwies, wurden 500 µM IPTG zur Induktion, 22°C und eine Expressionsdauer von 2.5 - 5 Std., abhängig vom Zellwachstum, als Standard-Expressionsbedingung festgelegt.

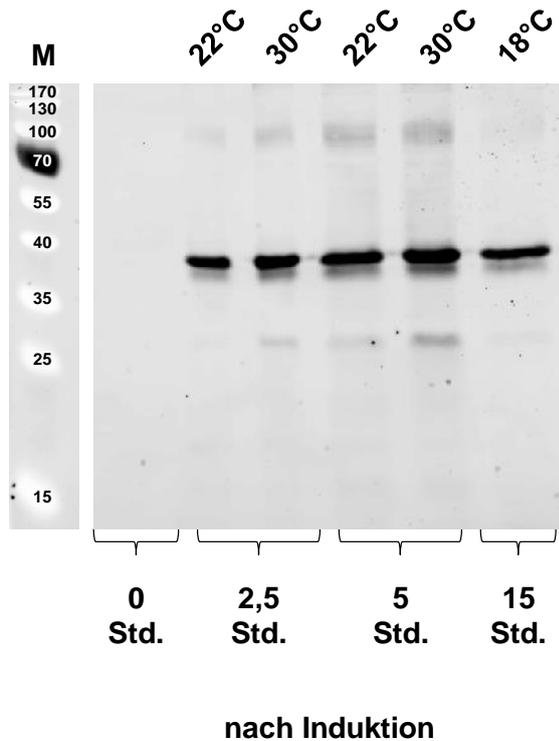


Abb. 11: Western Blot Analyse: Proteinmenge in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

Das Konstrukt CqsS₁₋₁₈₁F166C-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ wurde mit 500 µM IPTG induziert. Es wurden sowohl Proben vor (0 Std.), als auch 2,5, 5 und 15 Std. nach der Induktion (von links nach rechts) genommen. Als interner Größenstandard wurden 3 µl peqGOLD Proteinmarker IV (2.5) aufgetragen.

Entgegen der berechneten Masse von 47,7 kDa liefen die Proteinbanden stets unterhalb der erwarteten Höhe (42 kDa). Ein Grund hierfür könnte die unvollständige Denaturierung und die damit verbundene ungleichmäßige Bindung von SDS an das Protein sein. Dies kann gerade bei Membranproteinen zu einem veränderten Laufverhalten, einem sogenannten „gel shifting“, führen (79).

4.3 Signaltransduktion erfordert Homodimerisierung des Membranankers

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob neben der katalytischen Domäne auch die Dimerisierung des Membranankers für die Regulation der AC notwendig ist.

Diese Tests wurden mit der Wildtypsequenz von CqsS_{Vh} mit einem Phenylalanin an der Position 166 durchgeführt. Das Konstrukt CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ wies im Gegensatz zur Mutante CqsS₁₋₁₈₁F166C-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ (35% Stimulation bei 1 µM CAI-1 (Abb. 10) bzw. 42% Stimulation bei 10 µM CAI-1 (Anhang 2)) eine stärkere Aktivierung durch CAI-1 auf (84% Abb. 12 und Anhang 2) und ermöglicht so eine

eindeutigere Interpretation der Daten. Die Chimäre unterschied nicht zwischen den Liganden CAI-1 (C_{13}) und LAI-1 (C_{15}).

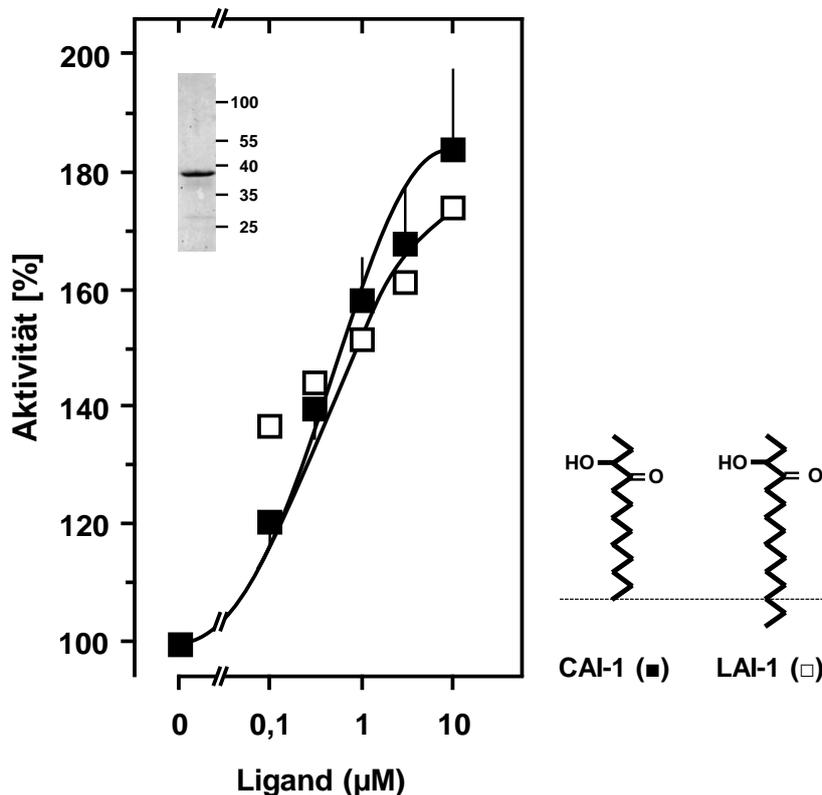


Abb. 12: Stimulation der Mutante $CqsS_{1-181}-Rv1625C_{218-443}$ durch CAI-1 oder LAI-1 (modifiziert nach (33)).

Die Basalaktivität betrug $5,5 \pm 0,8 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und die EC_{50} Konzentration 400 nM CAI-1 bzw. LAI-1. (■) CAI-1 ($n = 5-12$); (□) LAI-1 ($n = 1-2$). Die Stimulierung war ab 100 nM CAI-1 signifikant. Der Western Blot des Expressionsprodukts befindet sich links oben, die Struktur der Liganden rechts.

Für Klasse III ACn (11) als auch für Histidinkinasen (76,80) ist bekannt, dass für die enzymatische Aktivität eine Dimerisierung notwendig ist. Hier wurde daher untersucht, ob auch der QS-Rezeptor bei der Signaltransduktion dimerisieren muss. Dafür wurden bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene Rv1625c-Mutanten eingesetzt (20), bei denen entweder die Funktion der Me^{2+} bindenden AS D_{300} oder der AS R_{376} , welche für die Stabilisierung des Übergangszustandes verantwortlich ist, durch Mutation zu Alanin unterbunden wurde. Nur die Bildung eines „Heterodimers“ und die damit verbundene Komplementierung beider Mutationen ($D300A$ und $R376A$) führt zu einer aktiven AC (20). Zur Überprüfung der Dimerisierung des Membranankers wurde die Chimäre $CqsS_{1-181}-Rv1625C_{218-443}D300A$ alleine in beide „multiple cloning sites“ (MCSs) des pETDUET-3 Plasmids oder in Kombination mit $CqsS_{1-181}$

Rv1625_{C218-443}R376A kloniert und exprimiert (Tab. 19 und Anhang 1 Konstrukt-Nr. 81-82). Nur die Mutante, welche durch die Mutationen (D300A und R376A) komplementiert wird, wurde durch 10 μM CAI-1 um 97% stimuliert (Abb. 13 und Tab. 19 Konstrukt-Nr. 82).

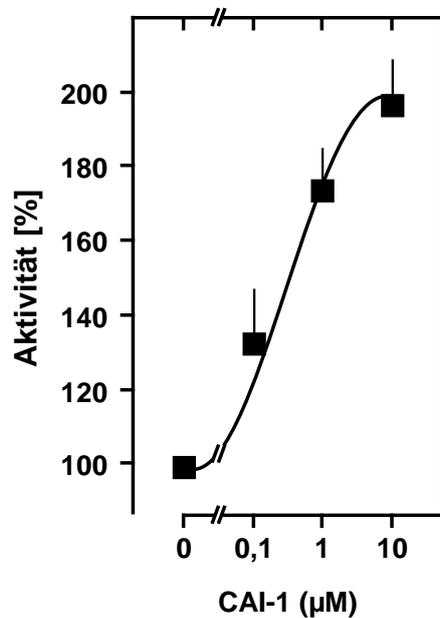


Abb. 13: Stimulation des Konstrukts Nr. 82 (Rv1625cD300A/Rv1625cR376A) durch CAI-1

Die Basalaktivität betrug $0,7 \pm 0,2 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und die EC_{50} Konzentration 300 nM CAI-1 ($n = 4$). Die Stimulierung war ab 1 μM CAI-1 signifikant.

Die Negativkontrolle (Tab. 19 Konstrukt-Nr. 81) war inaktiv. Das Experiment zeigt, dass der Membrananker (CqsS_{Vh}) homodimerisieren muss, um eine aktive und durch CAI-1 regulierbare AC zu erhalten. Die Frage, ob beide TMs für die Ligandenbindung verantwortlich sind, konnte dadurch nicht beantwortet werden.

Um die Spezifität der Membrananker-dimerisierung zu untersuchen, wurde der Rezeptor des Konstrukts CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625_{C218-443}R376A, mit der mutierten AS R376A, gegen den LqsS-Rezeptor (Tab. 19 Konstrukt-Nr. 83) bzw. den mutmaßlichen Rv1625c-Rezeptor (Tab. 19 Konstrukt-Nr.84) ausgetauscht. Das Konstrukt LqsS₁₋₁₉₁-Rv1625_{C218-443}R376A + CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625_{C218-443}D300A hatte eine leicht erhöhte Basalaktivität (Tab. 19 Konstrukt-Nr. 83). Eine doppelt so hohe Aktivität wurde mit der Mutante Rv1625_{C1-443}R376A + CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625_{C218-443}D300A erreicht (Tab. 19 Konstrukt-Nr. 84). Eine Stimulation durch CAI-1 oder LAI-1 war in beiden Fällen nicht möglich. Offenbar sind die beiden Monomere nahe genug beieinander, um ein aktives Zentrum zu bilden. Für eine intakte

Ligandenbindungsstelle ist ein CqsS-Homodimer notwendig (Tab. 19). Die Frage, ob der Ligand an der Grenzfläche beider TM-Monomere bindet oder die Bindung des Liganden innerhalb eines Monomers oder beider Monomere erfolgen muss, kann nicht beantwortet werden.

Konstrukt-Nr.	Dimere	Aktivität [nmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	
		Basal	10 µM CAI-1
81	 CqsS-Rv1625c-D ₃₀₀ A	0,03 ± 0,004	0,03 ± 0,005
	 CqsS-Rv1625c-D ₃₀₀ A		
82	 CqsS-Rv1625c-R ₃₇₆ A	0,7 ± 0,2 [†]	1,4 ± 0,3 [*]
	 CqsS-Rv1625c-D ₃₀₀ A		
83	 LqsS-Rv1625c-R ₃₇₆ A	1,1 ± 0,2 [†]	1,0 ± 0,2
	 CqsS-Rv1625c-D ₃₀₀ A		
84	 Rv1625c-Rv1625c-R ₃₇₆ A	1,9 ± 0,6 [†]	1,8 ± 0,6
	 CqsS-Rv1625c-D ₃₀₀ A		

Tab. 19: Homodimerisierung des QS-Rezeptors CqsS für Funktionalität und Spezifität der Chimäre notwendig (modifiziert nach (33))

Angegeben sind die Basalaktivitäten und die Aktivitäten nach Zugabe von 10 µM CAI-1. [Nr. 81] Als Negativkontrolle diente das inaktive Homodimer [CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃D300A]₂ [Nr. 82] Mit den komplementären Punktmutationen Rv1625cD300A und Rv1625cR376A wurde ein regulierbares Heterodimer erzeugt (*; p<0.05 zum Basalwert). Die sich ergänzenden Mutanten [Nr. 83] und [Nr. 84] mit verschiedenen Membrandomänen waren aktiv, jedoch nicht regulierbar. Die basale Aktivität der Konstrukte [Nr. 82], [Nr. 83] und [Nr. 84] war signifikant verschieden zu dem Homodimer [Nr. 81] (†; p<0.001). Die Grundaktivität (0,01 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹) von *E.coli* BL-21 (DE3) wurde nicht subtrahiert. $\bar{X} \pm \text{SEM}$; n = 4.

Die CqsS-Konstrukte zeigten ein unorthodoxes Laufverhalten während der SDS-PAGE (4.2). Dies war auch hier der Fall. Um die Expression der Proteine in beiden MCSs bestätigen zu können, enthielt die MCS1 N-terminal einen RGS(His)₄-tag (Abb. 14A) und die MCS2 C-terminal einen S-tag (Abb. 14B), wodurch eine individuelle Immundetektion möglich war. In beiden Fällen weisen die Proteine sowohl eine Bildung von Polymeren als auch Abbauprodukte auf, was möglicherweise ein Grund für die niedrigen Basalaktivitäten (Tab. 19) war.

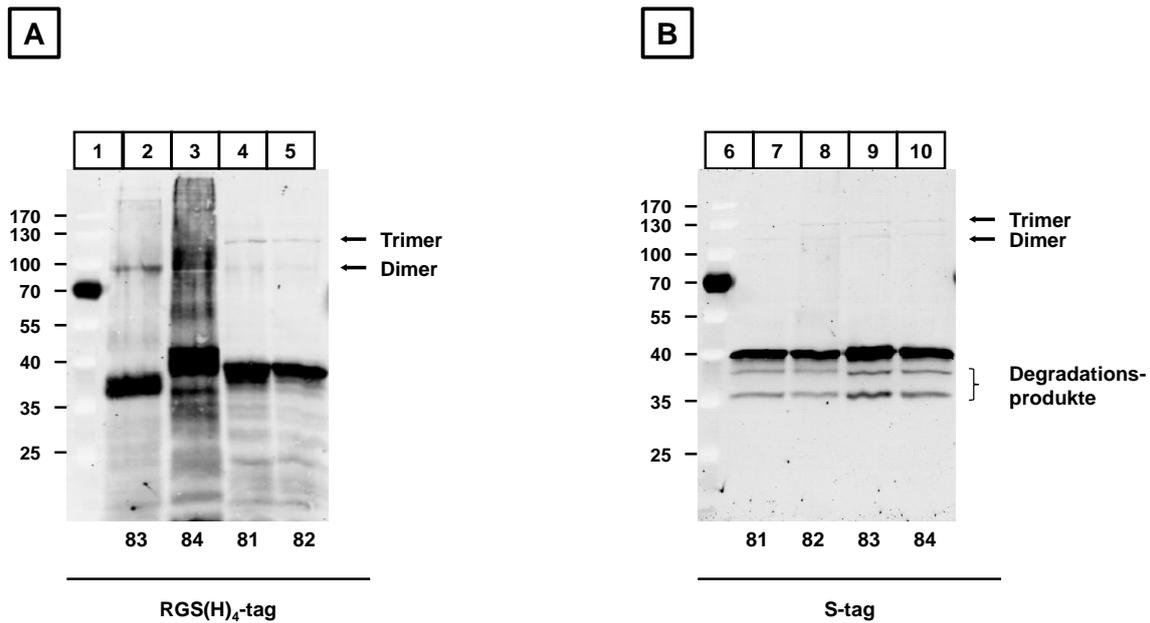


Abb. 14: Western Blot Analyse

Die Beschriftung 81-84 entspricht der Bezeichnung der Konstrukte in Tab. 19:

[81] = Homodimer [CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃-D300A]₂

[82] = Heterodimer [CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃-R376A] + [CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃-D300A]

[83] = Heterodimer [LqsS₁₋₁₉₁-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃-R376A] + [CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃-D300A]

[84] = Heterodimer [Rv1625C₁₋₄₄₃-R376A] + [CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃-D300A]

Es wurde je 5 µg Membranpräparation aufgetragen. Die erwartete Masse der CqsS₁₋₁₈₁-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ Monomere entsprach 47,7 kDa (RGS(His)₆-tag) bzw. 49,7 kDa (S-tag), für das LqsS₁₋₁₉₁-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ Monomer 48,0 kDa (RGS(His)₆-tag) und für das Holoenzym Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ 48,7 kDa (RGS(His)₆-tag). Als interner Größenstandard wurden in die Taschen 1 und 6 je 3 µl peqGOLD Proteinmarker IV (2.5) aufgetragen.

4.4 Position 166 in CqsS_{Vh} beeinflusst die Stärke des Liganden-vermittelten Signals

Wie bekannt, hat Cys₁₇₀ in CqsS_{Vc} am Ende der sechsten TM eine große Bedeutung für die Erkennung des Liganden CAI-1 (74,77,80). Bereits der Austausch von Cys₁₇₀ (in *V. cholerae*) zu Phe (in *V. harveyi*) führt zu einem drastischen Abfall der Aktivität des Proteins (77). In unserem Fall wurde durch die Mutation F166C in CqsS_{Vh} ebenfalls ein Rückgang der Stimulierbarkeit beobachtet (Abb. 15). Dies würde bedeuten, dass der Ligand durch den hydrophoben Kern der ca. 30 Å breiten Membran diffundieren muss, um an die AS am Ende der sechsten TM zu gelangen. Um zu überprüfen, ob dieses Ergebnis bei jeder beliebigen AS erzielt wird, wurde

Phe₁₆₆ (entspricht dem Cys₁₇₀ in *V. cholerae*) gegen alle anderen 19 proteinogenen ASn ausgetauscht.

Unterteilt man die ASn in apolare ASn, polare und ungeladene und geladene ASn wird sichtbar, dass die Stimulation der Gruppe der polaren und ungeladenen ASn durch CAI-1 unter 100% liegt (Abb. 15). Diese AS-Gruppe ist aus thermodynamischen Gründen ungünstig in eine unpolare Membran einzubauen und kommt daher seltener darin vor. Dennoch spielen die polaren Gruppen dieser ASn für die Stabilisierung der α -Helices eine entscheidende Rolle und machen zusammen mit ionisierbaren ASn 20 - 22% der TM-Domäne aus. Davon wiederum macht ein Großteil die ASn Serin, Cystein und Threonin aus (81).

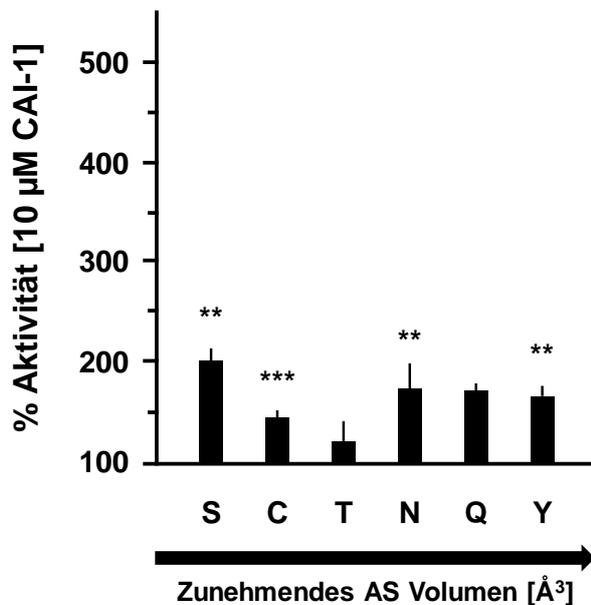


Abb. 15: Gruppe der polaren ungeladenen ASn zeigt eine Stimulation unter 100%

Im Konstrukt CqsS₁₋₁₈₁F166X-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ wurde die AS (X) durch die in der X-Achse angegebenen ASn ausgetauscht. Die ASn nehmen von links nach rechts an Volumen [Å³] zu. Die Y-Achse gibt die prozentuale Aktivierung der Mutante durch 10 µM CAI-1 wieder. $\bar{X} \pm \text{SEM}$, n = 4 - 12. Signifikante Stimulationen gegenüber der Basalaktivität: *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001. Die Basalaktivität lag zwischen 2,3 – 7,1 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹.

Die Aktivierung der Konstrukte, die an Position 166 eine geladene Aminosäure haben, beträgt zwischen 100 und 200%, mit Ausnahme von F₁₆₆R (88 ± 17%). Hierbei unterscheiden sich wiederum die basischen von den sauren ASn, wobei letztere eine doppelt so hohe Stimulation aufweisen (Abb. 16).

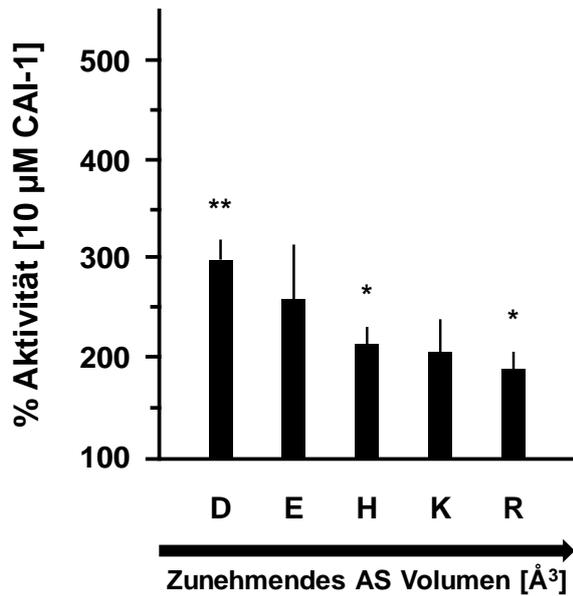


Abb. 16: Geladene ASn an der Position 166 zeigen eine Stimulation zwischen 100 - 200%

Die AS an Position 166 in CqsS₁₋₁₈₁F166X-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ wurde durch die in der X-Achse angegebenen ASn ausgetauscht. Mit zunehmendem Volumen [\AA^3] nimmt die Aktivierung ab (von links nach rechts). 10 μM CAI-1 stimuliert zwischen 100 und 200%. $\bar{X} \pm \text{SEM}$, n = 4. Signifikante Aktivierungen verglichen zur Basalaktivität: *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001. Die Basalaktivität lag zwischen 2,0 – 5,0 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹.

Die Gruppe der apolaren ASn zeigte Aktivitäten zwischen -1% (F166W) bis +380% im Fall von F166L durch 10 μM CAI-1 (Abb. 17). Die ASn mit kleinen Seitenketten und einem Volumen von 48 \AA^3 (Gly) bzw. 67 \AA^3 (Ala) werden um 83% bzw. 76% stimuliert. Die Seitenketten von Leucin, Isoleucin und Methionin haben ein Volumen von 124 \AA^3 . Mit Valin an Position 166 wird um 122% stimuliert. Die großen ASn mit aromatischen Seitenketten an Position 166 erlauben eine Aktivität von -1% (F166W) bzw. +84% (F₁₆₆). Trotz einer möglicherweise verminderten Stabilität der α -Helix mit Pro166, wurde eine Aktivierung von 131% erreicht.

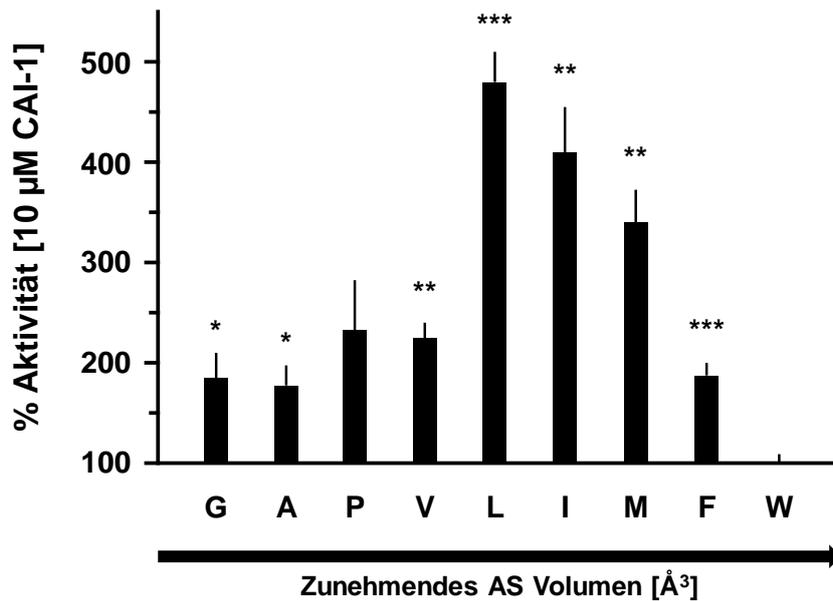


Abb. 17: Apolare ASn an der Position 166

Die AS an Position 166 in CqsS₁₋₁₈₁F166X-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ wurde durch die in der X-Achse angegebenen ASn ausgetauscht. Das Volumen [Å³] der auf der X-Achse dargestellten ASn nehmen von links nach rechts zu. Leu, Ile und Met weisen jeweils ein Volumen von 124 Å³ auf. Durch die Zugabe von 10 μM CAI-1 werden Stimulationen bis zu 380% erzielt. $\bar{X} \pm \text{SEM}$, n = 4 - 12. Signifikante Aktivierungen verglichen mit der Basalaktivität: *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001. Die basale Aktivität lag zwischen 2,0 – 9,6 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹.

Aufgrund der hohen Stimulation der CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ Mutante durch CAI-1 um 380% (Abb. 17 und 18) wurde diese Variante für alle weiteren Experimente verwendet. Interessanterweise befähigte die Mutation F166L die Chimäre dazu, die Liganden entsprechend ihrer Länge und ihrer Kopfgruppe zu unterscheiden.

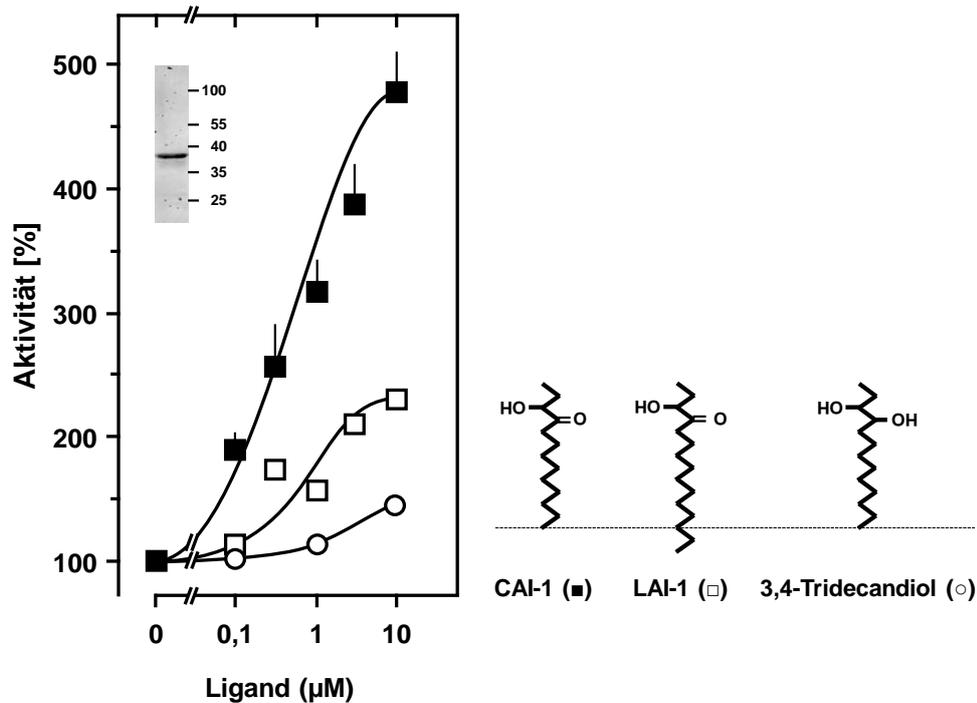


Abb. 18: Aktivierung der Chimäre $CqsS_{1-181}F166L-Rv1625c_{218-443}$ durch CAI-1, LAI-1 und 3, 4-Tridecandiol (modifiziert nach (33))

Die Basalaktivität betrug $4,0 \pm 0,7$ nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. EC₅₀ = 400 nM CAI-1; EC₅₀ = 900 nM LAI-1. (■) CAI-1 (n = 5-11); (□) LAI-1 (n = 1); (○) 3, 4-Tridecandiol (n = 4). Stimulierung signifikant ab 100 nM CAI-1. Der Western Blot befindet sich links oben, die Struktur der Liganden rechts.

4.5 Kinetische Charakterisierung von $CqsS_{1-181}F166L-Rv1625c_{218-443}$

In den AC-Tests wurden immer 5 μg Protein eingesetzt. Die Aktivität der Chimäre ($CqsS_{1-181}F166L-Rv1625c_{218-443}$) betrug mit 75 μM ATP $4,0 \pm 0,7$ nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ (n = 11). Zur kinetischen Charakterisierung des Proteins wurde jeweils nur ein Parameter (Substrat, Protein, Zeit, Temperatur oder pH-Wert) verändert.

4.5.1 Substratkinetik

Die Michaeliskonstante (K_m) für Mn²⁺-ATP (± 100 nM CAI-1) wurde mit den Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk ($K_m = 335$ μM ATP; $K_m + 100$ nM CAI-1 = 201 μM ATP) und Hanes-Woolf ($K_m = 233$ μM ATP; $K_m + 100$ nM CAI-1 = 163 μM ATP) ermittelt (Abb. 19B und C). Dies entspricht in etwa den publizierten Werten für die Rv1625c AC (20,66). Der K_m -Wert wurde durch CAI-1 nicht

beeinflusst. Er ist größer als die üblicherweise eingesetzte ATP-Konzentration von $75 \mu\text{M}$ ATP. Aufgrund der Vergleichbarkeit mit den Vorversuchen wurden die Testbedingungen jedoch beibehalten. Die Werte für den Hill-Koeffizienten lagen bei 0,849 bzw. 0,893 (+ 100 nM CAI-1). Wurden die durch Hanes-Woolf ermittelten V_{max} -Werte verwendet, erhielt man einen Hill-Koeffizienten von 1,009 und 1,017 (+ 100 nM CAI-1).

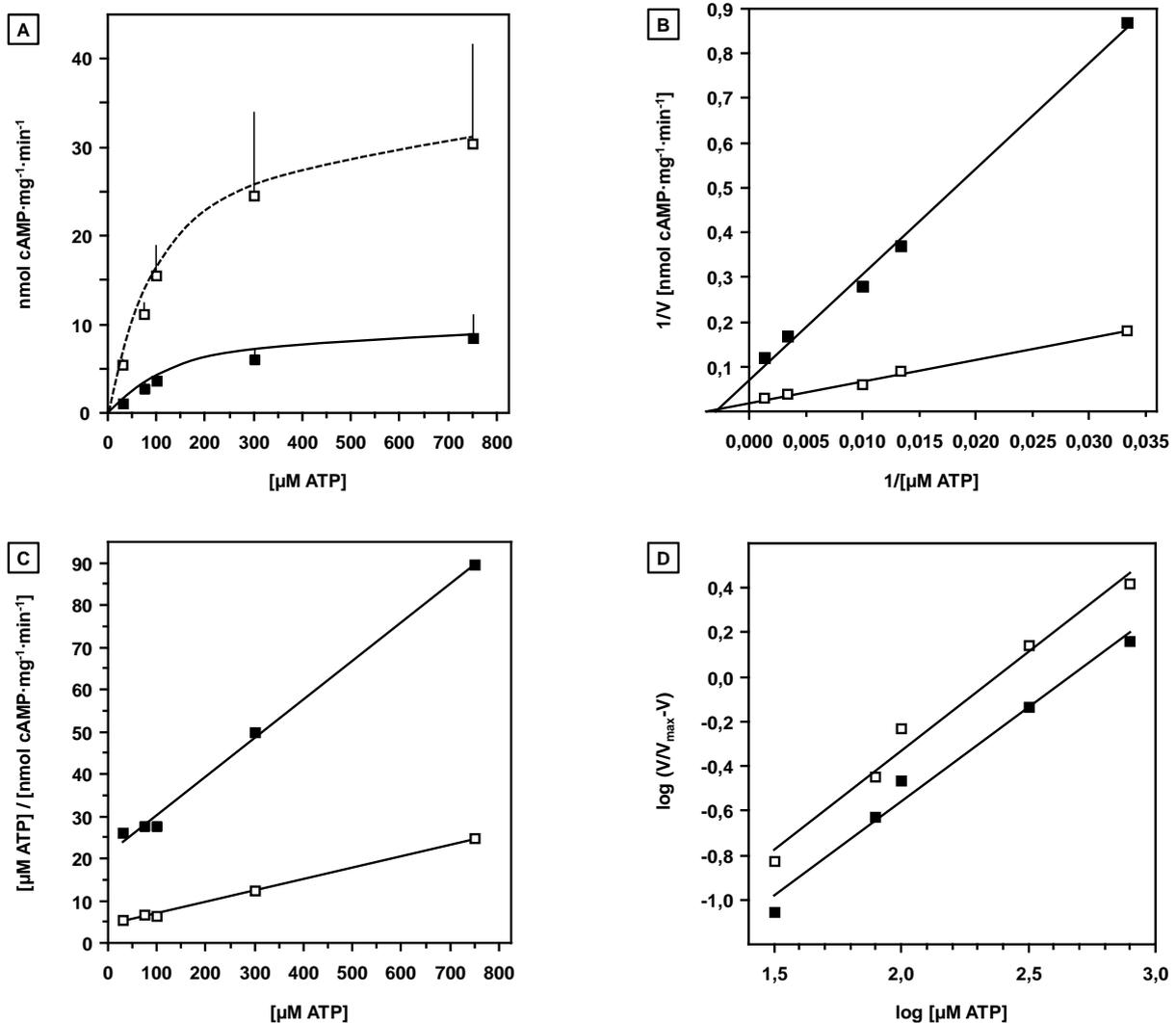


Abb. 19: Substratkinetik von CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ ± 100 nM CAI-1

Auftragung nach:

[A] Michaelis-Menten

[B] Lineweaver-Burk: V_{max} : 14 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, K_m : 335 μM ATP; ($R^2 = 0,994$).

+ 100nM CAI-1: V_{max} : 42 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹; K_m : 201 μM ATP; ($R^2 = 0,996$).

[C] Hanes-Woolf: V_{max} : 11 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, K_m : 233 μM ATP; ($R^2 = 0,995$).

+ 100nM CAI-1: V_{max} : 37 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹; K_m : 163 μM ATP; ($R^2 = 0,997$).

[D] Hill: Hill_{koef} (LB): 0,849 ($R^2 = 0,985$). + 100nM CAI-1: 0,893 ($R^2 = 0,987$).

Hill_{koef} (HW): 1,009 ($R^2 = 0,995$). + 100nM CAI-1: 1,017 ($R^2 = 0,995$)

(■) Ohne Zusatz; (□) 100nM CAI-1; V = spezifische Aktivität [nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹]; $\bar{X} \pm \text{SEM}$; n = 2

4.5.2 Proteinabhängigkeit

Die eingesetzte Proteinmenge lag zwischen 1 - 140 μg . Zu sehen ist eine lineare Beziehung zwischen der Proteinkonzentration und der Enzymaktivität ($R^2 = 0,983$, Abb. 20). Der zweigeteilte, von der Linearität abweichende Anstieg der Aktivität (angedeutet durch gestrichelte Linien), lässt sich durch die kleinen Pipettierolumina und einen Pipettenwechsel erklären.

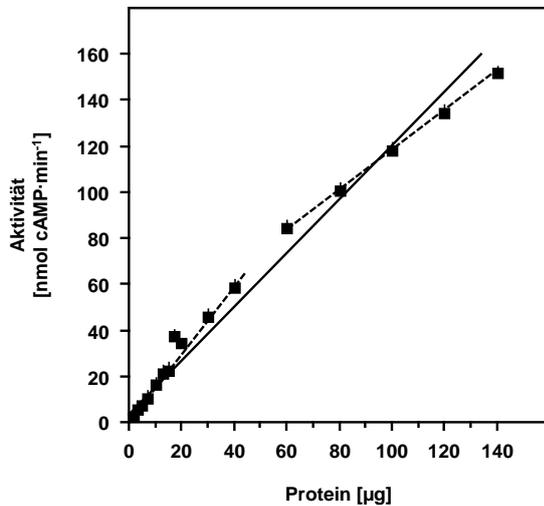


Abb. 20: Proteinabhängigkeit von $\text{CqsS}_{1-181}\text{F166L-Rv1625c}_{218-443}$

$\bar{X} \pm \text{SEM}$; $n = 2$

4.5.3 Zeitabhängigkeit

Der Umsatz von ATP zu cAMP war linear mit der Inkubationszeit ($R^2 = 0,999$, Abb. 21).

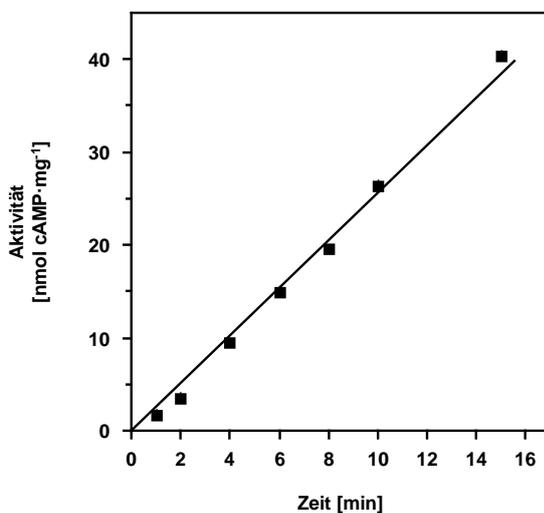


Abb. 21: Zeitabhängigkeit von $\text{CqsS}_{1-181}\text{F166L-Rv1625c}_{218-443}$

$\bar{X} \pm \text{SEM}$; $n = 2$

4.5.4 Temperaturabhängigkeit

Das Temperaturoptimum der Aktivität war 37°C (Abb. 22A). Die Aktivierungsenergie E_A von 40,7 kJ/mol wurde mittels Arrhenius-Plot ermittelt ($R^2 = 0,904$, Abb. 22B). Dies entspricht den Werten für die lösliche AC Rv1625_{C204-443} (20).

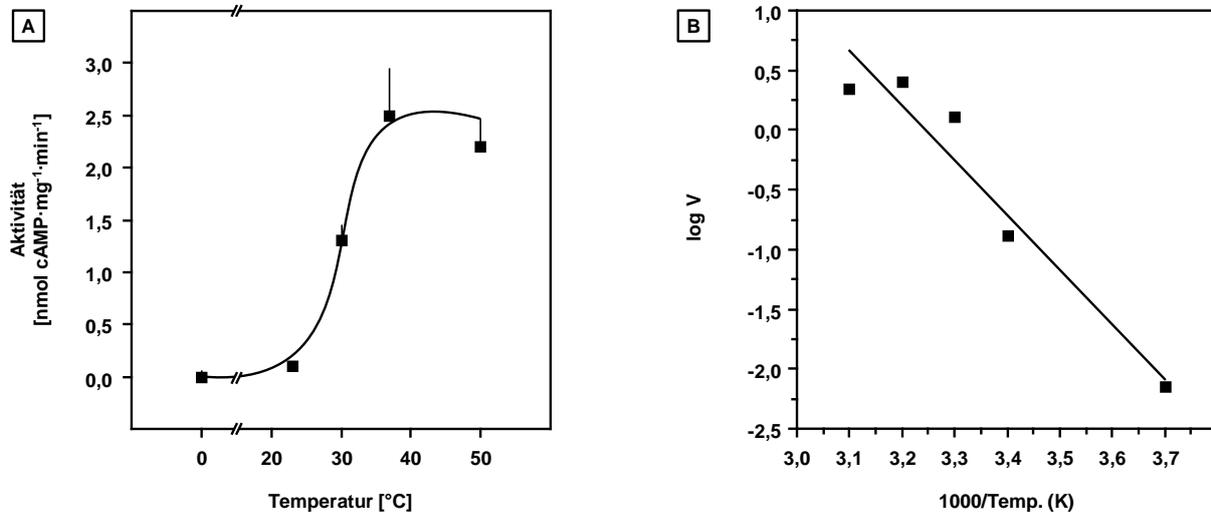


Abb. 22: Temperaturabhängigkeit von CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

[A] Temperaturabhängigkeit; [B] Arrhenius-Plot. V = spezifische Aktivität [nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹]

$\bar{X} \pm \text{SEM}$; n = 2

4.5.5 pH-Abhängigkeit

Der optimale pH-Bereich dieser Chimäre war pH 7,5 - 8,0.

Die verwendeten Puffer sind rechts neben dem Graphen aufgeführt. Für die lösliche AC Rv1625_{C204-443} wurde ein ähnlicher Wert berichtet (20).

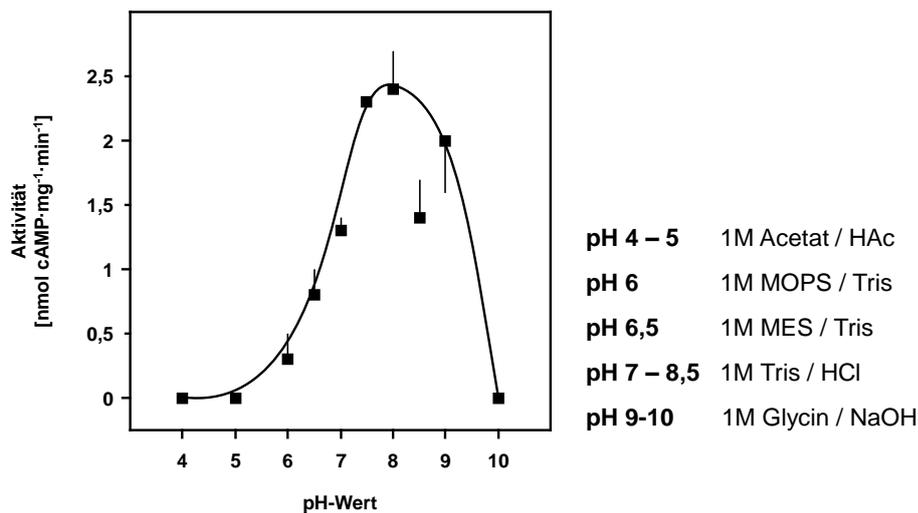


Abb. 23: pH-Abhängigkeit von CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

$\bar{X} \pm \text{SEM}$; n = 2

4.6 Eigenschaften der Aminosäuren und deren Position in der 6. TM für die Signalweiterleitung entscheidend

Angesichts vorheriger Untersuchungen (4.4) und Ergebnisse der Gruppe um B. Bassler, welche der AS₁₆₆ (C₁₇₀ in *V. cholerae*) eine besondere Rolle bei der Ligandenbindung zuschreiben (74,77), wurde der Membranausgang der sechsten α -Helix genauer untersucht. Dafür wurden C-terminal die letzten sieben ASn der 6.TM schrittweise mutiert (Konstrukt-Nr. 47 - 52). Der Positionstausch der ASn des äußeren Triplets FYF₁₆₈ (in *V. harveyi*) zu YFF₁₆₈ (Abb. 24) veränderte die Stimulation nur minimal (84% auf 51%). Auch die Art der aromatischen ASn scheint keinen Einfluss darauf zu haben (FYF168YYF +64%; Abb. 24). Der Austausch F166L steigerte die Stimulation um das 4,5-fache (vergleiche Abb. 12 und 18). Dies war positionsspezifisch. Veränderungen in der Abfolge der Aminosäuresequenz (LYF168LFY) halbierten die Aktivierung (Abb. 24). Wurde eine weitere aromatische AS durch Leucin ersetzt (LYF168LLF), sank die Stimulation auf das Niveau des Wt_{Vh} (86%). Durch den Austausch FYF168LNY (AS-Triplett aus LqsS) wurde nur noch eine Aktivierung von 21% beobachtet. Die Stimulierbarkeit durch LAI-1, dem spezifischen Liganden für LqsS, wurde durch diese Modifikation nicht begünstigt. Ebenso senkten die Mutationen G163A und FGN164AGS die Sensitivität für CAI-1 (Abb. 24). Die zuletzt genannte Mutation wurde entsprechend der AS-Sequenz-Positionen von LqsS gewählt und auf die Regulierbarkeit durch CAI-1 und LAI-1

getestet. Auch hier wurde die Empfindlichkeit für LAI-1 nicht erhöht. Damit zeigt sich, dass der Ausgang der sechsten TM einen sensiblen Bereich für die Signalbildung bzw. dessen Weiterleitung darstellt, der sich nicht auf die Position 166 beschränkt.

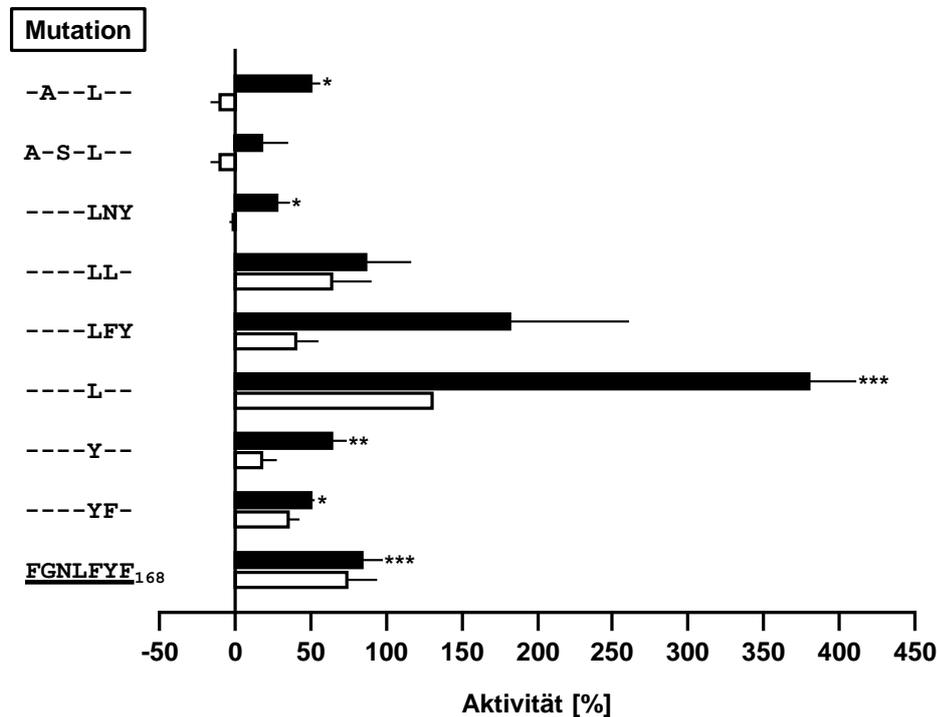


Abb. 24: Eigenschaften der ASn und deren Position in TM6 von CqsS_{vh} wichtig

Gezeigt sind Mutationen am Membranausgang der sechsten α -Helix (Y-Achse). Die Stimulation verändert sich bereits durch geringfügige Modifikationen in diesem Bereich. Die AS-Sequenz FGNLFYF₁₆₈ (unterstrichen) gibt die letzten sieben ASn der sechsten TM von CqsS_{vh} an. Unveränderte ASn sind mit einem Strich dargestellt. Mutierte ASn wurden mit der entsprechenden AS angegeben. Schwarze Balken = 10 μ M CAI-1; n = 2 – 11, $\bar{X} \pm$ SEM oder weiße Balken 10 μ M LAI-1; n = 1 - 4, $\bar{X} \pm$ SEM.

4.7 Alle Transmembranhelices sind für die Signaltransduktion notwendig

Da in vier Transmembranhelices ASn, welche die Sensitivität und die Spezifität des Liganden beeinflussen, identifiziert wurden (74), wurde der Fokus auf diese α -Helices gerichtet. Durch den Austausch kompletter Transmembranspannen von CqsS gegen LqsS sollte die für die Ligandenbindung relevante(n) TM(s) eingegrenzt werden. Die durch das Programm TopPred (82) ermittelten Transmembranhelices für CqsS von *V. cholerae* (74, SI Appendix) wurden auf die Sequenz von *V. harveyi* übertragen

und entsprechend gegen die AS-Sequenz von LqsS (*L. pneumophila*) mutiert. Die Transmembranhelices wurden wie folgt definiert (Abb. 7): 1.TM₁₃₋₃₃; 2.TM₄₃₋₆₃; 3.TM₇₄₋₉₄; 4.TM₉₇₋₁₁₇; 5.TM₁₂₀₋₁₄₀ und 6.TM₁₅₀₋₁₆₈ (74). Nach dem Austausch der Transmembranhelix TM3, TM4, TM5 oder TM6 von CqsS gegen LqsS ließ sich der Rezeptor weder durch CAI-1 noch durch LAI-1 regulieren (Abb. 26A). Dieser QS-Rezeptortyp kommt sowohl in *Vibrio*, *Legionella*, *Burkholderia* als auch etlichen weiteren Eubakterien vor (41,49,74,77). Ein AS-„Alignment“ von 6TM Proteinen verschiedener Spezies von γ -Proteobakterien (Abb. 25) zeigt, dass die 4.TM, die die Länge des Liganden erkennen soll (44,74), hoch konserviert ist. Im Gegensatz dazu weisen TM5 und 6 wenig Sequenzhomologien auf (Abb. 25).

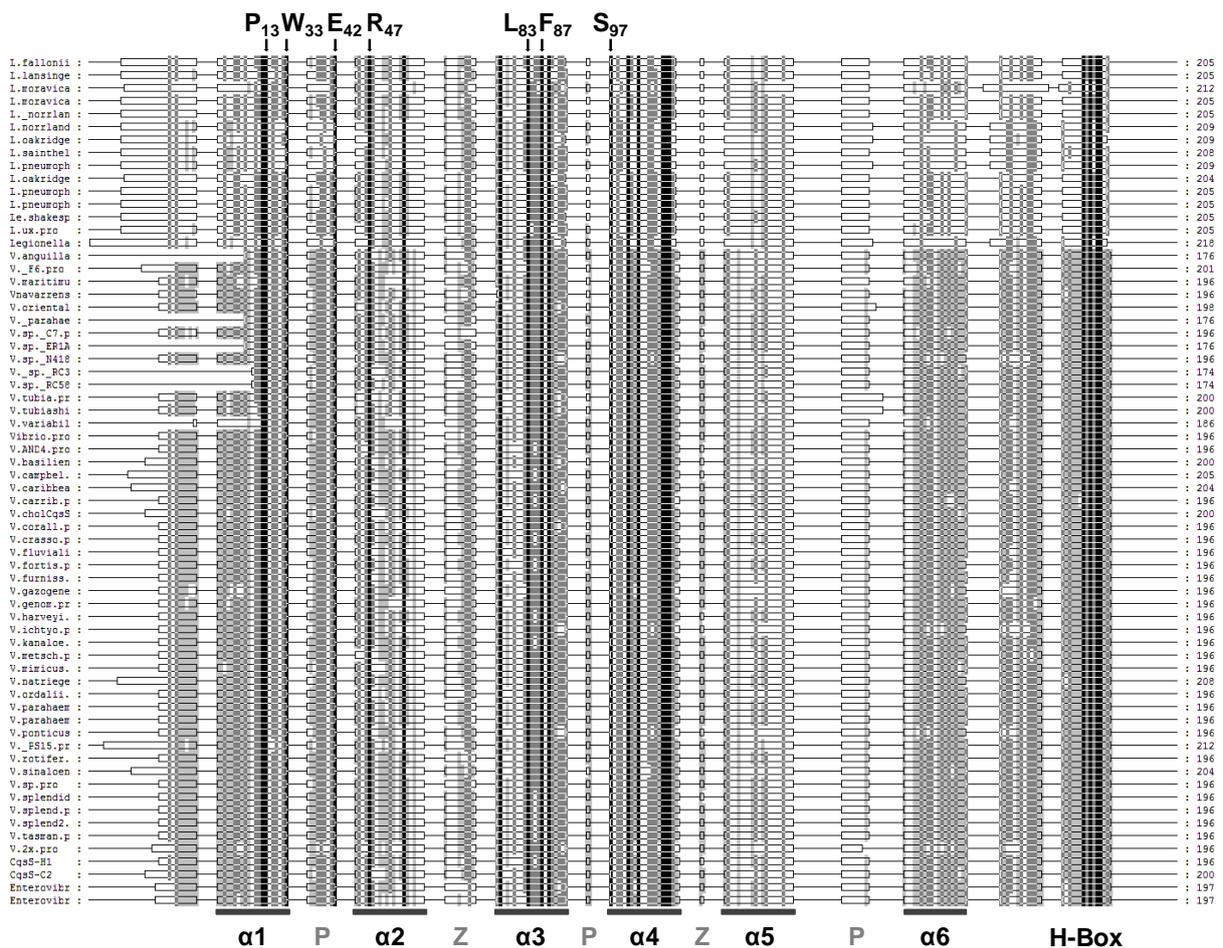


Abb. 25: AS-„Alignment“ von QS-Proteinen von *Vibrio sp.*, *Legionella sp.* und *Enterovibrio sp.* (von J.E. Schultz)

Die 6 transmembranen α -Helices sind als $\alpha 1$ -6 gekennzeichnet. Die zytosolischen und periplasmatischen Schlaufen sind mit (Z) bzw. (P) markiert. Der Grad der Konservierung der ASn steigt mit zunehmender Grauintensität. Oberhalb des „Alignment“ sind durchgehend konservierte Reste hervorgehoben.

Ausgehend von der Annahme, dass Sequenzunterschiede in TM5 und 6 der Spezifität des Liganden bzw. der Formung des Signals zugrunde liegen, wurden beide TMs unabhängig voneinander ausgetauscht. Beide Mutanten waren aktiv, jedoch nicht regulierbar (Abb. 26A). Auch der zusätzliche Austausch der Schlaufe zwischen der 5. und 6. TM in Kombination mit TM6 brachte keine stimulierbare Chimäre (Anhang 1).

Die AS-Sequenz der 5. zusammen mit der 6. TM oder die 6. TM mit und ohne Schlaufe in das Holoenzym Rv1625c eingesetzt, reicht offensichtlich nicht aus um eine funktionelle Bindung von CAI-1 zu ermöglichen (Anhang 1).

Dieselben Ergebnisse, die mit den beiden letzten TMs 5 und 6 erzielt wurden, wurden auch mit einem Austausch der ersten (AS₁₃₋₃₃), dritten (AS₇₄₋₉₄) oder vierten (AS₉₇₋₁₁₇) Transmembranspanne von CqsS_{Vh} durch LqsS erhalten (Abb. 26A). Ließ man Pro₁₃ unverändert und änderte nur die AS_{n14-33} der ersten TM, wurde sowohl mit CAI-1 als auch mit LAI-1 eine Hemmung um 30% beobachtet (Abb. 26B und Tab. 20). In den ersten TMs in CqsS_{Vc} wurden die die Regulierbarkeit beeinflussenden ASn identifiziert, u.a. P₃₁, W₃₇, E₄₆, R₅₁ (74). In CqsS_{Vh} sind dies P₂₇, W₃₃, E₄₂ und R₄₇. Diese ASn sind hoch konserviert (die Positionen der ASn stehen oberhalb Abb. 25), ebenso L₈₃, F₈₇ und S₉₇ (CqsS_{Vh}). P₃₁, W₃₇, E₄₆, R₅₁ und F₉₁ (CqsS_{Vc}) wurden durch Mutation zu Alanin als regulierende ASn identifiziert (74). In unserem Fall führte die Mutation R47A in CqsS_{Vh} (R₅₁ in CqsS_{Vc}) zu einem Zusammenbruch der Signalübertragung (Anhang 1). Dies wurde durch die Mutation S97A (am periplasmatischen Ausgang der 4. TM) nicht beobachtet (Anhang 1). Hingegen erwies sich der Austausch eines Großteils der zweiten TM (AS₄₃₋₅₉) als verträglich. Es wurde nicht nur eine Stimulation durch CAI-1 um 111% erreicht, sondern es änderte sich auch die Liganden-Affinität. So stieg die Affinität des Rezeptors für LAI-1 an (+151%). Bereits die Modifikation der letzten vier C-terminalen ASn der zweiten TM, hin zu ihrem LqsS-Homolog (RNRT63TPYW), senkte die Aktivierung durch LAI-1 von anfangs 151% auf 81% und im Falle von CAI-1 von 111% auf 52% (Abb. 26B und Anhang 3). Dies deutet auf eine Beteiligung der zweiten Transmembranhelix in der Ausbildung der Liganden-Bindungstasche hin. Durch diese Mutation vergrößert sich möglicherweise die Bindungstasche und ermöglicht die Bindung des größeren Liganden LAI-1 (C₁₅).

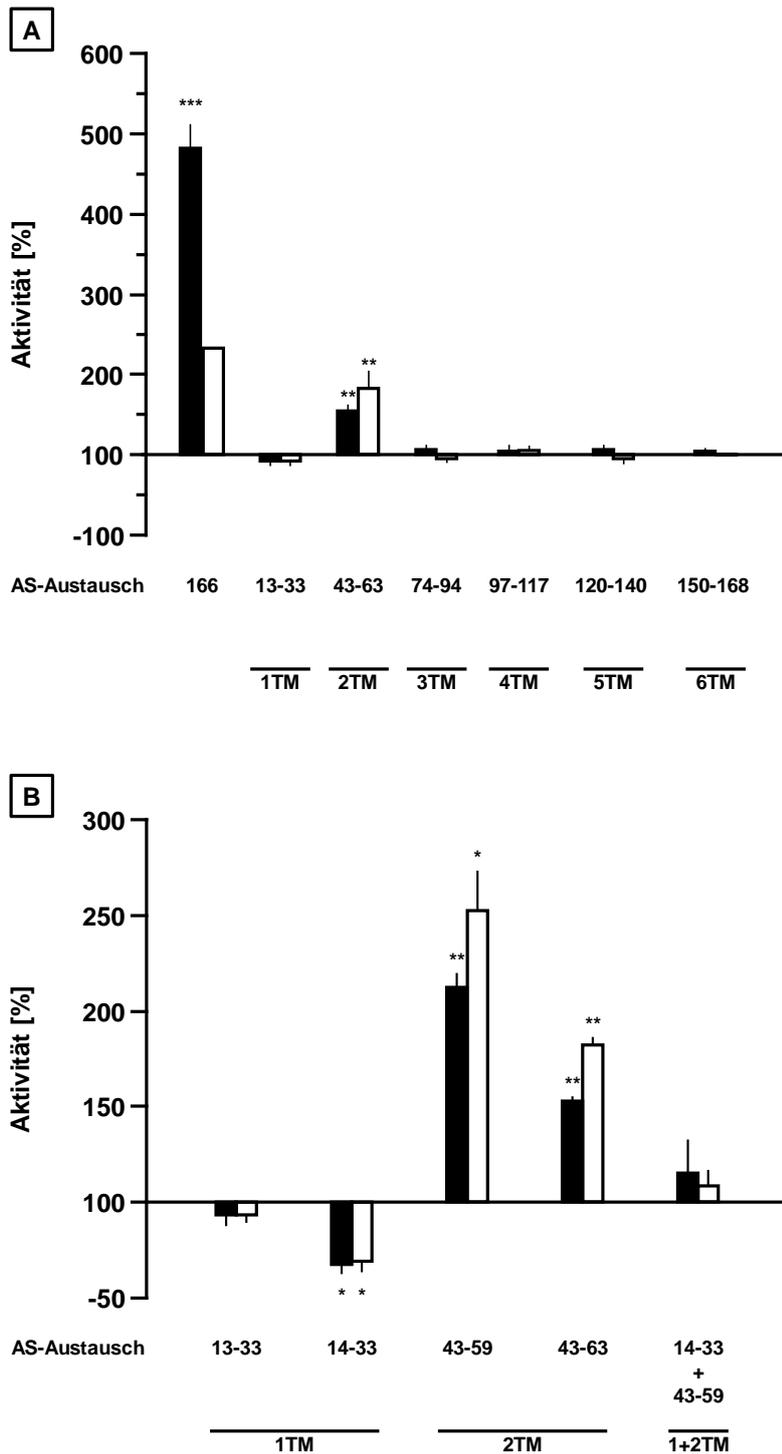


Abb. 26: AS-Austausch der Transmembranhelices von CqsS gegen LqsS

Auf der X-Achse dargestellt sind die ausgetauschten TMs des CqsS-Rezeptors gegen die homologe AS-Sequenz von LqsS ($n = 3$, $\bar{X} \pm \text{SEM}$). Zum Vergleich ist die Chimäre CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ (L₁₆₆) angegeben. Alle Mutanten (außer beim Austausch der TM6) enthalten die Mutation F166L im CqsS-Rezeptor. Die Regulation durch die Zugabe von 10 μM Ligand sind durch schwarze (CAI-1) bzw. weiße (LAI-1) Säulen dargestellt. Die Basalaktivität bewegte sich zwischen 0,3 – 6,5 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. Signifikante Aktivierungen verglichen mit der Basalaktivität sind markiert: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Die unregulierbaren Mutanten, bei denen entweder TM3, TM4 oder TM5 ausgetauscht wurde, hatten eine deutlich geringere Basalaktivität, verglichen mit den TM1-, TM2- oder TM6-Mutanten (Tab. 20). Da Mutationen innerhalb der 2. und 6. TM nachweislich zu einer veränderten Affinität für Liganden und unterschiedlichen Signalstärken führten (Abb. 26 und Anhang 1), liegt die Annahme nahe, dass mehrere TMs an der Rezeptorfunktion und der damit einhergehenden Ligandenbindung beteiligt sind.

Konstrukt-Nr.	Region	AS-Austausch	Aktivität		Regulation	Regulation
			[nmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	SEM	durch 10 µM CAI-1	durch 10 µM LAI-1
55	TM1	13-33	1,1	0,2	-32%	-31%
56	TM1	14-33	1,2	0,1	-7%	-7%
57	TM2	43-63	3,6	0,5	+52%	+81%
58	TM2	43-59	2,8	0,3	+111%	+151%
59	TM3	74-94	0,4	0,0	+4%	-4%
60	TM4	97-117	0,3	0,1	+2%	+3%
61	TM5	120-140	0,4	0,1	+4%	-4%
62	TM6	150-168	3,8	1,8	+3%	±0%
64	TM1+2	14-33 + 43-59	6,5	0,6	+15%	+8%
65	TM2+6	43-63 + 150-168	2,6	0,5	+3%	-6%
66	TM2+6	43-59 + 150-168	5,4	0,9	+15%	±0%

Tab. 20: AS-Austausch der TMs von CqsS gegen LqsS

Zusätzlich zur ausgetauschten Membranregion ist die jeweilige Basalaktivität und die prozentuale Stimulation durch CAI-1 und LAI-1 aufgelistet (n = 3).

Die Kombination zweier Mutanten mit unterschiedlichem Signalausgang (TM1 und TM2) sowie der Austausch der 2. und 6. TM führten zu keiner nennenswerten Stimulation (Tab. 20).

4.8 Die Aktivierung der Chimäre CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ durch CAI-1 ist irreversibel

Das QS-System von *V. cholerae* kontrolliert u.a. dessen Virulenz und Biofilmproduktion. Bei hoher Zelldichte wird der Ligand CAI-1 produziert und sezerniert. Anschließend bindet er an die extrazelluläre Seite des CqsS-Rezeptors (80). Als Folge einer intrazellulären Phosphorylierungskaskade werden die

Virulenzgene und die Biofilmproduktion heruntergefahren (42,48). Da CqsS keine großen extrazellulären Schleifen besitzt und CAI-1 lipophil ist, ist es wahrscheinlich, dass der Ligand innerhalb / zwischen der dimeren Membranregion bindet. Von einem QS-System, welches schnell auf sich verändernde Bedingungen reagieren muss, sollte erwartet werden, dass die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor nur von kurzer Dauer ist. Für diese Fragestellung wurde das Konstrukt CqsS₁₋₁₈₁F₁₆₆L-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ verwendet. Hierzu wurden die Membranen mit unterschiedlichen CAI-1 Konzentrationen (0 µM, 0,3 µM und 10 µM) stimuliert und anschließend einem AC-Test ohne radioaktive Reagenzien unterzogen. Nach Abstoppen der Reaktion in Eiswasser wurden die Membranen mit Hilfe eines weiteren Ultrazentrifugationsschrittes re-isoliert und mit Membranpuffer gewaschen. So wurde sichergestellt, dass überschüssiger Ligand aus der Reaktion entfernt wurde. Anschließend wurden die Proben in einem Radioaktiv-Test (3.2.10) mit den oben genannten Liganden-Konzentrationen (0,3 µM und 10 µM CAI-1) erneut stimuliert. Membranen, welche mit 0,3 µM CAI-1 vorbehandelt wurden (Abb. 27 Mitte) zeigten vergleichbare Basalaktivitäten zu den Membranen, die durch 0,3 µM CAI-1 stimuliert wurden (Abb. 27 links). Die mit 0,3 µM CAI-1 vorbehandelten Proben ließen sich durch die erneute Zugabe von 0,3 µM CAI-1 nur geringfügig wieder re-stimulieren (+27%). 10 µM CAI-1 aktivierte diese Membranen um 112%. Membranen, welche zuvor mit 10 µM CAI-1 gesättigt wurden, konnten durch 0,3 µM CAI-1 nicht erneut stimuliert werden. Ein ähnliches Ergebnis (+32%) wurde bei der Zugabe von 10 µM CAI-1 erzielt (Abb. 27 rechts). Im Vergleich dazu wurden Membranen, welche zuvor nicht mit dem Liganden vorbehandelt wurden, durch Zugabe von CAI-1 um 91% (0,3 µM CAI-1) bzw. 238% (10 µM CAI-1) aktiviert (Abb. 27 links). Als Kontrolle, dass das Lipid CAI-1 nicht an den Wänden des Reaktionsgefäßes verblieb oder der Ligand unspezifisch mit der Membran assoziiert vorlag, sondern eine spezifische Bindung mit dem Rezeptor einging, wurden zwei weitere Ansätze durchgeführt. Einmal wurde Protein gegen Puffer ersetzt um sicherzustellen, dass der Ligand sich weiterhin in der Lösung hielt. Beim zweiten Ansatz wurde der UZ-Überstand auf die durch ihn erzeugte Stimulierung naiver Membranen getestet. Die UZ-Überstände waren inaktiv (AC-Aktivitäten < 0,04 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹), konnten jedoch die Membranen in gleichem Maße wie die vorher eingesetzte CAI-1 Konzentration stimulieren. Das Ergebnis bedeutet, dass die Aktivierung durch CAI-1, irreversibel ist.

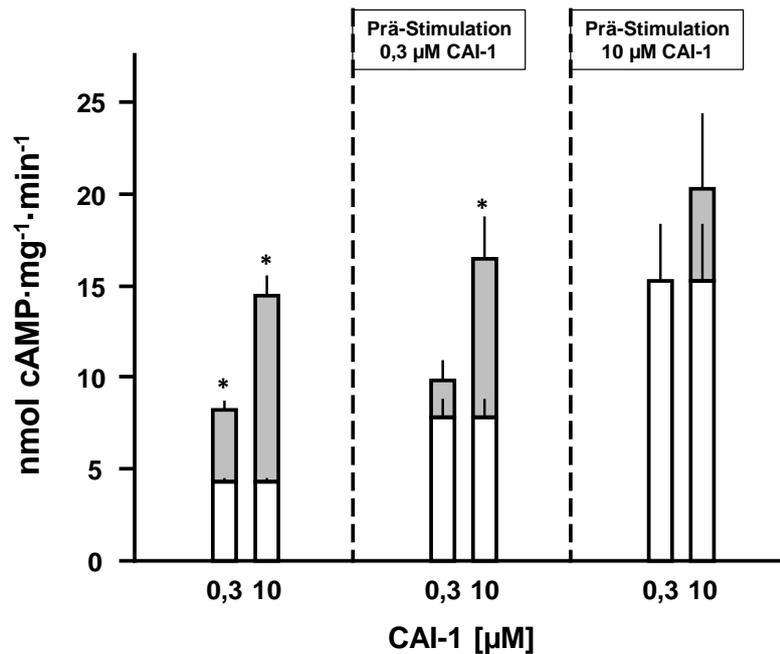


Abb. 27: Ligandenbindung an den CqsS-Rezeptor ist irreversibel (modifiziert nach (33))

Membranen mit CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ wurden mit 0,3 µM (Mitte) und 10 µM CAI-1 (rechts) stimuliert, erneut isoliert und durch 0,3 µM oder 10 µM CAI-1 re-stimuliert. Signifikante Stimulationen durch den Liganden im Vergleich zum entsprechenden Basalwert der Kontrolle (ohne Prä-Stimulation durch CAI-1) sind mit einem Stern markiert (*= p < 0,05). Der Mittelwert wurde aus den Doppelbestimmungen ermittelt (n = 6, $\bar{X} \pm \text{SEM}$). Die weißen Balken stellen die jeweilige Basalaktivität dar, graue Balken darüber repräsentieren die zusätzliche Aktivität durch CAI-1.

Die Expression der Proteine wurde durch SDS-PAGE / Western Blot analysiert. Oberhalb der detektierten Banden befand sich jeweils eine sehr schwache unspezifische Bande bei ca. 48 kDa, welche auch bei den erneut isolierten Membranpräparationen (MP A-C) vorhanden war, jedoch nicht in der Kontrolle (MP). Dieses Protein scheint Bestandteil des Überstandes zu sein, welcher auch in den Überständen A (+DMSO), B (+0,3 µM CAI-1) und C (+10 µM CAI-1) konzentriert vorliegt (Abb. 28B).

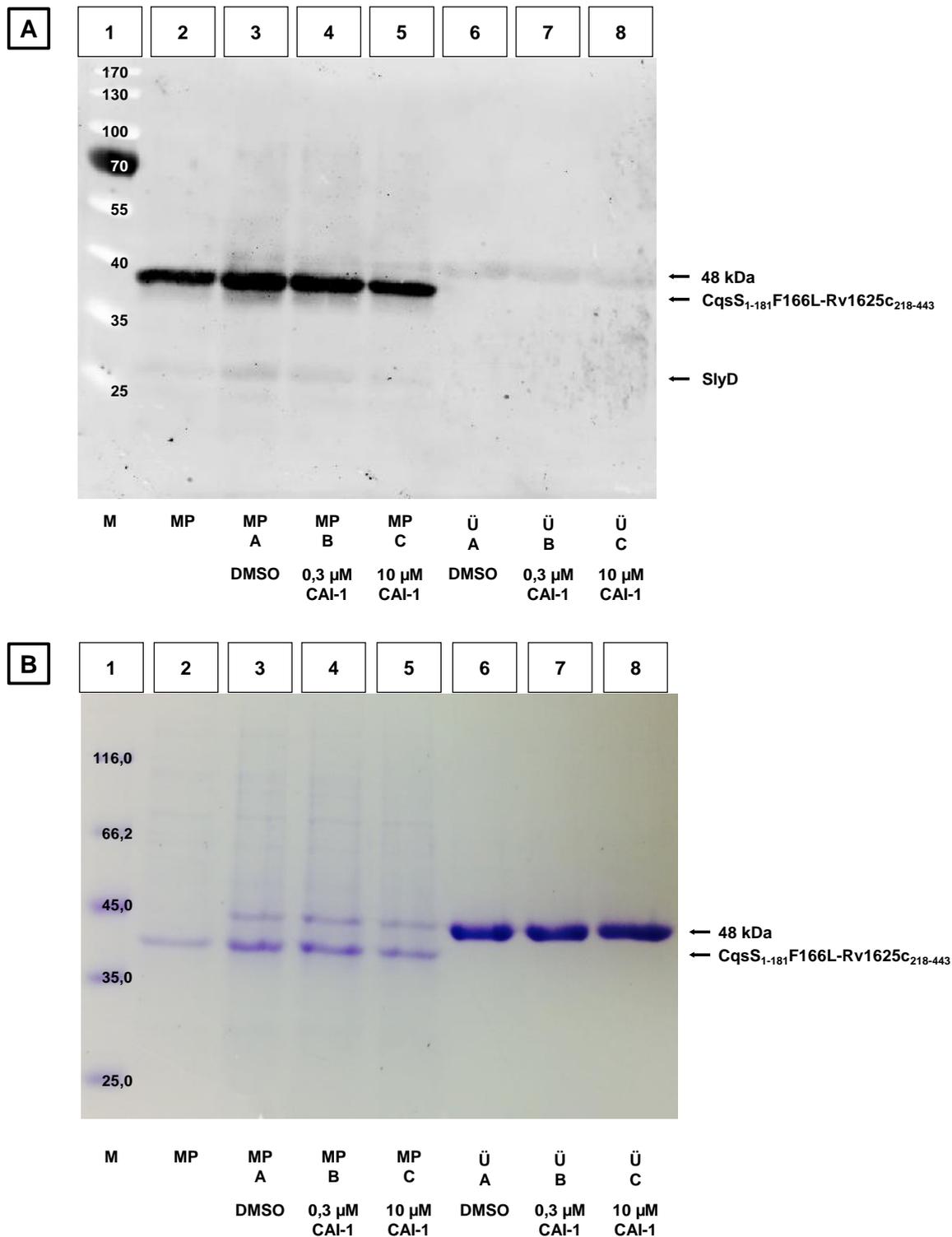


Abb. 28: Western Blot Analyse und SDS-PAGE des Liganden-Bindungstests

[A] Immundetektion der Chimären CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃ mit dem RGS(His)₄-AK.

[B] 12,5% SDS-PAGE mit 2,5 µg Protein.

Im Gegensatz zur erwarteten Laufhöhe von 47,7 kDa lief die Proteinbande auf einer Höhe von 42 kDa (Auswertung mittels Ettan DIGE Imager). 3 µl peqGOLD Proteinmarker IV (Western Blot) und 10 µl Proteinmarker I (SDS-PAGE) wurden als interner Größenstandard jeweils in die 1. Tasche (2.5) aufgetragen.

4.9 Versuche einer Solubilisation und Reinigung von CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃

Das gereinigte Protein sollte mittels Röntgenstrukturanalyse analysiert und die Proteinstruktur ermittelt werden. Hierfür wurde die Membranpräparation mit 0,8 - 1,2% DDM (n-Dodecyl- β -D-maltosid) behandelt (3.2.4) und nach mehreren Waschschritten mit Hilfe von Ni²⁺-NTA gereinigt (3.2.5). Das Protein wurde auf enzymatische Aktivität (3.2.10) und Stimulierbarkeit durch CAI-1 getestet (Abb. 29), 1,6 – 3 μ g Proteinlösung (3.2.7.2) auf ein SDS-Gel aufgetragen (3.2.8) und anschließend immundetektiert (3.2.9). Aufgrund der Umstände, dass durch die Verwendung von 0,8% DDM nicht ausreichend Protein aus der Membran gelöst werden konnte (Abb. 30A) und der Gebrauch von 1,2% DDM zu Proteinabbau und Bildung von Trimeren führte (Abb. 30C), wurde die Konzentration von 1,0% DDM als optimal eingestuft (Abb. 30B1 und B2). Mit zunehmender Detergens-Konzentration sanken die Basalaktivität und der Grad der Stimulierbarkeit durch CAI-1 der ungelösten Proteine, die in der Membran verblieben, sowie der gelösten Proteine (Abb. 30A - C). Die Aktivität der Membranpräparationen der Chimäre wurde jedoch durch die Zugabe von 1,0% DDM allein im Adenylatcyclasetest (3.2.10) nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Da das gelöste Protein durch die Reinigung die Stimulierbarkeit durch CAI-1 einbüßte (Abb. 29A und B) und ebenso die Basalaktivität stark absank, liegt die Vermutung nahe, dass das Lösen der Proteine aus der Membran zu einer partiellen Inaktivierung führte. Zudem werden Wirtsproteine, die für eine korrekte Faltung essenziell sind, wie etwa Chaperone, bei der Proteinreinigung ausgewaschen. Ein Beispiel für ein solches Protein, das sowohl eine Chaperon – als auch eine Peptidylprolyl cis/trans-Isomerase Aktivität besitzt, ist SlyD („sensitive to lysis D protein from *E. coli*“). Dieses wird als eines der am häufigsten durch IMAC co-gereinigten Proteine zitiert (83). Die Deletion dieses Gens in *E.coli* Stämmen führte zu erheblichen Wachstumsdefekten (84,85). Das Protein SlyD weist eine theoretische molekulare Masse von 20,9 kDa auf, läuft jedoch in einer SDS-PAGE bei 25 kDa (86). Ein Protein in dieser Größe wurde mehrfach in ungereinigten Fraktionen nachgewiesen (Abb. 11; Abb. 30A und C). Ob es sich jedoch hierbei um SlyD oder ein Abbauprodukt handelt, kann nicht beantwortet werden. Die Proteinfractionen, die die Bindungen über Ni²⁺-NTA, jedoch nicht die Reinigung über die Säulen (3.2.5)

durchliefen, zeigten eine vergleichbare Stimulation zu den ungelösten Fraktionen vor den Bindungen (Abb. 29B und 30B2 Rest Ü.).

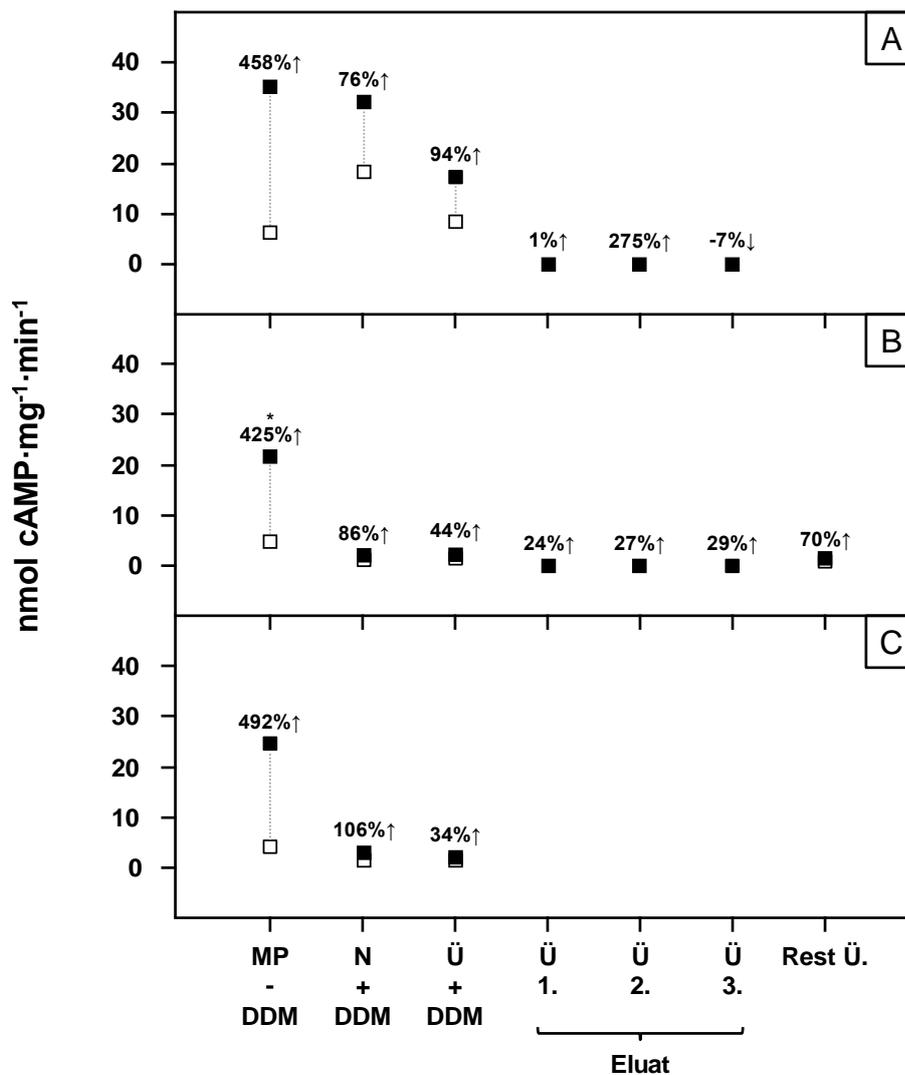
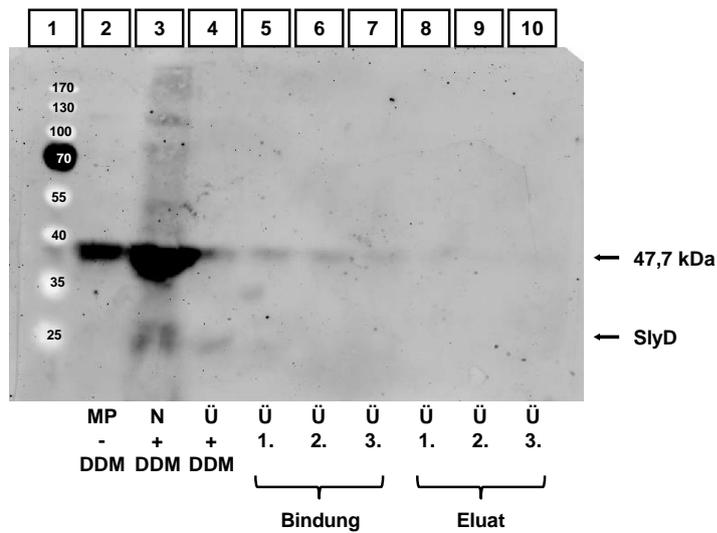
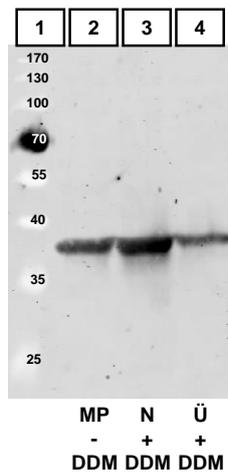
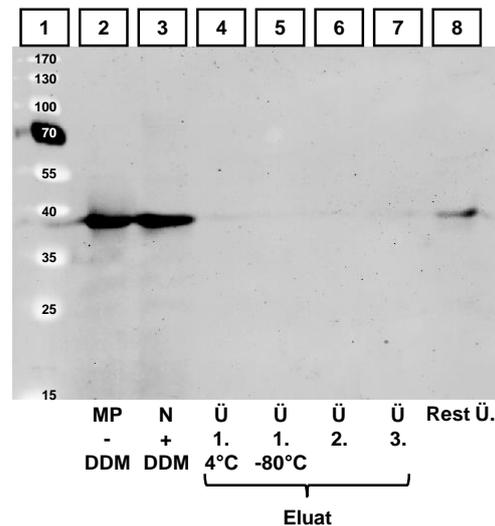
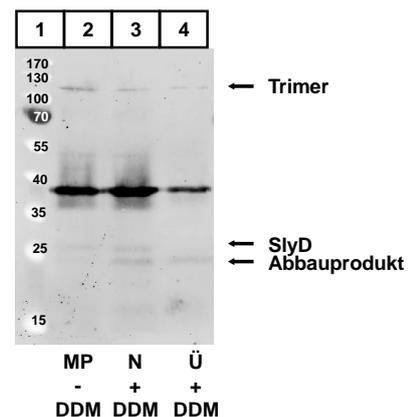


Abb. 29: Enzymatische Aktivität von CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃ vor und nach Solubilisation und Ni²⁺-NTA-Reinigung.

Die Proteine wurden mit [A] 0,8% DDM [B] 1,0% DDM oder [C] 1,2% DDM aus der Membran gelöst. Als Kontrolle diente die jeweilige Membranpräparation (MP) ohne Behandlung mit DDM. Die ungelösten Proteine finden sich im Niederschlag (N), die gelösten Proteine hingegen im Überstand (Ü). Die Basalaktivität (□) und Stimulation durch 10 µM CAI-1 (■) des ungebundenen Proteins, welches nach der 3. Bindung noch im Überstand vorlag, wurde mit „Rest Ü.“ bezeichnet.

Neben der verminderten Aktivität des gelösten Proteins stellte ein hoher Aktivitätsverlust durch die Reinigung über die Säulen ein weiteres Problem dar. Wie aus der Western Blot Analyse (Abb. 30A Spur 4) ersichtlich, ging das gebundene Protein (Abb. 30A Spur 5-7) durch die Reinigung über die Säulen größtenteils

verloren (Abb. 30A Spur 8-10). Auch eine Reduktion an Imidazol in den Waschpuffern führte nicht zu einer Steigerung der Ausbeute. Da die Versuchsdurchführung zwei Tage umfasste, wurden die Lagerungsbedingungen bei 4°C und, nach dem Einfrieren in flüssigem N₂, bei -80°C über Nacht für das gereinigte Protein überprüft. Die AC-Aktivität des schockgefrorenen Proteins betrug 1,2 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ und erreichte eine Stimulation um 33% durch 10 µM CAI-1. Die Lagerung über Nacht bei 4°C führte zu einem inaktiven Protein. Aufgrund der unbefriedigenden Proteinausbeute und dem Verlust der Regulierbarkeit wurden weitere Versuche in dieser Richtung eingestellt.

A 0,8% DDM**B1** 1,0% DDM**B2** 1,0% DDM**C** 1,2% DDM**Abb. 30: Western Blot Analyse: Solubilisation und Reinigung von CqsS₁₋₁₈₁F166L-Rv1625c₂₁₈₋₄₄₃**

Die Proteine wurden mit [A] 0,8% DDM [B1 + B2] 1,0% DDM oder [C] 1,2% DDM aus der Membran gelöst. Als Kontrolle diente die jeweilige Membranpräparation (MP) ohne Behandlung mit DDM. Die ungelösten Proteine finden sich im Niederschlag (N), die gelösten Proteine hingegen im Überstand (Ü). Das ungebundene Protein, das nach der 3. Bindung noch im Überstand vorhanden war, wurde mit „Rest Ü.“ bezeichnet. 3 µl peqGOLD Proteinmarker IV (2.5) wurden als interner Größenstandard jeweils in die 1. Tasche aufgetragen.

5 Diskussion

In einer Analyse der ersten AS-Sequenz einer Säugetier-AC, mit 2 x 6 Transmembranhelices, wurde über eine Transporterfunktion oder einen Ionenkanal als Membrananker spekuliert (13). 27 Jahre danach konnte der Transmembrandomäne immer noch keine eindeutige Funktion, die eine Fixierung in der Membran übersteigt, zugeordnet werden. Jedoch scheint die Funktion, ausschließlich als Anker zu fungieren, unwahrscheinlich, da das Membransegment etwa 40% des gesamten Proteins ausmacht und damit überdimensioniert ist. Die Säugetier-ACn und die mykobakterielle AC Rv1625c gehören zur Klasse IIIa und weisen einen ähnlichen TM-Aufbau auf. Membrangebundene ACn bei Wirbeltieren werden indirekt über G-Proteine reguliert, welche in Folge einer Stimulation eines GPCR intrazellulär freigesetzt werden. An die GPCRs docken viele extrazelluläre Signalmoleküle, z.B. Neurotransmitter und Hormone, und vermitteln abhängig vom Signalmolekül quantitative unterschiedliche intrazelluläre cAMP-Antworten. Bakterien hingegen besitzen nur GPCR-ähnliche Membranproteine, z.B. Bacteriorhodopsin, welches lichtvermittelt als Protonenpumpe arbeitet. Die Fragen die sich hier stellen, sind, ob dies das Ergebnis eines Verlustes der direkten Ligandenbindung während der Evolution ist, während sich die indirekte Regulation von GPCRs entwickelte, oder ob die Regulation von Säugetier-ACn durch Liganden bis *dato* übersehen worden ist? Wie hat sich die Regulation der 6TM-Membranmodule der Klasse IIIa ACn entwickelt? Da G-Proteine in Bakterien fehlen, kann davon ausgegangen werden, dass die bakteriellen ACn, wie zum Beispiel die von *Rhodopseudomonas palustris* (Uniprot Q132R4), direkt über ihren Membrananker reguliert werden. Letztere AC ist intrazellulär an ein Ferredoxin-Modul gebunden. Der Membrananker zeigt signifikante Sequenzähnlichkeiten zu Membrandomänen von Cytochrom-B, wie sie in Fumarat-Reduktasen / Succinat-Dehydrogenasen vorkommen. Die 6TM Module verfügen über vier in präzisiertem Abstand zueinander stehenden Histidin-Resten, welche Häm als Elektronenüberträger nutzen (87-90). Es kann daher vorhergesagt werden, dass die Membrananker der ACn dieser Gruppe zwei Häm-Einheiten als prosthetische Gruppen enthalten.

Ähnliche 6TM-Membranrezeptoren mit einer minimalen Länge der α -Helices und kurzen Verbindungsschlaufen wurden kürzlich beschrieben (41,50,59). Sie sind im Wesentlichen baugleich mit den Membranankern von 6TM ACn (13,20,91,92). Dieser

neue Rezeptor-Prototyp wird durch bakterielle QS-Rezeptoren in *Vibrio*, *Legionella*, *Burkholderia* und mehreren anderen Eubakterien (41,59,74,77) repräsentiert. Wie aus den Sequenzen der Sekundärstrukturen der Membrananker von Rv1625c und CqsS ersichtlich, ähneln sich beide Membrananker sowohl in der Länge ihrer TM-Spannen als auch in ihrer Schlaufenlänge (Abb. 6). Durch die Erzeugung einer Chimären aus dem QS-Rezeptor CqsS von *V. harveyi* und der katalytischen Domäne der AC Rv1625c wurde gezeigt, dass sich der Membrananker einer Klasse IIIa AC nicht nur durch einen baugleichen Rezeptor austauschen, sondern auch durch einen Liganden direkt regulieren lässt (33). Da die Liganden für CqsS und LqsS bekannt sind (49,59,74,77), ist die direkte Regulierung der AC-Aktivität keine wirkliche Überraschung. Eine funktionelle Chimäre aus den beiden Proteinen war abhängig von deren Verknüpfungspunkten. Das ist ein Hinweis darauf, dass solche Verbindungsstellen evolutionär festgelegt und entscheidend für die volle Funktionsfähigkeit der Signalübertragung zwischen funktionell unterschiedlichen Proteinen sind (93). Hierbei stellte sich die Fusion beider Proteine seitens der zytosolischen Domäne der AC als sehr schwierig heraus. Nur durch die Fusion des Membranankers direkt mit dem Beginn des CTE (**C**yclase **T**ransducer **E**lement, Ziegler et al. 2016, in Vorbereitung) wurde eine reproduzierbare Stimulation der Chimäre erhalten. Die Verknüpfung der CTE an eine zunehmende Zahl der ASn, ausgehend vom 6TM-Ausgang bis maximal zur H-Box von CqsS, resultierte überwiegend in einem Anstieg der Stimulierbarkeit durch CAI-1 (Abb. 8). Mit den in dieser Arbeit dargestellten Daten wurde gezeigt, dass das durch Liganden initiierte Signal eines 6TM QS-Rezeptors durch die homodimere katalytische Domäne einer Klasse IIIa AC dekodiert werden kann und in einer veränderten AC-Aktivität resultiert. Die Tatsache, dass eine Homodimerisierung im Bereich der TM-Domäne für eine Signaltransduktion erforderlich ist (Tab. 19), legt die Vermutung nahe, dass beide Monomere an der Bindung des Liganden beteiligt sind (94). Doch ob ein Liganden-Molekül in einem oder beiden bzw. zwischen den Grenzflächen beider Monomere bindet, wie es bei den Chemotaxisrezeptoren Tsr oder Tar (78,95) oder dem Ni²⁺-bindenden PhoQ-Sensor (96) der Fall ist, kann hier nicht beantwortet werden. Aufgrund der Lipophilie des Liganden und der damit verbundenen Affinität zur Bindung an Membranen, konnten keine Bindungsversuche unternommen werden. Jedoch kann aufgrund der kurzen α -Helices und der Dicke der Lipiddoppelschicht von ca. 30Å (97) von einer kompakten Faltung des Proteins in der Membran

ausgegangen werden, bei der die Helices nahezu orthogonal die Membran durchdringen. Dass die Erkennung und Sensitivität für unterschiedliche Liganden von einzelnen ASn in verschiedenen Membransegmenten abhängig ist, wurde zuvor von der Gruppe um B. Bassler gezeigt (74). Punktmutationen innerhalb der sechsten TM führten zu einer Veränderung der Signalstärke (Abb. 15-17, 24 und Anhang 1, Konstrukt-Nr. 16 und 28-52) und beeinflussten zum Teil die Liganden-Spezifität (vergleiche Abb. 12: $EC_{50} = 400$ nM CAI-1 oder LAI-1 und Abb. 18: $EC_{50} = 400$ nM CAI-1 oder 900 nM LAI-1). Doch in diesem Bereich schien ausschließlich die Signalintensität reguliert zu werden und nicht dessen Modulation (Abb. 15-17, 24). Hingegen zeigte eine Veränderung innerhalb der zweiten TM eine veränderte Affinität für CAI-1 und LAI-1 (Abb. 26). So könnte der Austausch der zweiten TM von CqsS gegen LqsS zu einer vergrößerten Bindungstasche im Dimer geführt haben, wodurch eine Bindung des größeren LAI-1 möglich wurde. Auffällig erschien zudem die Anhäufung an positiv geladenen ASn (hier Arginin) innerhalb der zweiten Transmembranhelix. Die Mutation des ersten Arginins in dieser TM (R47A) führte zu einem aktiven, jedoch nicht stimulierbaren Konstrukt (Anhang 1; Konstrukt-Nr. 53) (74). Ebenso führte der Austausch der letzten vier ASn gegen die LqsS-Sequenz (RNRT63TPYW, Abb. 26) zu einer Halbierung der Stimulation durch CAI-1 und LAI (Tab. 20). Arginine können sowohl Wechselwirkungen mit ASn benachbarter α -Helices des eigenen als auch des anderen Monomers eingehen und damit sowohl die Stabilität des Proteingerüsts beeinflussen (81) als auch an der Bindung von Cofaktoren oder von katalytischen Reaktionen beteiligt sein. Zwar ließe sich die Anzahl an positiv geladenen ASn in der Membran durch die „positive-inside rule“ (98-100) erklären, welche besagt, dass Arginin und Lysin viermal häufiger in den zytoplasmatischen als in den periplasmatischen Schleifen vorkommen und somit möglicherweise der Orientierung der Transmembranhelices in der Membran dienen. Jedoch ist der Einbau solcher geladener ASn in die TM-Domänen thermodynamisch erschwert und hier nur in der zweiten und vierten TM (hier Histidin und Aspartat) zu finden (Abb. 31). Allerdings befähigt die lange polare Seitenkette das Arginin begrenzt dazu sich zur polaren wässrigen Region der Grenzfläche (Richtung Zytosol) zu orientieren und so aus der TM-Region herauszuragen (101).

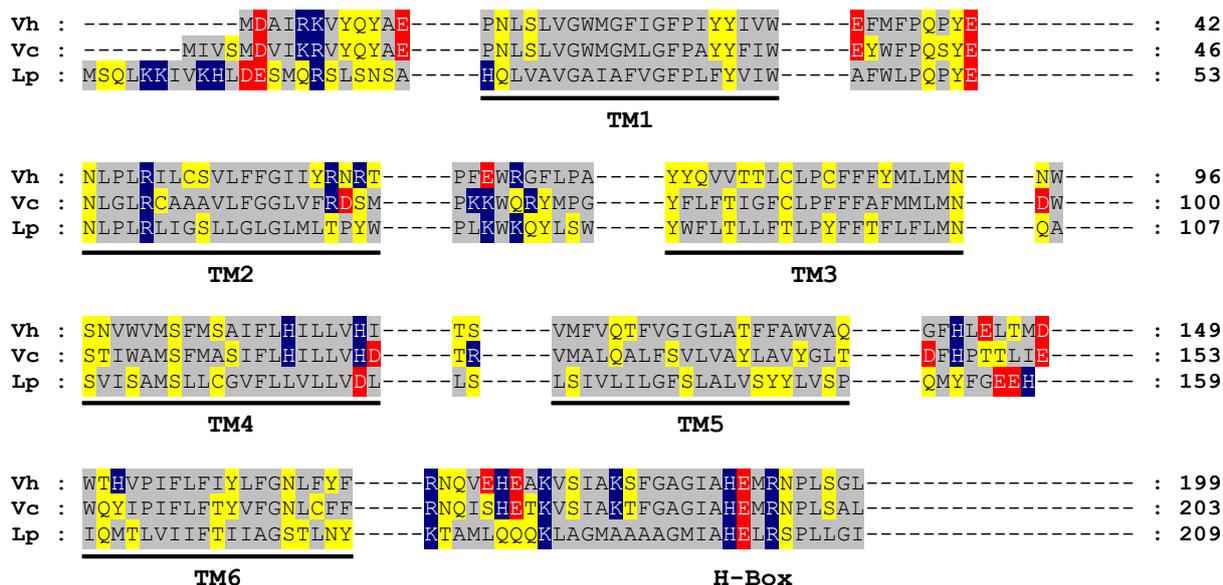


Abb. 31: AS-“Alignment“ der 6TMs CqsS von *V. harveyi* (Vh) und *V. cholerae* (Vc) sowie LqsS von *L. pneumophila* (Lp)

Schwarz unterstrichen sind die transmembranen α -Helices 1-6 (TM1-6). Grau unterlegt sind die apolaren ASn. Gelb markierte ASn sind polar und ungeladen, ASn mit blauem (positiv) bzw. rotem (negativ) Hintergrund sind geladen.

Verglichen mit den extrem kurzen Schlaufen zwischen TM3-4 und TM4-5 sind die Schleifen zwischen TM1-2, TM2-3 und TM5-6 etwas länger und flexibler und somit möglicherweise verantwortlich für die Konformationsänderungen innerhalb der Membran. Bestärkend kommt hinzu, dass in den ersten drei membrangebundenen Membranspannen stark konservierte ASn lokalisiert sind (Position der ASn eingezeichnet oberhalb Abb. 25). Die Notwendigkeit hochkonservierter ASn innerhalb der ersten drei TMs für die Sensitivität für CAI-1 sowie die Erkennung des C3-Restes des Liganden durch ASn in der vierten TM und die Längenmessung des Liganden durch die sechste TM wurde behauptet (44,74). Dies würde sich mit den hier vorgestellten Ergebnissen decken, bei denen Mutationen einzelner ASn in diesen Bereichen oder sogar der Austausch eines ganzen Transmembransegmentes (2.TM) die Stimulation der Chimäre sowie deren Liganden-Affinität beeinflussten (Abb. 26A und B). Dies legt die Vermutung nahe, dass diese TMs zur Grenzfläche beider Monomere gerichtet sind, mit denen der Ligand interagiert (Abb. 32) und macht die Beteiligung mehrerer Transmembransegmente bei der Bindung des Liganden wahrscheinlich.

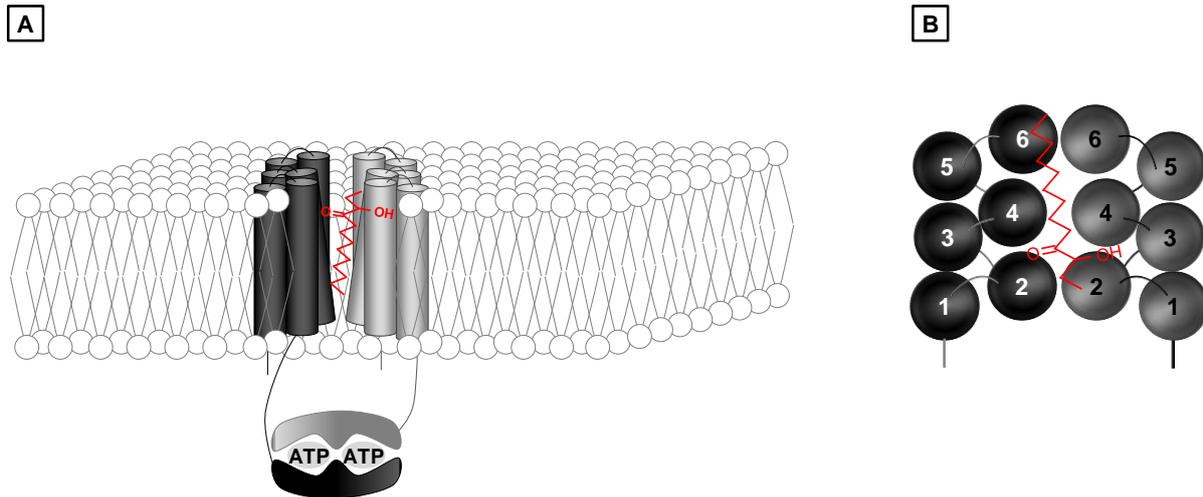


Abb. 32: Cartoon einer möglichen räumlichen Anordnung des QS-Rezeptors in der Membran

[A] Die Chimäre, verankert in der Membran, mit gebundenem CAI-1 an der Grenzfläche beider Monomere. [B] Dargestellt sind die α -Helices des Rezeptors von oben.

5.1 Bioinformatische Analysen stützen Rezeptorfunktion – Eine Hypothese

Da bei jeder Mutante eine Aktivität zu verzeichnen war und somit beide katalytischen Domänen nahe genug zusammen gekommen sein mussten um zwei aktive Zentren zu bilden, können alle Veränderungen der Regulierbarkeit der AC dem Membrananker zugesprochen werden.

Tatsächlich sind die Membrananker der bakteriellen Klasse IIIa ACn im Gegensatz zu den katalytischen Domänen sehr divergent (33). Die Membrandomänen von Wirbeltieren hingegen sind sehr stark konserviert, jedoch strikt in einer Isoform-spezifischen Weise vom Quastenflosser bis zum Menschen (33). Das bekräftigt die Hypothese, dass die Membrananker sich unabhängig von den katalytischen Domänen entwickelt haben. Diese Mutationen innerhalb der regulatorischen Domäne könnten so im Laufe der Zeit zu einer Spezifität für verschiedene Liganden geführt haben. Hingegen werden kleinste Veränderungen innerhalb der nachgeschalteten katalytischen Einheit nicht toleriert und führen somit zur Konservierung der Sequenz und Funktion (93). Dadurch bliebe der Mechanismus der Signaltransduktion *per se* erhalten, erlaubt jedoch unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten der vorgeschalteten Regulationseinheiten (102). Dies ließe auf eine unverzichtbare physiologische Funktion des α -helikalen Membranankers schließen und wirft die Frage nach dem genauen molekularen Mechanismus der direkten Signalübertragung

der 9 membrangebundenen Mammalia AC-Isoformen und deren extrazellulären Signalen auf.

Eine „Clusteranalyse“, bestehend aus 1616 6TM-Proteinen (6TM-ACn und CqsS ähnlichen Rezeptoren), wurde von Jens Baßler aus dem Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen durchgeführt. Diese Analyse resultierte in 6 klar voneinander abgegrenzten Membrananker-Gruppen, von denen fünf unterschiedlich stark miteinander verbunden waren (33).

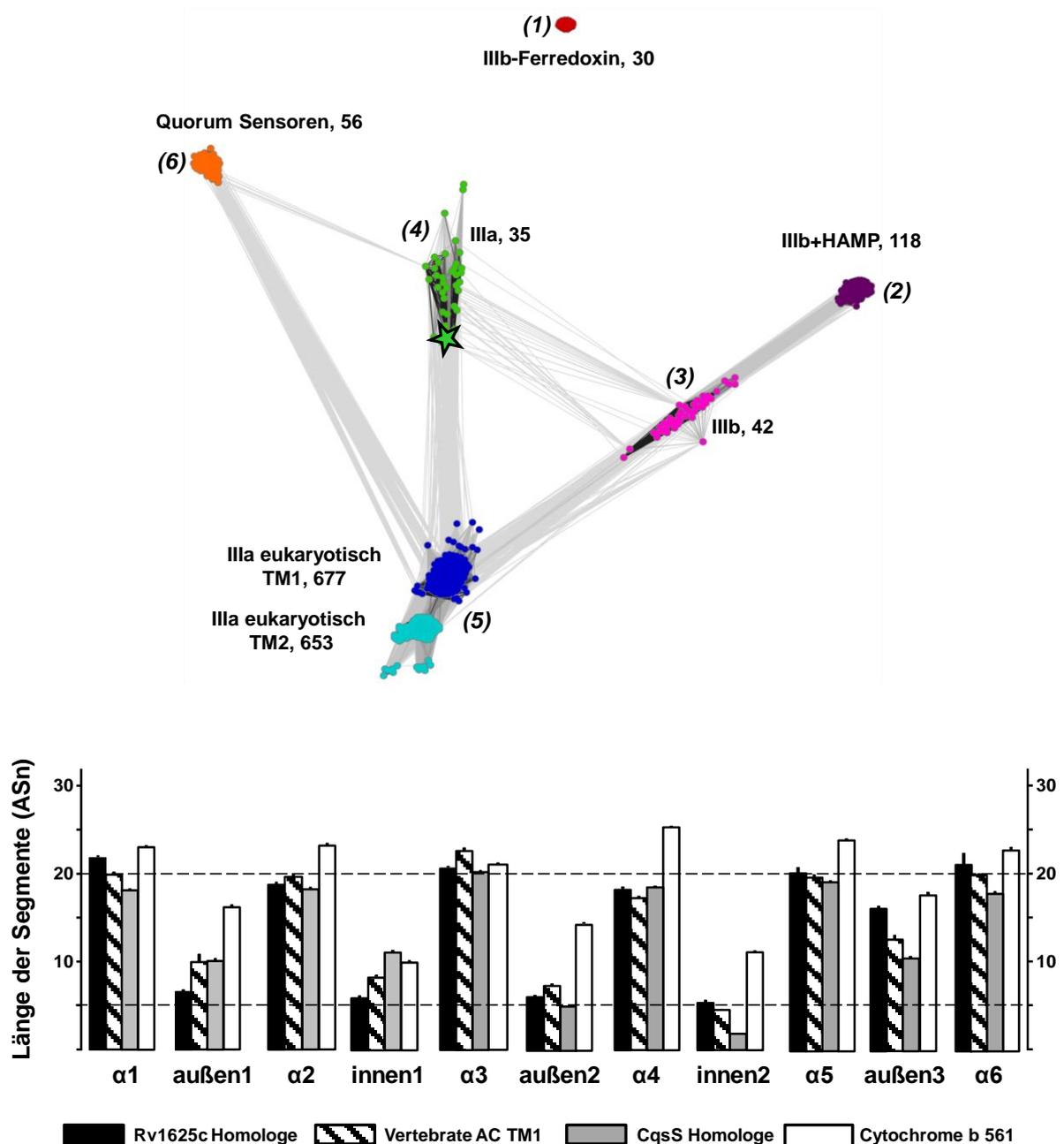


Abb. 33: Cluster-Analyse von 6TM Domänen von Adenylatcyclasen und CqsS-ähnlichen Rezeptoren sowie dem Längenvergleich der α -Helices und der Verbindungsschlaufen (modifiziert nach (33))

(1) Klasse IIIb ACn mit Ferredoxin-Modul; (2) Klasse IIIb ACn mit HAMP-Domäne; (3) Klasse IIIb ACn ohne HAMP-Domäne; (4) bakterielle Klasse IIIa ACn; (5) eukaryotische Klasse IIIa ACn; (6) Quorum-Sensing Rezeptoren

Darunter befindet sich auch der hier untersuchte QS-Rezeptor. Da transmembrane α -Helices vorwiegend aus hydrophoben Resten wie Leu, Ile, Val, Ala, Gly und Phe bestehen (103), ist bemerkenswert, dass trotzdem eine Differenzierung zwischen verschiedenen 6TM-Membranankern zustande kam. Dies steht im Widerspruch zu einer ausschließlichen Ankerfunktion. Sehr viel wahrscheinlicher erscheint es, dass diese unterschiedlichen Subtypen der bakteriellen und der neun pseudoheterodimeren Säuger-AC den vielfältigen Signalen, an die sie angepasst sind, entsprechen.

Das zweidimensionale Strukturmodell in Abbildung 6 zeigt eine erstaunliche Kürze der α -Helices und dessen Verbindungsschleifen. Dies würde eher gegen die Bindung eines extrazellulären Liganden sprechen. Allerdings gibt es Neurotransmitter wie z.B. Adrenalin oder niedermolekulare Mediatoren, welche im Membraninneren von sieben-membranspannigen GPCRs binden. Hinzu kommt, dass diese Schleifen deutlich kürzer als die vergleichbarer Proteine, wie zum Beispiel den GPCRs, bakteriellen Chemotaxisrezeptoren, Histidinkinasen und ACn mit 2 oder 4 TMs, sind. Dies konnte durch den Längenvergleich der Transmembransegmente und Schlaufen unterschiedlicher ACn, CqsS-Membrananker-Typen und orthologer Cytochrom b561 Proteine bestätigt werden. In einer Längenanalyse (durchgeführt von Jens Baßler, Abb. 33 unten) fiel auf, dass die Länge der TMs (ca. 20 ASn) und Schlaufen innerhalb desselben Ankertyps konserviert waren und eine große Ähnlichkeit zwischen den Ankern der ersten TM der eukaryotischen ACn, den bakteriellen ACn Klasse IIIa und IIIb sowie CqsS-artigen QS-Rezeptoren bestand. Zudem unterteilte die Clusteranalyse die Proteine in unterschiedliche Gruppen, zeigte aber deutliche Beziehungen zwischen den einzelnen Gruppierungen. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Verbindungen der QS-Rezeptoren zu der eukaryotischen AC C1 und den bakteriellen Klasse IIIa und IIIb ACn (Abb. 33 oben). Möglicherweise besteht eine entfernte Verwandtschaft dieser Membrananker / Rezeptortypen. Ein Beispiel hierfür ist Adrenalin und Rhodopsin, welche beide zur GPCRs-Familie gehören, die etwa 800 verschiedene Rezeptoren beim Menschen umfasst (104). Die Clusteranalyse stützt somit die Annahme von Guo et al., dass die bakterielle AC

Rv1625c als Vorläufer der Säuger-ACn gilt und einer Hälfte einer membrangebundenen eukaryotischen AC entspricht (20).

Dass, ungeachtet einer ähnlichen AS-Zusammensetzung und einer vergleichbaren Membrananker-Architektur die Einteilung signifikant voneinander abweichen kann, wird anhand der ersten Gruppierung deutlich (Abb.33). Diese Gruppe zeichnet sich durch Klasse IIIb ACn aus, welche eine zytosolische Ferredoxin-bindende Domäne besitzen und in keiner Beziehung zu den anderen 5 Gruppierungen steht.

Die Annahme, es könnte sich bei den dimerisierenden 6TM-Ankern um eine spezielle Membranlokalisation handeln (105) oder dass diese nur die Palette an Signalmodulen erweitern und sie strukturell und möglicherweise auch funktionell wahllos gegeneinander ausgetauscht werden können, ist nicht zutreffend. Erste Versuche den Membrananker eukaryotischer ACn auszutauschen resultierten in einem Aktivitätsverlust des Enzyms (106). Ebenso gelang der funktionelle Austausch eines bakteriellen 6TM AC-Ankers gegen einen 2TM-Chemorezeptor von *E. coli* für Serin oder Aspartat (Tsr oder Tar) (78,95,102) zuvor bei keiner Klasse IIIa AC mit einem 6TM-Anker.

Ein zusätzlicher Regulationsmechanismus durch eine direkte Regulation wäre eine weitere Interpretationsalternative. Hierbei wäre denkbar, dass bei Wirbeltieren die intrazelluläre cAMP-Konzentration der Interaktion eines direkten Liganden-vermittelten und eines indirekten G α -regulierten Prozesses untersteht. Eine dauerhafte Besetzung des Rezeptors mit einem Liganden und das damit verbundene Fehlen der unmittelbaren Anpassung an verschiedene physiologische Zustände würde eine Entwicklung hin zu einer kurzlebigen G α -Stimulierung erklären. Dadurch könnten länger andauernde Zustände, wie etwa das Empfinden von Wärme oder Kälte, über direkte Regulation und schnelle Reaktionen, wie es zum Beispiel bei der Immunantwort der Fall ist, über die indirekte Regulation gesteuert werden. Ein Beispiel für die Bindung eines Liganden innerhalb eines mehrspännigen Membranrezeptors mit kurzen extrazellulären Schlaufen ist Rhodopsin. Hier ist cis-Retinal kovalent an den GPCR Opsin gebunden. Photonen induzieren die Isomerisierung zu trans-Retinal einhergehend mit einer Aktivierung des Rezeptors (107). Nach erfolgter Anregung wird das Rhodopsin über mehrere enzymatische Reaktionen regeneriert. Wie in *Vibrio* das Signal unterbrochen wird, ist bisher unbekannt. Denkbar wäre hierbei ein Metabolismus zur Inaktivierung, das Herausfischen des Liganden durch ein weiteres Protein oder gar Proteolyse des

Proteins. Möglicherweise ist ein solches zweigleisiges Adaptationssystem aber auch aufgrund der kurzen Lebensspanne und dem schnelleren Vermehrungszyklus von Bakterien nicht erforderlich. Die Bakterienzellen der „neuen Generation“ könnten sich daher schnell an die aktuellen Bedingungen (z.B. eine veränderte Populationsdichte) anpassen. Dies würde die irreversible Bindung von CAI-1 an CqsS_{Vh} erklären (4.8). Es ist allerdings zu erwähnen, dass über die Art der Bindung des Liganden an den Rezeptor bislang noch Unwissenheit besteht. Möglicherweise wird die Konformation des Membranankers durch ein intrazelluläres Signal (z.B. durch das bis-(3', 5')-di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) (108)) verändert und der an die Innenseite beider Monomere assoziierte Ligand wird in das Periplasma entlassen.

Um welche Art von Liganden es sich bei den 6TM AC-Modulen handeln könnte oder wie der Regulationsmechanismus oder dessen Inaktivierung genau funktioniert, darüber kann nur spekuliert werden. Es muss sich hierbei nicht ausschließlich um ein Lipid wie im Falle von CAI-1 oder LAI-1 handeln. Auch andere lipophile Moleküle müssen in Betracht gezogen werden, ebenso die Möglichkeit, dass ein zusätzliches Membranprotein als wahrer Sensor agiert und die Aktivierung der AC horizontal über die Membran verlaufen könnte.

Die Schlussfolgerung, dass die AC-Membrananker in bakteriellen AC-Homodimeren sowie in pseudoheterodimeren Säugetier-Adenylatcyclasen als Liganden-Rezeptoren fungieren, deren Stimuli jedoch noch identifiziert werden müssen, erscheint durch die in dieser Arbeit erworbenen biochemischen Daten zusammen mit den bioinformatischen Analysen plausibel.

6 Zusammenfassung

Adenylatcyclasen (ACn) sind ubiquitär in Pro- und Eukaryoten und wandeln extrazelluläre Reize in ein einheitliches intrazelluläres cAMP-Signal (3', 5'-cyclic AMP-Signal) um. Viele bakterielle sowie die meisten eukaryotischen ACn besitzen Membrananker mit sechs Transmembranhelices und kurzen, sie verbindenden Schlaufen. Eine Funktion für den überdimensionierten Membrananker (>40% des Proteins) konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den indirekt über G-Protein-gekoppelten Rezeptoren regulierten eukaryotischen ACn bleibt das Regulationssignal für prokaryotische ACn mit wenigen Ausnahmen unklar.

Durch den Tausch des Membranankers der mykobakteriellen Rv1625c gegen den baugleichen Quorum-Sensing-Rezeptor CqsS (**C**holera **q**uorum **s**ensing **S**ensor) von *Vibrio harveyi* wurde eine membranverankerte und aktive AC erzeugt, welche durch den für CqsS spezifischen Liganden CAI-1 (**C**holera **A**utoinducer-1) direkt reguliert wurde. Zudem zeigten verschiedene Punktmutationen innerhalb des Membranankers und ein Austausch ganzer Transmembranhelices gegen die Aminosäuresequenz eines homologen QS-Rezeptors, dessen Beteiligung an einer Liganden-vermittelten Signalweiterleitung. Ebenso konnte bewiesen werden, dass die Signaltransduktion eine Homodimerisierung der Membrandomäne benötigt und diese, im Falle von CqsS (*V. harveyi*), irreversibel ist.

Die Daten unterstützen die Hypothese, dass die Membrananker der Klasse III ACn Rezeptoren sind und die AC-Regulation in Bakterien und Wirbeltieren einem gleichen Regulationsmechanismus unterworfen ist. Dies würde eine neue Dimension in der direkten AC-Regulierung zusätzlich zu der indirekten Regulierung von GPCRs in eukaryotischen Organismen eröffnen.

7 Anhang

7.1 Anhang 1

Nr.	Plasmid	MCS1		Basalaktivität	n	Regulation [%]	n	Regulation [%]	n	kDa	WB
		Membrananker	Katalytische Domäne	nmol cAMP·mg ⁻¹ ·mg ⁻¹		CAI-1 [1 µM]		LAI-1 [1 µM]			
1	pQE80 _L	CqsS ₁₋₁₆₈	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	16,2 ± 14,1	2	+ 9,8 ± 2,4%	2	k.T.	0	46,5	
2		CqsS ₁₋₁₇₂		11,3	1	+ 2,5%	1	k.T.	0	47,0	
3		CqsS ₁₋₁₉₀		4,6	1	- 1,4%	1	k.T.	0	48,9	
4		CqsS ₁₋₁₉₅		5,2	1	+ 0,5%	1	k.T.	0	49,5	
5		CqsS ₁₋₁₉₆		9,8	1	- 3,4%	1	k.T.	0	49,6	
8		CqsS ₁₋₁₆₈ :F166C	Rv1625C ₂₀₁₋₄₄₃	26,9	1	+ 8,3%	1	- 10,0%	1	46,7	
9			Rv1625C ₂₀₂₋₄₄₃	21,1	1	+ 11,7%	1	- 23,6%	1	46,6	
10			Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	20,3	1	+ 3,6%	1	k.T.	0	46,5	
11			Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	2,2 ± 0,6	2	+ 10,7 ± 25% EC ₅₀ = 300 nM	2	+ 5,9 ± 22,7% EC ₅₀ = 300 nM	2	44,8	
12		CqsS ₁₋₁₇₂ :F166C	Rv1625C ₂₀₁₋₄₄₃	18,2	1	+ 3,0%	1	k.T.	0	47,2	
13			Rv1625C ₂₀₂₋₄₄₃	29,8	1	- 5,5%	1	k.T.	0	47,1	
14			Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	10,3	1	+ 8,3%	1	k.T.	0	47,0	
15			Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	4,4 ± 0,4	2	+ 40,7 ± 6,9% EC ₅₀ = 200 nM	2	+ 6,0%	1	45,3	
16		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166C	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	7,1 ± 0,9	12	+ 35,1 ± 6,6% *** EC ₅₀ = 200 nM *	11	+ 2,1 ± 4,9%	6	46,3	
17		CqsS ₁₋₁₈₃ :F166C		6,6	1	+ 8,2%	1	- 1,1%	1	46,5	
18		CqsS ₁₋₁₈₅ :F166C		2,6	1	+ 31,0% EC ₅₀ = 200 nM	1	+ 9,6%	1	46,7	
19		CqsS ₁₋₁₈₇ :F166C		2,8	1	+ 10,0%	1	+ 4,0%	1	46,8	
20		CqsS ₁₋₁₈₈ :F166C		1,9	1	+ 23,3%	1	+ 22,7%	1	46,9	
21		CqsS ₁₋₁₉₀ :F166C	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	8,3	1	- 0,8%	1	k.T.	0	48,8	
22			Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	1,4	1	+ 11,2%	1	+ 13,6%	1	47,1	
23		CqsS ₁₋₁₉₅ :F166C	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	5,9	1	+ 7,6%	1	k.T.	0	49,5	
24			Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	2,4	1	- 9,6%	1	- 18,8%	1	47,8	

Nr.	Plasmid	MCS1		Basalaktivität	n	Regulation [%]	n	Regulation [%]	n	kDa	WB
		Membrananker	Katalytische Domäne			CAI-1 [1 µM]		LAI-1 [1 µM]			
25	pQE80 _L	CqsS ₁₋₁₉₆ :F166C	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	5,3	1	+ 21,9%	1	k.T.	0	49,6	
26			Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	2,5	1	+ 2,5%	1	+ 5,5%	1	47,9	
27		CqsS ₁₋₁₇₇	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	6,5 ± 3,4	3	+ 14,4 ± 13,5%	3	k.T.	0	45,9	
28		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166G	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	6,9 ± 1,9	4	+ 76,2 ± 13,5% * EC ₅₀ = 100 nM	4	+ 30,5 ± 17,2%	2	46,2	
29		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166A		9,0 ± 2,4	4	+ 83,8 ± 23,6% * EC ₅₀ = 80 nM	4	+ 37,4 ± 48,0%	2	46,2	
30		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166S		5,5 ± 1,1	4	+ 113,4 ± 11,1% ** EC ₅₀ = 100 nM	4	+ 33,8 ± 20,6%	2	46,3	
31		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166P		3,6 ± 1,4	4	+ 94,9 ± 24,0% * EC ₅₀ = 400 nM	4	k.T.	0	46,3	
32		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166D		2,0 ± 0,3	4	+ 134,8 ± 18,4% ** EC ₅₀ = 400 nM	4	k.T.	0	46,3	
33		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166T		3,4 ± 0,6	4	+ 40,1 ± 25,9% EC ₅₀ = 100 nM	4	+ 90,7%	1	46,3	
34		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166N		3,8 ± 0,5	4	+ 76,6 ± 10,7% ** EC ₅₀ = 60 nM	4	+ 60,8%	1	46,3	
35		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166V		6,4 ± 1,4	4	+ 107,3 ± 28,9% * EC ₅₀ = 100 nM	4	k.T.	0	46,3	
36		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166E		2,8 ± 1,1	4	+ 59,1 ± 13,9% * EC ₅₀ = 600 nM	4	k.T.	0	46,3	
37		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166Q		2,3 ± 0,3	4	+ 81,5 ± 2,0% *** EC ₅₀ = 1 µM	4	+ 49,5%	1	46,3	
38		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166H		5,0 ± 1,3	4	+ 85,0 ± 22,3% * EC ₅₀ = 400 nM	4	k.T.	0	46,3	
39		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166L		4,0 ± 0,7	11	+ 219,8 ± 22,6% ** EC ₅₀ = 400 nM	5	+ 56,3%	1	46,3	
40		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166I		2,0 ± 0,3	4	+ 239,3 ± 35,6% ** EC ₅₀ = 400 nM	4	+ 63,7%	1	46,3	
41		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166M		2,8 ± 0,4	4	+ 144,5 ± 38,2% * EC ₅₀ = 200 nM	4	+ 14,6%	1	46,3	
42		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166K		5,0 ± 1,5	4	+ 80,2 ± 18,4% * EC ₅₀ = 200 nM	4	k.T.	0	46,3	
43		CqsS ₁₋₁₈₁		5,5 ± 0,8	12	+ 58,8 ± 6,8% *** EC ₅₀ = 400 nM	12	+ 51,6% ± 9,6%	2	46,3	
44		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166Y		6,7 ± 0,7	4	+ 33,5 ± 7,4% * EC ₅₀ = 200 nM	4	k.T.	0	46,3	
45		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166R		4,7 ± 1,1	4	+ 81,9 ± 19,3% * EC ₅₀ = 200 nM	4	k.T.	0	46,3	
46		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166W		9,6 ± 3,2	4	+ 5,2 ± 3,3%	4	k.T.	0	46,4	
47		CqsS ₁₋₁₈₁ :FY167YF		7,0 ± 1,1	2	+ 36,3 ± 31,0% EC ₅₀ = 600 nM	2	k.T.	0	46,3	
48		CqsS ₁₋₁₈₁ :FYF168LFY		1,7 ± 0,3	2	+ 81,5 ± 12,7% EC ₅₀ = 1 µM	2	k.T.	0	46,3	
49		CqsS ₁₋₁₈₁ :FY167LL		5,8 ± 1,3	2	+ 77,4 ± 17,2% EC ₅₀ = 200 nM	2	k.T.	0	46,3	
50		CqsS ₁₋₁₈₁ :FYF168LNY		10,8 ± 3,0	5	+ 27,0 ± 5,8% ** EC ₅₀ = 400 nM	5	- 2,5 ± 3,8%	5	46,3	
51		CqsS ₁₋₁₈₁ :G163A;F166L		5,5 ± 0,6	3	+ 44,8 ± 12,3% EC ₅₀ = 100 nM	3	k.T.	0	46,3	
52		CqsS ₁₋₁₈₁ :FGN164AGS;F166L		4,1 ± 0,5	3	- 25,8 ± 2,1% **	3	k.T.	0	46,2	
53		CqsS ₁₋₁₈₁ :R47A;F166L		3,4 ± 0,5	2	- 3,0 ± 4,8%	2	- 4,1 ± 4,0%	2	46,2	
54		CqsS ₁₋₁₈₁ :S97A;F166L		1,6 ± 0,1	2	+ 225,5 ± 38,0% ↓	2	+ 38,4%	1	46,3	

Nr.	Plasmid	MCS1		Basalaktivität	n	Regulation [%]	n	Regulation [%]	n	kDa	WB
		Membrananker	Katalytische Domäne	nmol cAMP·mg ⁻¹ ·mg ⁻¹		CAI-1 [1 µM]		LAI-1 [1 µM]			
55	pQE80 _L	CqsS ₁₋₁₈₁ :F166L; 1TM CqsS ₁₃₋₃₃ 1TM LqsS ₂₄₋₄₄	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	1,1 ± 0,2	3	+ 3,3 ± 4,0%	3	+ 2,1 ± 2,7%	3	46,2	
56		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166L; 1TM CqsS ₁₄₋₃₃ 1TM LqsS ₂₅₋₄₄		1,2 ± 0,1	3	-13,2 ± 1,7% * IC ₅₀ = 1 µM	3	- 12,6 ± 8,7%	3	46,1	
57		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166L; 2TM CqsS ₄₃₋₆₃ 2TM LqsS ₅₄₋₇₄		3,6 ± 0,5	3	+ 44,7 ± 1,2% ***	3	+ 74,2 ± 13,8% *	3	45,8	
58		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166L; 2TM CqsS ₄₃₋₅₉ 2TM LqsS ₅₄₋₇₀		2,8 ± 0,3	3	+ 46,5 ± 6,7% *	3	+ 169,5 ± 2,7% ***	3	46,0	
59		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166L; 3TM CqsS ₇₄₋₉₄ 3TM LqsS ₈₅₋₁₀₅		0,4 ± 0,0	3	+ 9,1 ± 5,5%	3	+ 8,2 ± 8,5%	3	46,4	
60		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166L; 4TM CqsS ₉₇₋₁₁₇ 4TM LqsS ₁₀₈₋₁₂₈		0,3 ± 0,1	3	+ 6,7 ± 4,0%	3	- 3,0 ± 4,3%	3	46,0	
61		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166L; 5TM CqsS ₁₂₀₋₁₄₀ 5TM LqsS ₁₃₁₋₁₅₁		0,4 ± 0,1	3	- 0,3 ± 2,6%	3	- 0,1 ± 8,1%	3	46,2	
62		CqsS ₁₋₁₈₁ : 6TM CqsS ₁₅₀₋₁₆₈ 6TM LqsS ₁₆₀₋₁₇₈		3,8 ± 1,8	3	+ 6,8 ± 1,5% *	3	- 0,6 ± 3,2%	3	46,0	
63		CqsS ₁₋₁₈₁ : 5/6TM loop+6TM CqsS ₁₄₀₋₁₆₈ 5/6TM loop+6TM LqsS ₁₅₁₋₁₇₈		1,6 ± 0,8	3	- 2,3 ± 2,5%	3	- 6,9 ± 2,0%	3	45,9	
64		CqsS ₁₋₁₈₁ :F166L; 1+2TM CqsS ₁₄₋₃₃₊₄₃₋₅₉ 1+2TM LqsS ₂₅₋₄₄₊₅₄₋₇₀		6,5 ± 0,6	3	+ 10,1 ± 4,3%	3	+ 17,1 ± 10,6%	3	45,9	
65		CqsS ₁₋₁₈₁ : 2+6TM CqsS ₄₃₋₆₃₊₁₅₀₋₁₆₈ 2+6TM LqsS ₅₄₋₇₄₊₁₆₀₋₁₇₈		2,6 ± 0,5	3	+ 5,5 ± 5,5%	3	- 5,9 ± 8,9%	3	45,8	
66		CqsS ₁₋₁₈₁ : 2+6TM CqsS ₄₃₋₅₉₊₁₅₀₋₁₆₈ 2+6TM LqsS ₅₄₋₇₀₊₁₆₀₋₁₇₈		5,4 ± 0,9	3	+ 11,3 ± 10,7%	3	+ 0,1 ± 9,9%	3	45,8	
67		Rv1625C ₁₋₂₁₇ : 6TM Rv1625C ₁₈₃₋₂₀₁ 6TM CqsS ₁₅₀₋₁₆₈ F166L		4,0 ± 1,7	3	+ 4,1 ± 13,2%	3	k.T.	0	47,8	
68		Rv1625C ₁₋₂₁₇ : 5/6TM loop+6TM Rv1625C ₁₆₈₋₂₀₁ 5/6TM loop+6TM CqsS ₁₄₀₋₁₆₈ F166L		5,7 ± 2,8	3	+ 2,3 ± 21,0%	3	k.T.	0	47,4	
69		Rv1625C ₁₋₂₁₇ : 5+6TM Rv1625C ₁₅₀₋₁₆₇₊₁₈₃₋₂₀₁ 5+6TM CqsS ₁₂₀₋₁₃₉₊₁₅₀₋₁₆₈ F166L		1,1 ± 0,0	3	- 0,1 ± 2,7%	3	k.T.	0	48,3	

Nr.	Plasmid	MCS1		MCS2		Basalaktivität	n	Regulation [%]	n	Regulation [%]	n	kDa	WB
		Membrananker	Katalytische Domäne	Membrananker	Katalytische Domäne	nmol cAMP·mg ⁻¹ ·mg ⁻¹		CAI-1 [1 µM]		LAI-1 [1 µM]			
73	pETDuet-3	CqsS ₁₋₁₈₁ F166C	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃	CqsS ₁₋₁₈₁ F166C	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃	12,2 ± 7,8	3	+ 38,6 ± 22,9%	3	k.T.	0	MCS1: 46,3 MCS2: 46,3	
74		CqsS ₁₋₁₈₁ F166C	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃	CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃	4,0 ± 0,6	2	+ 32,0 ± 42,5%	2	k.T.	0	MCS1: 46,3 MCS2: 46,3	
75		CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃	CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃	11,8 ± 7,2	3	+ 45,0 ± 31,2%	3	k.T.	0	MCS1: 46,3 MCS2: 46,5	
76		Rv1625c ₁₋₂₀₂	Rv1625c ₂₀₃₋₄₄₃	--	--	106,7	1	- 3,9%	1	k.T.	0	MCS1: 47,4 MCS2: --	
77		Rv1625c ₁₋₂₀₂	Rv1625c ₂₀₃₋₄₄₃	Rv1625c ₁₋₂₀₂	Rv1625c ₂₀₃₋₄₄₃	k.T.	0	k.T.	0	k.T.	0	MCS1: 47,4 MCS2: 47,4	--
78		Rv1625c ₁₋₂₀₂	Rv1625c ₂₀₃₋₄₄₃	CqsS ₁₋₁₈₁ F166C	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃	k.T.	0	k.T.	0	k.T.	0	MCS1: 47,4 MCS2: 46,3	--
79		Rv1625c ₁₋₂₀₂	Rv1625c ₂₀₃₋₄₄₃	CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃	k.T.	0	k.T.	0	k.T.	0	MCS1: 47,4 MCS2: 46,3	--
80		--	--	CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ D300A	k.T.	0	k.T.	0	k.T.	0	MCS1: -- MCS2: 46,3	--
81		CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ D300A	CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ D300A	0,03 ± 0,004	4	+ 6,7 ± 23,2%	4	- 42,0 ± 35,9%	2	MCS1: 46,3 MCS2: 46,3	
82		CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ R376A	CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ D300A	0,7 ± 0,2	4	+ 74,5 ± 10,2% ** EC ₅₀ = 0,15 nM	4	+ 39,8 ± 15,5%	2	MCS1: 46,3 MCS2: 46,3	
83		LqsS ₁₋₁₉₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ R376A	CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ D300A	1,1 ± 0,2	4	- 3,8 ± 5,9%	4	+ 10,1 ± 2,4% *	3	MCS1: 46,5 MCS2: 46,3	
84		Rv1625c ₁₋₂₀₂	Rv1625c ₂₀₃₋₄₄₃ R376A	CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625c ₂₁₈₋₄₄₃ D300A	1,9 ± 0,6	4	- 4,8 ± 5,0%	4	- 9,5 ± 12,3%	2	MCS1: 47,3 MCS2: 46,3	

Nr.	Plasmid	MCS1		Basalaktivität	n	Regulation [%]	n	Regulation [%]	n	kDa	WB
		Membrananker	Katalytische Domäne	nmol cAMP·mg ⁻¹ ·mg ⁻¹		CAI-1 [1 µM]		LAI-1 [1 µM]			
85	pQE80 _L	LqsS ₁₋₁₇₈	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	7,8	1	k.T.	0	+ 15,1%	1	46,9	
86		LqsS ₁₋₁₈₂	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	10,1	1	k.T.	0	+ 7,7%	1	47,3	
87		LqsS ₁₋₂₀₀	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	6,2	1	k.T.	0	+ 2,6%	1	49,1	
88		LqsS ₁₋₂₀₅	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	5,8	1	k.T.	0	- 13,8%	1	49,7	
89		LqsS ₁₋₂₀₆	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	5,7	1	k.T.	0	- 4,2%	1	49,8	
90		LqsS ₁₋₁₇₈	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	4,9 ± 1,1	5	- 66,6 ± 4,8% ***	5	- 64,5 ± 4,1% *** IC ₅₀ = 65 nM	5	45,2	
91		LqsS ₁₋₁₈₂	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	14,8 ± 3,4	5	- 33,9 ± 2,7% ***	5	- 24,3 ± 3,3% ** IC ₅₀ = 431 nM	5	45,6	
92		LqsS ₁₋₁₉₁	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	26,4 ± 3,8	10	- 20,5 ± 3,2% ***	7	+ 19,5 ± 2,6% ** EC ₅₀ = 48 nM	10	46,6	
93		LqsS ₁₋₂₀₀	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	0,8	1	+ 24,6%	1	+ 14,4%	1	47,4	
94		LqsS ₁₋₂₀₅	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	0,6	1	- 4,6%	1	+ 10,7%	1	48,0	
95		LqsS ₁₋₂₀₆	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	1,2	1	+ 114,1%	1	+ 48,2% EC ₅₀ = 40 nM	1	48,1	
98		Rv1625C ₁₋₂₀₂	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃	36,7 ± 0,4	2	- 11,7% ↓	1	k.T.	0	47,4	
99		--	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃	14,3	1	- 37,5% ↓	1	- 2,2% ↓	1	24,8	
101		--	--	0,02	1	k.T.	0	k.T.	0	--	
102	pETDuet-3	--	--	0,01	1	+ 40,9% ↑	1	k.T.	0	--	
103	pQE30	Rv1625C ₁₋₂₀₂	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃ D300A	k.T.	0	k.T.	0	k.T.	0	47,3	
104		Rv1625C ₁₋₂₀₂	Rv1625C ₂₀₃₋₄₄₃ R376A	k.T.	0	k.T.	0	k.T.	0	47,3	
105		CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃ D300A	k.T.	0	k.T.	0	k.T.	0	46,3	
106		CqsS ₁₋₁₈₁	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃ R376A	k.T.	0	k.T.	0	k.T.	0	46,3	
107		LqsS ₁₋₁₉₁	Rv1625C ₂₁₈₋₄₄₃ R376A	k.T.	0	k.T.	0	k.T.	0	46,5	

Die prozentuale Stimulation bzw. Hemmung wurde jeweils den normalisierten Daten entnommen.

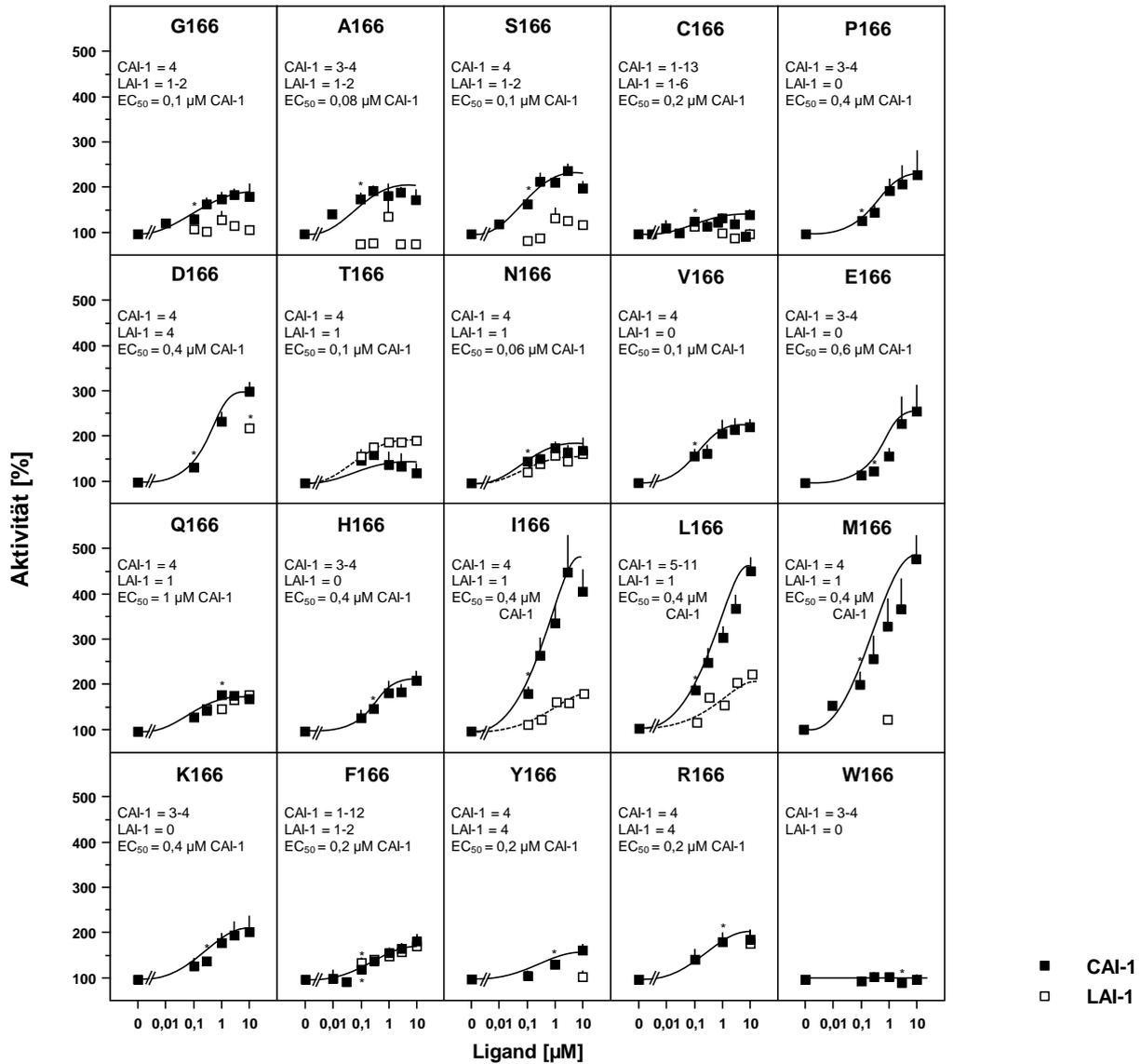
k.T. = es wurde **kein Test** mit diesem Liganden (CAI-1, LAI-1) durchgeführt oder nicht mit der Konzentration von 1 µM.

„n“ entspricht einer unabhängigen Proteinexpression.

Signifikante Stimulationen bzw. Hemmungen durch 1 µM Liganden sind wie folgt markiert: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

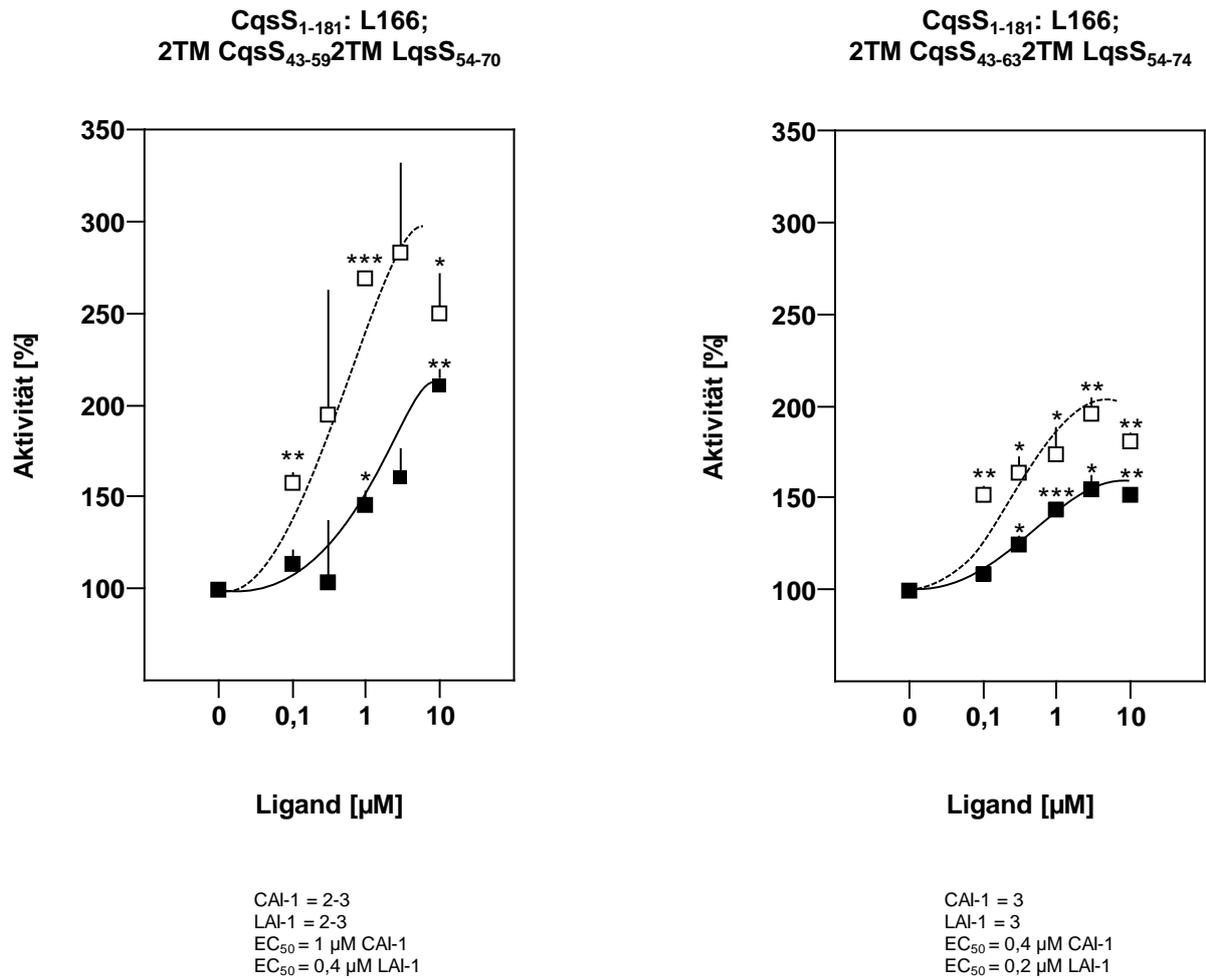
Ausgelassene Konstrukt-Nummern waren nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

7.2 Anhang 2

**Chimäres Protein CqsS₁₋₁₈₁F₁₆₆X-Rv1625C₂₁₈₋₄₄₃**

Die AS an Position 166 (X) wurde gegen alle 19 ASn ersetzt. Die Daten sind normalisiert auf den Basalwert und in Prozent angegeben. Signifikante Stimulationen sind wie folgt markiert: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

7.3 Anhang 3

**Austausch der zweiten Transmembran von CqsS gegen die homologe Sequenz von CqsS**

(■) CAI-1 (n = 3); (□) LAI-1 (n = 3). $\bar{X} \pm \text{SEM}$. Signifikante Stimulationen sind wie folgt markiert:

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

8 Literaturverzeichnis

1. Lalley, P. M., Pierrefiche, O., Bischoff, A. M., and Richter, D. W. (1997) cAMP-dependent protein kinase modulates expiratory neurons in vivo. *Journal of neurophysiology* **77**, 1119-1131
2. Schulkes, C., and Schaap, P. (1995) cAMP-dependent protein kinase activity is essential for preaggregative gene expression in Dictyostelium. *FEBS letters* **368**, 381-384
3. Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D., and Kaupp, U. B. (1990) Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS letters* **270**, 24-29
4. Dugan, L. L., Kim, J. S., Zhang, Y., Bart, R. D., Sun, Y., Holtzman, D. M., and Gutmann, D. H. (1999) Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *J Biol Chem* **274**, 25842-25848
5. Baker, D. A., and Kelly, J. M. (2004) Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Molecular microbiology* **52**, 1229-1242
6. Francis, S. H., Turko, I. V., and Corbin, J. D. (2001) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **65**, 1-52
7. Barzu, O., and Danchin, A. (1994) Adenylyl cyclases: a heterogeneous class of ATP-utilizing enzymes. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **49**, 241-283
8. Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T., and Frank, D. W. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the Pseudomonas aeruginosa type III system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13899-13904
9. Leppla, S. H. (1982) Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 3162-3166
10. Weiss, A. A., Hewlett, E. L., Myers, G. A., and Falkow, S. (1984) Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of Bordetella pertussis. *The Journal of infectious diseases* **150**, 219-222
11. Linder, J. U., and Schultz, J. E. (2003) The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cellular signalling* **15**, 1081-1089
12. Linder, J. U. (2006) Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **63**, 1736-1751
13. Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H. A., Tang, W. J., Feinstein, P. G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R. R., and Gilman, A. G. (1989) Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* **244**, 1558-1564
14. Tang, W. J., and Gilman, A. G. (1995) Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs alpha and forskolin. *Science* **268**, 1769-1772
15. Tesmer, J. J., Sunahara, R. K., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsalpha.GTPgammaS. *Science* **278**, 1907-1916
16. Dessauer, C. W., Scully, T. T., and Gilman, A. G. (1997) Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **272**, 22272-22277
17. Liu, Y., Ruoho, A. E., Rao, V. D., and Hurley, J. H. (1997) Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 13414-13419
18. Yan, S. Z., Huang, Z. H., Andrews, R. K., and Tang, W. J. (1998) Conversion of forskolin-insensitive to forskolin-sensitive (mouse-type IX) adenylyl cyclase. *Molecular pharmacology* **53**, 182-187

19. Yan, S. Z., Huang, Z. H., Shaw, R. S., and Tang, W. J. (1997a) The conserved asparagine and arginine are essential for catalysis of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **272**, 12342-12349
20. Guo, Y. L., Seebacher, T., Kurz, U., Linder, J. U., and Schultz, J. E. (2001) Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases. *EMBO J* **20**, 3667-3675
21. McCue, L. A., McDonough, K. A., and Lawrence, C. E. (2000) Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome research* **10**, 204-219
22. Shenoy, A. R., Srinivas, A., Mahalingam, M., and Visweswariah, S. S. (2005a) An adenylyl cyclase pseudogene in *Mycobacterium tuberculosis* has a functional ortholog in *Mycobacterium avium*. *Biochimie* **87**, 557-563
23. Abdel Motaal, A., Tews, I., Schultz, J. E., and Linder, J. U. (2006) Fatty acid regulation of adenylyl cyclase Rv2212 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *The FEBS journal* **273**, 4219-4228
24. Castro, L. I., Hermsen, C., Schultz, J. E., and Linder, J. U. (2005) Adenylyl cyclase Rv0386 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv uses a novel mode for substrate selection. *The FEBS journal* **272**, 3085-3092
25. Linder, J. U., Hammer, A., and Schultz, J. E. (2004) The effect of HAMP domains on class IIIb adenylyl cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**, 2446-2451
26. Linder, J. U., Schultz, A., and Schultz, J. E. (2002) Adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an autoinhibitory N-terminal domain. *J Biol Chem* **277**, 15271-15276
27. Reddy, S. K., Kamireddi, M., Dhanireddy, K., Young, L., Davis, A., and Reddy, P. T. (2001) Eukaryotic-like adenylyl cyclases in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning and characterization. *J Biol Chem* **276**, 35141-35149
28. Sinha, S. C., Wetterer, M., Sprang, S. R., Schultz, J. E., and Linder, J. U. (2005) Origin of asymmetry in adenylyl cyclases: structures of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1900c. *EMBO J* **24**, 663-673
29. Findeisen, F., Linder, J. U., Schultz, A., Schultz, J. E., Brugger, B., Wieland, F., Sinning, I., and Tews, I. (2007) The structure of the regulatory domain of the adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* with bound oleic acid. *Journal of molecular biology* **369**, 1282-1295
30. Bai, G., Knapp, G. S., and McDonough, K. A. (2011) Cyclic AMP signalling in mycobacteria: redirecting the conversation with a common currency. *Cellular microbiology* **13**, 349-358
31. Shenoy, A. R., Sreenath, N., Podobnik, M., Kovacevic, M., and Visweswariah, S. S. (2005b) The Rv0805 gene from *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase: biochemical and mutational analysis. *Biochemistry* **44**, 15695-15704
32. Aravind, L., and Ponting, C. P. (1999) The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS microbiology letters* **176**, 111-116
33. Beltz, S., Bassler, J., and Schultz, J. E. (2016) Regulation by the quorum sensor from *Vibrio* indicates a receptor function for the membrane anchors of adenylate cyclases. *eLife* 2016;**5**:e13098
34. Bai, G., McCue, L. A., and McDonough, K. A. (2005) Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3676 (CRPMt), a cyclic AMP receptor protein-like DNA binding protein. *Journal of bacteriology* **187**, 7795-7804
35. Padh, H., and Venkitasubramanian, T. A. (1976) Adenosine 3',5'-monophosphate in *Mycobacterium phlei* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Microbios* **16**, 183-189
36. Agarwal, N., Lamichhane, G., Gupta, R., Nolan, S., and Bishai, W. R. (2009) Cyclic AMP intoxication of macrophages by a *Mycobacterium tuberculosis* adenylate cyclase. *Nature* **460**, 98-102

37. Bai, G., Schaak, D. D., and McDonough, K. A. (2009) cAMP levels within *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG increase upon infection of macrophages. *FEMS immunology and medical microbiology* **55**, 68-73
38. Lowrie, D. B., Jackett, P. S., and Ratcliffe, N. A. (1975) *Mycobacterium microti* may protect itself from intracellular destruction by releasing cyclic AMP into phagosomes. *Nature* **254**, 600-602
39. McDonough, K. A., and Rodriguez, A. (2012) The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: from signal to sword. *Nature reviews. Microbiology* **10**, 27-38
40. Fuqua, C., and Greenberg, E. P. (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 685-695
41. Ng, W. L., and Bassler, B. L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics* **43**, 197-222
42. Rutherford, S. T., and Bassler, B. L. (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**
43. Shank, E. A., and Kolter, R. (2009) New developments in microbial interspecies signaling. *Current opinion in microbiology* **12**, 205-214
44. Perez, L. J., Ng, W. L., Marano, P., Brook, K., Bassler, B. L., and Semmelhack, M. F. (2012) Role of the CAI-1 fatty acid tail in the *Vibrio cholerae* quorum sensing response. *Journal of medicinal chemistry* **55**, 9669-9681
45. Bassler, B. L., and Losick, R. (2006) Bacterially speaking. *Cell* **125**, 237-246
46. Miller, M. B., Skorupski, K., Lenz, D. H., Taylor, R. K., and Bassler, B. L. (2002) Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* **110**, 303-314
47. Tiaden, A., Spirig, T., Weber, S. S., Bruggemann, H., Bosshard, R., Buchrieser, C., and Hilbi, H. (2007) The *Legionella pneumophila* response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. *Cellular microbiology* **9**, 2903-2920
48. Higgins, D. A., Pomianek, M. E., Kraml, C. M., Taylor, R. K., Semmelhack, M. F., and Bassler, B. L. (2007) The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature* **450**, 883-886
49. Spirig, T., Tiaden, A., Kiefer, P., Buchrieser, C., Vorholt, J. A., and Hilbi, H. (2008) The *Legionella* autoinducer synthase LqsA produces an alpha-hydroxyketone signaling molecule. *J Biol Chem* **283**, 18113-18123
50. Tiaden, A., Spirig, T., and Hilbi, H. (2010) Bacterial gene regulation by alpha-hydroxyketone signaling. *Trends in microbiology* **18**, 288-297
51. Kessler, A., Schell, U., Sahr, T., Tiaden, A., Harrison, C., Buchrieser, C., and Hilbi, H. (2013) The *Legionella pneumophila* orphan sensor kinase LqsT regulates competence and pathogen-host interactions as a component of the LAI-1 circuit. *Environmental microbiology* **15**, 646-662
52. Perraud, A. L., Weiss, V., and Gross, R. (1999) Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends in microbiology* **7**, 115-120
53. Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000) Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry* **69**, 183-215
54. Henke, J. M., and Bassler, B. L. (2004a) Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology* **186**, 3794-3805
55. Henke, J. M., and Bassler, B. L. (2004b) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology* **186**, 6902-6914
56. Lenz, D. H., Mok, K. C., Lilley, B. N., Kulkarni, R. V., Wingreen, N. S., and Bassler, B. L. (2004) The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* **118**, 69-82
57. Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E., and Silverman, M. R. (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular microbiology* **9**, 773-786

58. Bassler, B. L., Wright, M., and Silverman, M. R. (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular microbiology* **13**, 273-286
59. Tiaden, A., and Hilbi, H. (2012) alpha-Hydroxyketone synthesis and sensing by *Legionella* and *Vibrio*. *Sensors* **12**, 2899-2919
60. Freeman, J. A., and Bassler, B. L. (1999a) A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Molecular microbiology* **31**, 665-677
61. Freeman, J. A., and Bassler, B. L. (1999b) Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology* **181**, 899-906
62. Freeman, J. A., Lilley, B. N., and Bassler, B. L. (2000) A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Molecular microbiology* **35**, 139-149
63. Lilley, B. N., and Bassler, B. L. (2000) Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Molecular microbiology* **36**, 940-954
64. Martin, M., Showalter, R., and Silverman, M. (1989) Identification of a locus controlling expression of luminescence genes in *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology* **171**, 2406-2414
65. Showalter, R. E., Martin, M. O., and Silverman, M. R. (1990) Cloning and nucleotide sequence of luxR, a regulatory gene controlling bioluminescence in *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology* **172**, 2946-2954
66. Guo, Y. L., Kurz, U., Schultz, A., Linder, J. U., Dittrich, D., Keller, C., Ehlers, S., Sander, P., and Schultz, J. E. (2005) Interaction of Rv1625c, a mycobacterial class IIIa adenylyl cyclase, with a mammalian congener. *Molecular microbiology* **57**, 667-677
67. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59
68. Braman, J., Papworth, C., and Greener, A. (1996) Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods in molecular biology* **57**, 31-44
69. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599
70. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
71. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
72. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350-4354
73. Salomon, Y., Londos, C., and Rodbell, M. (1974) A highly sensitive adenylyl cyclase assay. *Anal Biochem* **58**, 541-548
74. Ng, W. L., Wei, Y., Perez, L. J., Cong, J., Long, T., Koch, M., Semmelhack, M. F., Wingreen, N. S., and Bassler, B. L. (2010) Probing bacterial transmembrane histidine kinase receptor-ligand interactions with natural and synthetic molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 5575-5580
75. Grebe, T. W., and Stock, J. B. (1999) The histidine protein kinase superfamily. *Advances in microbial physiology* **41**, 139-227
76. Casino, P., Miguel-Romero, L., and Marina, A. (2014) Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nature communications* **5**, 3258
77. Ng, W. L., Perez, L. J., Wei, Y., Kraml, C., Semmelhack, M. F., and Bassler, B. L. (2011) Signal production and detection specificity in *Vibrio* CqsA/CqsS quorum-sensing systems. *Molecular microbiology* **79**, 1407-1417

78. Winkler, K., Schultz, A., and Schultz, J. E. (2012) The S-helix determines the signal in a Tsr receptor/adenylyl cyclase reporter. *J Biol Chem* **287**, 15479-15488
79. Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., and Deber, C. M. (2009) Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 1760-1765
80. Wei, Y., Ng, W. L., Cong, J., and Bassler, B. L. (2012) Ligand and antagonist driven regulation of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing receptor CqsS. *Molecular microbiology* **83**, 1095-1108
81. Adamian, L., and Liang, J. (2002) Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers. *Proteins* **47**, 209-218
82. Claros, M. G., and von Heijne, G. (1994) TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* **10**, 685-686
83. Bolanos-Garcia, V. M., and Davies, O. R. (2006) Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 1304-1313
84. Roof, W. D., Fang, H. Q., Young, K. D., Sun, J., and Young, R. (1997) Mutational analysis of slyD, an *Escherichia coli* gene encoding a protein of the FKBP immunophilin family. *Molecular microbiology* **25**, 1031-1046
85. Wulfing, C., Lombardero, J., and Pluckthun, A. (1994) An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *J Biol Chem* **269**, 2895-2901
86. Hottenrott, S., Schumann, T., Pluckthun, A., Fischer, G., and Rahfeld, J. U. (1997) The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J Biol Chem* **272**, 15697-15701
87. Kern, M., Scheithauer, J., Kranz, R. G., and Simon, J. (2010 a) Essential histidine pairs indicate conserved haem binding in epsilonproteobacterial cytochrome c haem lyases. *Microbiology* **156**, 3773-3781
88. Kern, M., Eisel, F., Scheithauer, J., Kranz, R. G., and Simon, J. (2010 b) Substrate specificity of three cytochrome c haem lyase isoenzymes from *Wolinella succinogenes*: unconventional haem c binding motifs are not sufficient for haem c attachment by Nrf1 and CcsA1. *Molecular microbiology* **75**, 122-137
89. Hederstedt, L. (1998) The membrane-integral domain of succinate:quinone oxidoreductases--a secretive haem-containing domain. *Biochemical Society transactions* **26**, 408-413
90. Einsle, O., Stach, P., Messerschmidt, A., Simon, J., Kroger, A., Huber, R., and Kroneck, P. M. (2000) Cytochrome c nitrite reductase from *Wolinella succinogenes*. Structure at 1.6 Å resolution, inhibitor binding, and heme-packing motifs. *J Biol Chem* **275**, 39608-39616
91. Sunahara, R. K., Dessauer, C. W., and Gilman, A. G. (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 461-480
92. Sinha, S. C., and Sprang, S. R. (2006) Structures, mechanism, regulation and evolution of class III nucleotidyl cyclases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **157**, 105-140
93. Schultz, J. E., and Natarajan, J. (2013) Regulated unfolding: a basic principle of intraprotein signaling in modular proteins. *Trends in biochemical sciences* **38**, 538-545
94. Yang, Y., Park, H., and Inouye, M. (1993) Ligand binding induces an asymmetrical transmembrane signal through a receptor dimer. *Journal of molecular biology* **232**, 493-498
95. Kanchan, K., Linder, J., Winkler, K., Hantke, K., Schultz, A., and Schultz, J. E. (2010) Transmembrane signaling in chimeras of the *Escherichia coli* aspartate and serine chemotaxis receptors and bacterial class III adenylyl cyclases. *J Biol Chem* **285**, 2090-2099

96. Cheung, J., Bingman, C. A., Reyngold, M., Hendrickson, W. A., and Waldburger, C. D. (2008) Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *J Biol Chem* **283**, 13762-13770
97. White, S. H., and Wimley, W. C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **28**, 319-365
98. von Heijne, G., and Gavel, Y. (1988) Topogenic signals in integral membrane proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* **174**, 671-678
99. von Heijne, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *Journal of molecular biology* **225**, 487-494
100. von Heijne, G. (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J* **5**, 3021-3027
101. Hedin, L. E., Illergard, K., and Elofsson, A. (2011) An introduction to membrane proteins. *Journal of proteome research* **10**, 3324-3331
102. Schultz, J. E., Kanchan, K., and Ziegler, M. (2015) Intraprotein signal transduction by HAMP domains: a balancing act. *International journal of medical microbiology : JMMM* **305**, 243-251
103. Senes, A., Gerstein, M., and Engelman, D. M. (2000) Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *Journal of molecular biology* **296**, 921-936
104. Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E., Mumford, R. A., Slater, E. E., Sigal, I. S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Strader, C. D. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**, 75-79
105. Crossthwaite, A. J., Seebacher, T., Masada, N., Ciruela, A., Dufraux, K., Schultz, J. E., and Cooper, D. M. (2005) The cytosolic domains of Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts. *J Biol Chem* **280**, 6380-6391
106. Seebacher, T., Linder, J. U., and Schultz, J. E. (2001) An isoform-specific interaction of the membrane anchors affects mammalian adenylyl cyclase type V activity. *European journal of biochemistry / FEBS* **268**, 105-110
107. Huang, C. C., and Tesmer, J. J. (2011) Recognition in the face of diversity: interactions of heterotrimeric G proteins and G protein-coupled receptor (GPCR) kinases with activated GPCRs. *J Biol Chem* **286**, 7715-7721
108. Waters, C. M., Lu, W., Rabinowitz, J. D., and Bassler, B. L. (2008) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of vpsT. *Journal of bacteriology* **190**, 2527-2536
109. Smith, C. (2007) Cloning and mutagenesis: tinkering with the order of things. *Nature Methods* **4**, 455-461
110. Cooper, T. G. Biochemische Arbeitsmethoden. Berlin: De Gruyter, 1981