

# **Charakterisierung eines universellen 'Cyclase-Transducer-Elements' (CTE) in Klasse IIIa Adenylatcyclasen**

## **Dissertation**

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

vorgelegt von  
Dipl. Biol. (t.o.) Miriam Sabrina Ziegler  
aus Stuttgart

Tübingen  
2016

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

13.02.2017

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Joachim E. Schultz

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen, Hilfsmittel sowie Ergebnisse von Dritten angegeben habe.

Tübingen, den 13.02.2017

Miriam S. Ziegler



## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Joachim E. Schultz, für die Möglichkeit, dieses spannende Themengebiet für meine Promotion zu nutzen. Er gewährte mir den Freiraum, eigene Ideen in der Forschung zu verfolgen und stand mir mit wissenschaftlichen Diskussionen, die neue Denkanstöße gaben, stets hilfreich zur Seite. Ich bedanke mich für die Möglichkeit zur Teilnahme an Kongressen.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Ruth bedanke ich mich ganz herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Klaus Hantke und Herrn PD Dr. Bertolt Gust danke ich für die Abnahme der Promotionsprüfung. Herrn Hantke danke ich weiterhin für viele hilfreiche, fachliche Diskussionen und die gute Zusammenarbeit im Labor.

Herrn Prof. Dr. Hubert Hilbi danke ich für die Bereitstellung der LqsS-Klone.

Für die erfolgreiche und produktive Kooperation bedanke ich mich bei Frau Dr. Kajal Kanchan, Herrn Jens Baßler und Herrn Prof. Dr. Andrei N. Lupas.

Bei Frau Anita Schultz bedanke ich mich für die Bereitstellung verschiedener Konstrukte und für ihre Hilfsbereitschaft bei Klonierungsproblemen.

Frau Dr. Yinglan Guo danke ich für die freundschaftlichen und fachlichen Diskussionen.

Bei Frau Ursula Kurz bedanke ich mich für einen reibungslosen Laborbetrieb, die Übernahme entlastender Klonierungs- und Aufreinigungsschritte sowie für ihre fachlichen und freundschaftlichen Ratschläge sehr herzlich.

Allen Mitarbeitern der Arbeitskreise Ruth, Lukowski und Drews danke ich für die nette Zusammenarbeit und gute Atmosphäre auf der 7. Ebene.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des AK Schultz bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und das angenehme Arbeitsklima. Meinen Kolleginnen Dr. Karin Winkler, Dr. Janani Natarajan, Dr. Simone Breitkopf und Dr. Stephanie Beltz danke ich für viele fachliche Anregungen und für ihre Freundschaft im und außerhalb des Labors. Frau Dr. Laura García Mondéjar und Frau Dr. Simone Breitkopf danke ich fürs Einarbeiten in die Labormethoden, Frau Dr. Stephanie Beltz für die Überlassung der LqsS-Konstrukte, Marta Cerrolaza für ihr hohes Engagement.

Meiner Familie und Dr. Jakob Birke danke ich von Herzen für die Aufmunterungen und das Wissen, dass wir immer füreinander da sind. Danke!

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>8</b>
<b>II.</b>	<b>ZUGANGSNUMMERN, DOMÄNENÜBERSICHT UND AMINOSÄURESEQUENZEN MIT POSITIONSNUMMERN .....</b>	<b>10</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>12</b>
1.1	SIGNALTRANSDUKTION.....	12
1.2	MODULARITÄT VON ENZYMEN: HAMP, S-HELIX UND CTE .....	13
1.2.1	<i>HAMP Domäne</i> .....	13
1.2.2	<i>S-Helix</i> .....	14
1.2.3	<i>Cyclase-Transducer-Element (CTE)</i> .....	15
1.3	ADENYLATCYCLASEN .....	16
1.3.1	<i>Mykobakterielle Adenylatcyclasen Rv1625c und Rv3645</i> .....	19
1.3.2	<i>Cyanobakterielle CyaG aus Spirulina spp. (Arthrospira)</i> .....	20
1.4	CHEMOTAXISREZEPTOREN VON <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	21
1.5	QUORUM SENSING REZEPTOREN LQSS UND CQS.....	23
1.6	ZIEL DER ARBEIT .....	25
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
2.1	CHEMIKALIEN UND KITS.....	27
2.2	GERÄTE.....	28
2.3	SOFTWARE .....	29
2.4	BAKTERIENSTÄMME.....	30
2.5	PLASMIDE.....	30
2.6	OLIGONUKLEOTIDE.....	32
2.7	MEDIEN UND ALLGEMEINE WACHSTUMSBEDINGUNGEN.....	36
2.7.1	<i>Medien</i> .....	36
2.7.2	<i>Wachstumsbedingungen</i> .....	37
2.7.3	<i>Kompetente Zellen</i> .....	37
2.7.4	<i>Dauerkulturen</i> .....	38
2.8	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	38
2.8.1	<i>Isolierung von Plasmid-DNA</i> .....	38
2.8.2	<i>Bestimmung der DNA-Konzentration</i> .....	38
2.8.3	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i> .....	38
2.8.4	<i>Agarosegelelektrophorese</i> .....	43
2.8.5	<i>Restriktionsverdau</i> .....	43
2.8.6	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i> .....	44
2.8.7	<i>Transformation von Escherichia coli</i> .....	44
2.8.8	<i>Plasmid-DNA Sequenzierung</i> .....	44
2.9	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	45
2.9.1	<i>Expression</i> .....	45
2.9.2	<i>Zellernte</i> .....	45
2.9.3	<i>Zellaufschluss durch French Press</i> .....	46
2.9.4	<i>Präparation von Membranproteinen</i> .....	46
2.9.5	<i>Präparation löslicher, cytosolischer Proteine durch Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen (IMAC)</i> .....	46
2.9.6	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bradford</i> .....	47

2.9.7	<i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	48
2.9.8	<i>Western Blot</i> .....	49
2.9.9	<i>Ponceau S Färbung</i> .....	50
2.9.10	<i>Immunologische Detektion</i> .....	50
2.9.11	<i>Coomassiefärbung</i> .....	51
2.10	ADENYLATCYCLASE-AKTIVITÄTSTEST .....	51
2.11	KLONIERUNGSÜBERSICHT .....	54
2.11.1	<i>Klonierungen für Kapitel 3.1</i> .....	54
2.11.2	<i>Klonierungen für Kapitel 3.2</i> .....	56
2.11.3	<i>Klonierungen für Kapitel 3.3</i> .....	60
2.11.4	<i>Klonierungen für Kapitel 3.4</i> .....	62
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>75</b>
3.1	DIE S-HELIX ALS MODUL IN TSR CHIMÄREN.....	75
3.1.1	<i>Chimären mit Rv3645 AC</i> .....	75
3.1.2	<i>Chimären mit CyaG AC</i> .....	77
3.1.3	<i>Chimären mit Rv1625c AC</i> .....	79
3.2	LQS S - RV1625C CHIMÄREN .....	81
3.2.1	<i>Optimierung der Verknüpfungsposition des LqsS-Rezeptors</i> .....	83
3.2.2	<i>Optimierung der Verknüpfungsposition der Rv1625c AC</i> .....	87
3.3	INTERAKTIONEN LQS S REZEPTOR MIT CYAG HAMP UND S-HELIX.....	90
3.3.1	<i>LqsS-CyaG Chimären</i> .....	90
3.3.2	<i>LqsS-CyaG-Rv1625c Dreifach-Chimären</i> .....	93
3.4	IDENTIFIZIERUNG DES NEUEN CYCLASE-TRANSDUCER-ELEMENTS (CTE) .....	96
3.4.1	<i>Bioinformatische Untersuchung der CTE</i> .....	97
3.4.2	<i>Biochemische Untersuchung der CTE</i> .....	98
3.4.3	<i>Interaktion der CTE mit der S-Helix</i> .....	99
3.4.4	<i>Kompatibilität der CTE von Bakterien und Wirbeltieren</i> .....	104
3.5	VERGLEICH DER REGULATION DURCH LAI-1 UND CAI-1 .....	116
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>118</b>
4.1	DIE S-HELIX IN TSR CHIMÄREN.....	118
4.2	LQS S ALS REZEPTOR FÜR ADENYLATCYCLASEN.....	121
4.3	EIN NEUES CYCLASE-TRANSDUCER-ELEMENT, CTE .....	123
4.3.1	<i>Interaktion von S-Helix und CTE in LqsS-Chimären</i> .....	124
4.3.2	<i>CTE Substitutionen</i> .....	127
4.4	VERGLEICH VON LAI-1 UND CAI-1 .....	131
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>134</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>135</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>138</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

AC(n)	Adenylatcyclase(n)
AS(n)	Aminosäure(n)
C1, C2	katalytische Domänen in Säugetier ACn
CAI-1	<i>Cholera</i> AutoInducer-1
CHD	Cyclase Homologie Domäne
CqsS	<i>Cholera</i> quorum sensing Sensor
CTE	Cyclase Transducer Element
C-terminal	am Carboxy Ende
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EAL	Proteindomäne mit den konservierten ASn E, A und L
EC <sub>50</sub>	Konzentration der halbmaximalen Stimulation
Epac	durch cAMP aktivierte Austauschproteine
GAF	Proteindomäne (nach dem Vorkommen in cGMP spezifischen Phosphodiesterasen, Adenylatcyclasen und dem Protein FhlA)
GGDEF	Proteindomäne mit dem konservierten AS Sequenzmotiv GG[DE][DE]F
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
HAMP	Signalwandlerdomäne (nach dem Vorkommen in <b>H</b> istidinkinasen, <b>A</b> denylatcyclasen, <b>m</b> ethylakzeptierenden Proteinen, <b>P</b> hosphatasen)
His-Tag	Histidin-Tag (AS-Folge: RGSHHHHHH)
IC <sub>50</sub>	Konzentration der halbmaximalen Hemmung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB	Lysogeny Broth (Nährmedium)
LAI-1	<i>Legionella</i> AutoInducer-1
LqsS	<i>Legionella</i> quorum sensing Sensor
MCP(e)	Methyl-akzeptierende(s) Chemotaxisprotein(e)
MCS	Mehrfache Klonierungsstelle (Multiple Cloning Site)
N-terminal	am Amino Ende

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Proteindomäne (nach der Entdeckung in den Proteinen Per, Arnt und Sim)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QS	Quorum Sensing
SDS	Natriumlaurylsulfat
S-Helix	Signaling Helix
S-Tag	Peptid aus RNaseA (AS-Folge: KETAAAKFERQHMS)
TAE	Tris-Acetat mit EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembran
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
TSS	Transformations- und Aufbewahrungslösung
Tween 20	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
Tsr	Serinrezeptor von <i>Escherichia coli</i>
WT	Wildtyp

## II. Zugangsnummern, Domänenübersicht und Aminosäuresequenzen mit Positionsnummern

In dieser Arbeit wurden chimäre Enzyme generiert, indem Domänen von verschiedenen Proteinen neu zusammengesetzt wurden. Als Rezeptor wurde entweder Tsr aus *Escherichia coli* oder LqsS aus *Legionella pneumophila* verwendet. Die Liganden waren bekannt und im Labor verfügbar. Es handelte sich um (L-)Serin bzw. LAI-1 (*Legionella* AutoInducer-1). Als Effektor kamen die (Adenylat-) Cyclase Homologie Domänen (CHDn) von CyaG aus *Arthrospira maxima* sowie Rv1625c und Rv3645 aus *Mycobacterium tuberculosis* zum Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CHD von Klasse IIIa Adenylatcyclasen (ACn) wie CyaG und Rv1625c weiter unterteilt in die Elemente CTE (Cyclase-Transducer-Element) und CHD. Zwischen Rezeptor- und Effektor-domäne wurden bei Bedarf weitere Elemente gesetzt, wie die HAMP Domäne von Af1503 aus *Archaeoglobus fulgidus*, Tsr (*E. coli*) oder CyaG (*A. maxima*), oder auch die S-Helix von CyaG (*A. maxima*). CTE-Substitutionen wurden mit CTE1 und CTE2 der AC Isoform V aus dem Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) durchgeführt.

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine mit ihren Zugangsnummern aufgelistet. Darunter sind die jeweils eingesetzten Domänen genannt (links) und die entsprechende Aminosäuresequenz mit Positionsnummern angegeben (rechts).

<b>Tsr (<i>E. coli</i>)</b>		UniProtKB/TrEMBL: P02942 gi: 16132176
<b>Rezeptor</b>	M <sub>1</sub> LKRIKIVTSLLLVLAVFGLLQLTSGGLFFNALKNDKENFTVLQTIQQQSTL NGSWVALLQTRNTLNLRAGIRYMMQNNIGSGSTVAELMESASISLKQAEKN WADYEALPRDPRQSTAAAAEIKRNYDIYHNALAEIQLLGAGKINEFFDQPTQ GYQDGFQYVAYMEQNDRLHDIIVSDNNASYSQAMWILVGMIVVLAVIFA VWFGIK <sub>215</sub>	
<b>HAMP</b>	A <sub>216</sub> SLVAPMNRLLIDSIRHIAGDGLVKPIEVDGSNEMGQLAESLRHMQGELMRT VG <sub>268</sub>	

<b>LqsS (<i>L. pneumophila</i>)</b>		UniProtKB/TrEMBL: Q5ZRY7
<i>Einsatz in variabler Länge</i>		gi: 499250892
<b>Rezeptor</b>	M <sub>1</sub> SQLKKIVKHLDESMQRSLSNSAHQLVAVGAIQVGFPLFYVIWAFWLPQPY ENLPLRLIGSLLGLGLMLTPYWPLKWKQYLSWYWFLLFTLTPYFFTFLLFLM NQASVISAMSLLCGVFLVLLVDLLSIVLILGFSLALVSYLVSPQMYFGEEHI QMTLVIIFTIAGSTLNY <sub>178</sub> KTAMLQQQK <sub>187</sub> LAGM <sub>191</sub> AAAAGMIAHELRSPLLG IKSGAQUAL <sub>216</sub>	

<b>Af1503(S288I/A291I) (<i>A. fulgidus</i>)</b>		UniProtKB/TrEMBL: O28769
[1]		gi: 499181460
<b>HAMP</b>	S <sub>278</sub> TITRPIIELiNTiDKIAEGNLEAEVPHQNRADIEIGILAKSIERLRRSLKVAME <sub>331</sub>	

<b>CyaG (<i>A. maxima</i>)</b>		UniProtKB/TrEMBL: B5VYJ6 gi: 209524220
<b>HAMP</b>	R <sub>370</sub> WISEPILRLSEASSAIASGARNATASAELNQKVKVEKIRELGMLSESFNMMI QNLRDSFI <sub>430</sub>	
<b>S-Helix</b>	A <sub>431</sub> LENTNRE <sub>438</sub> LEQRVLERTAALLQEKE <sub>455</sub>	
<b>CHD</b>	<b>CTE</b>	R <sub>456</sub> SEELLLNVLPKPIADQLKA <sub>475</sub>
	<b>CHD</b>	N <sub>476</sub> KKAIASAIEEVTILFADIVGFTPLSARMHPIDLVSLLNEMFSIFDHL AEKHKLEKIKTIGDAYMVVGGPLPQDNHAEAIADMALEMQAAMKQ FQGSYLVGSESFQIRIGINTGSVVAGVIGIKKFIYDLWGDVNIASRMES SGTPGSIQVTEETYNRLKKNYIFKERGPIPVKGGKGMTTYWLLGKPKV VDISS <sub>672</sub>

<b>Rv3645c (<i>M. tuberculosis</i>)</b>		UniProtKB/TrEMBL: O06362 gi: 1561078162
<b>CHD</b>	L <sub>331</sub> RDLFGRYVGEDVARRALERGTELGGQERDVAVLFDLVGSTQLAATRPPAE VVQLLNEFFRVVETVARHGGFVNKFQGDAAALAFGAPIEHPDGAGAALSAARE LHDELIPVLGSAEFGIGVSAGRAIAGHIGAQARFEYTVIGDPVNEAARLTELAKE DGHVLASAIIVSGALDAEALCWDVGEVVELRGRAAPTQLARPMNLAAPPEVSS EVRG <sub>549</sub>	

<b>Rv1625c (<i>M. tuberculosis</i>)</b>		UniProtKB/TrEMBL: P9WQ35 gi: 614134238
<b>cytosol.</b>	D <sub>204</sub> TARAEAVMEAEHD <sub>217</sub>	
<b>CHD</b>	<b>CTE</b>	R <sub>218</sub> SEALLANMLPASIAERLKE <sub>237</sub>
	<b>CHD</b>	P <sub>238</sub> ERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSADF ELVDQHGLEKIKVSGDSYVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAA QLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVGDAVNVASRM ESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGR KVAADPGEVRGAEPRTAGV <sub>443</sub>

<b>AC Isoform V (<i>O. cuniculus</i>)</b>		UniProtKB/TrEMBL: P40144 (ADCY5) gi: 130491813
<b>CTE1</b>	Q <sub>430</sub> QERLLLSVLPRHVAMEMKA <sub>449</sub>	
<b>CTE2</b>	Y <sub>1038</sub> NRLLHNILPKDVAAHFLA <sub>1057</sub>	

# 1 Einleitung

## 1.1 Signaltransduktion

In Eukaryoten wie Prokaryoten sind einzelne Zellen durch mindestens eine Membran von ihrer Umgebung getrennt. Dadurch können sie den Stoff- und Energiefluss kontrollieren, um intern die notwendigen biochemischen Reaktionen durchführen zu können. Für ihr Überleben ist ein geregelter Stofftransport über die Membran nötig, wie beispielsweise der Import von Substraten oder der Export von Abfallprodukten sowie funktioneller Sekundärmetabolite. Essentiell ist aber auch eine umfassende Wahrnehmung ihrer Umgebung, um auf jede Situation angepasst zu reagieren. Dafür befinden sich in der Membran viele verschiedene Rezeptoren, die äußere Reize registrieren. Das Signal wird über die Membran ins Zellinnere weitergeleitet. Mit der Übertragung des Signals ins Cytosol geht oft auch eine Verstärkung einher. Die Signale münden in verschiedenen Ebenen zellinterner Signalkaskaden, deren netzwerkartige Verschaltung eine adäquate Antwort garantiert.

Signaltransduktion lässt sich vereinfacht in die drei Schritte Wahrnehmung, Weiterleitung und Reaktion aufteilen. In Bakterien finden sich häufig Einkomponentensysteme, alle Schritte sind hier in einem, meist cytosolischen Protein vereint [2]. In den ebenfalls häufigen Zweikomponentensystemen (TCS) werden die drei Funktionen auf zwei separate Proteine verteilt. Die Wahrnehmung eines Signals findet am membran- gebundenen Rezeptor statt, die Weiterleitung erfolgt über cytosolische Domänen desselben Proteins. Effektorproteine im Cytosol binden an das Transmembranprotein und sorgen für eine zellinterne Antwort [3–5]. Trotz hoher Signalspezifität besitzen die Rezeptoren der TCS einen ähnlichen modularen Aufbau [6], beispielsweise wurden häufig HAMP, GAF, GGDEF, EAL oder PAS Domänen identifiziert. Ihnen wird eine Modifizierung des weitergeleiteten Signals zugeschrieben [7, 8]. Der modulare Aufbau der Rezeptorproteine sowie die große Anzahl an funktionellen cytosolischen Domänen deuteten auf eine mögliche universelle Sprache der Signaltransduktion hin [9–12]. Beispiele für TCS sind G-Protein stimulierte Adenylatcyclasen (ACn) (Abb. 1.6), Chemotaxis (Abb. 1.7) und Quorum Sensing (Abb. 1.9).

## 1.2 Modularität von Enzymen: HAMP, S-Helix und CTE

### 1.2.1 HAMP Domäne

Der Name der HAMP Domäne leitet sich von ihrem Vorkommen in **H**istidinkinasen, **A**denylatcyclasen, **m**ethylakzeptierenden Chemotaxisproteinen und **P**hosphatasen ab. Mittlerweile wurden sie in weiteren bakteriellen Enzymen, aber auch in Histidinkinasen von Pilzen gefunden [13, 14]. Aktuell sind über 100.000 HAMP Domänen in über 93.000 Proteinen in der nichtredundanten SMART-EMBL Datenbank verzeichnet. In den dimerisierenden Membranproteinen von Zweikomponentensystemen kommen HAMP Domänen in der Regel direkt nach der Rezeptordomäne einzeln oder seriell hintereinander vor. Deshalb wurde HAMP Domänen bereits früh die Funktion eines Signalwandlers zugeschrieben. Sie beeinflussen die Aktivität der nachfolgenden cytosolischen Domänen [15–17].

HAMP Domänen bestehen aus etwa 50 Aminosäuren (ASn) und bilden zwei amphipatische  $\alpha$ -Helices aus, die durch einen Konnektor verbunden sind [18]. Die ASn der  $\alpha$ -Helices besitzen ein sich wiederholendes Muster in Heptaden (7 ASn), ihre Benennung mit 'abcdefg' offenbart an den Positionen 'a' und 'd' stets hydrophobe ASn. Diese liegen im Inneren des Vierhelixbündels und stabilisieren die Struktur durch hydrophobe Wechselwirkungen [19], was auch als ein Merkmal von coiled-coil Strukturen beschrieben wurde [20].

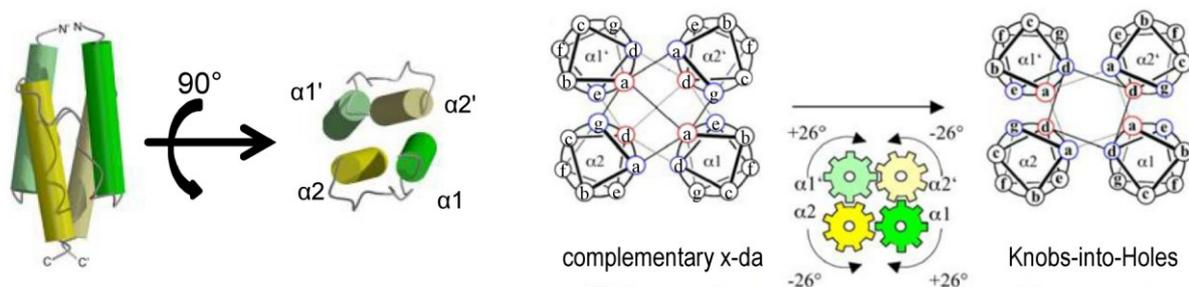


Abb. 1.1 Darstellung der HAMP Domäne nach [16]. Links: Seitenansicht und Aufsicht des Vierhelixbündels mit Darstellung der dimeren Helices  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  als Zylinder. 7 ASn (eine Heptade) bilden etwa zwei Windungen. Rechts: Aufsicht der ASn der Heptade (abcdefg nummeriert) in der 'complementary x-da' Packung, bei der die hydrophoben ASn der Positionen a und d überkreuz stehen. Die Packung lässt sich durch Rotation um  $26^\circ$  in die 'Knobs-into-Holes' Packung überführen. Die Zahnräder stellen die Drehung als Modell (Gearbox-Modell) dar.

Die 2006 gelöste NMR-Struktur der HAMP Domäne von Af1503 aus *Archaeoglobus fulgidus* bestätigte einen homodimeren coiled-coil Aufbau von insgesamt vier  $\alpha$ -Helices [16, 21, 22]. Die vorgefundene 'complementary x-da' Geometrie ist typisch für antiparallele Helixanordnungen [19], durch eine Rotation der benachbarten Helices um

26° lässt sie sich in die isoenergetische Knobs-into-Holes Geometrie überführen (siehe auch Abb. 1.1, rechts). Unter Einbezug aller bisher publizierten Interaktionsstudien und Strukturen [16, 23, 24] wird inzwischen von der Signaltransduktion durch das "dynamic bundle" ausgegangen. Die Helices werden hierbei vertikal zueinander versetzt bei gleichzeitiger Rotation, die insgesamt eine Restrukturierung der Domäne bewirkt [22, 25–27].

### 1.2.2 S-Helix

Die 'signaling'- oder auch S-Helix kommt in fast allen Prokaryoten und einigen Euryarchaeen vor, in Eukaryoten nur in Tieren und Pilzen. Sie ist ein konserviertes Segment von ca. 40 ASn, das in Histidinkinasen direkt eine N-terminale Rezeptordomäne mit einer C-terminalen katalytischen Domäne verbindet, ansonsten üblicherweise nach der HAMP Domäne bzw. zwischen zwei signalisierenden Domänen vorkommt [28, 29]. Sie zeigt das für coiled-coils typische Heptadenmuster mit hydrophoben ASn an Positionen a und d (siehe Abb. 1.2). Es wurden Unterbrechungen dieser Periodizität in Form eines Stutters (Insertion von 4 ASn) oder Stammers (Insertion von 3 ASn) beobachtet [30]. Die kanonische  $\alpha$ -Helix wird hierdurch unter- bzw. überdreht und folglich ihre 'Knobs-into-Holes' Packung gestört [31]. Dies tritt gehäuft in der Nähe von funktionellen Bereichen der Enzymkatalyse auf. In Abb. 1.2 ist ein Sequenzlogo von S-Helices dargestellt. Die Größe der ASn repräsentiert ihre Häufigkeit an der entsprechenden Position, deutlich erkennbar ist ein zentrales 'ERT'-Motiv.



Abb. 1.2 Sequenzlogo des Bereiches von S-Helices aus [28]. Die Konservierung der ASn an den jeweiligen Positionen wird durch die Größe des entsprechenden Buchstabens repräsentiert, darunter ist die Nummerierung in Heptaden (abcdefg) angegeben. Die vertikale Achse ist in Bits angegeben, mit maximal  $\log_2 20 = 4,3$  Bits pro Position.

Im dimeren Enzym kommt die S-Helix doppelt vor, ihr wurde eine Beteiligung an der Dimerisation und damit an der Signaltransduktion zugesprochen [32, 33]. Es wurde vermutet, dass die S-Helix in der Kommunikation zwischen zwei globulären Domänen als Schalter funktionieren könnte, der eine konstitutive Aktivierung der nachfolgenden Domänen verhindert [28]. Die Wichtigkeit der S-Helix wird am Beispiel der Zapfen-Stäbchen-Dystrophie deutlich. Hier führt eine konstitutiv aktive Guanylatcyclase in der menschlichen Retina schließlich zur Erblindung. Ursache ist eine Punktmutation im hochkonservierten ERT-Motiv der innersten Heptade der S-Helix [32, 34].

Die S-Helix von CyaG aus *Arthrospira platensis* ist nur 25 ASn lang. Sie besteht aus drei Heptaden und einem Stutter (3x7 + 4 ASn) und ist zwischen der HAMP und der CHD Domäne lokalisiert. Im Rahmen der Dissertation von K. Winkler wurde die S-Helix in Tsr-Rezeptor chimären Enzymen charakterisiert. Die Deletion der S-Helix resultierte in einer Umkehr des weitergeleiteten Signals [35]. Signalinversion wurde ebenfalls beobachtet, wenn zusätzlich zur Deletion von ein bis zwei Heptaden auch der C-terminale Stutter entfernt war. Blieb der Stutter erhalten, waren die Chimären nicht durch Serin reguliert. Die additive Insertion der S-Helix mit 25, 18 oder 11 ASn resultierte ebenfalls in Signalinversion. Es wurde daher die Annahme formuliert, dass die S-Helix ein eigenständiges Modul ist, das durch die Dimerisierung wie ein Schalter die Signaltransduktion beeinflusst.

### 1.2.3 Cyclase-Transducer-Element (CTE)

Der N-Terminus der katalytisch aktiven Cyclase Homologie Domäne von Klasse IIIa und IIIb Adenylatcyclasen, teilweise auch von Guanylatcyclasen, weist eine hohe Sequenzkonservierung auf [36, 37]. In Abb. 1.3 ist ein Sequenzauszug im relevanten Bereich dargestellt. Deutlich erkennbar ist das gehäufte Auftreten der ASn Paare LL und VA sowie das mittig gelegene SVLP/NILP Motiv. Diese Region von 20-25 ASn wurde 2008 von S. Dunin infolge bioinformatischer Beobachtungen identifiziert und aufgrund ihrer vorhergesagten helikalen Struktur als C-Helix bezeichnet (persönliche Mitteilung). Unter diesem Namen wurde die Region in bisherigen Dissertationen und Publikationen als hypothetisches Element genannt.

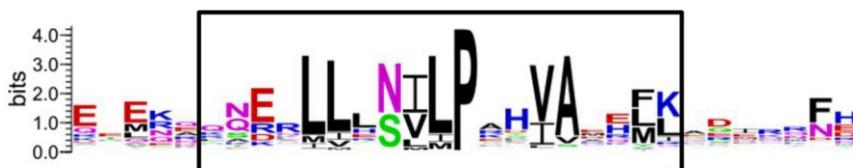


Abb. 1.3 Sequenzlogo der CTE (umrahmt) aus [38]. Die Konservierung der ASn an den jeweiligen Positionen wird durch die Größe des entsprechenden Buchstabens dargestellt, zugrunde lag ein Alignment aus 2045 Sequenzen.

In den zwei gelösten Strukturen einer GC der Ratte (pdb: 3hls) sowie der AC Isoform X des Menschen (pdb: 4clf) wird im Bereich des Prolins eine Unterbrechung der helikalen Struktur gezeigt. Obwohl die S-Helix kein für coiled-coils typisches Heptadenmuster zeigt, könnte sie über die Ausbildung eines zwei-Helix-Bündels einen wichtigen Beitrag zur Dimerisierung leisten. Die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte Region von 20 ASn erhielt den bezeichnenden Namen Cyclase-Transducer-Element (CTE).

### 1.3 Adenylatcyclasen

Adenylatcyclasen (ACn) sind Enzyme, die meist als Dimer die Metallionen-abhängige Reaktion von ATP zu cAMP katalysieren [39, 40]. Sie kommen in fast allen Organismen vor und sind aufgrund sequenzieller und struktureller Unterschiede in sechs Klassen (I-VI) unterteilt [41]. Klasse I ACn sind vor allem cytosolische Enzyme, die in Gram-negativen Bakterien der Familie Enterobacteriaceae wie z.B. *E. coli* vorkommen. ACn der Klasse II sind lösliche Toxine, sie werden vor allem von *Bacillus anthracis* und *Bordetella pertussis* während einer Infektion sezerniert. Am häufigsten und in allen drei Domänen des Lebens vertreten sind ACn der Klasse III, zu ihr gehören alle eukaryotischen ACn und die meisten bakteriellen ACn. Sie sind am besten erforscht und werden aufgrund sequenzieller Unterschiede der katalytischen ASn weiter unterteilt in die Subklassen a bis d [42]. Die katalytisch aktive Domäne ist stark konserviert und wird als Cyclase Homologie Domäne (CHD) bezeichnet. Von den Klassen IV bis VI sind bisher nur wenige Vertreter bekannt [43–46].

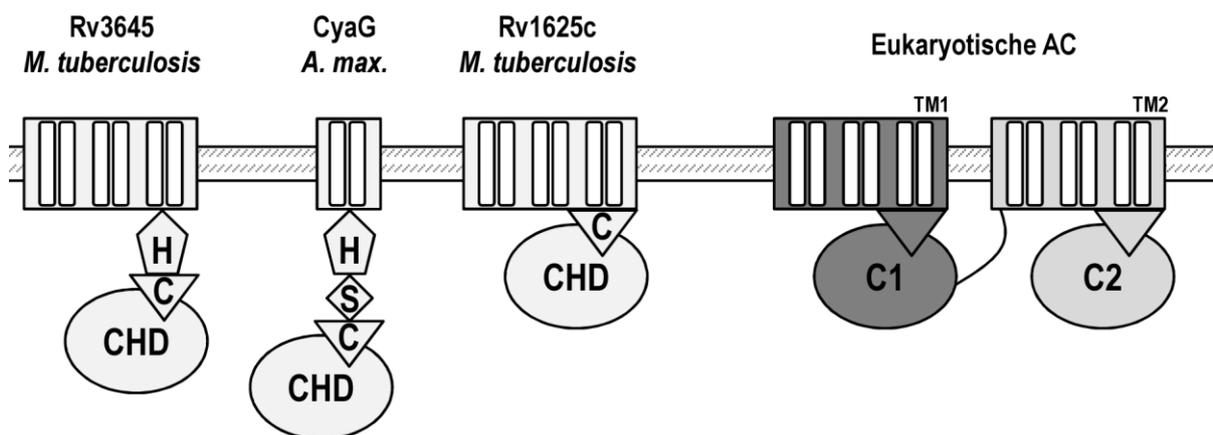


Abb. 1.4 Schematische Darstellung von Klasse III Adenylatcyclasen. Für die drei bakteriellen ACn (links) ist nur ein Monomer des homodimeren Enzyms dargestellt. An die 2 bzw. 6 TM Membrandomänen bindende Liganden sind unbekannt. Rv3645 gehört zur Klasse IIIb, alle anderen ACn zur Klasse IIIa. Die Rv1625 stellt aufgrund ihres Aufbaus die Hälfte der membrangebundenen, eukaryotischen ACn dar. H = HAMP Domäne, CHD = katalytische Domäne, S = S-Helix, C bzw. Dreieck = CTE. C1 = CHD1, C2 = CHD2 in eukaryotischen ACn.

Eukaryotische ACn kommen gewebsspezifisch vor und werden in 10 Isoformen unterteilt [47, 48]. Die lösliche Isoform X wird pH-abhängig durch das Hydrogenkarbonat-Ion aktiviert [49] und gehört zur Klasse IIIb. Isoformen I bis IX gehören hingegen zur Klasse IIIa, sind membranständig und in ihrem Aufbau sehr ähnlich (vgl. auch Abb. 1.4 bis 1.6). Auf N-terminale sechs Transmembran (6 TM)  $\alpha$ -Helices folgt eine cytosolische Domäne C1, auf die wiederum weitere 6 TM  $\alpha$ -Helices mit ebenfalls angeschlossener cytosolischer Domäne C2 folgen [37]. Die Membrananker machen hierbei etwa 40% des Gesamtproteins aus; die jeweils etwa 40 kDa großen cytosolischen Domänen bestehen ihrerseits aus katalytischen und regulatorischen Subdomänen [50]. Die funktionelle eukaryotische Adenylatcyclase ist somit ein 12 TM

Pseudoheterodimer. Die sechs katalytisch essentiellen ASn sind auf C1 und C2 verteilt, daher entsteht das aktive Zentrum erst durch Dimerisierung der beiden cytosolischen Domänen.

Im Gegensatz dazu sind funktionelle bakterielle ACn Homodimere; auf einer Peptidkette liegen eine 6 TM und eine cytosolische Domäne. Da alle sechs essentiellen ASn auf beiden Monomeren codiert sind, besitzen sie zwei aktive Zentren. In jedem aktiven Zentrum sorgen zwei Aspartatreste für die Bindung des für die Katalyse essentiellen Kofaktors Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) bei Eukaryoten bzw. Mangan ( $Mn^{2+}$ ) bei Prokaryoten. Auf der gegenüberliegenden CHD tragen zwei ASn zur Purinerkennung und zwei weitere zur Stabilisierung des Übergangszustandes bei. Eine schematische Darstellung der CHDn beider ACn ist in Abb. 1.5 zu finden.

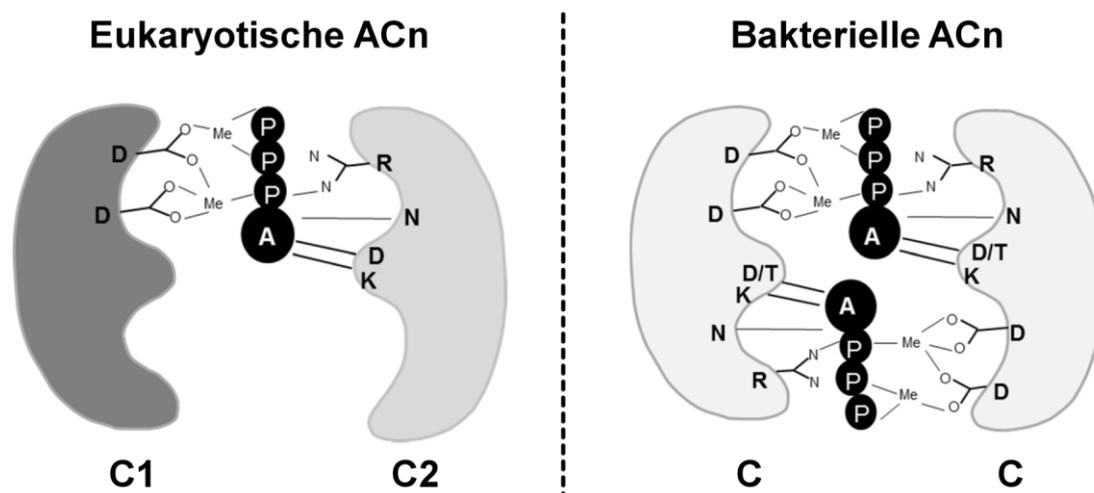


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der dimeren cytosolischen Domänen (Graustufen) mit den sechs ASn im Einbuchstabencode, die zusammen ein aktives Zentrum koordinieren. Jedes Aspartat (D) bindet dabei ein divalentes Metallkation (Me). In Schwarz ist das Substrat dargestellt: A = Adenosin, p = Phosphatgruppe. Links: Heterodimere in Eukaryoten besitzen nur ein aktives Zentrum, in die zweite Tasche kann der Stimulator Forskolin binden. Rechts: in Prokaryoten sind alle sechs ASn auf beiden Monomeren codiert und es entstehen zwei aktive Zentren. Adaptiert nach [42, 51].

Die Regulation eukaryotischer ACn erfolgt durch G-Proteine, die durch  $G_s\alpha$  stimulierend bzw. durch  $G_i\alpha$  inhibierend ausfallen kann. Stimulierendes Forskolin kann in der zweiten, nicht katalytischen Tasche binden [52–54].



### 1.3.1 Mykobakterielle Adenylatcyclasen Rv1625c und Rv3645

*Mycobacterium tuberculosis* ist ein Humanpathogen, das die weltweit verbreitete Tuberkulose verursacht. Das Gram-positive Bakterium ist um das Peptidoglykan mit einer zusätzlichen Mykolsäureschicht umgeben, wodurch es eine hohe Resistenz gegen äußere Einflüsse wie beispielsweise Antibiotika und Säuren besitzt. Es wird von den Makrophagen in der Lunge aufgenommen, kann aber die Verschmelzung des Endosoms mit dem Lysosom unterbinden und somit lange Zeit im Wirt überdauern. Diese Fähigkeit wird auch einer erhöhten cAMP Konzentration zugeschrieben [70]. Nicht verwunderlich ist daher, dass im Genom von *M. tuberculosis* H37Rv 15 vollständige Gene und ein Pseudogen für Adenylatcyclasen entdeckt wurden [71]. Die Vielfalt ihrer Domänenorganisation macht differenzierte Einsatzgebiete in Abhängigkeit der Physiologie sehr wahrscheinlich. H37Rv stellt ein Modellsystem für die Untersuchung von bakteriellen cAMP Signalwegen dar [72]. Alle 16 ACn von H37Rv gehören zur Klasse III, für die meisten wurde katalytische Aktivität nachgewiesen, einige sind biochemisch oder strukturell charakterisiert (pH-sensitive Rv1264, pdb: 1y10, 1y11, Rv1900c pdb: 1ybt) [60, 64, 73–78].

#### Mykobakterielle Rv1625c

Die mykobakterielle Rv1625c gehört zu Klasse IIIa ACn und wurde bereits intensiv biochemisch untersucht [50, 75]. Die Struktur des cytosolischen Teils wurde mit 2,7 Å gelöst und in der Datenbank hinterlegt (pdb: 1yk9, 4p2m). Es handelt sich allerdings um eine katalytisch inaktive AC mit drei Mutationen im aktiven Zentrum [79, 80]. Rv1625c ist als Homodimer aktiv, jedes Monomer besitzt sechs Transmembranhelices gefolgt von einer cytosolischen Domäne. Das Monomer ist in seinem Aufbau mit exakt einer Hälfte von eukaryotischen ACn vergleichbar, die Rv1625c gilt daher als prototypisch (siehe Abb. 1.4) [75]. Da jedes Monomer alle sechs wichtigen ASn für das katalytische Zentrum kodiert, besitzt die Rv1625c im Gegensatz zu eukaryotischen ACn jedoch zwei aktive Zentren (siehe Abb. 1.5).

#### Mykobakterielle Rv3645

Rv3645c sowie die ACn Rv1318c, Rv1319c und Rv1320c gehören zu den mykobakteriellen Klasse IIIb ACn. An der Substratbindung sind hier Lysin und Threonin statt wie bei Klasse IIIa Lysin und Aspartat beteiligt, was ein wesentliches Unterscheidungskriterium darstellt. Auch in ihrer Topologie unterscheiden sie sich von Klasse IIIa ACn; die vier ACn besitzen den modularen Aufbau von 6 TM, gefolgt von einer HAMP Domäne und einer CHD (siehe Abb. 1.4) [77, 81]. Dieser Aufbau ähnelt stark dem der Chemotaxisrezeptoren, weshalb Untersuchungen zur Wirkungsweise der HAMP

Domänen in chimären Enzymen mit den Rezeptoren von Tsr und Tar kombiniert mit der CHD von Rv3645 durchgeführt wurden [1, 82, 83].

### 1.3.2 Cyanobakterielle CyaG aus *Spirulina* spp. (*Arthrospira*)

Cyanobakterien kommen vorzugsweise in alkalischen Seen mit hohem Salzgehalt vor und zählen zu den ältesten Lebewesen auf der Erde. Sie gelten als maßgeblich an der Erhöhung des Sauerstoffgehalts in der Ur-Erdatmosphäre verantwortlich [84–89]. Einige filamentöse Cyanobakterien, wie *Anabaena*, können in spezialisierten Zellen, den Heterocysten, Stickstoff fixieren [90, 91].

Die photoautotrophe *Spirulina* wurde 1940 und 1970 als grünblauer Algent Teppich im Tschad-See entdeckt, von denen sich Schwärme von Flamingos sowie Einheimische ernährten [92]. Es wurde spekuliert, dass extrazelluläres cAMP möglicherweise an der Ausbildung der Algenteppeiche beteiligt ist [93]. Beispielsweise wurden im Genom von *Arthrospira platensis* NIES-39 mit 22 ACn überdurchschnittlich viele cAMP Produzenten identifiziert [94], von denen mit CyaA, CyaC, CyaG sowie CyaB1 und CyaB2 fünf strukturell diverse ACn bereits bekannt waren [59, 95–97]. CyaG wurde als homolog zu Klasse III ACn sowie zu Guanylatcyclasen (GCn) identifiziert. Die Bindetaschen von ACn und GCn sind ähnlich, dennoch besitzen sie eine hohe Substratspezifität und eine zu vernachlässigende Aktivität gegenüber dem jeweils anderen Substrat. Nach der Mutation dreier an der Katalyse beteiligten ASn konnte eine Änderung der Substratspezifität von einer AC zu einer GC beobachtet werden [98]. Die CyaG wurde daher als möglicher Vorfahr von humanen GCn und ACn gedeutet [99].

CyaG besitzt eine 2 TM Domäne, auf die eine HAMP sowie eine katalytische Domäne folgt (siehe Abb. 1.4). Ihr Aufbau ist damit ähnlich den Chemotaxisrezeptoren, über eine Verwandtschaft wurde spekuliert [99]. Anders als die vier mykobakteriellen Klasse IIIb ACn besitzt CyaG zusätzlich eine S-Helix, die die HAMP mit der katalytischen Domäne verbindet. Zunächst als einfacher Linker bezeichnet deuten weiterführende Untersuchungen der S-Helix auf ein selbstständiges Modul hin (1.2.2).

## 1.4 Chemotaxisrezeptoren von *Escherichia coli*

*Escherichia coli* ist ein Gram-negativer, fakultativ anaerober, einzelliger Organismus. Dank seines Vorkommens in der menschlichen und tierischen Darmflora ist *E. coli* der mit am besten untersuchte Prokaryot, das Genom vieler Stämme ist entschlüsselt. Es gibt einige humanpathogene Arten, in der Forschung stellt *E. coli* einen beliebten Modellorganismus dar und wird weltweit für die Forschung und Produktion von Proteinen und niedermolekularen Verbindungen herangezogen.

*E. coli* ist in der Lage, Lock- und Schreckstoffe in seiner Umgebung wahrzunehmen und dank seiner peritrichen Begeißelung mit einem angepassten motilen Verhalten zu reagieren (Chemotaxis). Die Untersuchung der Chemotaxis begann in den 1960er Jahren und gilt als ein besonders gut erforschtes Zweikomponentensystem [100–103]. Als Rezeptoren wurden die fünf MCPs (Methylakzeptierende Chemotaxisproteine) Tsr, Tar, Tap, Trg und Aer charakterisiert. Tsr erkennt Serin als Lock- und Leucin und Indol als Schreckstoffe; Tar erkennt Aspartat und Maltose als Lock- und Nickel und Kobalt als Schreckstoffe; Tap erkennt Dipeptide und Trg Ribose und Galaktose als Lockstoffe [104]. Aer registriert das umgebende Redoxpotential [105]. Chemotaxisrezeptoren kommen vorrangig als Trimere von Dimeren am Zellpol vor [106–109]. Diese Rezeptorclusterbildung erlaubt eine Beeinflussung benachbarter MCPs und erhöht die Empfindlichkeit dieses Systems [110].

MCPs befinden sich in einem Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen (siehe auch Abb. 1.7): bei niedriger Lockstoffkonzentration (Kinase-ON) werden die MCPs methyliert und der über die Phosphatübertragungskaskade beeinflusste Motor sorgt für die Schlagrichtung der Flagellen im Uhrzeigersinn (CW), die Zelle taumelt und richtet sich dabei willkürlich neu aus. Bei hoher Lockstoffkonzentration (Kinase-OFF) bleibt die Autophosphorylierung sowie die Methylierung der MCPs aus, die Flagellen schlagen gegen den Uhrzeigersinn (CCW), die Zelle schwimmt. Mit Hilfe des Vergleiches von Methylierungsgrad der MCPs zu aktueller Ligandenkonzentration kann die Zelle feststellen, ob sie in eine günstige und ungünstige Richtung schwimmt, auch Adaption genannt [23, 111, 112]. In einer einheitlichen Umgebung gleicht die Fortbewegung der Zelle einem Random Walk. In einem günstigen Gradienten kommt die Zelle ihrer bevorzugten Umgebung näher, indem sie länger im CCW-Modus verbleibt, auch als verzerrter Random Walk (engl. Biased random walk) bezeichnet.

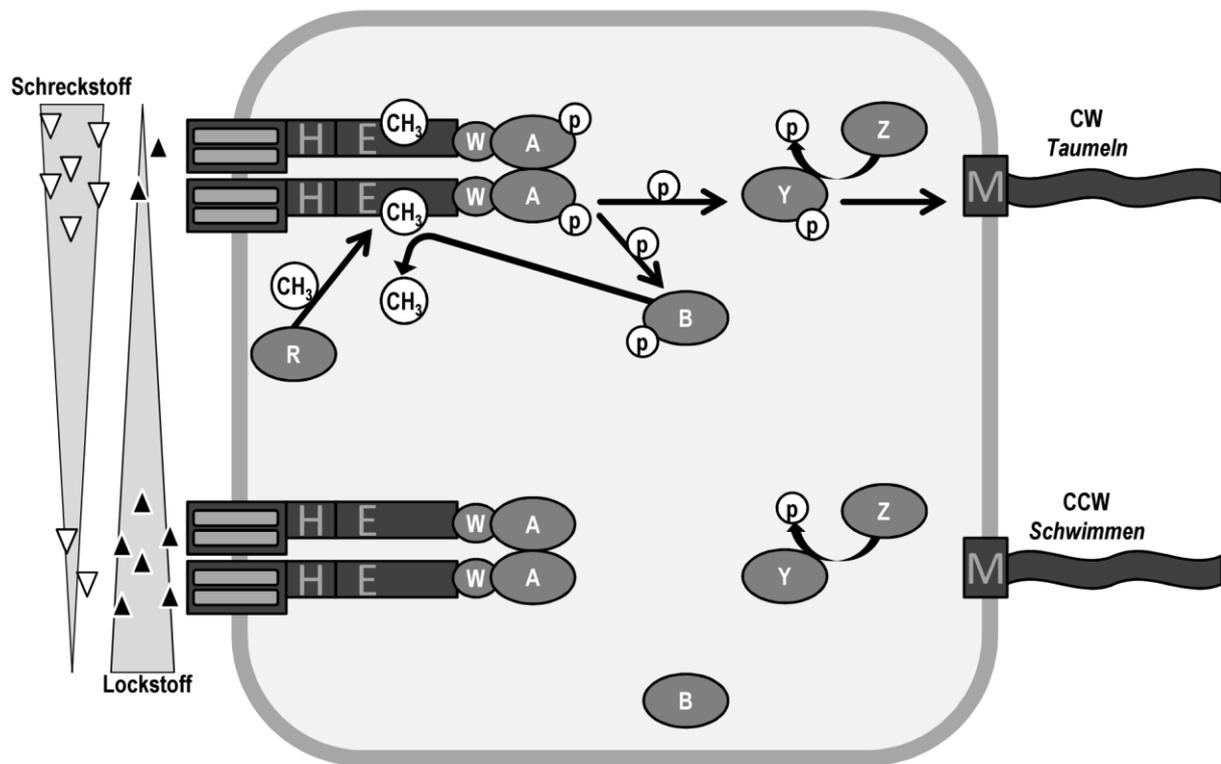


Abb. 1.7 Schematische Darstellung der beiden Zustände der an der Chemotaxis beteiligten Proteine (hellgrau). Der Transfer von Phosphat (p) oder Methylgruppen (CH<sub>3</sub>) ist durch Pfeile angegeben. Dunkelgrau: links Tsr Dimer (mit den drei Segmenten 2 TM Domäne, H = HAMP Domäne, E = Effektordomäne) sowie rechts M = Motor mit Flagellum. Schwarze Dreiecke: Lockstoff, weiße Dreiecke: Schreckstoff. Nach [23]. Auf cytosolischer Seite liegen MCPs als ternäre Komplexe mit dem Adapterprotein CheW (W) und der Histidinkinase CheA (A) vor. Sie befinden sich in einem Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen: Kinase-ON (oben) und Kinase-OFF (unten). Sind nur geringe Lockstoffe vorhanden (oben), wird die Autophosphorylierung von CheA stimuliert. CheA-p überträgt seinen Phosphatrest auf einen der beiden Antwortregulatoren CheY (Y, motorische Kontrolle) oder CheB (B, sensorische Kontrolle). CheY-p bindet an den Flagellenmotor (M) und bewirkt eine Umkehr der Flagellenschlagrichtung auf 'im Uhrzeigersinn' (clockwise, CW). Die Zelle taumelt und richtet sich zufällig neu aus. CheY-p wird rasch von der CheZ-Phosphatase (Z) hydrolysiert, sodass lediglich neu gebildetes CheY-p den Grundzustand der Schlagrichtung (gegen den Uhrzeigersinn, counterclockwise, CCW) beeinflussen kann, wodurch eine zeitnahe Abstimmung auf die Lock- bzw. Schreckstoffkonzentration gewährleistet ist. Der Methylierungsgrad der MCPs wird zusätzlich in einer Rückkopplungsschleife durch die Antagonisten CheB (B) und CheR (R) reguliert, CheB-p sorgt für eine Demethylierung, CheR für die Methylierung des Chemorezeptors.

Die Struktur des Chemotaxisrezeptors Tsr wurde 1999 gelöst [113]. Tsr besitzt zwei Transmembranhelices mit einem großen periplasmatischen Loop für die Ligandenbindung, im Cytosol folgen eine HAMP Domäne und die Effektordomäne, auf der sich die Methylierungsstellen befinden, sowie die Regionen zur Interaktion mit CheA und CheW. Rezeptor und HAMP Domäne von Tsr bzw. Tar konnten bereits erfolgreich mit der cytosolischen Effektordomäne verschiedener ACn gekoppelt und funktionelle chimäre Proteine generiert werden [1, 82].

## 1.5 Quorum Sensing Rezeptoren LqsS und CqsS

Die Erstbeschreibung der obligat aeroben, stäbchenförmigen Legionellen erfolgte 1947. Über Aerosole in die menschliche Lunge gelangend wurde *Legionella pneumophila* 1976 als Erreger der Legionärskrankheit beschrieben [114, 115]. Die fakultativ anaeroben, gekrümmten, monotrich begeißelten Vibrionen wurden bereits 1854 erstmals beschrieben [116]. Das von *Vibrio cholerae* sekretierte Cholera toxin gelangt in die Epithelzellen des Dünndarms, wo es G-Proteine stimuliert und eine ständige cAMP Produktion veranlasst. Auf die induzierte Sekretion vieler Ionen folgt durch Osmose ein massiver Wasserverlust, welcher sich in einer lebensbedrohlichen Diarrhoe äußert [117]. *Vibrio harveyi* ist ein marines, biolumineszentes Bakterium, welches sowohl frei schwimmend als auch assoziiert mit Meerestieren als Symbiont, Kommensal oder Parasit auftritt. Es wurden bisher keine humanpathogenen Stämme beschrieben.

Legionellen wie Vibrionen sind Gram-negative Bakterien und durch Quorum Sensing (QS) zur Wahrnehmung der Zellpopulationsdichte befähigt. Jedes Bakterium sekretiert hierbei geringe Mengen eines Signalmoleküls. Befinden sich viele Bakterien in nächster Nähe, ist die Konzentration dieses Signalmoleküls, sog. Autoinducer, lokal erhöht und die Population zeigt durch veränderte Genexpression ein gruppenspezifisches Verhalten [118–120]. Besonders wichtig ist dies bei der Ausbildung von Biofilmen, bei der Virulenz, bei der Antibiotikaresistenz oder der Biolumineszenz [121, 122].

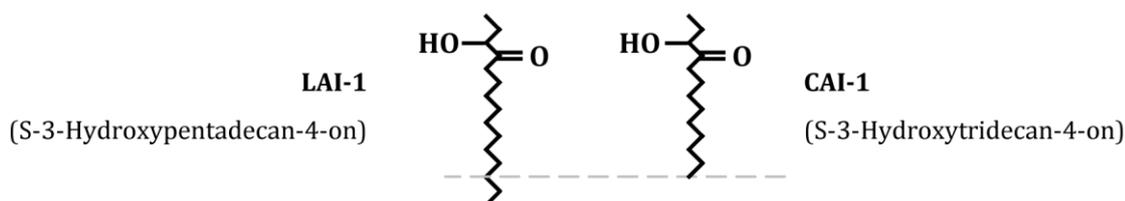


Abb. 1.8 Die Liganden LAI-1 bzw. CAI-1 der QS-Rezeptoren LqsS (von *Legionella pneumophila*) bzw. CqsS (von *Vibrio* spp.) unterscheiden sich in ihrer Länge um zwei C-Atome.

In Vibrionen wurden vier verschiedene QS-Systeme beschrieben [123–125], die spätestens im Antwortregulator LuxO konvergieren [123, 126]. Im namensgebenden Bakterium *V. cholerae* wurde das Cqs-System (*Cholera* quorum sensing) entdeckt [125]. Es wurde auch in *V. harveyi* identifiziert [123], und ist schematisch in Abb. 1.9, links, dargestellt. In Vibrionen bildet CqsA das Signalmolekül CAI-1, welches an den Rezeptor von CqsS bindet [123, 127]. Homolog dazu bildet LqsA in *L. pneumophila* das Signalmolekül LAI-1, welches an den Rezeptor von LqsS bindet [128, 129]. LAI-1 (*Legionella* AutoInducer-1) und CAI-1 (*Cholera* AutoInducer-1) sind Lipide, die sich in ihrer Länge um zwei C-Atome unterscheiden [119].

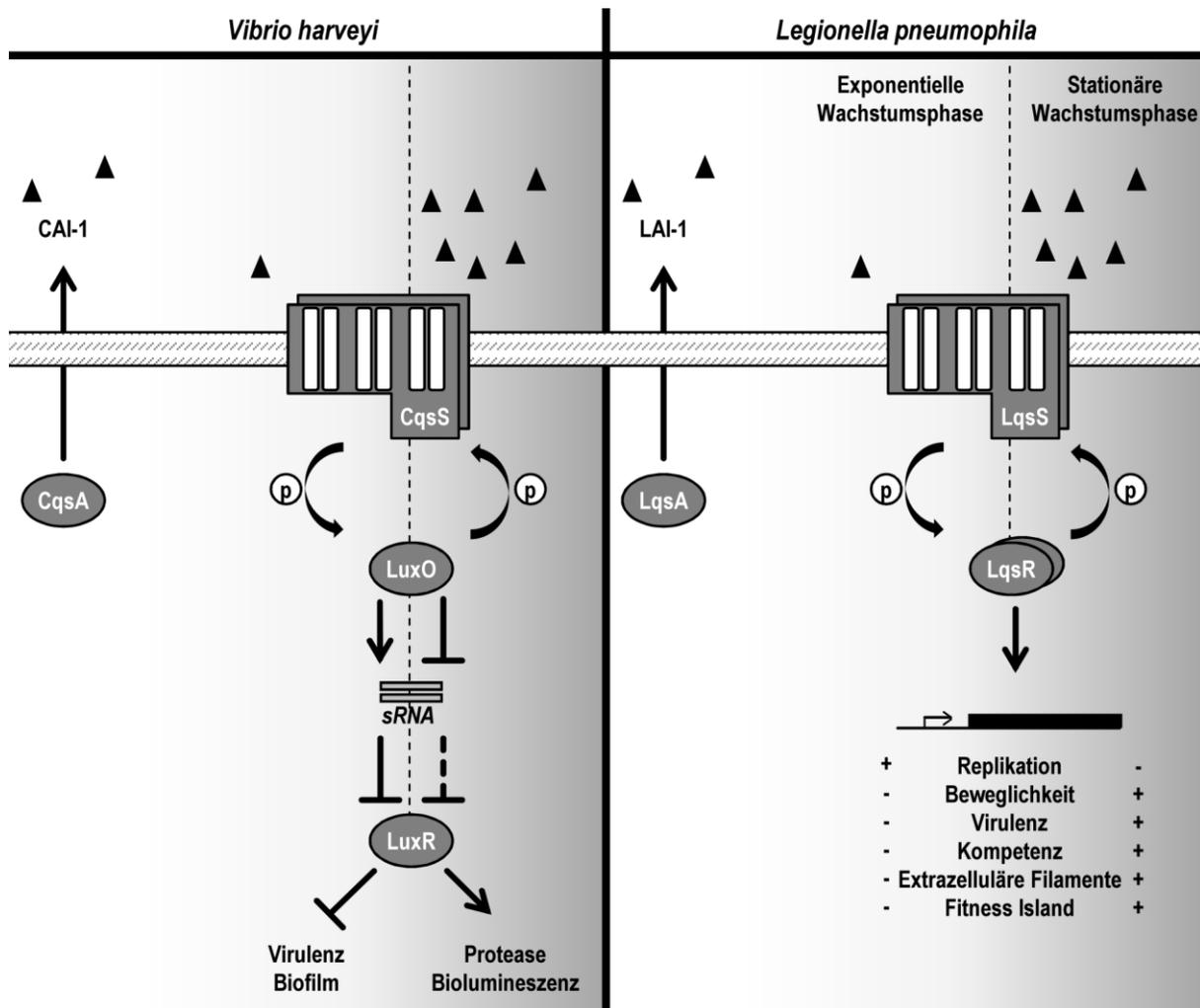


Abb. 1.9 Schematische Darstellung der QS Systeme in *V. harveyi* (links) und *L. pneumophila* (rechts), adaptiert nach [130–132]. Jeweils links der gestrichelten Linie ist der Phosphatfluss (P) und die resultierenden Phänotypen bei niedriger, rechts davon bei hoher Ligandenkonzentration dargestellt. Die Liganden CAI-1 bzw. LAI-1 (Dreiecke) werden von der Synthetase CqsA bzw. LqsA produziert, bei niedrigen Konzentrationen sind die homodimeren Rezeptoren CqsS bzw. LqsS als Histidinkinase aktiv. **Der Phosphatrest von CqsS** wird über LuxU auf LuxO transferiert, LuxO-p induziert die Expression für regulatorische RNA (sRNA), wodurch die Expression des Gens für LuxR gehemmt wird [132]. Ohne LuxR wird die Expression der Gene für Virulenz und Biofilmbildung nicht gehemmt und die Expression der Luziferasegene nicht stimuliert. Bei hoher Ligandenkonzentration kehrt sich diese Kaskade um, sodass LuxR aktiv ist, was phänotypisch als Biolumineszenz sichtbar ist [133, 134]. **Der Phosphatrest von LqsS** wird direkt auf den dadurch dimerisierenden Antwortregulator LqsR übertragen und die Replikationsmaschinerie bleibt angeregt. Bei erhöhter LAI-1 Konzentration durch erhöhte Zellzahl kehrt sich die Kaskade um, durch inaktives LqsR wird die Replikation gestoppt und die Expression der Gene für Virulenz, Kompetenz und Filamente zur Beweglichkeit angeregt.

CqsS und LqsS (*Cholera-* bzw. *Legionella* quorum sensing Sensor) sind bei niedrigen Ligandenkonzentrationen als Histidinkinase aktiv, bei hohen als Phosphatase. Die Histidinkinasen geben nach ihrer Autophosphorylierung den Phosphatrest über die sogenannte Phosphatübertragungskaskade auf cytosolische Antwortregulatorproteine (LuxO bzw. LqsR, Abb. 1.9) weiter, die darauf hin die Expression entsprechender Gene induzieren (siehe Text zu Abb. 1.9) [135, 136]. Interessanterweise wird die Virulenz in *Legionella pneumophila* bei hoher LAI-1 Konzentration ausgelöst, während dies bei Vibrionen bei niedriger CAI-1 Konzentration der Fall ist [137].

Im aktiven Enzym liegen die Membrandomänen der QS Rezeptoren LqsS und CqsS als Homodimere vor [119, 121]. Sie ähneln in ihrem Aufbau stark den 2x 6 TM Membrandomänen der Adenylatcyclase des Rindes, welche 1989 mit kurzen extramembranal Schleifen beschrieben wurde, was eine dichte Packung der 6 TM Helices erfordert [37]. Bisher wurde eine direkte Ligandenbindung in eukaryotischen ACn aufgrund der kurzen Schleifen ausgeschlossen, mit der Entdeckung der lipophilen Liganden LAI-1 und CAI-1 wären für ACn jedoch ähnliche Liganden denkbar.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Sensorische Membranproteine ermöglichen den Informationsfluss durch eine anderweitig undurchlässige Membran. Beim Vergleich ihres Aufbaus fällt eine ähnliche Organisation in Modulen auf, ihre Verwandtschaft auf evolutiver Ebene ist naheliegend. Beispielsweise wurde die HAMP Domäne in über acht verschiedenen Enzymklassen gefunden [13], auch die S-Helix wurde häufig als Linker zwischen zwei signalisierenden Domänen beschrieben [28]. Es ist eine spannende Frage, inwieweit die Signaltransduktion über die Membran einem universellen Mechanismus folgt. Bisher wurden hierzu verschiedene funktionelle chimäre Proteine aus dem Tsr-Rezeptor von *E. coli* und verschiedenen mykobakteriellen oder cyanobakteriellen katalytischen Domänen von ACn erzeugt und dabei die Signaltransduktion über die dazwischen geschalteten Domänen untersucht. Vor kurzem wurde die S-Helix der CyaG AC im Rahmen ihrer natürlichen HAMP und katalytischen Domäne charakterisiert. Die Entdeckung, dass sie aufgrund ihrer An- bzw. Abwesenheit das Signal der Regulation zu invertieren vermag, **wirft die Frage auf, ob die S-Helix als eigenständiges Modul betrachtet werden kann. Diese Fragestellung wurde zunächst in Tsr Rezeptor Chimären mit Klasse IIIa und IIIb ACn untersucht, später auch in LqsS Rezeptor Chimären.**

In Eukaryoten werden ACn indirekt über G-Proteine reguliert. Eine zusätzliche direkte Regulation über die 2x 6 TM Membrandomäne wurde daher für unnötig und aufgrund der kurzen extramembranal Schleifen auch für unwahrscheinlich gehalten. In Bakterien wurden bislang keine G-Proteine entdeckt. Über die Regulation der ACn ist bis auf wenige Ausnahmen von pH-Wert und Peptiden wenig bekannt. Viele membran-gebundene bakterielle ACn besitzen jedoch einen strukturell ähnlichen Aufbau wie ihre eukaryotischen Verwandten. Neue Erkenntnisse weisen auf eine direkte Regulation hin. Der ähnliche Quorum Sensing Rezeptor von CqsS aus *V. harveyi* war mit der mykobakteriellen Rv1625c AC zu funktionellen, auf den Liganden CAI-1 sensitive Chimären verknüpft worden. Analog waren funktionelle und durch den Liganden LAI-1 regulierte Chimären mit LqsS aus *Legionella pneumophila* generiert worden [138].

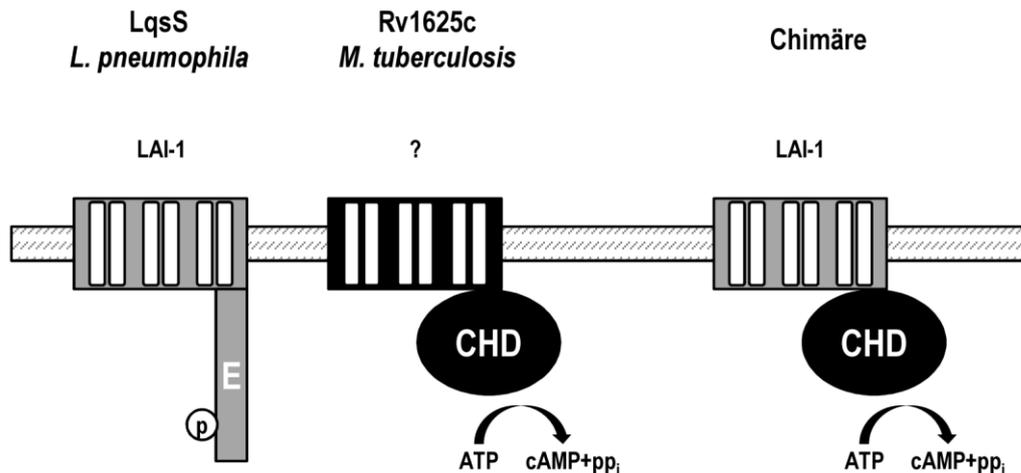


Abb. 1.10 Schematische Darstellung chimärer Enzyme (Monomere). Links: LqsS mit 6 TM Helices bindet den Liganden LAI-1, die Effektor-domäne E wird phosphoryliert (p). Mitte: Es ist kein Ligand für den 6 TM Rezeptor von Rv1625c bekannt '?', die katalytische Domäne CHD setzt ATP zu cAMP und Pyrophosphat (pp<sub>i</sub>) um. Rechts: Das chimäre Enzym mit dem 6 TM Rezeptor von LqsS bindet den Liganden LAI-1 und setzt abhängig von dessen Konzentration eine messbare Menge an ATP Molekülen pro Zeit um.

Bei der Erzeugung von chimären Enzymen zeigt sich die Wichtigkeit des Kennens der richtigen Domänengrenzen. Da bei den ersten drei LqsS-Rv1625c Chimären sowohl Hemmung als auch Stimulation durch LAI-1 auftrat, sollten im Rahmen dieser Arbeit **die Anknüpfpositionen von LqsS und Rv1625c genauer untersucht und optimiert werden**. Hierbei wurden seitens Rv1625c nur wenige Positionen toleriert, die auffälliger Weise den Beginn eines bisher unter dem Namen C-Helix bekannten, hochkonservierten helikalen Bereiches markierten. Ihrer Entdeckung 2008 im Rahmen bioinformatischer Studien von S. Dunin (MPI, Tübingen) folgte keine Untersuchung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte **dieser Bereich charakterisiert werden, er wurde schließlich CTE (für Cyclase Transducer Element) genannt**. Bei Betrachtung der AS Sequenzen der CTE in bakteriellen ACn und allen neun Isoformen membrangebundener eukaryotischer ACn fiel ein hoher Grad an Konservierung auf. **Durch Substitution der mykobakteriellen CTE durch eukaryotische CTE sollte die Fragestellung der Kompatibilität untersucht werden**. Hierfür wurden membrangebundene Homodimere und Heterodimere sowie lösliche Heterodimere eingesetzt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Kits

Firma, Ort	Material
AppliChem, Darmstadt	Acrylamid 4K-solution 30% (37, 5:1)
B. Braun Melsungen AG, Melsungen	Sterican® Kanülen Gr. 2, Gr. 18
Biomers.net GmbH, Ulm	Oligonukleotide
BIO-RAD, München	BIO-RAD Proteinassay-Farbstoffkonzentrat, Profinity™ IMAC Ni <sup>2+</sup> charged Resin
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	Rotilabo®-Blottingpapiere 0,35 mm, allgemeine Verbrauchsmaterialien
GE Healthcare, Freiburg	Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Hyperfilm ECL, ECL Plex Ziege-anti-Maus IgG-Cy3 Sekundärantikörper
Hartmann Analytik, Braunschweig	[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-ATP
Macherey-Nagel, Düren	Porablot PDVF Membran (2 $\mu$ m Porengröße)
Merck Millipore, Darmstadt	Aluminiumoxid 90 aktiv neutral 0.063-0.200 mm (70-230 mesh ASTM), Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten, allgemeine Verbrauchsmaterialien
New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA (USA)	Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase
Novagen R&D systems, Wiesbaden	S-Tag monoklonaler Antikörper
PEQLAB, Erlangen	KAPA HiFi PCR Kit, dNTPs, peqGOLD Protein-Marker I und IV
Perkin Elmer, Massachusetts, MA (USA)	[2,8- <sup>3</sup> H]-cAMP (Ammoniumsalz), LSC-Szintillator Cocktail Ultima Gold XR
Promega, Madison, WI (USA)	Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System
QIAGEN, Hilden	monoklonale Antikörper Maus-anti-RGS-His4 bzw. Tetra-His™ (IgG1, BSA-frei), Ni-NTA Agarose, pREP4 Vektor
Roche (Boehringer), Mannheim	Alkaline Phosphatase, ATP, $\lambda$ -DNA, Rapid DNA Ligation Kit, Restriktionsenzyme

Serva, Heidelberg	Visking dialysis tubing 8/32 Durchmesser 16 mm
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO (USA)	Dowex® 50WX4-400 Ion-exchange resin, LB-Medium, allgemeine Verbrauchsmaterialien
Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting	HiYield PCR Clean-Up und Gel Extraction Kit
VWR, Radnor, PA, USA	ECL Plex Ziege-anti-Maus IgG-Cy3 Sekundärantikörper

## 2.2 Geräte

Firma, Ort	Gerät
Beckman Coulter GmbH, Krefeld	Ultrazentrifuge Beckman L-60 mit Rotor Type 50.2Ti
Bender & Hobein AG, Zürich, CH	Vortex Genie 2
BINDER GmbH, Tuttlingen	Brutschränke
Biometra, Göttingen	T3000 Thermocycler, UVstar312 nm
Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA (USA)	Western Blotting Apparat Trans-Blot SD 'Semi Dry Transfer Cell'
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen	Gelelektrophorese-Kammern, Kämmen und Gelschlitten für Agarosegele
Eppendorf, Hamburg	BioPhotometer, Thermomixer compact, Tischzentrifugen Minispin und 5418, Vakuumzentrifuge Concentrator 5301
GE Healthcare, Freiburg	Ettan DIGE Imager, Hoefer Mighty small II E250 Kammer, Hoefer Mighty small SE245 gel casting apparatus, Szintillationszähler LKB Wallac 1209 Rackbeta ,Primo'
GFL, München	Überkopfschüttler GFL 3025
Knick, Berlin	pH-Meter 761 Calimatic
Kontron-Hermle, Gosheim	Rotor A6.14 (SS34) und A8.24 (GSA)
Sartorius AG, Göttingen	Waage
SLM instruments, Urbana, IL (USA)	French Pressure Cell Press FA-078-E1 mit Zubehör
Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold	Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R, Zentrifuge Sorvall RC 5B Plus

## 2.3 Software

Programm	Anwendung	Quelle
GENtle	Organisation aller Chimären, Auswertung der Sequenzierungen, Alignments, Primerdesign	A free multi-purpose molecular biology tool, 2006, Magnus Manske, PhD thesis
Genedoc	Bearbeitung multipler Alignments	Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility Version 2.5.000 [139]
Image Quant TL	Auswertung Western Blots	GE Healthcare, Freiburg
JPred4	Strukturvorhersage	A Protein Secondary Structure Prediction Server [140]
Phyre2	3D Proteinmodellierung	Internetseite für 3D Proteinmodellierung [141]
PyMOL	3D Protein-Analyse	PyMOL v0.99. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
QTI-Plot	Visualisierungsprogramm, Funktionenplot	Version 0.9.8.9
Weblogo	Sequenzlogo	Version 2.8.2 (2005-09-08) <a href="http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi">http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi</a> [142]
Zotero	Literaturverzeichnis	Version 4.0.29.11
MS Office Paket (Word, Excel, PowerPoint)	Allgemeine Projektbearbeitung	Microsoft, Redmond, WA, USA

## 2.4 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Verwendung	Genotyp	Herkunft
XL1 blue	Klonierung, nach QuikChange	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F <sup>-</sup> <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene
BL21 (DE3)	Für Expression von Genen auf Plasmid pQE80L und pETDuet-3	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
BL21 DE3 (pREP4)	Für Expression von Genen auf Plasmid pQE30	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pREP4: KanR, lacI	Novagen
C43 (DE3)	Für Expression toxischer Proteine	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Lucigen

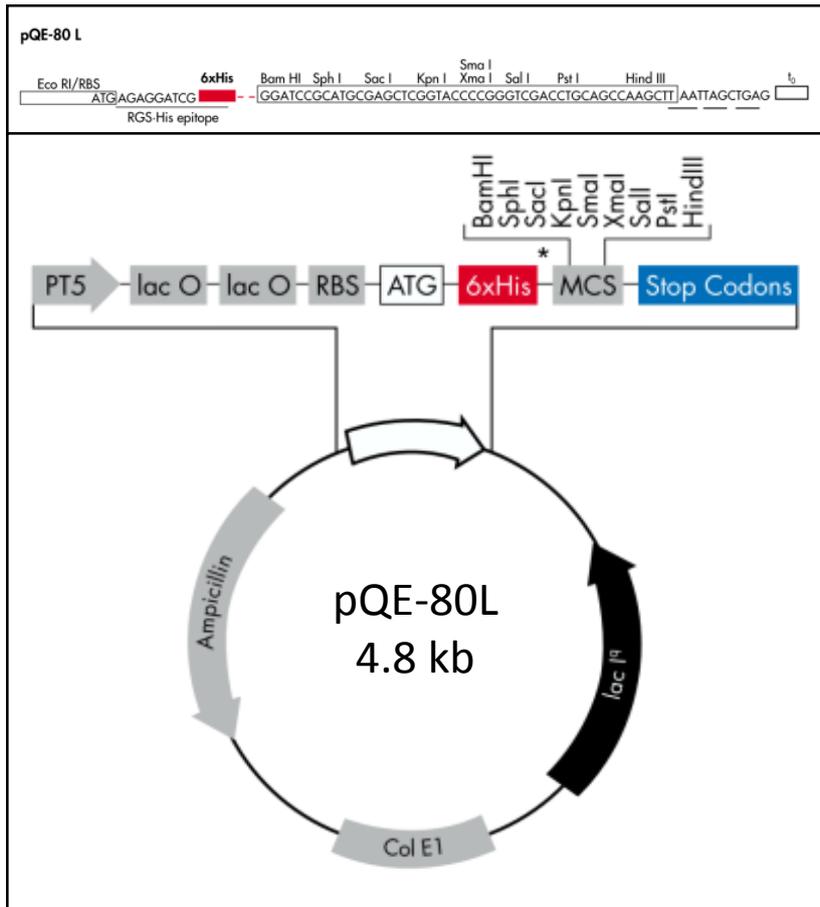
## 2.5 Plasmide

Es wurde hauptsächlich das Plasmid **pQE-80L** (Qiagen) verwendet. Dem T5-Promoter mit Ribosomenbindestelle (RBS) folgt eine IPTG induzierbare multiple cloning site (MCS) mit N-terminalem RGSHis<sub>6</sub>-Tag. Es sind weiterhin ein lacI<sup>q</sup>-Gen (für die konstitutive Expression des Repressors des IPTG-Promoters) vorhanden sowie ein Gen, das für die beta-Lactamase (Ampicillin-Resistenz) codiert.

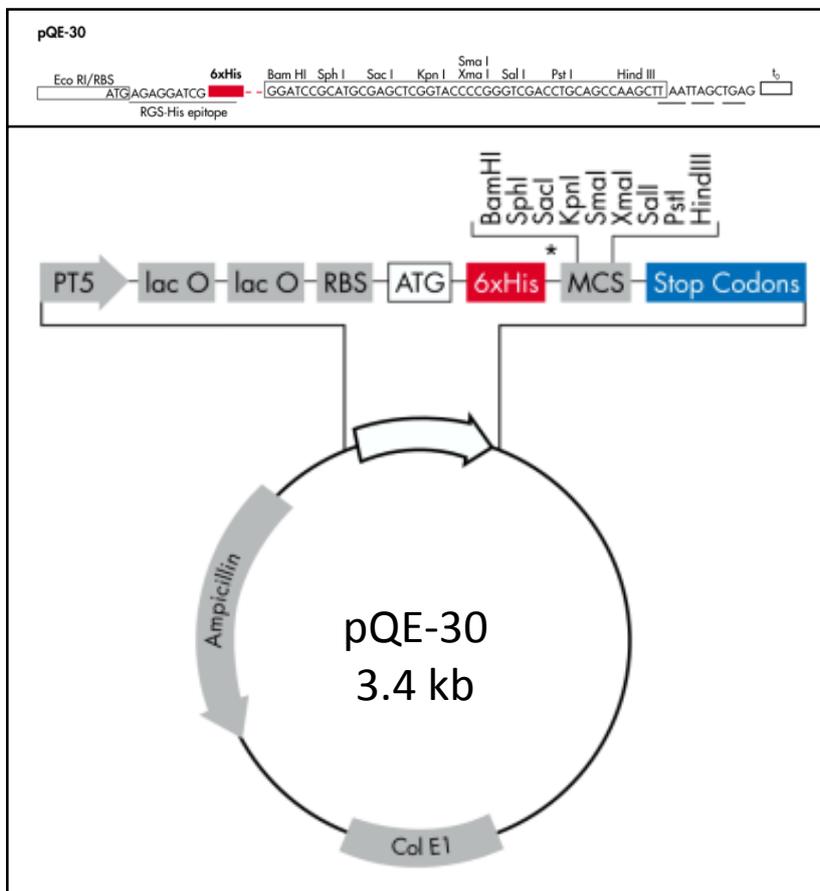
In einigen Fällen wurde das Plasmid **pQE-30** (Qiagen) eingesetzt, es ist identisch zu pQE-80L mit Ausnahme des Fehlens des lacI<sup>q</sup>-Gens. Daher wurde dieses Plasmid stets in Kombination mit pREP4 verwendet.

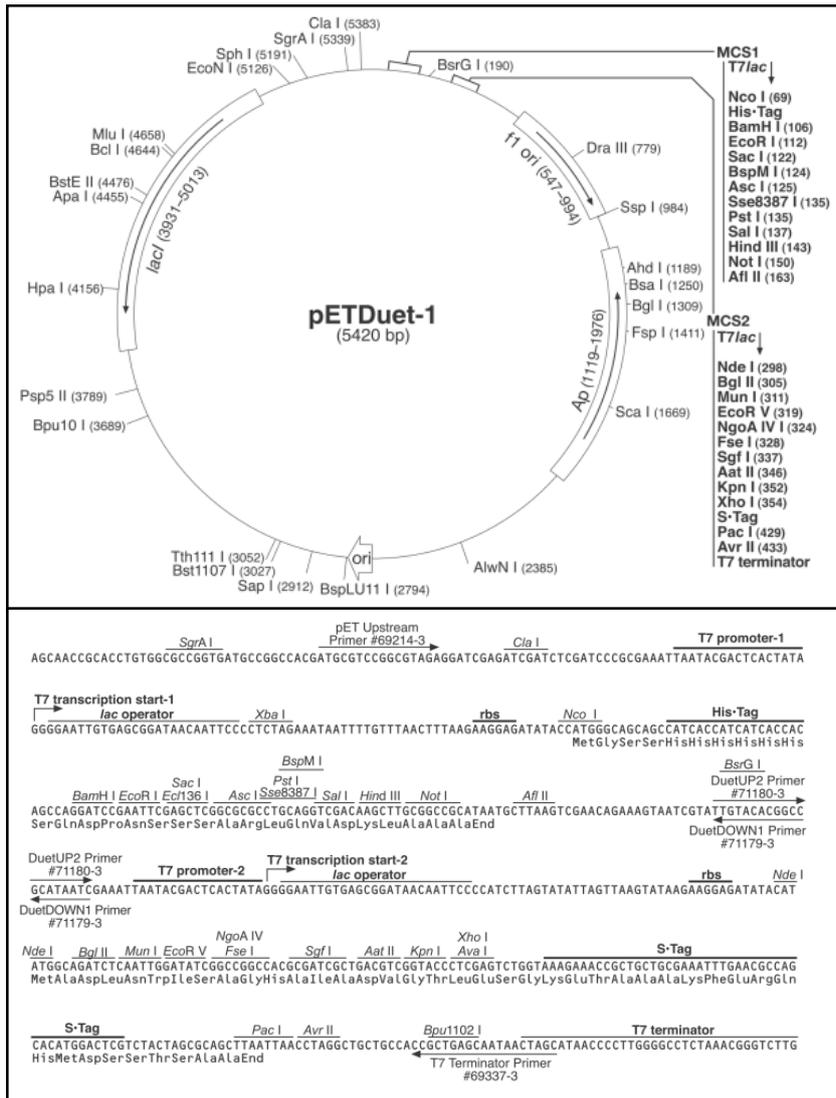
**pREP4** beinhaltet ein lacI<sup>q</sup>-Gen sowie ein Resistenzgen gegen Kanamycin.

Das Plasmid **pETDuet-1** (Novagen) war durch A. Schultz modifiziert worden, indem die MCS1 durch die von pQE-30 ersetzt wurde, das Plasmid wurde im Labor unter der Bezeichnung **pETDuet-3** geführt. Das Plasmid enthält zwei IPTG induzierbare MCS, sodass zwei verschiedene Gene gleichermaßen exprimiert werden konnten. Beiden MCS ist ein T7 Promoter/lac operator mit RBS vorangestellt. In MCS-1 eingefügte Gensequenzen erhalten einen N-terminalen RGSHis<sub>6</sub>-Tag, in MCS-2 eingefügte einen C-terminalen S-Tag zur späteren differentiellen Detektion im Western Blot. Das Plasmid pETDuet enthält weiterhin ein lacI<sup>q</sup>-Gen sowie ein Gen, das für die beta-Lactamase (Ampicillin-Resistenz) codiert.



**Abb. 2.1 Plasmidkarten der Vektoren pQE-80L (oben) und pQE-30 (unten) von Qiagen mit Darstellung der Sequenzen der multiple cloning site (MCS).** PT5: T5 Promoter, lac O: lac Operator, RBS: Ribosomenbindestelle, ATG: Start codon, 6xHis: Tag mit 6 Histidinen, MCS: Multiple Cloning Site mit Restriktionsschnittstellen, Stop codon: Stop in allen Leserastern, Col E1: Col E1 Replikationsstart, Ampicillin: Resistenzgen gegen Ampicillin, lacI: Gen für konstitutive Expression des Repressors.





**Abb. 2.2 Plasmidkarte von pETDuet-1 (oben) von Novagen mit Darstellung der Sequenzen der multiple cloning sites (MCS, unten).** ori: pBR322 ColE1 origin, lacI: Gen für Expression des Repressors, f1 ori: Origin, Ap: Resistenzgen gegen Ampicillin. pETDuet besitzt im Gegensatz zu den pQE Vektoren zwei MCS (Multiple Cloning Site, jeweils mit Restriktionsschnittstellen), jeweils mit einem vorangestellten T7 Promotor (T7lac). In dieser Arbeit wurde der pETDuet-3 (modifiziert durch A. Schultz) verwendet, hier wurde die MCS1 durch die MCS der pQE Vektoren ersetzt.

## 2.6 Oligonukleotide

Die Klonierungen der Konstrukte wurden mit Methoden wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt. Das Einfügen von DNA-Sequenzen in die MCS von pQE30 bzw. pQE80L erfolgte zumeist zwischen die N-terminale BamHI und die C-terminale HindIII Schnittstelle, dem Protein wurde folglich ein N-terminaler RGSHis<sub>6</sub>-Tag angefügt. Das Einfügen von DNA-Sequenzen in die MCS1 von pETDuet-3 erfolgte ebenfalls über BamHI/HindIII, da diese identisch zur MCS von pQE80L war (siehe 2.5). Für die MCS2 von pETDuet-3 wurde die N-terminale NdeI und die C-terminale EcoRV Schnittstelle verwendet, hierbei wurde ein C-terminaler S-Tag angefügt.

Alle Primer wurden von der Firma biomers.net, Ulm, hergestellt und sind nachfolgend in 5' - 3' Richtung angegeben. 's' steht für sense, 'as' steht für antisense Primer. Es wurden allgemeine Primer verwendet, die an komplementäre Sequenzen im entsprechenden

Vektor binden (siehe Tab. 2.1), sowie spezielle Primer, die für individuelle Mutagenesen eingesetzt wurden (siehe Tab. 2.2.)

Unterstrichene Basensequenzen stehen für eine Restriktionsschnittstelle, wenn sie zur Klonierung verwendet wurde. Diese waren: AGC'GCT (AfeI), G'GATCC (BamHI), A'GATCT (BglII), GAT'ATC (EcoRV), A'AGCTT (HindIII), CA'TATG (NdeI). Unterstrichene Aminosäuresequenzen stehen für den bindenden Bereich des Primers ans Template. Punktmutationen sind durch Änderung der Groß- bzw. Kleinschreibung dargestellt.

Tab. 2.1 Liste der verwendeten Standard Sequenzier- und Klonierungsprimer für die entsprechenden Vektoren:

Name		Sequenz in 5' - 3' Richtung	Alias	Vektor
U-pQE	s	cggataacaatttcacacag		pQE30 und pQE80
R-pQE	as	agttctgaggtcattactgg		
XmnI	s	gctcatcattggaaaacgttcttcggg	(bindet ca. 470 bp vor U-pQE)	
pETDuet MCS1	s	atgcgtccggcgtaga	pETDuet-3_MCS1_s	pETDuet
pETDuet MCS1	as	gattatgcggccgtgtacaa	Duet Down1_as	
pETDuet MCS2	s	ttgtacacggccgcataatc	Duet Up2_s	
pETDuet MCS2	as	accctcaagaccgtttaga	RpET_MCS_pQE30_as	

Tab. 2.2 Liste mit spezifischen Primern für die Klonierung aller verwendeten Konstrukte. Angegeben ist die Nummer, die Richtung (s= sense, as= antisense), die Basensequenz in Kleinbuchstaben (Restriktionsschnittstellen BamHI, BglII, AfeI, NdeI und EcoRV hervorgehoben, Mutationen in Großbuchstaben). Die jeweils resultierende AS Sequenz ist angegeben, unterstrichen sind die sechs bindenden AS der PCR, resultierende Restriktionsschnittstellen sind fett hervorgehoben.

Name		Sequenz in 5' - 3' Richtung	AS Sequenz
MZ01	as	attctcgagcgctccatggcgaccttgag	<u>LKVAMEALEN</u>
MZ02	s	gtcgccatggaggcgctcgagaataactaac	VAMEALENT <u>N</u>
MZ03	as	ttgttctaattcctccatggcgaccttgag	<u>LKVAMEELEQ</u>
MZ04	s	gtcgccatggaggaattagaacaacgggta	VAMEELEQ <u>RV</u>
MZ05	as	cgccgtcctttcctccatggcgaccttgag	<u>LKVAMEERTA</u>
MZ06	s	gtcgccatggaggaaggacggcgcgctg	VAMEERTA <u>AL</u>
MZ07	as	aagc <b>agcgcT</b> gccgtcctttctaatacccgttg	<u>QRVLERTaALL</u>
MZ08	s	aggacggc <b>Agcgct</b> gcttcaagaaaaggaggaattagaacaacgggtattagaa	RTa <u>ALLQEKEELEQRVLE</u>
MZ09	as	ctcttcgatcgctccatggcgaccttgag	<u>LKVAMERSEE</u>
MZ10	s	gtcgccatggagcgatcggaagagctatta	VAMERSE <u>ELL</u>
MZ11	as	ttgttctaattcctccatggcgaccttgaggct	<u>SLKVAMELEQ</u>
MZ12	s	aaggctcgccatggaattagaacaacgggta	KVAMELEQ <u>RV</u>
MZ13	as	ttgttctaattcggcgaccttgaggctcct	<u>RSLKVAELEQ</u>
MZ14	s	ctcaaggtcgccgaattagaacaacgggta	LKVAELEQ <u>RV</u>
MZ15	as	ttgttctaattcgaccttgaggctcctct	<u>RRSLKVELEQ</u>
MZ16	s	agcctcaaggtcgaattagaacaacgggta	SLKVELEQ <u>RV</u>
MZ19	as	ctcttcgatcgatggcgaccttgaggct	<u>SLKVAMRSEE</u>

MZ20	s	aaggctgcatgcatggaagagctatta	<u>KVAMRSEELL</u>
MZ21	as	ctctccgatcggcgacctgaggctcct	<u>RSLKVARSEE</u>
MZ22	s	ctcaaggtcggcgatcggaagagctatta	<u>LKVARSEELL</u>
MZ23	as	ctctccgatcggacctgaggctcctct	<u>RRSLKVRSEE</u>
MZ24	s	agcctcaaggtcggcgatcggaagagctatta	<u>SLKVRSEELL</u>
MZ25	as	aataaatgaatccttgaggctcctctcag	<u>LRRSLKDSFI</u>
MZ26	s	aggagctcaaggattcatttattgctca	<u>RSLKDSFIAL</u>
MZ45	s	caacaaaaattggctagatctgaagcactg	<u>QQKLARSEAL</u>
MZ46	as	cagtcttcagatctagccaattttgttg	<u>QQKLARSEAL</u>
MZ47	s	caaaaaattggctggcagatctgaagcactgctg	<u>QKLAGRSEALL</u>
MZ48	as	cagcagtcttcagatctgccaccaattttg	<u>QKLAGRSEALL</u>
MZ49	s	caaaaaattggctggatggctagatctgaagcactgctg	<u>QKLAGMARSEALL</u>
MZ50	as	cagcagtcttcagatctagccatgccaccaattttg	<u>QKLAGMARSEALL</u>
MZ51	as	cttcagatcttcagcagcagccatgcc	<u>GMAAAARSE</u>
MZ52	as	cttcagatcttcagcctgagcagcagc	<u>AAAAGMRSE</u>
MZ69	as	ctcaacatggctgtttataattaaagtag	<u>TLNYKTAML</u>
MZ70	s	ccatgttgagatctgaagcactgctg	<u>MLRSEALL</u>
MZ71	as	cttgcaacatggctgtttataat	<u>YKTAMLQ</u>
MZ72	s	gttgcaaatgctgaagcactgctg	<u>LQRSEALL</u>
MZ73	as	cagatctttgtgcaacatggctgtttata	<u>YKTAMLQQRS</u>
MZ74	s	gcaacaaagatctgaagcactgctg	<u>QQRSEALL</u>
MZ75	as	agatctttgttgcaacatggctgtt	<u>TAMLQQQRS</u>
MZ76	s	tgcaacaacaaagatctgaagcactgctg	<u>QQQRSEALL</u>
MZ77	as	gatctttttgttgcaacatggctg	<u>AMLQQQKR</u>
MZ78	s	caacaaaaagatctgaagcactgctg	<u>QQRSEALL</u>
MZ79	as	cttcagatctcaattttgttgcaacatggc	<u>AMLQQQKLRS</u>
MZ80	s	caacaaaaattgagatctgaagcactgctg	<u>QQKLRSSEALL</u>
MZ89	as	attctccagcggatgccaccaattttg	<u>QKLAGMALEN</u>
MZ90	s	ttggctggcatggcgctggagaataactaac	<u>LAGMALENTN</u>
MZ91	as	actaatccagcggatgccaccaattttg	<u>QKLAGMRWIS</u>
MZ92	s	ttggctggcatggcgtggattagtaaccg	<u>LAGMRWISEP</u>
MZ93	s	gaaaaggagAgatctgaagagctattactaatg	<u>EKERSELELLN</u>
MZ94	as	attctccagcgcataattaaagtagaacc	<u>GSTLNYALEN</u>
MZ95	s	actttaaattatgctggagaataactaac	<u>TLNYALENTN</u>
MZ96	as	attctccagcgccttctgttgcaacatgg	<u>MLOQQKALEN</u>
MZ97	s	caacaacagaaggcgtggagaataactaacg	<u>QQQKALENTN</u>
MZ98	as	tcgatcgaagcttagatctaccacgtgctccggggacc	<u>GPPAAGGRSKLRS</u>
MZ99	as	gcggggaaggacggacagcaggagccgctcctgttgctgctccgctccatgacc	<u>VMEAEHDQERLLLSVLPR</u>
MZ100	s	ctccccccacgttgccatggagatgaaagaccggagcgaacatcatcg	<u>LPRHVAMEMKAPERINII</u>
MZ101	as	cttgggcaggatgtgtgacagcggcgggtgtagctgctccgctccatgacc	<u>VMEAEHDYNNRLLHNLPK</u>
MZ102	s	atctgcccgaagcgtggcggcactctctggccccgagcgaacatcatcg	<u>ILPKDVAAHFLAPERINII</u>
MZ103	as	gcaggactgtagtacagctcgtcattgctggcggcggcggcggcggcggc	<u>AAHFLARERRNDELYYQSC</u>
MZ104	s	gacgagctgtactaccagctcgtcagctgctggcggcggcggcggcggcggc	<u>DELYYQSCCECVAVMFADIVG</u>
MZ105	s	gacgagctgtactaccagctcgtcagctgctggcggcggcggcggcggcggc	<u>DELYYQSCCECVAVMFASIVG</u>
MZ106	s	cacttctgcccagcgaacatcatcgcc	<u>HFLPERINIIA</u>
MZ107	as	tcgctcggcaggaaagtgggcggccacgtcc	<u>DVAAHFLPER</u>
MZ108	s	gagcagcagcctacaaccggcggctgctgac	<u>EHDAYNRRLH</u>

MZ109	as	ccggttgtaggcgtctgtctccgcctcatgacc	<u>VMEAEHDAYNR</u>
MZ110	s	gagcagcaccaggcctacaaccggcggtctgctgc	<u>EHDQAYNRRL</u>
MZ111	as	ccggttgtaggcctggctgtctccgcctcatgacc	<u>VMEAEHDQAYNR</u>
MZ112	s	gagcagcactcagggcctacaaccggcggtctgctgc	<u>EHDLQAYNRLLH</u>
MZ113	as	ccgccggttgtaggcctgaggtctgtctccgcctcatgacc	<u>VMEAEHDLQAYNRR</u>
MZ114	s	ctgctgtccgtcctccggccagcatcgccgag	<u>LLSVLPASIAE</u>
MZ115	as	aaggacggacagcaggagccgctctgttggtctgtctccgcctcatg	<u>MEAEHDQQRLLLSVL</u>
MZ116	s	atggagatgaaagcaccgagcgaacatcatc	<u>MEMKAPERNI</u>
MZ117	as	tgcttcatctccatggcaactggcggggcaacatgttgccagcag	<u>LLANMLPRHVAMEMKA</u>
MZ118	s	aacatcctgcccgagctggcgccactctctg	<u>NILPaDVAHF</u>
MZ119	as	ggcgccacgtcccgggcaggatgtgtgctgagcag	<u>LLHNILPaDVAA</u>
MZ120	s	cagcaaacagaggcggtcctgCACtccgtctccccgccac	<u>HDQQRLLhSVLPRH</u>
MZ121	as	gggaaggacggaGTGcaggagccgctctgttggtctgtctccgcctc	<u>EAEHDLQQRLLhSVLP</u>
MZ122	s	gtcttccccgcGACgttgcatgCACatgaagcaccgagcg	<u>VLPRdVAMhMKAPE</u>
MZ123	as	gggtgcttcatGTGcatggcaacGTCgcggggaaggacggacag	<u>LSVLPdVAMhMKAP</u>
MZ124	as	tgctcgagcgtttttgtgtgcaacat	<u>MLQQQRSEA</u>
MZ125	s	caacaacaaaaacgctccgaagcactgctg	<u>QQQRSEALL</u>
MZ126	as	ccgctcctgtgtttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKQER</u>
MZ127	s	caacaacaaaaacaagcaggcggtcctg	<u>QQQKQERLL</u>
MZ128	as	ccgccggtgtattttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKYNRR</u>
MZ129	s	caacaacaaaaataaccggcggtctgctg	<u>QQQKYNRRLL</u>
MZ130	as	tagtgcttaagcttcatcagaccctgccgtcgggg	<u>PRTAGV**A*AL</u>
MZ131	s	gatatacatatgcacaactaaaaaaatag	<u>DIHMSQLKKI</u>
MZ132	as	accgccgatcgcacccctgccgtcggggtc	<u>EPRTAGVDIGG</u>
MZ141	s	caagcgttaagatctgaagagctattactaat	<u>QALRSEELLN</u>
MZ142	s	TAGATCggatccatgcaactaaaaaaatagtg	<u>*IGSMSQLKKIV</u>
MZ143	as	cagtgttcagatcttaacgttgagcggcctctt	<u>KSGAQLRSEAL</u>
MZ144	as	cagtgttcagatctacgcaattcagggaat	<u>IAHELRRSEAL</u>
MZ145	as	cagtgttcagatctgccgtctttattctctaa	<u>LGIKSGRSEAL</u>
MZ146	as	cagtgttcagatctgtctgtcggctttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKAHDRSEAL</u>
MZ147	as	cagtgttcagatctgtctgtcctttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKEHDRSEAL</u>
MZ148	as	cagtgttcagatctgtctgtttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKHDRSEAL</u>
MZ149	as	cagtgttcagatctgtctttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKDRSEAL</u>
MZ150	s	caacaacaaaaatcgaagcactgctggcc	<u>QQQKSEALLA</u>
MZ151	as	cagtgttcagattttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKSEAL</u>
MZ152	s	caacaacaaaaagaagcactgctggccaac	<u>QQQKEALLAN</u>
MZ153	as	cagcagtgctctttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKEALL</u>
MZ154	s	caacaacaaaaagcactgctggccaacatg	<u>QQQKALLANM</u>
MZ155	as	ggccagcagtgctttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKALLA</u>
MZ156	s	gaacaacgggtattagaaggacggcggtctcaagaaaaggagcccagcgaaac	<u>QRVLERTAALLQEKEPERN</u>
MZ157	as	taataccggtgttctaattctcggtagtattctccagcgtctttaagccgctggc	<u>AERLKEALENTNRELEQRLV</u>
MZ158	as	caacatgtggccagcagttttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKLLANML</u>
MZ159	s	atgttgcaacaacaaaactggccaacatgttgccg	<u>MLQQQKLANMLP</u>
MZ160	as	ggccggcaacatgttgctttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKANMLPA</u>
MZ162	as	tcggttagtattctccagagcttaagccgctcgcgat	<u>IAERLKALENTNR</u>
MZ163	s	agcatcgccgagcggctgtctggagaataactaacgga	<u>SIAERLKALENTNR</u>
MZ166	as	actaatccagcgtttgtgtgcaacat	<u>MLQQQKRWIS</u>

MZ167	s	caacaacaaaaacgctggattagtgaaaccg	QQQKRWISEP
MZ172	s	agcatcgccgagcggcttaaacccgagcgaacatcatcgcc	SIAERLKPERNIIA
MZ173	as	ggcgatgatgttctgctcggaagccgctcggcgatgctggc	ASIAERLPERNIIA
MZ174	as	ttcatgggcaatcatgcctgcagcagcagccatgccagccaattcttaagccgctcggc	AERLKELAGMAAAAGMIAHE
MZ175	s	gcccatgaattgcgttcaccattgtaggaataaagagcggccccgagcgaacatcatc	AHELRSPLLGKSGPERNII
MZ176	as	tcgctcgggttctttttttgtgttgcaacat	MLQQQKKEPER
MZ177	s	ttgcaacaacaaaaagaacccgagcgaacatc	LQQQKPERNI
MZ178	as	gatgttctgctcgggtttttgtgttgcaacat	MLQQQKPERNI
MZ179	s	ttgcaacaacaaaaagagcgaacatcatcgcc	LQQQKERNIIA
MZ180	as	atgttgcaacaacaaaaCTGtctgaagcactg	MLQQQKLEALL
MZ181	s	caacaacaaaaCAGtctgaagcactgctggcc	QQQKQSEALLA
MZ182	as	atgttgcaacaacaaaaTATtctgaagcactg	MLQQQKYSEALL
MZ183	s	caacaacaaaaGATtctgaagcactgctggcc	QQQKDSEALLA

## 2.7 Medien und allgemeine Wachstumsbedingungen

Alle Medien und Puffer wurden mit MilliQ-Wasser angesetzt. War ein bestimmter pH-Wert erforderlich, erfolgte dessen Einstellung bei der zu verwendenden Temperatur.

### 2.7.1 Medien

Für flüssig-LB Medium wurde 20 g LB-Nährmedium auf 1 Liter Wasser eingewogen und gelöst. Das Medium wurde in benötigter Menge in entsprechende Gefäße verteilt und für 20 min bei 121°C autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur (RT).

Für LB-Agarplatten wurde 35 g LB-Agar auf 1 Liter Wasser eingewogen, gelöst und für 20 min bei 121°C autoklaviert. Bei Bedarf wurden Antibiotika dem auskühlenden LB-Agar beigemischt und in Petrischalen zum Aushärten gegossen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Alle Medien wurden von Ursula Kurz hergestellt.

**LB-Flüssigmedium (RT):** 2% LB-Nährmedium

**LB-Agarplatten (4°C):** 3,5% LB-Agar; wahlweise mit 0,1 mg/ml Ampicillin und/oder 0,05 mg/ml Kanamycin

### 2.7.2 Wachstumsbedingungen

Alle Flüssigkulturen wurden auf Rotationsschüttlern bei 220rpm inkubiert. Die Menge an LB-Medium betrug bei Reagenzgläsern 5 ml und bei Erlenmeyerkolben maximal 20% des Gefäßvolumens. Es wurden bei Bedarf frisch Antibiotika zugegeben: 0,1 mg/ml Ampicillin bzw. 0,05 mg/ml Kanamycin. Das Zellwachstum wurde durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 600 nm Wellenlänge im Photometer verfolgt.

**Stocklösungen (-20°C):** Kanamycin: 50 mg/ml; Ampicillin: 100 mg/ml; IPTG: 1 M

### 2.7.3 Kompetente Zellen

#### CaCl<sub>2</sub>-Methode:

Es wurden 5 ml einer Übernachtskultur (37°C) zu 100 ml vorgewärmten LB-Medium gegeben und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden auf 50 ml Falcontubes verteilt und auf Eiswasser abgekühlt, anschließend für 10 min bei 4.300 x g bei 4°C abzentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Pellets wurden in jeweils 1 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert, gepoolt, und das Volumen mit eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> auf 50 ml aufgefüllt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde erneut für 10 min bei 4.300 x g bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> mit 20% Glycerin resuspendiert (eiskalt) und für 2 bis 6 Stunden auf Eis stehen gelassen. Die Zellen wurden zu 100 µl aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Kompetenz wurde mit einer Transformation von 1 µg Plasmid DNA auf 100 µl der frisch hergestellten kompetenten *E. coli* Zellen überprüft.

#### TSS-Methode:

Es wurden 2 ml aus einer Übernachtskultur (37°C) in 200 ml (1:100) vorgewärmtes LB-Medium überführt und erneut bei 37°C inkubiert bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5. Anschließend wurden die Zellen auf sterile 50 ml Falcontubes aufgeteilt, im Eiswasser abgekühlt und für 15 min bei 4.300 x g bei 4°C abzentrifugiert. Die Pellets wurden in insgesamt 5 ml eiskaltem TSS resuspendiert und 2 - 3 Stunden auf Eis stehen gelassen. Die Zellen wurden zu 100 µl aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Kompetenz wurde mit einer Transformation von 1 µg Plasmid DNA auf 100 µl der frisch hergestellten kompetenten *E. coli* Zellen überprüft.

**TSS (4°C, steril filtriert):** 3 g PEG8000, 1,5 ml DMSO, 2,22 g MgSO<sub>4</sub>,  
ad 30 ml mit LB-Medium

### 2.7.4 Dauerkulturen

Für die Lagerung der *E. coli* Stämme, die das Plasmid mit dem gewünschten Gen trugen, wurden 200 µl einer frisch angezogenen Flüssigkultur mit 800 µl sterilem Glycerin (85%) vermengt, beschriftet und bei -80°C gelagert.

## 2.8 Molekularbiologische Methoden

### 2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Es wurden zweimal 1,5 ml Zellsuspension einer Übernachtskultur *E. coli* in LB-Amp bzw. LB-Amp/Kan bei 13.000 rpm abzentrifugiert (2.7.2). Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem Kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System gemäß den Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde in 70 - 100 µl Elutionspuffer eluiert und auf Eis bzw. bei -20°C gelagert.

### 2.8.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration doppelsträngig vorliegender DNA wurde in Quarzküvetten im Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm ( $A_{260}$ ) bestimmt, bei gleichzeitiger Messung von Proteinkontamination bei  $A_{280}$ . Als Leerwert diente  $H_2O$ . Es wurden 2 µl dsDNA-Lösung mit 78 µl  $H_2O$  vermengt. Diese Verdünnung wurde im Bedienelement des Photometers eingegeben und in die Berechnung der Konzentration mit eingerechnet:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = [A_{260} \cdot F \cdot U] \mu\text{g} : 1000 \mu\text{l}$$

U = Umrechnungsfaktor, hier 50 (50 µg/ml dsDNA entspricht einer  $OD_{260}$  von 1)

F = Verdünnungsfaktor, hier 39 (2 zu 78 Verdünnung der Probe)

Es konnte von einer tragbaren Verunreinigung durch Proteine ausgegangen werden, wenn das Verhältnis von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  bei Werten über 1,6 lag.

### 2.8.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR werden DNA Sequenzen amplifiziert. Spezifische Primer definieren den zu amplifizierenden Bereich [143]. Ein Ansatz von 50 µl wurde nach folgendem Schema auf Eis angesetzt:

Tab. 2.3 Auflistung der Bestandteile eines typischen PCR-Ansatzes

Bestandteil	Menge [ $\mu\text{l}$ ]	Absolute Menge in 50 $\mu\text{l}$ Ansatz
HiFi 5x Puffer mit 25 mM $\text{MgCl}_2$	10 $\mu\text{l}$	1x
KAPA-DNA-Polymerase (1 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$	0,5 U
dNTPs (jeweils 10 mM)	1 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{M}$
Sense Primer (s) (20 $\mu\text{M}$ )	1,25 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$
Antisense Primer (as) (20 $\mu\text{M}$ )	1,25 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$
Template (Miniprep 1:50)	1 $\mu\text{l}$	2 - 10 ng
$\text{H}_2\text{O}$	ad 50 $\mu\text{l}$	

Sollten mehrere PCR-Reaktionen angesetzt werden, wurden diejenigen Bestandteile, die für alle Ansätze gleich waren (meistens Puffer, Polymerase, dNTPs), in einem Mastermix zusammenpipettiert und danach auf die Ansätze mit verschiedenen Bestandteilen (meistens beide Primer und Template) verteilt. Alle Ansätze wurden gemischt und kurz abzentrifugiert. Die Durchführung der PCR erfolgte im Thermocycler T3000. Das Standardprogramm (siehe Tab. 2.4) bestand aus zweiminütigem Aufheizen der Probe bei 95°C, um sämtliche doppelsträngig vorliegenden DNA-Moleküle zu trennen. Die Amplifikation erfolgte anschließend in drei Schritten, die insgesamt 30 mal hintereinander durchgeführt wurden: Zuerst wurde die Temperatur auf 98°C erhöht, um die doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen zu trennen (Denaturierung). Damit sich die Primer an ihre komplementäre Sequenz anlagern können (Annealing), wurde die Temperatur anschließend auf die Hybridisierungstemperatur gesenkt. Sie ist abhängig von der Sequenz der Primer und wird für die ersten 18 bindenden Basen mit der Formel  $T_M = [2 \cdot n(A, T) + 4 \cdot n(G, C)]^\circ\text{C}$  näherungsweise berechnet. Je höher die Temperatur, desto spezifischer muss die Sequenz übereinstimmen, je niedriger die Temperatur, desto unspezifischer kann ein Primer binden. Dies war dann wichtig, wenn Mutationen eingefügt werden sollten oder beide Primer eines Ansatzes stark unterschiedliche Hybridisierungstemperaturen besaßen. Im dritten Schritt wurde die Temperatur auf 68°C angehoben, bei der die Polymerase, ausgehend von den Primern, die komplementären Basen passend zur Matrize von 5' in 3' Richtung anfügte (Elongation).

Tab. 2.4 beispielhaftes PCR-Programm mit KAPA-HiFi-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
Vorlauf	95°C	120 sec
Denaturierung	98°C	20 sec
Hybridisierung	$T_M$	15 sec
Elongation	68°C	30 sec pro 1000 Basen
Auffüllen	68°C	300 sec
Abkühlen	4°C	Ohne Begrenzung

29x

**QuikChange PCR (One-Step site directed mutagenesis PCR)**

Für Mutationen, Deletionen oder Insertionen von ein bis vier Aminosäuren wurde die sogenannte QuikChange PCR (Kit verfügbar bei Stratagene) bzw. One-Step site directed mutagenesis PCR durchgeführt [144]. Hierbei ist es essentiell, eine DNA Polymerase wie die Kapa-DNA-Polymerase mit 3'-5' Exonuklease Funktion, auch Proof-Reading genannt, zu verwenden. Die Primer wurden derart entworfen, dass die bindenden, ersten 18 Basen in 3' Richtung komplementär zum Template waren, gefolgt von der (nicht komplementären) Mutationssequenz. In 5' Richtung wurden nur 12 Basen komplementär zum Template angehängt. Die Primer hatten somit eine Länge von 30 bis 45 Basen, wobei sich die einzufügende Mutation im hinteren Drittel aus 3' Richtung befand.

**QuikChange PCR:**



**Abfolge der einzelnen Schritte:**

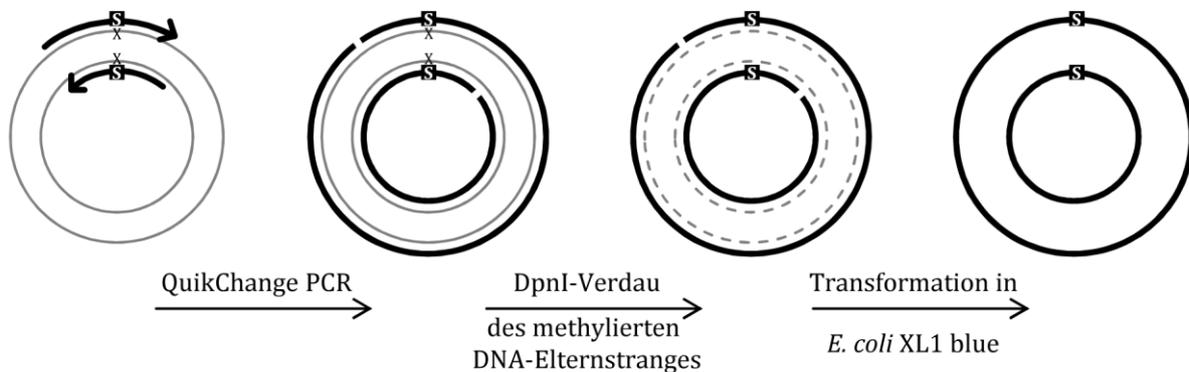


Abb. 2.3 Schematische Darstellung der QuikChange PCR (oben) und der Abfolge der einzelnen Schritte (unten). In Grau das doppelsträngige DNA Template (Elternstrang) mit dem zu mutierenden Bereich X. In Schwarz die entsprechenden sense und antisense Primer mit der Anstelle von X zu setzenden Sequenz S sowie die neusynthetisierte DNA. Die 3' terminale Region von 18 bp der Primer stellt die komplementär bindende Region zum Template dar.

Definitionsgemäß handelt es sich bei der QuikChange PCR nicht um eine echte PCR, da keine exponentielle Amplifikation erfolgt. Zu beachten war die aufgrund der Vollsynthese des gesamten Plasmids erforderliche längere Elongationszeit, gegebenenfalls war die Menge an dNTPs etwas zu erhöhen. Es wurden außerdem nur 12-18 Zyklen durchgeführt. Im Anschluss an die PCR wurde dem PCR-Ansatz 1 µl des Restriktionsenzym DpnI (20 U) beigemischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Weil nur die parentalen, unmutierten DNA-Stränge methyliert vorliegen, werden diese selektiv durch DpnI verdaut.

Es wurden 2-5 µl der verdauten PCR-Ansätze zu 50-100 µl kompetenten *E. coli* XL1 blue Zellen gegeben und die Transformation wie unter 2.8.7 beschrieben durchgeführt. Die Verwendung von XL1 blue war unumgänglich, da dieser Stamm den aus der QuikChange PCR resultierenden dsDNA-Strangbruch zu reparieren vermag.

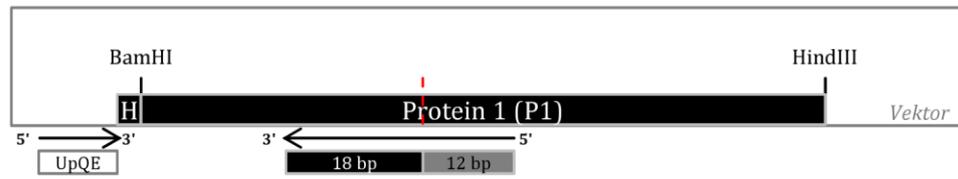
### **Fusions-PCR**

Die Fusions-PCR eignete sich besonders gut, um zwei DNA Sequenzen zu verknüpfen, die in keinem vorhandenen Konstrukt hintereinander vorkommen [145]. Dafür wurden zwei PCR-Reaktionen hintereinander durchgeführt: In der ersten PCR wurde jeweils eine Teilsequenz amplifiziert, aufgrund individueller Primer mit einem ca. 12 Basen langen Überhang der anderen Teilsequenz an der späteren Verknüpfungsseite. In der darauffolgenden, eigentlichen Fusions-PCR dienten die beiden verschiedenen PCR Fragmente aus der vorangegangenen PCR als Template. Eingesetzt wurde mit ca. 1800 ng in bis zu 12 µl eine relativ große Menge beider Templates. Durch den komplementären Überhang aus insgesamt 24 Basen konnten die beiden Fragmente sich aneinander anlagern und der Polymerase als 5'-3' Anfangspunkt für die Synthese dienen. Die ersten 5 Zyklen wurden mit einer 5-10°C niedrigeren Hybridisierungstemperatur als die restlichen 25 Zyklen durchgeführt. Weiterhin erwies es sich als vorteilhaft, wenn die die kombinierte Sequenz flankierenden Primer (meistens die Standard Vektor Primer "U-pQE" und "R-pQE") erst nach der Hälfte aller durchlaufenen Zyklen zugegeben wurden (zwischen Elongation und Denaturierung). Nach jeder PCR wurden das komplette Reaktionsvolumen mit 10 µl BX-Puffer versetzt und auf ein Agarosegel (2.8.4) aufgetragen.

**PCR 1a**

Template:

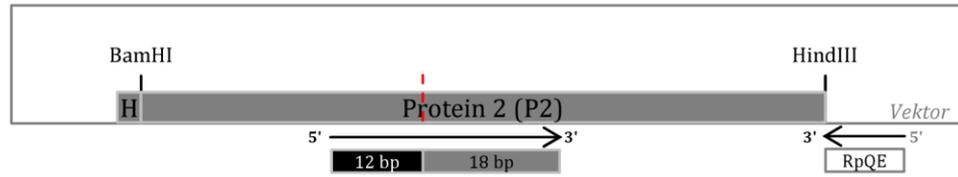
Primerpaar:



**PCR 1b**

Template:

Primerpaar:



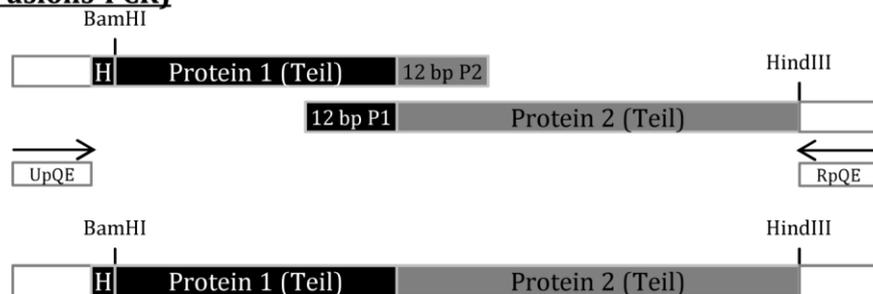
**PCR 2 (eigentliche Fusions-PCR)**

dsDNA Produkt aus 1a:

dsDNA Produkt aus 1b:

Primerpaar:

dsDNA Produkt der PCR2:



**Verdau BamHI/HindIII**

- des dsDNA Produkts aus PCR2
- des gewünschten Vektors

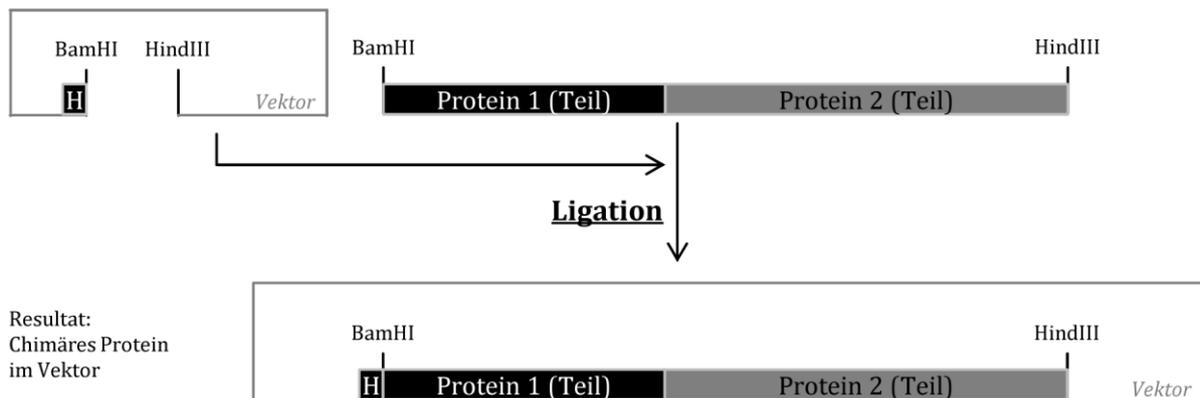


Abb. 2.4 Schema einer Fusions-PCR. Die zwei zu verbindenden Teilstücke werden zuerst in separaten Reaktionen amplifiziert (PCR 1a und 1b), hierbei wird ein Überhang von 12 bp mit identischer Sequenz zum anderen Teilstück angefügt (12 bp P1 bzw. 12 bp P2). Beide PCR Produkte dienen in der eigentlichen Fusions-PCR (PCR 2) als Template, die vorher äußersten Primer (hier: UpQE und RpQE) sorgen für die Amplifikation der kombinierten DNA. Das fusionierte Produkt enthält die N- und C-terminalen Restriktionsschnittstellen der entsprechenden Originalfragmente (hier: BamHI und HindIII), über welche die fusionierte dsDNA in den gewünschten Vektor eingefügt werden kann.

### 2.8.4 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente aufgetrennt, kürzere Fragmente laufen im Gel weiter als längere. Verwendet wurden 1 bis 1,5%-ige Agarosegele in TAE-Laufpuffer. Die Proben wurden mit ca. 20% des Volumens mit BX-Puffer vermengt und aufgetragen, als Referenz wurden 7-10 µl λ-Marker (EcoRI-HindIII verdaute λ-DNA) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 95 V und 150 mA für 25 bis 35 Minuten. Anschließend erfolgte die Färbung im Ethidiumbromidbad (10 mg/l), die Gele wurden unter UV-Licht evaluiert und fotografiert.

Für die Isolation von DNA-Fragmenten wurden diese aus dem Agarosegel unter UV-Licht zügig und präzise mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte anschließend mit dem HiYield® Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit gemäß den Angaben des Herstellers Süd-Laborbedarf. Das Elutionsvolumen von 30 bis 50 µl wurde an die Menge zu erwartender DNA angepasst.

**1x TAE-Puffer (RT):** 40 mM Tris-Acetat pH 8; 1 mM EDTA

**BX-Puffer (-20°C):** 1x TAE, 5% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau,  
0,05% Xylencyanol

### 2.8.5 Restriktionsverdau

Die eingesetzten Restriktionsenzyme sind Endonukleasen und können eine für sie spezifische Basensequenz erkennen und hydrolysieren. Die entstehenden DNA-Fragmente besitzen definierte Enden, die entweder überhängend oder glatt (englisch: sticky bzw. blunt) sind und anschließend mit anderen Fragmenten mit komplementären Enden neuverknüpft werden können. Beim Restriktionsverdau für die Klonierung betrug das Reaktionsvolumen 20 µl. Es wurden 1 bis 1,5 µg DNA mit 16 Units der jeweils benötigten Restriktionsenzyme im jeweils optimalen Puffer für 2-3 Stunden bei 37°C verdaut. Um eine Religation des Vektors zu vermeiden, wurde für die letzten 30 Minuten des Verdauens des Vektors noch 1 µl alkalische Phosphatase zum Dephosphorylieren des 5' Endes zum Verdauansatz beigemischt. Anschließend erfolgte die Auftrennung per Agarosegelelektrophorese.

Für den Kontrollverdau von Plasmid-DNA wurden ca. 300 ng DNA mit 4 Units BamHI-HF und 4 Units HindIII-HF Restriktionsenzymen von NEB im Puffer CutSmart in einem 10 µl Ansatz für 10-30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die resultierenden Fragmentgrößen wurden anschließend im Agarosegel überprüft.

### 2.8.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Verknüpfung zweier dsDNA-Fragmente mit komplementären Enden wurde das Verhältnis Vektor zu Insert von 1:3 bis 1:1 berücksichtigt, pro Ansatz kamen ca. 60 ng Vektor zum Einsatz. Die Ligation erfolgte in einem 20 µl Ansatz, welcher neben den beiden DNA-Fragmenten noch den T4-DNA-Ligase Puffer von NEB sowie 400 Units der T4-DNA-Ligase von NEB enthielt. Der Ansatz wurde für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C stehen gelassen.

### 2.8.7 Transformation von *Escherichia coli*

20 µl des Ligationsansatzes wurden mit 10 µl CM-Puffer sowie 70 µl H<sub>2</sub>O vermischt und anschließend zu 100 µl kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis gegeben. Je nach Bedarf handelte es sich hierbei um die Stämme XL1 blue, BL21 (DE3)[pREP4] oder BL21 (DE3). Nach Inkubation auf Eis für 20-30 Minuten erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 42 Sekunden und erneute Inkubation auf Eis für 10-20 Minuten. Danach wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und das Reaktionsgefäß für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die angewachsenen Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien entsprechen verschiedenen Klonen, die auf ihre Sequenzrichtigkeit geprüft wurden. Dazu wurden einzelne Klone gepickt und in 5 ml flüssigem LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C angezogen und ein Miniprep (2.8.1) angefertigt.

**CM-Puffer 10x (4°C):** 100 mM CaCl<sub>2</sub>; 100 mM MgCl<sub>2</sub>

### 2.8.8 Plasmid-DNA Sequenzierung

In ein Reaktionsgefäß wurden ca. 500 ng DNA und 5 µl 5 µM Sequenzierprimer gegeben und zur Firma GATC Biotech AG geschickt. Die erhaltene Basensequenz wurde mit dem Programm GENTle mit der Zielsequenz verglichen.

## 2.9 Proteinbiochemische Methoden

### 2.9.1 Expression

Zunächst wurden 5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin) und mit Zellen aus der gewünschten Dauerkultur versetzt. Die Inkubation dieser Vorkultur erfolgte über Nacht bei 30°C. Am nächsten Morgen wurden 200 ml vorgewärmtes LB-Medium in einem 1 Liter Kolben mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit 5 ml der Vorkultur angeimpft. Die OD<sub>600</sub> betrug zumeist 0,08 bis 0,1. Die Kultur wurde bei 37°C bis OD<sub>600</sub> 0,3 - 0,4 inkubiert. Dann wurde für 20-30 Minuten bei 22°C abgekühlt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 wurde dann durch IPTG Zugabe die Expression des Zielproteins induziert. Bei den pQE-Vektoren 30 und 80L wurde mit 100 µM IPTG, beim pETDuet-Vektor mit 500 µM IPTG induziert (jeweils Endkonzentrationen). Die Kultur wurde für 3-4 Stunden bei 22°C geschüttelt.

### 2.9.2 Zellernte

Drei bis vier Stunden nach Induktion wurden die Zellen in einen Zentrifugationsbecher überführt, die OD<sub>600</sub> zumeist in einer 1:10 Verdünnung bestimmt und eine 1,5 ml Probe entnommen. Die Zentrifugation erfolgte bei 3.200 x g für 10 min bei 4°. Das Pellet wurde auf Eis in 50 ml Falcontubes überführt, in 40 ml kaltem Waschpuffer durch Vortexen suspendiert. Die gewaschenen Zellen wurden danach für 15 min bei 4.300 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde entweder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert oder direkt weiterverwendet.

Die entnommene 1,5 ml Probe wurde für 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und das mit 150 µl Lysepuffer sowie 50 µl SDS Probenpuffer versetzte Pellet solange gevortext, bis alles suspendiert war. Diese Probe wurde nur zur Kontrolle auf exprimiertes Protein angefertigt, bei -20°C gelagert, und bei Bedarf auf ein SDS-PAGE Gel (2.9.7) aufgetragen.

**Waschpuffer (4°C):** 50 mM Tris/HCl pH 8; 1 mM EDTA

**Lysepuffer (4°C):** 50 mM Tris/HCl pH 8; 2 mM 3-Thioglycerol; 50 mM NaCl

**Probenpuffer (4x, -20°C):** 8 M Harnstoff; 40 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1 M EDTA;  
5% SDS; 0,05% Bromphenolblau

### 2.9.3 Zellaufschluss durch French Press

Das Pellet der Expression wurde auf Eis in 25 ml kaltem Zellsuspensionspuffer durch Vortexen suspendiert und die Zellen anschließend mit einer kalten French Press Apparatur (bei 4°C gelagert) mit einem Druck von ca. 1.100 psi in 1-2 Durchgängen aufgeschlossen.

**Zellsuspensionspuffer (4°C):** 50 mM Tris/HCl pH 8; 2 mM bzw. 0,02% Thioglycerol

### 2.9.4 Präparation von Membranproteinen

Nach dem Aufschluss in der French Press wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 4.300 x g für 30 min bei 4°C entfernt. Der Überstand wurde in ein vorgekühltes Ultrazentrifugengefäß überführt und die Gewichte aller Gefäße samt Deckel exakt austariert. Der nächste Zentrifugationsschritt erfolgte im Vakuum bei 100.000 x g für 60 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml kaltem Membranpuffer gelöst und in einem Dounce-Homogenisator suspendiert. Es wurde ein Bradford-Test durchgeführt (2.9.6) und ein Aliquot von 5 µg Protein in 10 µl Volumen für die SDS-PAGE entnommen (2.9.7). Anschließend wurde das Homogenisat weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

**Membranpuffer (4°C):** 40mM Tris/HCl pH 8,0; 1,6 mM bzw. 0,016% Thioglycerin;  
20% Glycerin

### 2.9.5 Präparation löslicher, cytosolischer Proteine durch Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen (IMAC)

Das mit einem His-Tag versehene Zielprotein kann durch IMAC (Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen) von anderen Proteinen im Zelllysate getrennt werden [146]. Zum Einsatz kam Ni<sup>2+</sup>-NTA. Das Nickelion bildet über vier seiner sechs Koordinationsstellen einen stabilen Chelatkomplex mit Nitriloessigsäure (NTA) aus, NTA ist kovalent mit dem Agarosesäulenmaterial verbunden. Die beiden freien Koordinationsstellen des Nickels interagieren hochaffin mit zwei benachbarten Histidinen des aus sechs Histidinen bestehenden Tags und bilden einen Chelatkomplex aus. Proteine ohne His-Tag binden nicht und werden durch Waschen des Säulenmaterials entfernt. Das Zielprotein wird anschließend mit einem Imidazolgradienten vom Säulenmaterial eluiert. Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose wird als 50% Suspension mit

Ethanol gelagert und muss vor Gebrauch aufgeschüttelt und als Suspension abgenommen werden.

Nach dem Aufschluss in der French Press wurden die Zelltrümmer bei 48.000 x g für 30 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml Falcon-tube überführt und mit 200 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA Suspension versetzt und für 3-4 Stunden auf Eis unter leichter Schüttelbewegung inkubiert. Das Säulenmaterial wurde abzentrifugiert (1 min, 3.200 x g, 4°C), in 0,5 ml Waschpuffer A resuspendiert und auf eine Minispin-Säule mit Filter (aus dem Wizard® Plasmid *Purification Kit*) überführt. Eine Spritze (5 ml) wurde auf die Säule geschraubt und das Säulenmaterial durch tropfenweises Durchdrücken von jeweils 2 ml Waschpuffer B und C gewaschen. Die Proteine wurden eluiert mit 0,5 ml Elutionspuffer. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde das Eluat erneut auf die Säule aufgebracht und mit weiteren 0,5 ml Elutionspuffer eluiert. Da die mykobakterielle AC bei Imidazolkonzentrationen über 1 mM katalytisch gehemmt wird, wurde das Eluat über Nacht bei 4°C in Dialysepuffer dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde am nächsten Tag durch Bradford bestimmt (2.9.6) und ein AC-Aktivitätstest durchgeführt (2.10). Die Proteine wurden in Dialysepuffer bei 4°C gelagert.

**Waschpuffer A:** 50 mM Tris/HCl pH 8; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 400 mM NaCl; 5 mM Imidazol

**Waschpuffer B:** 50 mM Tris/HCl pH 8; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 400 mM NaCl; 15 mM Imidazol

**Waschpuffer C:** 50 mM Tris/HCl pH 8; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM NaCl; 15 mM Imidazol

**Elutionspuffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM NaCl; 150 mM Imidazol

**Dialysepuffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 20% Glycerin

Alle Puffer wurden bei 4°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurde der Dialysepuffer mit 2 mM, alle anderen Puffer mit 10 mM β-Mercaptoethanol versetzt.

### 2.9.6 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradfordmethode bestimmt [147]. Sie beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 in saurer Lösung an die Seitenketten basischer Aminosäuren. Dabei wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschoben. Eine Messung im Photometer bei OD<sub>595</sub> gibt Aufschluss über die Proteinkonzentration.

In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden folgende Ansätze pipettiert. Für Proteinlösungen wurden Doppelwerte genommen:

100 mg/l BSA-Stocklösung [ $\mu$ l]	0	40	80	100	120	Proteinlösung [ $\mu$ l]	10
H <sub>2</sub> O [ $\mu$ l]	800	760	720	700	680	H <sub>2</sub> O [ $\mu$ l]	790

Zu den 800  $\mu$ l wurden jeweils 200  $\mu$ l Bioradlösung gegeben, für homogene Durchmischung gesorgt und für 5-10 Minuten inkubiert. In einer frischen Küvette wurden die Werte bei OD<sub>595</sub> notiert, die Probe mit 0  $\mu$ l BSA/ 800  $\mu$ l Wasser diente als Referenzwert. Mithilfe der OD<sub>595</sub> Werte für die BSA-Lösungen mit bekannter Proteinkonzentration wurde eine Kalibriergerade erstellt, sodass auf die (unbekannte) Konzentration für die Proteinlösung zurückgerechnet werden konnte. Hierbei war zu beachten, dass die Absorptionswerte der Proteinlösung im linearen Bereich der Kalibriergeraden lagen.

### 2.9.7 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine einer Proteinlösung nach ihrer Größe aufgetrennt [148]. Hierfür wurden Aliquots von Proteinlösungen mit 4x Ladepuffer versetzt. Das im Ladepuffer befindliche  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert vorhandene Schwefelbrücken, negativ geladenes SDS lagert sich an die Peptidbindungen an. Die monomeren Peptidketten erhalten so eine negative Ladung proportional zu ihrer Länge. Ihre Auftrennung erfolgt im Polyacrylamidgel, welches durch Polymerisieren von Polyacrylamid (PAA) durch die Radikalstarter APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methylethan-1,2-diamin) entsteht. Die Porengröße wird durch die Konzentration an Acrylamid bestimmt. Im relativ grobmaschigen Sammelgel, in das die Proteinlösungen aufgetragen werden, werden die Proteine konzentriert, sodass sie im anschließenden, basischen Trenngel räumlich nach Größe aufgetrennt werden können. Es wurden vor allem 15 bis 12,5%ige Gele verwendet, da die untersuchten Proteine im Größenbereich von 50 bis 80 kDa lagen.

Tab. 2.5 Zusammensetzung für 2 SDS-PAGE Gele

Trenngel (pH 8,8)				Sammelgel (pH 6,8)	
Komponente	10%	12,5%	15%	Komponente	
H <sub>2</sub> O	5 ml	4 ml	3 ml	H <sub>2</sub> O	2,4 ml
PAA	4 ml	5 ml	6 ml	PAA	0,6 ml
Trenngelpuffer (4x)	3 ml	3 ml	3 ml	Sammelgelpuffer (4x)	1,0 ml
APS 10%	80 $\mu$ l			APS 10%	40 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l			TEMED	10 $\mu$ l

H<sub>2</sub>O, PAA und der Trenngelpuffer wurden zusammenpipettiert, gemischt und das APS und TEMED als Radikalstarter zuletzt zugegeben. Die Mischung wurde zwischen zwei mit Spacern abgedichtete, saubere Glasplatten gefüllt und mit Isopropanol überschichtet auspolymerisieren gelassen. Nach Abkippen des Isopropanols wurde ein Kamm eingesetzt und mit ebenfalls frisch angesetztem Sammelgel überschichtet. Das vollständig auspolymerisierte Gel wurde in feuchten Tüchern über Nacht bei 4°C gelagert.

Je zwei Gele wurden gegenüber in die Halterung gespannt und die Hoefer *Mighty Small II* E250 Kammer mit 200 ml SDS-Laufpuffer (1x) gefüllt. Nach gezogenem Kamm wurden die Taschen mit 10 µl Proteinlösung bzw. 3 µl Protein-Marker beladen. Erfolgte anschließend ein Western Blot, wurden 1 µg Protein in 10 µl Lösung sowie prestained Marker pEQ IV verwendet; bei anschließender Coomassie Färbung wurden 5 µg Protein in 10 µl Lösung sowie unstained Marker pEQ I verwendet. Je Gel wurden 20 mA bei maximal 200 V angelegt, für etwa 60 min oder kurz bevor die sichtbare blaue Bande aus dem Gel austrat.

Damit die Proteinlösungen für die beiden anschließenden Verfahren 1 bzw. 5 µg pro 10 µl Protein enthielten, wurden sie entsprechend mit Wasser verdünnt und bestanden zu 25% aus 4x Probenpuffer. Lösungen mit Membranproteinen wurden gevortext und für 15 Minuten bei 37°C erwärmt; Lösungen mit löslichen Proteinen wurden für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

<b>Trenngelpuffer (4x,RT):</b>	1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4% SDS
<b>Sammelgelpuffer (4x, RT):</b>	0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% SDS
<b>SDS-Laufpuffer (10x, RT):</b>	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 0,1% SDS
<b>Probenpuffer (4x, -20°C):</b>	8 M Harnstoff; 40 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1 M EDTA; 5% SDS; 0,05% Bromphenolblau

### 2.9.8 Western Blot

Die bei der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (1 µg Protein in 10 µl Auftragsvolumen) wurden durch Semi-Dry-Blot-Verfahren nach Towbin [149] durch eine angelegte Spannung auf eine aktivierte PVDF-Nitrozellulosemembran mit 0,2 µm Porengröße übertragen.

Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung für 10 min in Methanol geschüttelt, kurz mit VE-Wasser gewaschen und 10 min in 1x Towbin-Blot Puffer geschüttelt. Das SDS-PAGE

Gel wurde für 5 min, das Whatmanpapier kurz vor Gebrauch in 1 x Towbin-Blot-Puffer getränkt. Der luftblasenfreie Schichtaufbau betrug von der Anode zur Kathode: 3x Whatmanpapier 3 mm (9 cm x 6 cm) - Nitrozellulosemembran (8,5 cm x 5 cm) - SDS-PAGE Gel - 3x Whatmanpapier 3mm (9 cm x 6 cm). An die Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell Apparatur wurden dann für drei Stunden 20 V und 200 mA für ein Blot bzw. 400 mA für zwei Blots angelegt.

**Towbin-Blot-Stock (10x, RT):** 250 mM Tris; 1,92 M Glycin

**Towbin-Blot-Puffer (1x, RT):** 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Methanol

### 2.9.9 Ponceau S Färbung

Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, der reversibel an die positiv geladenen Amino-gruppen von Proteinen bindet. Zur Überprüfung, ob Proteine auf der Nitrozellulosemembran gebunden waren, wurde die frisch geblottete Membran bei Raumtemperatur in Ponceau S Lösung stehen gelassen, bis Banden sichtbar waren. Anschließend wurde die Membran mit VE-Wasser klargespült.

**Ponceau S Lösung (RT):** 0,4 g Ponceau S; 198 ml H<sub>2</sub>O; 2 ml Eisessig

### 2.9.10 Immunologische Detektion

Alle in dieser Arbeit untersuchten Proteine enthielten einen N-terminalen His-Epitop-Tag oder einen C-terminalen S-Epitop-Tag. Nach dem Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran durch Western Blotting sollten die Proteine mit spezifisch bindenden Antikörpern gegen diese Epitop-Tags nachgewiesen werden. Dazu wurde die Membran zunächst zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen für 30 min oder über Nacht in Milchpulverlösung geschüttelt. Danach wurde dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran seitenrichtig in ein 50 ml Falcontube überführt und zusammen mit dem entsprechenden primären Antikörper in 5 ml 1. AK-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur über Kopf rotieren gelassen. Danach wurde dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran im Dunkeln für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper ECL Plex Cy3 in 5 ml TBS-T, der spezifisch an den Fc-Teil des primären Antikörper bindet, über Kopf rotieren gelassen. Ebenfalls im Dunkeln wurde danach dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde zwischen

fusselfreien Tüchern getrocknet. Die Fluoreszenz wurde im Ettan Dige Imager gescannt und digital ausgegeben. Mit dem Programm Image Quant TL wurden die Bandenintensitäten quantifiziert sowie die Laufhöhe ermittelt.

**Milchpulverlösung:** 5% fettfreies Milchpulver in filtriertem TBS-T

**TBS-T (RT):** 0,1% Tween 20 in 1x TBS-Puffer; filtrieren

**TBS-Puffer, 1x (RT):** 20 mM Tris/HCl pH 7,6; 140 mM NaCl

**1. AK Lösung:** 5% BSA; 0,05% NaN<sub>3</sub>; in filtriertem TBS-T

**Primärer Antikörper:** 1:2000 RGS-His<sub>4</sub> (monoklonal aus der Maus);  
1:5000 S-Tag (monoklonal aus der Maus)

**Sekundärer Antikörper:** 1:2500 ECL Plex Cy3 (Ziege-anti-Maus)

### 2.9.11 Coomassiefärbung

Bei der Coomassiefärbung werden alle Proteine eines SDS-PAGE Gels angefärbt, indem das Coomassie-Brilliant-Blau an die basischen Seitenketten der Aminosäuren bindet. Die Färbung wurde als Kontrolle der gleichmäßigen Expression bzw. zum Nachweis aufgereinigter Proteine durchgeführt. Dazu wurde das Gel nach der SDS-PAGE (2.9.7) für eine Stunde in der Färbelösung geschüttelt. Anschließend wurde das Gel in mehrfach gewechselter Entfärbelösung geschüttelt, bis das Gel entfärbt war, aber die Proteinbanden deutlich zu sehen waren. Das Gel wurde abfotografiert und an der Luft getrocknet.

**Färbelösung (RT):** 0,2% Coomassie-Brilliant-Blau R-250; 10% Essigsäure;  
40% Methanol

**Entfärbelösung (RT):** 10% Essigsäure; 30% Ethanol

## 2.10 Adenylatcyclase-Aktivitätstest

Die Bestimmung der Aktivität der Adenylatcyclasen erfolgte mit radioaktiv markiertem Wasserstoff (<sup>3</sup>H, Tritium) und Phosphor (<sup>32</sup>P). Zunächst wurde eine Proteinpräparation bekannter Proteinkonzentration mit entsprechenden Zusätzen und Pufferbedingungen für einen definierten Zeitraum mit dem Substrat [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]-ATP inkubiert. Die

anschließende Trennung des Produktes  $^{32}\text{P}$ -cAMP von nicht umgesetztem Substrat erfolgte chromatographisch über zwei hintereinander geschaltete Säulen, bei der die Ausbeute über die Tritiumwerte bestimmt wurde. Der Aktivitätstest wurde nach Salomon [150] durchgeführt:

Das Reaktionsvolumen betrug 100  $\mu\text{l}$  in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß. Es bestand aus 50  $\mu\text{l}$  Cocktail, 40  $\mu\text{l}$  individueller Mischung aus Protein und Ligand und 10  $\mu\text{l}$  Substratlösung (ATP/ $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP Mischung). Für jede Kombination aus Protein und Ligandenkonzentration wurden Doppelwerte gemessen. Als Leerwert wurden zwei Ansätze pipettiert, die weder Protein noch Ligand enthielten. Alle Schritte wurden auf Eis pipettiert und die Substratlösung zuletzt zugegeben. Die enzymatische Reaktion fand bei 37°C für 10 Minuten statt. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem die Gefäße in Eiswasser gestellt und mit 150  $\mu\text{l}$  AC-Stop Lösung versetzt wurden, welche einen Überschuss an nicht radioaktiv markiertem Substrat (ATP) enthielt. Dann wurde 800  $\mu\text{l}$  VE-Wasser zugesetzt und der Inhalt jedes Reaktionsgefäßes auf je eine Dowex-Säule aufgebracht (9 x 1 cm Glassäule mit 1,2 g Dowex 50WX4-400, Kationentauscher). Nachdem das Volumen durchgelaufen war wurde mit 3,5 ml VE-Wasser gewaschen, um ATP von cAMP zu trennen. Anschließend wurden die Dowex-Säulen auf Alox-Säulen gestellt und mit 5 ml VE-Wasser eluiert (10 x 0,5 cm Plastiksäulen mit 1 g aktivem, neutralen  $\text{Al}_2\text{O}_3$  90). Im letzten Schritt wurden die Proben mit 4,5 ml 0,1 mM Tris/HCl pH 7,5 von den Alox-Säulen in mit jeweils 4 ml Ultima Gold XR Szintillationsflüssigkeit vorgelegten Gefäßen eluiert. Danach wurden die Gefäße verschlossen, geschüttelt und die Zerfälle pro Minute von  $^3\text{H}$  und  $^{32}\text{P}$  für 2 Minuten im Szintillationszähler LKB Wallac 1209 Rackbeta 'Primo' (GE Healthcare, Freiburg) gemessen. Als Kontrollen wurden vier Gefäße mit 4 ml Ultima Gold XR Szintillationsflüssigkeit und 4,5 ml 0,1 mM Tris/HCl pH 7,5 vorgelegt; zwei davon wurden mit je 50  $\mu\text{l}$  Cocktail versetzt (=  $^3\text{H}$ -Blank), die zwei anderen mit 10  $\mu\text{l}$  einer 1:10 Verdünnung der Substratlösung (=  $^{32}\text{P}$ -Blank).

Die spezifische Aktivität in  $\text{pmol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  wurde nach der folgenden Formel berechnet. Wegen des Überstrahleffekts von  $^{32}\text{P}$  in den  $^3\text{H}$ -Zählkanal wurden 3% der erhaltenen cpm von  $^{32}\text{P}$  von den erhaltenen cpm von  $^3\text{H}$  abgezogen:

$$\text{Aktivität} \frac{\text{pmol [cAMP]}}{\text{mg [Protein]} \times \text{min}} = \frac{\text{cpm } ^{32}\text{P Probe} - \text{cpm } ^{32}\text{P Leerreaktion}}{\text{cpm } ^{32}\text{P Blank}}$$

$$\times \frac{\text{cpm } ^3\text{H Blank}}{\text{cpm } ^3\text{H Probe} - 0,03 \times \text{cpm } ^{32}\text{P Probe}} \times \frac{\text{ATP } [\mu\text{M}] \times 10^5}{\text{Reaktionszeit [min]} \times \text{Protein } [\mu\text{g}]}$$

Die Dowex-Säulen wurden regeneriert, indem sie zuerst mit 5 ml 2 N HCl und anschließend mit 10 und dann mit 5 ml VE-Wasser gewaschen wurden. Die Alox-Säulen wurde zweimal mit 4,5 ml 0,1 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen.

**Cocktail für Membranpräparationen (mit regenerierendem System, 2x, RT):**

50% Glycerin; 0,1 M Tris/HCl pH 8; 6 mM MnCl<sub>2</sub>; 4 mM <sup>3</sup>H-cAMP (1,64 x 10<sup>6</sup> Bq/mmol); 12 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)

**Cocktail für cytosolische Proteine (ohne regenerierendes System, 2x, RT):**

50% Glycerin; 0,1 M Tris/HCl pH 8; 6 mM MnCl<sub>2</sub>; 4 mM <sup>3</sup>H-cAMP (1,64 x 10<sup>6</sup> Bq/mmol)

**<sup>3</sup>H-cAMP Stammlösung (10x, -20°C):**

40 mM cAMP pH 7,5 (mit gesättigter Tris-Lösung bei RT). Inklusive 10-20 kBq/ml [2,8-<sup>3</sup>H]-cAMP (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Salz)

**ATP Substratlösung (10x, -20°C):**

2 mM ATP pH 7,5 für Rv3645 und CyaG  
750 μM ATP pH 7,5 für Rv1625c  
Jeweils frisch mit 16-30kBq [ $\alpha$  <sup>32</sup>P] ATP versetzten

**AC-Stop Lösung (1,5x, -20°C):**

3 mM ATP; 1,5% SDS; pH 7,5 (mit gesättigter Tris Lösung bei RT)

Für die Auswertung wurden nur cpm-Werte größer des dreifachen Leerwerts als Aktivität gewertet. Die Ausbeute an Tritium gab Aufschluss über die Effizienz des Chromatographieverfahrens. Der Umsatz an Substrat lag zumeist unter 10% und betrug maximal 20%. Die erhaltenen Doppelwerte wurden als ein Wert zusammengefasst. Für die statistische Auswertung wurde je Expressionskultur ein Wert für jede Ligandenkonzentration gewertet und der S.E.M. bestimmt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der Students t-test angewendet. Für die Vergleichbarkeit verschiedener Expressionen und Konstrukte, wurden die Aktivitäten in Prozent umgerechnet. Dabei wurde innerhalb eines Tests die Enzymaktivität ohne Ligand als 100% gesetzt und die Aktivitäten bei verschiedener Ligandenkonzentration prozentual ins Verhältnis gesetzt. Die prozentuale Regulation einer Chimäre verschiedener Expressionen durch den Liganden ist unbeeinflusst von der eingesetzten Proteinmenge in der (Membran-) Präparation, die über Bradford bzw. Western Blot abgeschätzt wurde.

In den Membranpräparationen befand sich auch die AC des *E. coli* Expressionsstammes. Die Aktivität wurde in entsprechenden Leervektoren gemessen. Sie lag mit 20 bis 50 pmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> im Bereich des Hintergrundrauschens, folglich war ein Beitrag der *E. coli* AC ausgeschlossen.

## 2.11 Klonierungsübersicht

### 2.11.1 Klonierungen für Kapitel 3.1

#### Chimären mit Rv3645 AC

Ausgangskonstrukte waren die beiden Chimären Nr. 2 (Tsr<sub>Rezeptor</sub>-Af1503<sub>HAMP(S288I/A291I)</sub>-Rv3645<sub>CHD</sub>) von L. García Mondéjar und Nr. 1 (Tsr<sub>Rezeptor</sub>-Tsr<sub>HAMP</sub>-CyaG<sub>S-Helix</sub>-Rv3645<sub>CHD</sub>) von K. Winkler. Mit Fusions-PCR wurden sie zu den Konstrukten Nr. 3 bis 5 (Tsr<sub>Rezeptor</sub>-Af1503<sub>HAMP(S288I/S291I)</sub>-CyaG<sub>S-Helix</sub>-Rv3645<sub>CHD</sub>) kombiniert, die S-Helix wurde dabei in verschiedenen Längen eingeführt. Anschließend wurden die PCR Produkte über BamHI/HindIII in die MCS von pQE30 eingesetzt und in *E. coli* BL21 (DE) [pREP4] transformiert. Zur Einführung der zweimal 18 ASn langen S-Helix (Nr. 6) wurde zunächst eine PCR durchgeführt. Die Primer enthielten die AS Sequenz mit einer stillen Punktmutation, die in einer singulären Restriktionsschnittstelle Afel resultierte. Anschließend wurden die Fragmente BamHI/Afel bzw. Afel/HindIII sowie der Vektor BamHI/HindIII verdaut und eine Ligation mit den drei Fragmenten durchgeführt. Die Transformation erfolgte ebenfalls in *E. coli* BL21 (DE3) [pREP4].

Nr	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
1	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Tsr <sub>HAMP</sub> (216-268) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv3645 <sub>CHD</sub> (331-549)	K. Winkler
2	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-331) Rv3645 <sub>CHD</sub> (331-549)	L. García Mondéjar
3	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-331) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv3645 <sub>CHD</sub> (331-549)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30	
	PCR 1a: Template: #2	Primer s: UpQE Primer as: MZ01
	PCR 1b: Template: #1	Primer s: MZ02 Primer as: RpQE
4	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-331) CyaG <sub>S-Helix</sub> (438-455) Rv3645 <sub>CHD</sub> (331-549)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30	
	PCR 1a: Template: #2	Primer s: UpQE Primer as: MZ03
	PCR 1b: Template: #1	Primer s: MZ04 Primer as: RpQE
5	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-331) CyaG <sub>S-Helix</sub> (445-455) Rv3645 <sub>CHD</sub> (331-549)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30	
	PCR 1a: Template: #2	Primer s: UpQE Primer as: MZ05
	PCR 1b: Template: #1	Primer s: MZ06 Primer as: RpQE

6	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215)Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-331)2xCyaG <sub>S-Helix</sub> (438-455)Rv3645 <sub>CHD</sub> (331-549)	diese Arbeit
PCR für Restriktionsschnittstellen, anschließend Verdau und Dreifachligation in pQE30		
PCR A:	Template: #4	Primer s: UpQE    Primer as: MZ07    Verdau: BamHI/AfeI
PCR B:	Template: #4	Primer s: MZ08    Primer as: RpQE    Verdau: AfeI/HindIII
Verdau Vektor: BamHI/HindIII		
7	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Tsr <sub>HAMP</sub> (216-268) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	K. Winkler
8	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Tsr <sub>HAMP</sub> (216-268) CyaG <sub>S-Helix</sub> (438-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	K. Freudenberger
9	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Tsr <sub>HAMP</sub> (216-268) CyaG <sub>S-Helix</sub> (445-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	K. Freudenberger

### Chimären mit CyaG AC

Es wurden Chimären mit dem Domänenaufbau "Tsr<sub>Rezeptor</sub>-Af1503<sub>HAMP</sub>(S288I/A291I)-CyaG<sub>S-Helix</sub>-CyaG<sub>CHD</sub>" kloniert, die S-Helix wurde in den Längen 18 oder 25 ASn eingesetzt. Die Af1503 HAMP wurde C-terminal bis zu vier ASn verkürzt (V, A, M, E) während die S-Helix bei gleicher Länge belassen wurde. Die Ausgangskonstrukte waren erneut Konstrukte von K. Winkler und L. García Mondéjar, die mit Fusions-PCR zu den jeweiligen Chimären kombiniert wurden. Die PCR-Produkte wurden anschließend BamHI/HindIII verdaut und in die MCS von pQE30 eingesetzt. Die Transformation erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) [pREP4] Zellen.

Nr.	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
10	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-331) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30		
PCR 1a:	Template: #3	Primer s: UpQE    Primer as: MZ09
PCR 1b:	Template: #7	Primer s: MZ10    Primer as: RpQE
11	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-331) CyaG <sub>S-Helix</sub> (438-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30		
PCR 1a:	Template: #4	Primer s: UpQE    Primer as: MZ03
PCR 1b:	Template: #7	Primer s: MZ04    Primer as: RpQE
12	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-331) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30		
PCR 1a:	Template: #3	Primer s: UpQE    Primer as: MZ01
PCR 1b:	Template: #7	Primer s: MZ02    Primer as: RpQE
13	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-330) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30		
PCR 1a:	Template: #2	Primer s: UpQE    Primer as: MZ19
PCR 1b:	Template: #7	Primer s: MZ20    Primer as: RpQE

14	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-330) CyaG <sub>S-Helix</sub> (438-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30	
	PCR 1a: Template: #2	Primer s: UpQE Primer as: MZ11
	PCR 1b: Template: #7	Primer s: MZ12 Primer as: RpQE
15	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-329) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30	
	PCR 1a: Template: #2	Primer s: UpQE Primer as: MZ21
	PCR 1b: Template: #7	Primer s: MZ22 Primer as: RpQE
16	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-329) CyaG <sub>S-Helix</sub> (438-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30	
	PCR 1a: Template: #2	Primer s: UpQE Primer as: MZ13
	PCR 1b: Template: #7	Primer s: MZ14 Primer as: RpQE
17	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-328) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30	
	PCR 1a: Template: #2	Primer s: UpQE Primer as: MZ23
	PCR 1b: Template: #7	Primer s: MZ24 Primer as: RpQE
18	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) Af1503 <sub>HAMP</sub> (278-328) CyaG <sub>S-Helix</sub> (438-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE30	
	PCR 1a: Template: #2	Primer s: UpQE Primer as: MZ15
	PCR 1b: Template: #7	Primer s: MZ16 Primer as: RpQE

### Chimären mit Rv1625c AC

Die Konstrukte wurden von A. Schultz kloniert. Sie hatten den Domänenaufbau "Tsr<sub>Rezeptor</sub>-CyaG<sub>HAMP</sub>-CyaG<sub>S-Helix</sub>-Rv1625c<sub>CHD</sub>" mit Variationen in der S-Helix.

Nr.	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
19	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) CyaG <sub>HAMP</sub> (370-430) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	A. Schultz
20	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) CyaG <sub>HAMP</sub> (370-430) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	A. Schultz
21	Tsr <sub>Rezeptor</sub> (1-215) CyaG <sub>HAMP</sub> (370-426) CyaG <sub>S-Helix</sub> (452-455) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	A. Schultz

### 2.11.2 Klonierungen für Kapitel 3.2

Das Gen für LqsS auf dem Plasmid pUS-1 stammte von Prof. Dr. H. Hilbi, München. Alle Konstrukte wurden in pQE80L kloniert und für die Expression in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Ein Auszug der Aminosäuresequenzen für die LqsS-Rv1625c Chimären lautet:

<b>LqsS</b>	M <sub>1</sub> .. STLNY <sub>178</sub> KTAM <sub>182</sub> LQQQK <sub>187</sub> LAGM <sub>191</sub> AAAAGMIAHELR <sub>203</sub>
<b>Rezeptor</b>	SPLLGKSG <sub>212</sub> AQAL <sub>216</sub>
<b>Rv1625c CHD</b>	A <sub>214</sub> EHDR <sub>218</sub> SEALLANMLPASIAERLKE <sub>237</sub> PERNIADKYDEASVLFAD <sub>256</sub> .. V <sub>443</sub>

### Klonierungen für Kapitel 3.2.1

Die Chimären Nr. 23,24 und 25, LqsS-Y178, M182 und M191 an Rv1625c<sub>218-443</sub> wurden von S. Beltz für diese Arbeit übernommen [138]. Die meisten weiteren Konstrukte von LqsS und Rv1625c<sub>218-443</sub> wurden anschließend mit QuikChange PCR generiert, das Plasmid in *E. coli* XL1 blue transformiert und zur Expression in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. In Rv1625c war später an der Position R218/S219 eine stille Mutation eingeführt worden (BglII). Durch PCR konnte die gewünschte Länge von LqsS mit C-terminaler BglII Schnittstelle amplifiziert und anschließend über Restriktionsverdau (BamHI/BglII) und Ligation mit Rv1625c verbunden werden. Für die drei Konstrukte LqsS-R203, G212 und L216 (Nr. 36, 37 und 38) wurde die LqsS-Sequenz mit Primern flankiert amplifiziert, sodass eine N-terminale BamHI und C-terminale BglII Schnittstelle eingesetzt wurde. Anschließend wurde das PCR-Produkt durch Restriktionsverdau und Ligation mit Rv1625c verbunden.

Nr.	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
22	LqsS Sequenz in pUS-1	H. Hilbi
23	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-178) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	S. Beltz
24	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-182) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	S. Beltz
25	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-191) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	S. Beltz
26	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-183) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	diese Arbeit

QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in *E. coli* XL1 blue

Template: #32    Primer s: MZ69    Primer as: MZ70

27	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-184) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
----	---	--------------

QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in *E. coli* XL1 blue

Template: #32    Primer s: MZ72    Primer as: MZ71

28	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-185) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
----	---	--------------

QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in *E. coli* XL1 blue

Template: #32    Primer s: MZ74    Primer as: MZ73

29	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-186) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
----	---	--------------

QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in *E. coli* XL1 blue

Template: #32    Primer s: MZ76    Primer as: MZ75

30	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #32    Primer s: MZ78    Primer as: MZ77	
31	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-188) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #32    Primer s: MZ80    Primer as: MZ79	
32	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-189) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #25    Primer s: MZ45    Primer as: MZ46	
33	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-192) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #25    Primer s: MZ49    Primer as: MZ50	
34	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-195) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	U. Kurz
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BamHI/BglII und Ligation in pQE80L	
	PCR:    Template: #22    Primer s: UpQE    Primer as: MZ51	
35	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-197) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	U. Kurz
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BamHI/BglII und Ligation in pQE80L	
	PCR:    Template: #22    Primer s: UpQE    Primer as: MZ52	
36	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-203) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BamHI/BglII und Ligation in #30	
	PCR:    Template: #22    Primer s: MZ142    Primer as: MZ144	
37	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-212) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BamHI/BglII und Ligation in #30	
	PCR:    Template: #22    Primer s: MZ142    Primer as: MZ145	
38	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-216) Rv1625c <sub>CHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BamHI/BglII und Ligation in #30	
	PCR:    Template: #22    Primer s: MZ142    Primer as: MZ143	

### Klonierungen für Kapitel 3.2.2

In diesem Kapitel wurden an LqsS(1-187) verschiedene Längen von Rv1625c angefügt. Für die Anknüpfung an ASn A214 bis D217 (Nr. 39-42) wurde wie im vorangegangenen Kapitel per PCR an LqsS die C-terminale BglII Schnittstelle angefügt, anschließend wurde durch BamHI/BglII Verdau und Ligation mit Rv1625c verbunden. Für die anderen Chimären wurden zwei Verfahren angewendet: Zum einen wurden Deletionen von 1-3 ASn per QuikChange PCR eingeführt, das Plasmid in *E. coli* XL1 blue transformiert und zur Expression in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Zum anderen wurden beide Domänen durch Fusions-PCR zusammengefügt, mit anschließendem BamHI/HindIII Verdau in die MCS von pQE80L ligiert und in *E. coli* BL21 (DE3)

transformiert. In einigen Fällen wurden die Primerpaare so geplant, dass durch jeden Primer eine andere Mutation eingefügt wurde (Nr. 46-52). Die Verifizierung der Mutanten gelang hier durch Sequenzierung.

Nr.	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
39	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>214</b> -443)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BamHI/BglII und Ligation in #30	
	PCR:      Template: #25      Primer s: UpQE      Primer as: MZ146	
40	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>215</b> -443)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BamHI/BglII und Ligation in #30	
	PCR:      Template: #25      Primer s: UpQE      Primer as: MZ147	
41	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>216</b> -443)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BamHI/BglII und Ligation in #30	
	PCR:      Template: #25      Primer s: UpQE      Primer as: MZ148	
42	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>217</b> -443)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BamHI/BglII und Ligation in #30	
	PCR:      Template: #25      Primer s: UpQE      Primer as: MZ149	
43	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>219</b> -443)	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #30      Primer s: MZ150      Primer as: MZ151	
44	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>220</b> -443)	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #30      Primer s: MZ152      Primer as: MZ153	
45	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>221</b> -443)	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #30      Primer s: MZ154      Primer as: MZ155	
46	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>222</b> -443)	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #45      Primer s: MZ159      Primer as: MZ158	
47	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>223</b> -443)	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #45      Primer s: MZ159      Primer as: MZ158	
48	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>224</b> -443)	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #45      Primer s: MZ159      Primer as: MZ160	
49	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>236</b> -443)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a:      Template: #30      Primer s: UpQE      Primer as: MZ176	
	PCR 1b:      Template: #30      Primer s: MZ177      Primer as: RpQE	

50	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>237-443</b> )	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #30 Primer s: UpQE Primer as: MZ176	
	PCR 1b: Template: #30 Primer s: MZ177 Primer as: RpQE	
51	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>238-443</b> )	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #30 Primer s: UpQE Primer as: MZ178	
	PCR 1b: Template: #30 Primer s: MZ179 Primer as: RpQE	
52	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> ( <b>239-443</b> )	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #30 Primer s: UpQE Primer as: MZ178	
	PCR 1b: Template: #30 Primer s: MZ179 Primer as: RpQE	

### 2.11.3 Klonierungen für Kapitel 3.3

Alle Konstrukte wurden in pQE80L kloniert und für die Expression in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Der LqsS-Rezeptor wurde mit den Längen Y178, K187, M191 eingesetzt. An ihn wurde entweder die CHD angefügt, die S-Helix mit CHD, oder die HAMP Domäne mit S-Helix und CHD. Die Konstrukte waren sequenzidentisch mit Ausnahme der unterschiedlichen CHD. Die beiden CTE's wurden hier nicht separat betrachtet, sondern als Teil der CHD behandelt.

Tab. 2.6 Sequenzauszug mit Positionsnummern der jeweiligen Domänen. Der LqsS-Rezeptor wurde mit der CHD von CyaG oder der CHD von Rv1625c verknüpft. Zudem wurden mit beiden CHDn Chimären generiert mit der S-Helix sowie mit HAMP Domäne und S-Helix.

<b>LqsS Rezeptor</b>	M <sub>1</sub> .. GSTLNY <sub>178</sub> KTAMLQQQK <sub>187</sub> LAGM <sub>191</sub> AAAAGMIAHEL <sub>R203</sub> SPLLG <sub>IKSG212</sub> AQAL <sub>216</sub>	
<b>CyaG HAMP</b>	R <sub>370</sub> WISE .. LRDSFI <sub>430</sub>	
<b>CyaG S-Helix</b>	A <sub>431</sub> LENTNRELEQRVLERTAALLQEKE <sub>455</sub>	
	↓	↓
<b>CHD</b>	<u>CyaG:</u> R <sub>456</sub> SEELLLNVLPKPIADQLKA <sub>475</sub> N <sub>476</sub> KKAIASAIIEV <sub>TILFAD493</sub> .. S <sub>672</sub>	<u>Rv1625c:</u> R <sub>218</sub> SEALLANMLPASIAERLKE <sub>237</sub> P <sub>238</sub> ERNIADKYDEASVLFAD <sub>256</sub> .. V <sub>443</sub>

Für die LqsS-CyaG CHD Konstrukte wurde analog zur Rv1625c CHD eine stille Mutation an der Position R456/S457 (BglII) eingeführt (Nr. 56b). Anschließend wurde die Rv1625c CHD über BglII/HindIII durch die CyaG CHD ausgetauscht. Die Konstrukte mit HAMP und S-Helix wurden durch Fusions-PCR zusammengefügt, in Abhängigkeit der

CHD wurden die gleichen Primer mit unterschiedlichen Templates eingesetzt. Nach anschließendem BamHI/HindIII Verdau wurden die PCR-Produkte in die MCS von pQE80L ligiert und in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert.

Nr.	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
53	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-Y178) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BglII/HindIII und Ligation in #23	
	PCR:      Template: #12      Primer s: MZ93      Primer as: RpQE	
54	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BglII/HindIII und Ligation in #30	
	PCR:      Template: #12      Primer s: MZ93      Primer as: RpQE	
55	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-M191) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BglII/HindIII und Ligation in #25	
	PCR:      Template: #12      Primer s: MZ93      Primer as: RpQE	
56	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-Y178) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a:    Template: #23      Primer s: UpQE      Primer as: MZ94	
	PCR 1b:    Template: #63      Primer s: MZ95      Primer as: RpQE	
56b	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-Y178) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672) mit BglII (R456 S457)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstelle BglII, anschließend Verdau BglII/HindIII und Ligation in #64	
	PCR:      Template: #63      Primer s: MZ141      Primer as: RpQE	
57	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a:    Template: #23      Primer s: UpQE      Primer as: MZ96	
	PCR 1b:    Template: #63      Primer s: MZ97      Primer as: RpQE	
58	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-M191) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a:    Template: #25      Primer s: UpQE      Primer as: MZ89	
	PCR 1b:    Template: #12      Primer s: MZ90      Primer as: RpQE	
59	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-Y178) LqsS(179-R203) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Verdau #64 und #56b BglII/HindIII, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente	
60	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) LqsS(188-G212) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Verdau #65 und #56b BglII/HindIII, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente	
61	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-M191) LqsS(192-L216) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Verdau #66 und #56b BglII/HindIII, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente	
62	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) CyaG <sub>HAMP</sub> (370-430) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a:    Template: #30      Primer s: XmnI      Primer as: MZ166	
	PCR 1b:    Template: #63      Primer s: MZ167      Primer as: RpQE	

63	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-M191) CyaG <sub>HAMP</sub> (370-430) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) CyaG <sub>CHD</sub> (456-672)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #25	Primer s: UpQE Primer as: MZ89
	PCR 1b: Template: #12	Primer s: MZ90 Primer as: RpQE
64	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-Y178) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #23	Primer s: UpQE Primer as: MZ94
	PCR 1b: Template: #19	Primer s: MZ95 Primer as: RpQE
65	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #30	Primer s: UpQE Primer as: MZ97
	PCR 1b: Template: #19	Primer s: MZ96 Primer as: RpQE
66	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-M191) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #25	Primer s: UpQE Primer as: MZ89
	PCR 1b: Template: #19	Primer s: MZ90 Primer as: RpQE
67	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) CyaG <sub>HAMP</sub> (370-430) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #30	Primer s: XmnI Primer as: MZ166
	PCR 1b: Template: #68	Primer s: MZ167 Primer as: RpQE
68	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-M191) CyaG <sub>HAMP</sub> (370-430) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (218-443)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #25	Primer s: UpQE Primer as: MZ91
	PCR 1b: Template: #19	Primer s: MZ92 Primer as: RpQE

### 2.11.4 Klonierungen für Kapitel 3.4

Es kamen die Vektoren pQE80L und pETDuet-3 zum Einsatz. Für die Expression wurden diese in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert.

#### Klonierungen für Kapitel 3.4.2

Die vier Punktmutanten von R218 wurden durch QuikChange PCR mit dem Template der Referenzchimäre (LqsS<sub>1-187</sub>-Rv1625<sub>C218-443</sub>) in pQE80L generiert, indem mit jedem Primer eine der Mutationen eingefügt wurde. Nach der Transformation in *E. coli* XL1 blue und Durchführung von Minipreps erfolgte die Unterscheidung der Mutanten durch Sequenzierung. Die R218Y Mutante wurde nicht erhalten. Nach Bestätigung der

richtigen Sequenz erfolgte eine Transformation in *E. coli* BL21 (DE3) mit erneuter Sequenzierung.

Nr.	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
69	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (218-443; <b>R218Q</b> )	U. Kurz
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue Template: #30    Primer s: MZ181    Primer as: MZ180	
70	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (218-443; <b>R218L</b> )	U. Kurz
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue Template: #30    Primer s: MZ181    Primer as: MZ180	
71	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-187) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (218-443; <b>R218D</b> )	U. Kurz
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue Template: #30    Primer s: MZ183    Primer as: MZ182	

### Klonierungen für Kapitel 3.4.3

Die Deletionen von E237 bzw. K236 und E237 in der Referenzchimäre LqsS<sub>1-187</sub>-Rv1625<sub>C<sub>218-443</sub></sub> wurde durch Fusions-PCR durchgeführt (Nr. 76, 77). Anschließend wurde das PCR Produkt über BamHI/HindIII in die MCS von pQE80L eingesetzt und in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Die Differenzierung der Mutanten erfolgte durch Sequenzierung. Weiterhin wurde die S-Helix aus CyaG N- bzw. C-terminal der CTE (20, 19 oder 18 ASn) eingeführt. Dies erfolgte durch Fusions-PCR, anschließendem BamHI/HindIII Restriktionsverdau sowie Ligation in die MCS von pQE80L. Die Transformation erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3). Die Primer MZ152-155, MZ172 und 173 wurden bereits in vorherigen Klonierungen eingesetzt und hier wiederverwendet.

Nr.	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
72	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>C<sub>CTE</sub></sub> (218-237) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443)	U. Kurz
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L PCR 1a:    Template: #30    Primer s: UpQE    Primer as: MZ157 PCR 1b:    Template: #30    Primer s: MZ156    Primer as: RpQE	
73	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>C<sub>CTE</sub></sub> (218-237) LqsS(188-212) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L PCR 1a:    Template: #30    Primer s: UpQE    Primer as: MZ174 PCR 1b:    Template: #30    Primer s: MZ175    Primer as: RpQE	

74	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-236) Rv1625 <sub>CHD</sub> (238-443)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #65	Primer s: UpQE Primer as: MZ173
	PCR 1b: Template: #65	Primer s: MZ172 Primer as: RpQE
75	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-235) Rv1625 <sub>CHD</sub> (238-443)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #65	Primer s: UpQE Primer as: MZ173
	PCR 1b: Template: #65	Primer s: MZ172 Primer as: RpQE
76	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-236) Rv1625 <sub>CHD</sub> (238-443)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #30	Primer s: UpQE Primer as: MZ173
	PCR 1b: Template: #65	Primer s: MZ172 Primer as: RpQE
77	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-235) Rv1625 <sub>CHD</sub> (238-443)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #30	Primer s: UpQE Primer as: MZ173
	PCR 1b: Template: #65	Primer s: MZ172 Primer as: RpQE
78	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-236) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv1625 <sub>CHD</sub> (238-443)	U. Kurz
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #72	Primer s: UpQE Primer as: MZ162
	PCR 1b: Template: #72	Primer s: MZ163 Primer as: RpQE
79	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-235) CyaG <sub>S-Helix</sub> (431-455) Rv1625 <sub>CHD</sub> (238-443)	U. Kurz
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #72	Primer s: UpQE Primer as: MZ162
	PCR 1b: Template: #72	Primer s: MZ163 Primer as: RpQE

#### Klonierungen für Kapitel 3.4.4

In diesem Kapitel werden Chimären vorgestellt, bei denen die CTE der Rv1625c durch CTE's der AC Isoform V ersetzt wurden. Die Kompatibilität zweier verschiedener CTE's wurde im heterodimer aktiven Enzym untersucht. Der nötige heterodimere Charakter wurde durch die Einführung von sich komplementierenden Mutationen in die CHD der Rv1625c gewährleistet, die modifizierten CHDn wurden analog ihrer Säugetier-verwandten mit C1 und C2 bezeichnet. Die Mutationen in Rv1625c\_C1 lauteten N372T und R376H, wodurch kein Übergangszustand mehr stabilisiert werden kann. Die Mutationen in Rv1625c\_C2 lauteten D256S, D300S und S301T, sodass kein ATP und kein Kofaktor mehr gebunden werden kann. Das resultierende Heterodimer besitzt ein aktives Zentrum, im Gegensatz zum ursprünglichen Homodimer, welches zwei aktive Zentren besitzt. Rv1625c\_C1<sub>204-443</sub> und Rv1625c\_C2<sub>204-443</sub> waren durch ein Tetradeka-

peptid verbunden, die Rv1625c-CTE<sub>218-237</sub> wurde in verschiedenen Chimären durch die ACV\_CTE1 bzw. die ACV\_CTE2 ersetzt (Tab. 2.7).

Tab. 2.7 Schematische Darstellung der kombinierten Segmente von oben nach unten: Die Sequenz N- bzw. C-terminal des Linkers ist bis auf wenige ASn in der CHD und der gewählten CTE identisch. Die Mutationen in Rv1625c\_C1 (N372T und R376H) und Rv1625c\_C2 (D256S, D300S und S301T) sind hervorgehoben. Die Schnittstelle StuI (Abb. 2.5) befindet sich an Position A250/S251.

	D <sub>204</sub> DTARAEAVMEAEHD <sub>217</sub>		
CTE	Rv1625c-CTE R <sub>218</sub> SEALLANMLP ASIAERLKE <sub>237</sub>	ACV_CTE1 Q <sub>430</sub> QERLLLSVLP RHVAMEMKA <sub>449</sub>	ACV_CTE2 Y <sub>1038</sub> NRRLLNILP KDVA AHFLA <sub>1057</sub>
CHD	Rv1625c_C1 P <sub>238</sub> ERNIADKYDEASVLFAD <sub>256</sub> IVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSADFDELVDQH GLEKIKVSGD <sub>300</sub> S <sub>301</sub> YMVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNP VPLRVGLATGPVVAGVVGSRFFYDVWGDAVT <sub>372</sub> VASH <sub>376</sub> MESTDSVGQIQVPDE VYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLI GRKVAADPGEVRGAEPRTAGV <sub>443</sub>		
Linker	TRAAGGPPAAGGRS		
	D <sub>204</sub> DTARAEAVMEAEHD <sub>217</sub>		
CTE	Rv1625c-CTE R <sub>218</sub> SEALLANMLP ASIAERLKE <sub>237</sub>	ACV_CTE1 Q <sub>430</sub> QERLLLSVLP RHVAMEMKA <sub>449</sub>	ACV_CTE2 Y <sub>1038</sub> NRRLLNILP KDVA AHFLA <sub>1057</sub>
CHD	Rv1625c_C2 P <sub>238</sub> ERNIADKYDEASVLFAS <sub>256</sub> IVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSADFDELVDQH GLEKIKVSGS <sub>300</sub> T <sub>301</sub> YMVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNP VPLRVGLATGPVVAGVVGSRFFYDVWGDAVN <sub>372</sub> VASR <sub>376</sub> MESTDSVGQIQVPDE VYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLI GRKVAADPGEVRGAEPRTAGV <sub>443</sub>		

Die Ausgangskonstrukte von A. Schultz waren in pQE30 kloniert und besaßen die Rv1625\_C1 bzw. Rv1625c\_C2 charakteristischen Mutationen (Nr. 81 und 83). An die Rv1625c\_C1 (Nr. 81) wurde durch PCR mit Primer MZ98 C-terminal die Sequenz "TRAAGGPPAAGGRS KL" (RS=BglII, KL=HindIII) angefügt und anschließend über BamHI/HindIII in die MCS von pQE80L eingesetzt. Die Linkersequenz wurde zuvor bereits in der Form "TRAAGGPPAAGGLE" erfolgreich verwendet [75] und wurde im Rahmen dieser Arbeit zugunsten der Restriktionsschnittstelle BglII (Aminosäuren 'RS') modifiziert. Rv1625c\_C2 wurde ebenfalls in pQE80L umgesetzt (=Nr. 83, in pQE80L).

Aufgrund der nahezu identischen AS Sequenz wurden Modifikationen der CTE's in die auf separaten Plasmiden liegenden Rv1625c\_C1 und Rv1625c\_C2 Konstrukte eingeführt. Die Substitution der 20 ASn langen CTE von Rv1625c mit ACV\_CTE1 bzw. CTE2 erfolgte mit jeweils Rv1625c\_C1 bzw. Rv1625c\_C2 als Template durch Fusions-PCR. Der in Schritt PCR 1a und 1b durch spezifische Primer (MZ99-102, Tab. 2.2) angefügte Überhang war relativ lang. Er bestand aus 36 bp der einzusetzenden CTE, sodass sich 12 bp (4 ASn) der neuen CTE für den Fusionsschritt überlappten (siehe Abb. 2.5). Das Fusionsprodukt wurde anschließend über BamHI/HindIII in die MCS von pQE80L eingesetzt und in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert.

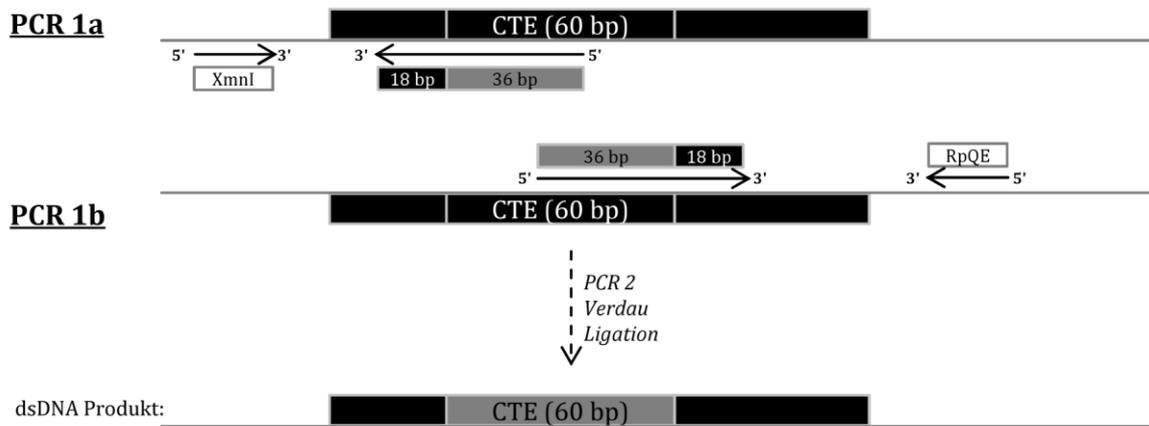


Abb. 2.5 Schematische Darstellung der beiden Primerpaare für Schritt PCR 1a und 1b der Fusions-PCR. Die Sequenz von 60 bp (20 ASn) der neuen CTE (grau) wurde allein durch überlappende Anhänge eingefügt.

Nachdem jede der drei CTE's mit jedem der beiden CHDn verknüpft auf einem separaten Vektor vorlag, wurden alle neun Kombinationsmöglichkeiten von C1 mit C2 kloniert. Dies wurde erreicht, indem die C1 mit EcoRI und BglII verdaut wurde und die C2 mit BamHI und EcoRI. Da BglII und BamHI Isochizomere sind, können ihre komplementären Enden bei der Ligation verknüpft werden, was allerdings in einer DNA-Sequenz ohne Schnittstelle resultiert (Abb. 2.6).

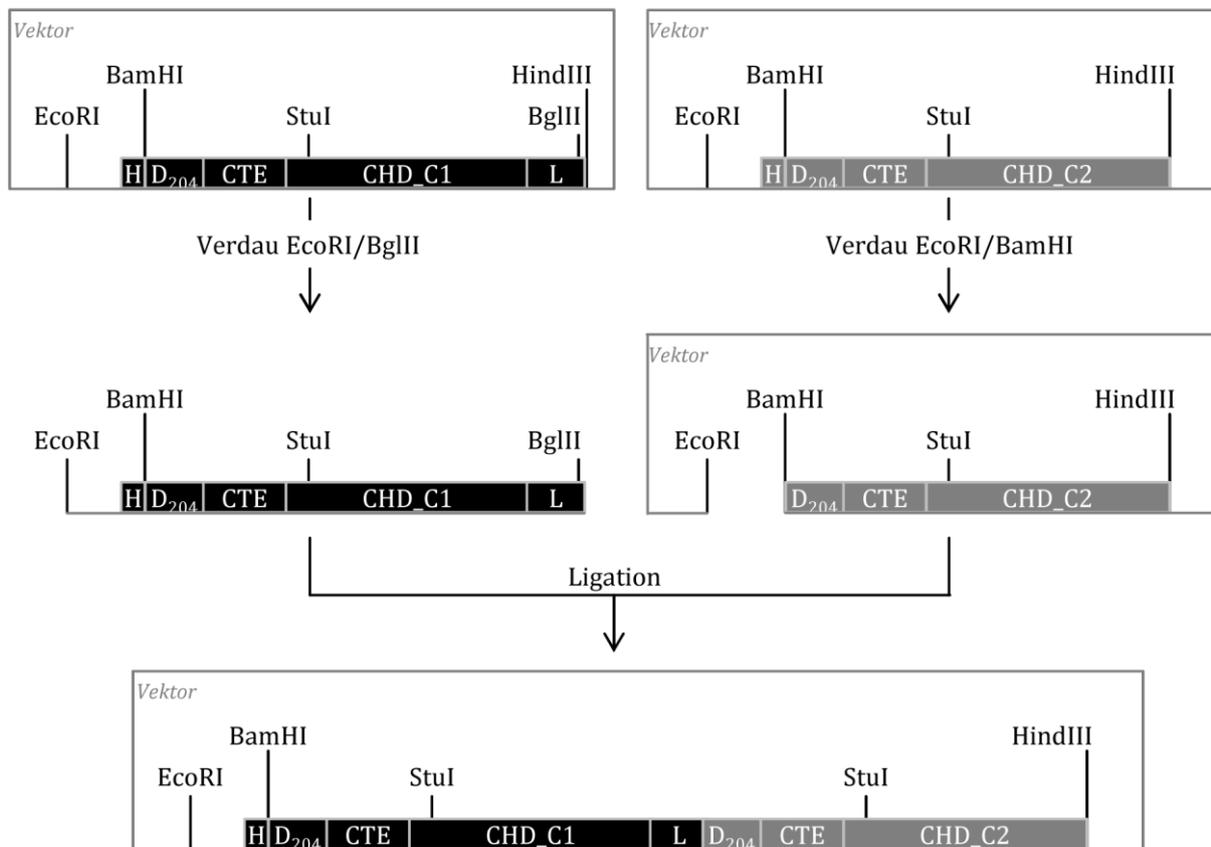


Abb. 2.6 oben: Sequenzdarstellung der beiden Ausgangskonstrukte. Sie waren separat in die MCS von pQE80L kloniert. Darunter Klonierungsschritte Verdau und Ligation. Angegeben sind die relevanten Restriktionsschnittstellen sowie eine Übersicht der Abfolge der Segmente. H: His6-Tag, D<sub>204</sub>: Beginn des cytosolischen Teils von Rv1625c (204-217). CTE: entsprechendes Cyclase Transducer Element. CHD\_C1: CHD von Rv1625<sub>CP238-V443</sub> mit Mutationen N372T und R376H. L: Linkersequenz TRAAGGPPAAGGRS. CHD\_C2: CHD von Rv1625<sub>CP238-V443</sub> mit Mutationen D256S, D300S, S301T.

Nr.	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
80	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>C<sub>CTE</sub></sub> (218-237) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGLE	A.Schultz
81	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>C<sub>CTE</sub></sub> (218-237) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGLE	A.Schultz
82	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>C<sub>CTE</sub></sub> (218-237) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
PCR für Restriktionsschnittstelle BglII und HindIII, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L PCR:      Template: #81      Primer s: UpQE      Primer as: MZ98		
83	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>C<sub>CTE</sub></sub> (218-237) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; D256S D300S S301T)	A.Schultz

## Material und Methoden

84	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	M. Cerrolaza
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #82 Primer s: XmnI Primer as: MZ99	
	PCR 1b: Template: #82 Primer s: MZ100 Primer as: RpQE	
85	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	M. Cerrolaza
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #83 Primer s: XmnI Primer as: MZ99	
	PCR 1b: Template: #83 Primer s: MZ100 Primer as: RpQE	
86	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	M. Cerrolaza
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #82 Primer s: XmnI Primer as: MZ101	
	PCR 1b: Template: #82 Primer s: MZ102 Primer as: RpQE	
87	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	M. Cerrolaza
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #83 Primer s: XmnI Primer as: MZ101	
	PCR 1b: Template: #83 Primer s: MZ102 Primer as: RpQE	
88	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>CCTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>CCTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	M. Cerrolaza
	Verdau #82 EcoRI/BglII und #85 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente	
89	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	M. Cerrolaza
	Verdau #84 EcoRI/BglII und #85 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente	
90	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	M. Cerrolaza
	Verdau #86 EcoRI/BglII und #87 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente	
91	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	M. Cerrolaza
	Verdau #83 EcoRI/BglII und #87 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente	

92	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	M. Cerrolaza
	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	

Verdau #86 EcoRI/BglII und #85 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente

93	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	M. Cerrolaza
	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	

Verdau #82 EcoRI/BglII und #85 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente

94	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	M. Cerrolaza
	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	

Verdau #84 EcoRI/BglII und #83 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente

95	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	M. Cerrolaza
	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	

Verdau #82 EcoRI/BglII und #87 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente

96	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	M. Cerrolaza
	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	

Verdau #86 EcoRI/BglII und #83 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente

Es wurden weiterhin Längenmodifikationen sowie Punktmutationen der CTE1 und CTE2 untersucht, diese Mutationen wurden bevorzugt durch QuikChange PCR eingeführt, mit anschließender Transformation in *E. coli* XL1 blue. Nach Bestätigung der richtigen Sequenz wurde eine Transformation in *E. coli* BL21 [DE3] durchgeführt und die Kombination der 'C1' und 'C2' wie in Abb. 2.6 dargestellt kloniert. In Tab. 2.2 sind alle hierzu verwendeten Primer aufgelistet.

Nr.	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
97	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-439) Rv1625 <sub>CTE</sub> (288-237) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit

Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L

PCR 1a: Template: #82 Primer s: XmnI Primer as: MZ115

PCR 1b: Template: #82 Primer s: MZ114 Primer as: RpQE

## Material und Methoden

98	Rv1625c(204-217) Rv1625c <sub>CTE</sub> (218- <b>227</b> ) ACV <sub>CTE1</sub> ( <b>440</b> -449) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #82 Primer s: XmnI Primer as: MZ117	
	PCR 1b: Template: #82 Primer s: MZ116 Primer as: RpQE	
99	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449; <b>E432R L436H</b> ) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #84 Primer s: MZ120 Primer as: MZ121	
100	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449; <b>E446H</b> ) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #84 Primer s: MZ122 Primer as: MZ123	
101	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430- <b>439</b> ) Rv1625c <sub>CTE</sub> ( <b>288</b> -237) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
1B	Rv1625c(204-217) Rv1625c <sub>CTE</sub> (218-237) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	
	Verdau #97 EcoRI/BglII und #83 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente	
102	Rv1625c(204-217) Rv1625c <sub>CTE</sub> (218- <b>227</b> ) ACV <sub>CTE1</sub> ( <b>440</b> -449) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
1C	Rv1625c(204-217) Rv1625c <sub>CTE</sub> (218-237) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	
	Verdau #98 EcoRI/BglII und #83 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente	
103	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449; <b>E432R L436H</b> ) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
1D	Rv1625c(204-217) Rv1625c <sub>CTE</sub> (218-237) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	
	Verdau #99 EcoRI/BglII und #83 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente	
104	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449; <b>E446H</b> ) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
1E	Rv1625c(204-217) Rv1625c <sub>CTE</sub> (218-237) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	
	Verdau #100 EcoRI/BglII und #83 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente	
105	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038- <b>1079</b> ) Rv1625c <sub>CHD</sub> ( <b>257</b> -443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #87 Primer s: XmnI Primer as: MZ103	
	PCR 1b: Template: #87 Primer s: MZ104 Primer as: RpQE	
106	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038- <b>1056</b> ) Rv1625c <sub>CHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
	QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue	
	Template: #87 Primer s: MZ108 Primer as: MZ107	

107	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> ( <b>1037-1056</b> ) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
<p>QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue</p> <p>Template: #106 Primer s: MZ108 Primer as: MZ109</p>		
108	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> ( <b>1037-1057</b> ) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
<p>QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue</p> <p>Template: #87 Primer s: MZ108 Primer as: MZ109</p>		
109	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> ( <b>1036-1057</b> ) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
<p>QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue</p> <p>Template: #87 Primer s: MZ110 Primer as: MZ111</p>		
110	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> ( <b>1035-1057</b> ) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
<p>QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue</p> <p>Template: #87 Primer s: MZ112 Primer as: MZ113</p>		
111	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057; <b>K1049A</b> ) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
<p>QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue</p> <p>Template: #87 Primer s: MZ118 Primer as: MZ119</p>		
112	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>CCTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
2B	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038- <b>1079</b> ) Rv1625 <sub>CCHD</sub> ( <b>257-443</b> ; D256S D300S S301T)	
<p>Verdau #82 EcoRI/BglII und #105 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente</p>		
113	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>CCTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
2C	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> (1038- <b>1056</b> ) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	
<p>Verdau #82 EcoRI/BglII und #106 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente</p>		
114	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>CCTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
2D	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> ( <b>1037-1056</b> ) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	
<p>Verdau #82 EcoRI/BglII und #107 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente</p>		
115	Rv1625c(204-217) Rv1625 <sub>CCTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; N372T R376H) TRAAGGPPAAGGRS	diese Arbeit
2E	Rv1625c(204-217) ACV <sub>CTE2</sub> ( <b>1037-1057</b> ) Rv1625 <sub>CCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	
<p>Verdau #82 EcoRI/BglII und #108 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente</p>		

116	Rv1625c(204-217) TRAAGGPPAAGGRS	Rv1625 <sub>C<sub>TE</sub></sub> (218-237)	Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; N372T R376H)	diese Arbeit
2F	Rv1625c(204-217) S301T)	ACV <sub>C<sub>TE</sub>2</sub> ( <b>1036</b> -1057)	Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; D256S D300S	
Verdau #82 EcoRI/BglII und #109 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente				
117	Rv1625c(204-217) TRAAGGPPAAGGRS	Rv1625 <sub>C<sub>TE</sub></sub> (218-237)	Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; N372T R376H)	diese Arbeit
2G	Rv1625c(204-217) S301T)	ACV <sub>C<sub>TE</sub>2</sub> ( <b>1035</b> -1057)	Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; D256S D300S	
Verdau #82 EcoRI/BglII und #110 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente				
118	Rv1625c(204-217) TRAAGGPPAAGGRS	Rv1625 <sub>C<sub>TE</sub></sub> (218-237)	Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; N372T R376H)	diese Arbeit
2H	Rv1625c(204-217) S301T)	ACV <sub>C<sub>TE</sub>2</sub> (1038-1057; <b>K1049A</b> )	Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; D256S D300S	
Verdau #82 EcoRI/BglII und #111 BamHI/EcoRI, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente				

### Klonierung der Membranproteine

Zur Untersuchung des Einflusses der beiden AC V CTE's auf die Signaltransduktion wurden Chimären mit dem LqsS-Rezeptor hergestellt. Die homodimeren Chimären LqsS-ACV CTE1-Rv1625c bzw. LqsS-ACV CTE2-Rv1625c wurden durch Restriktionsverdau hergestellt. Durch den Verdau mit StuI und HindIII konnte der C-terminale Teil der CHD von Rv1625c durch den ohne Mutationen ersetzt werden. Die singuläre Schnittstelle StuI befindet sich an AS-Position A250/S251 und damit N-terminal der individuellen 'C1'/'C2' Mutationen (vgl. auch Abb. 2.6). Sie wurden in pQE80L kloniert und in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert.

Nr.	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
119	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>C<sub>TE</sub>1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443)	diese Arbeit
Verdau #30 und #124 StuI/HindIII, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente		
120	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>C<sub>TE</sub>2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443)	diese Arbeit
Verdau #30 und #125 StuI/HindIII, anschließend Ligation der entsprechenden Fragmente		
121	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>C<sub>TE</sub>1</sub> (430-449; <b>E446H</b> ) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443)	U. Kurz
QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue Template: #119 Primer s: MZ122 Primer as: MZ123		
122	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>C<sub>TE</sub>2</sub> (1038-1057; <b>K1049A</b> ) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443)	U. Kurz
QuikChange PCR, anschließend DpnI Verdau und Transformation in <i>E. coli</i> XL1 blue Template: #120 Primer s: MZ118 Primer as: MZ119		

Die heterodimeren Membranproteine wurden für den Aktivitätstest koexprimiert, da sie in den gleichen Membranfragmenten nach der Aufreinigung verankert sein müssen. Es wurde hierfür der Vektor pETDuet-3 eingesetzt, er besitzt zwei gleichwertig IPTG-induzierbare MCS. Da beide in den Vektor einzusetzende Konstrukte in ihrer DNA-Sequenz größtenteils identisch waren, erfolgte die Klonierung auch hier separat voneinander in pQE80L. Zunächst wurde LqsS<sub>1-187</sub> an die jeweilige CTE durch Fusions-PCR angeknüpft und anschließend über BamHI/HindIII Verdau in pQE80L eingesetzt (Nr. 123-128). Die 'C1'-Chimären wurden gleichzeitig in die MCS1 von pETDuet-3 eingesetzt (Nr. 123-125). Die Transformation erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3). An die 'C2'-Chimären wurde durch PCR die N-terminale Schnittstelle NdeI und die C-terminale Schnittstelle EcoRV angefügt (Primer MZ131 und 132, Tab. 2.2) und anschließend durch Restriktionsverdau in die MCS2 eingesetzt. Es konnten nicht alle neun Kombinationsmöglichkeiten erfolgreich kloniert werden (Nr. 129-133).

Nr.	Domänenorganisation und Klonierung	Herkunft
123	MCS1: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; N372T R376H)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in MCS1 von pET-Duet3	
	PCR 1a: Template: #25 Primer s: UpQE Primer as: MZ124	
	PCR 1b: Template: #82 Primer s: MZ125 Primer as: MZ130	
124	MCS1: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; N372T R376H)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in MCS1 von pET-Duet3	
	PCR 1a: Template: #25 Primer s: UpQE Primer as: MZ126	
	PCR 1b: Template: #84 Primer s: MZ127 Primer as: MZ130	
125	MCS1: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; N372T R376H)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in MCS1 von pET-Duet3	
	PCR 1a: Template: #25 Primer s: UpQE Primer as: MZ128	
	PCR 1b: Template: #86 Primer s: MZ129 Primer as: MZ130	
126	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>CTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #25 Primer s: UpQE Primer as: MZ124	
	PCR 1b: Template: #83 Primer s: MZ125 Primer as: MZ130	
127	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>C<sub>CHD</sub></sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #25 Primer s: UpQE Primer as: MZ126	
	PCR 1b: Template: #85 Primer s: MZ127 Primer as: MZ130	

128	LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>cCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
	Fusions-PCR, anschließend Verdau BamHI/HindIII und Ligation in pQE80L	
	PCR 1a: Template: #25 Primer s: UpQE Primer as: MZ128	
	PCR 1b: Template: #87 Primer s: MZ129 Primer as: MZ130	
129	MCS1: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>cCTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>cCHD</sub> (238-443; N372T R376H) MCS2: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>cCTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>cCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstellen NdeI und EcoRV, anschließend Verdau NdeI/EcoRV und Ligation in MCS2 von #123	
	PCR: Template: #126 Primer s: MZ131 Primer as: MZ132	
130	MCS1: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>cCHD</sub> (238-443; N372T R376H) MCS2: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>cCTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>cCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstellen NdeI und EcoRV, anschließend Verdau NdeI/EcoRV und Ligation in MCS2 von #124	
	PCR: Template: #126 Primer s: MZ131 Primer as: MZ132	
131	MCS1: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>CTE1</sub> (430-449) Rv1625 <sub>cCHD</sub> (238-443; N372T R376H) MCS2: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>cCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstellen NdeI und EcoRV, anschließend Verdau NdeI/EcoRV und Ligation in MCS2 von #124	
	PCR: Template: #128 Primer s: MZ131 Primer as: MZ132	
132	MCS1: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) Rv1625 <sub>cCTE</sub> (218-237) Rv1625 <sub>cCHD</sub> (238-443; N372T R376H) MCS2: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>cCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstellen NdeI und EcoRV, anschließend Verdau NdeI/EcoRV und Ligation in MCS2 von #123	
	PCR: Template: #128 Primer s: MZ131 Primer as: MZ132	
133	MCS1: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>cCHD</sub> (238-443; N372T R376H) MCS2: LqsS <sub>Rezeptor</sub> (1-K187) ACV <sub>CTE2</sub> (1038-1057) Rv1625 <sub>cCHD</sub> (238-443; D256S D300S S301T)	diese Arbeit
	PCR für Restriktionsschnittstellen NdeI und EcoRV, anschließend Verdau NdeI/EcoRV und Ligation in MCS2 von #125	
	PCR: Template: #128 Primer s: MZ131 Primer as: MZ132	

## 3 Ergebnisse

Die für die Signaltransduktion über eine Membran verantwortlichen Proteine bestehen mindestens aus einer in der Membran lokalisierten Rezeptordomäne und einer im Cytosol lokalisierten Effektor-domäne. Häufig besitzen sie zusätzlich noch eine oder mehrere dazwischen liegende Domänen, die das Signal weiterleiten und dabei modifizieren können. In dieser Arbeit wurden mit der S-Helix und der CTE zwei solcher Domänen untersucht, die CTE wurde erstmals charakterisiert.

Adenylatcyclasen (ACn) katalysieren den Umsatz von ATP zu cAMP. In dieser Arbeit kam das radioaktiv markierte Substrat [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-ATP zum Einsatz, es wurde die Menge an gebildetem  $^{32}\text{P}$ -cAMP bestimmt (2.10). Für membranständige bakterielle ACn ist kein Ligand bekannt, daher erfolgte die Untersuchung der Signaltransduktion mit chimären Enzymen, bei denen die Rezeptordomäne von anderen Enzymen mit bekannten Liganden stammte. Zuvor waren viele Chimären mit den Chemotaxisrezeptoren aus *E. coli* für Serin, Tsr, bzw. Aspartat, Tar, erfolgreich charakterisiert worden, die Expression der Membranproteine erfolgte homolog in *E. coli* [1, 35, 82, 83].

### 3.1 Die S-Helix als Modul in Tsr Chimären

Die S-Helix aus der Klasse IIIa AC CyaG aus *Arthrospira maxima* ist 25 ASn lang und verbindet die an die Transmembrandomäne folgende HAMP Domäne mit der CHD. Ihre Charakterisierung erfolgte von K. Winkler in Chimären mit dem Tsr Rezeptor [151]. Die ursprünglich durch Serin gehemmte Chimäre wurde nach der Deletion der S-Helix bzw. der zusätzlichen Insertion von 25 oder 18 ASn langen S-Helices durch Serin stimuliert. Es wurde gezeigt, dass für die Signalinversion durch die S-Helix eine Deletion von einer bis drei Heptaden und einem Stutter (1, 2, 3 x 7 + 4) nötig ist. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob die S-Helix als eigenständiges Modul auch in der Klasse IIIb AC Rv3645 fungieren kann.

#### 3.1.1 Chimären mit Rv3645 AC

Bei der Rv3645 AC handelt es sich um eine Klasse IIIb AC, die eine HAMP Domäne zwischen Rezeptor und Cyclase Domäne besitzt. Als Ausgangskonstrukt diente die Chimäre **Tsr<sub>Rezeptor</sub>-Af1503<sub>HAMP</sub>-Rv3645<sub>CHD</sub>** von L. García Mondéjar mit den beiden Punktmutationen S288I und A291I in der HAMP Domäne. Bei einer Basalaktivität von etwa 18 nmol cAMP·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> zeigte sie eine 59%ige Hemmung durch 10 mM Serin [152]. Hier wurde die S-Helix in den Längen von 25, 18, 11 und 2x 18 ASn zwischen HAMP und Rv3645 AC eingefügt und auf Regulation durch L-Serin untersucht (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Konstrukte mit  $Tsr_{\text{Rezeptor}}\text{-Af1503}_{\text{HAMP}}\text{-CyaG}_{\text{S-Helix}}\text{-Rv3645}_{\text{CHD}}$ . Angegeben ist die verwendete AS Sequenz der S-Helix, die Anzahl eingefügter ASn sowie die Charakteristika der resultierenden Chimären.  $n=2$ ,  $\pm$  S.E.M. In der ersten Zeile grau hinterlegt sind Angaben zur Referenzchimäre von L. García Mondéjar [1].

S-Helix von CyaG [AS Sequenz]	Anzahl ASn	Basalaktivität [nmol cAMP·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	Hemmung bei 10 mM Serin [%]
–	0	17,7	-59
ALENTNRELEQRLERTAAALLQEKE	25	10,3 $\pm$ 5,2	<i>nicht reguliert</i>
ELEQRLERTAAALLQEKE	18	13,0 $\pm$ 3,5	-25,3
ERTAALLQEKE	11	22,2 $\pm$ 0,5	<i>nicht reguliert</i>
2x (ELEQRLERTAAALLQEKE)	2x 18	4,7 $\pm$ 2,1	<i>nicht reguliert</i>

Das Einfügen der S-Helix mit 25, 11 bzw. zweimal 18 ASn führte mit 10,3, 22,2 bzw. 4,7 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> zu aktiven, aber nicht regulierten Chimären. Wurden 18 ASn eingesetzt (ELEQRLERTAAALLQEKE), war die Chimäre mit 13 nmol cAMP·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> aktiv und wurde bei 10 mM Serin zu 25,3% gehemmt. Eine Signalumkehr durch das Einfügen der S-Helix wurde nicht beobachtet.

In einem zweiten Ansatz diente die Chimäre  $Tsr_{\text{Rezeptor}}\text{-}Tsr_{\text{HAMP}}\text{-Rv3645}_{\text{CHD}}$  von K. Kanchan als Ausgangskonstrukt. K. Winkler beobachtete durch das Einfügen der S-Helix (Gesamtlänge 25 ASn) zwischen HAMP Domäne und CHD keine Signalumkehr, die Chimäre war wie das Ausgangskonstrukt aktiv und durch Serin gehemmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von Verkürzungen der S-Helix untersucht. Das Einfügen der verkürzten S-Helix mit 18 bzw. 11 ASn resultierte in aktiven Chimären, die gehemmt wurden. Die Chimären unterschieden sich somit nicht wesentlich von den Ausgangskonstrukten (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Konstrukte mit  $Tsr_{\text{Rezeptor}}\text{-}Tsr_{\text{HAMP}}\text{-CyaG}_{\text{S-Helix}}\text{-Rv3645}_{\text{CHD}}$ . Angegeben ist die verwendete AS Sequenz der S-Helix sowie die Charakteristika der resultierenden Chimären.  $n=1-2$ ,  $\pm$  S.E.M. In den ersten beiden Zeilen grau hinterlegt sind Angaben zu den Referenzchimären von K. Kanchan [153], sowie K. Winkler (unveröffentlicht).

S-Helix von CyaG [AS Sequenz]	Anzahl ASn	Basalaktivität [nmol cAMP·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	Hemmung bei 10 mM Serin [%]
–	0	18,2	-71
ALENTNRELEQRLERTAAALLQEKE	25	9,8	-31
ELEQRLERTAAALLQEKE	18	6,4	-54,8
ERTAALLQEKE	11	24,0 $\pm$ 1,7	-61,0 $\pm$ 10,2

### 3.1.2 Chimären mit CyaG AC

Es wäre möglich, dass die S-Helix nicht mit der Klasse IIIb CHD von Rv3645 kompatibel ist, daher wurde die Klasse IIIa AC CyaG eingesetzt. Ausgehend von der von K. Winkler untersuchten Tsr<sub>Rezeptor</sub>-CyaG<sub>HAMP</sub>-CyaG<sub>S-Helix</sub>-CyaG<sub>CHD</sub> Chimäre wurde in der vorliegenden Arbeit die HAMP Domäne durch die von Af1503 (S288I/A291I) ersetzt. Es resultierten die Dreifachchimären **Tsr<sub>Rezeptor</sub>-Af1503<sub>HAMP</sub>-CyaG<sub>S-Helix</sub>-CyaG<sub>CHD</sub>** bzw. **Tsr<sub>Rezeptor</sub>-Af1503<sub>HAMP</sub>-CyaG<sub>CHD</sub>**. HAMP Domänen bestehen aus zwei gleichlangen Helices zu je 19-22 ASn, die durch einen ca. 12 ASn langen Konnektor verknüpft sind. Im dimeren Enzym bildet das Vierhelixbündel eine coiled-coil Struktur aus. Bei der Durchnummerierung der ASn mit 'abcdefg' (eine Heptade) befinden sich an den Positionen a und d stets die in der coiled-coil nach innen gerichteten, die Struktur stabilisierenden, hydrophoben ASn (grau hinterlegt in Abb. 3.1).

<u>HAMP:</u>	Helix 1	Konnektor	Helix 2
<b>Tsr</b>	ASLIVAPMNRLIDSIRHIAG	G-----DLVKPIE-VDGS	NEMGQLAESLRHMQGELMRTVG
<b>Af1503</b>	STITRPIIEL <u>i</u> NT <u>i</u> DKIAE	G-----NLEAEVPHQNR	DEIGILAKSIERLRRSLKVAME
<b>CyaG</b>	RWISEPILRLSEASSAIAS	GARNATASAELNQKVKVE-KI	RELGMLSESFNMMIQNLRDSFI
	--d---a--d---a--d--		--a--d---a--d---a-----

Abb. 3.1 Alignment der AS Sequenz der HAMP Domänen von Tsr, Af1503 und CyaG. Darunter ist die Heptadennummerierung 'abcdefg' angegeben, die ASn an den Positionen a und d grau hinterlegt. Die von L. García Mondéjar eingeführten Mutationen S288I/A291I sind in unterstrichenen Kleinbuchstaben dargestellt (in Helix 1).

Es wurde angenommen, dass die S-Helix die Sekundärstruktur einer Helix besitzt und die Rotation der zweiten Helix der HAMP Domäne fortsetzt. Für zwei volle Umdrehungen in einer kanonischen coiled-coil sind sieben ASn nötig. Eine Deletion von drei ASn wird Stutter, eine Deletion von vier ASn Stammer genannt. Sie sorgen in einer kanonischen coiled-coil für eine Unter- bzw. Überdrehung der Helix [31]. Die Anknüpfung der CyaG-Domäne(n) erfolgte unter diesem Aspekt an die um null bis drei ASn verkürzte HAMP von Af1503 (siehe Abb. 3.2). In Chimären ohne S-Helix folgte auf die jeweilige HAMP-Sequenz direkt die CHD von CyaG, beginnend mit R<sub>456</sub>SEELL.

Die Helix 2 der HAMP Domänen von CyaG und Af1503 sind gleich lang. Bei einer Fortsetzung der Heptadennummerierung müsste daher das Glutamat (E) der Af1503 HAMP die am besten geeignete Anknüpfposition für die S-Helix bzw. CHD darstellen. Die am wenigsten geeignete Anknüpfposition müsste entsprechend Valin (V) darstellen, da dann die geladenen ASn Arginin (R) und Glutamat (E) an die a und d Positionen rücken (Abb. 3.2).

<b>E</b>	<u>LRRSLK</u> <u>VAME</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>E</u>
<b>E</b>	<u>LRRSLK</u> <u>VAME</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>E</u>
<b>M</b>	<u>LRRSLK</u> <u>VAME</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>E</u>
<b>A</b>	<u>LRRSLK</u> <u>VAME</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>E</u>
<b>V</b>	<u>LRRSLK</u> <u>VAME</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>E</u>
	d---a--d---a--d---a--

Abb. 3.2 Sequenzauszug um die Verknüpfungsstelle von Af1503 HAMP (unterstrichen) mit der 25 bzw. 18 ASn langen S-Helix von CyaG (kursiv). Links neben den Sequenzen ist die Bezeichnung der Chimären (wie in Abb. 3.3) angegeben. Unter den Sequenzen ist die Nummerierung in Heptaden a bis g aus der HAMP Domäne fortgesetzt dargestellt, die Positionen a und d sind grau hinterlegt.

Keine der Chimären wurde signifikant durch 1 mM Serin reguliert, was auch in der geringen n-Zahl begründet sein könnte (Abb. 3.3). Es wurden jedoch Tendenzen beobachtet. Bei der Anknüpfung an die Af1503 HAMP Domäne mit voller Länge, an Glutamat, wurde kein Unterschied zwischen der 25 ASn und der 18 ASn langen S-Helix festgestellt, beide Chimären waren mit etwa 10 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> aktiv und wurden zu etwa 15% gehemmt. Ohne S-Helix wurde hingegen eine Stimulation von 13% gemessen. Es wurde hier eine Signalinversion durch die S-Helix beobachtet, auch wenn die Regulation um 15% relativ schwach und nicht signifikant ausfiel.

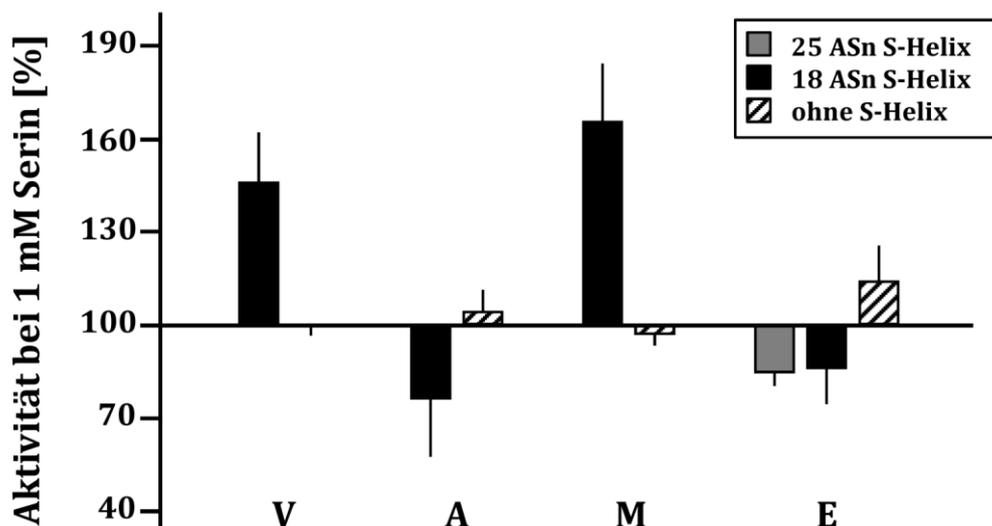


Abb. 3.3 Aktivitäten der Tsr<sub>Rezeptor</sub>-Af1503<sub>HAMP</sub>-CyaG Chimären bei 1 mM Serin. 100% Aktivität entspricht der Basalaktivität. Die Buchstaben V, A, M und E stehen für die ASn der Af1503 HAMP, an welcher die CyaG angeknüpft wurde (vgl. Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Grau: mit 25 ASn S-Helix, schwarz: mit 18 ASn S-Helix, gestreift: ohne S-Helix. n = 2-3, ± S.E.M. 20 µg Protein. Keine Signifikanzen.

Alle Chimären ohne S-Helix wiesen geringe Basalaktivitäten auf, diejenigen mit verkürzter HAMP Domäne waren durch Serin nicht reguliert (Tab. 3.3 und Abb. 3.3). Daher konnte hier eine Signalinversion durch die S-Helix ausgeschlossen werden.

Tab. 3.3 Basalaktivitäten und Regulation durch Serin in % der  $Tsr_{\text{Rezeptor}}\text{-Af1503}_{\text{HAMP}}\text{-CyaG}_{\text{S-Helix}}\text{-CyaG}_{\text{CHD}}$  Chimären.  $n = 2-3$ ,  $\pm$  S.E.M. Anknüpfpositionen an Af1503 HAMP waren V, A, M oder E; Länge der S-Helix betrug 18 oder 25 ASn. n.r. = nicht reguliert, positive Regulation = Stimulation, negative Regulation = Hemmung.

AS in Af1503	V		A		M		E		
Länge S-Helix [Anzahl ASn]	18	-	18	-	18	-	25	18	-
Basalaktivität [nmol·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	5,1 ±1,3	1,4 ±0,4	13,3 ±2,2	1,0 ±0,3	1,7 ±0,5	3,5 ±1,2	8,9 ±0,5	11,9 ±0,6	1,0 ±0,1
Regulation bei 1 mM Serin [%]	+44,9 ±16,3	n.r.	-23,4 ±18,9	n.r.	+64,4 ±19,0	n.r.	-15,4 ±4,5	-13,9 ±11,5	+13,0 ±11,6

War jedoch die S-Helix mit 18 ASn in den Chimären vorhanden, dann wurde Regulation durch Serin beobachtet. Es zeigte sich ein alternierendes Muster von Stimulation und Hemmung: So resultierte die Anknüpfung an Valin (V) in einer Stimulation von 44,9%, an Alanin (A) in einer Hemmung von 23,4%, an Methionin (M) in einer Stimulation von 64,4% und an Glutamat (E) in einer Hemmung von 13,9% (schwarze Balken in Abb. 3.3). Diese beobachtete Signalinversion bzgl. der Chimären mit S-Helix muss demnach in der Anknüpfung an die sukzessiv verkürzte HAMP Domäne begründet sein.

### 3.1.3 Chimären mit Rv1625c AC

CyaG und Rv1625c sind Klasse IIIa ACn, allerdings besitzt Rv1625c im Gegensatz zu CyaG keine HAMP Domäne und keine S-Helix. Es wurden Dreifachchimären  $Tsr_{\text{Rezeptor}}\text{-CyaG}_{\text{HAMP}}\text{-[CyaG}_{\text{S-Helix}}]\text{-Rv1625c}_{\text{CHD}}$  erzeugt, um zu untersuchen, ob die katalytische Domäne der Rv1625c durch das Vorschalten einer HAMP Domäne durch Serin reguliert werden kann. Außerdem wurde geprüft, ob die S-Helix hier als Modul fungiert.

Die Verknüpfung von Tsr, CyaG und Rv1625c resultierte in aktiven und signifikant durch Serin regulierten Proteinen (Abb. 3.4). Chimäre A, mit S-Helix, wurde durch 10 mM Serin mit  $54,7 \pm 5,7\%$  gehemmt und besaß mit  $99,1 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  eine hohe Basalaktivität. Die Chimären B und C sind 25 ASn kürzer als Chimäre A. Bei Chimäre B fehlte die S-Helix, die CyaG HAMP war direkt mit der CHD von Rv1625c verbunden, bei Chimäre C erfolgte diese Deletion um vier ASn N-terminal verschoben (Tab. 3.4).

Tab. 3.4 Sequenzauszug der drei A bis C nummerierten Tsr-CyaG-Rv1625c Dreifachchimären. ASn aus CyaG sind in Großbuchstaben, ASn aus Rv1625c in Kleinbuchstaben dargestellt. n=2, ± S.E.M. IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>= Halbmaximal wirksame Ligandenkonzentrationen.

	HAMP CyaG	S-Helix CyaG	CHD Rv1625c	Basalaktivität [nmol·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	
<b>A</b>	RDSFI	ALENTNRELEQRVLERTAALLQEKE	rseall	99,1 ± 15,8	IC <sub>50</sub> = 69nM
<b>B</b>	RDSFI	-----	rseall	7,7 ± 0,2	EC <sub>50</sub> = 1086nM
<b>C</b>	R----	-----QEKE	rseall	36,5 ± 5,2	EC <sub>50</sub> = 352nM

Chimäre B wurde durch 10 mM Serin mit 219,9 ± 21,3% stimuliert und besaß eine Basalaktivität von 7,7 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. Auch Chimäre C wurde durch Serin stimuliert, bei 10 mM lag die Stimulation bei 90,8 ± 8,4% und damit geringer, die Basalaktivität mit 36,5 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> höher als die von Chimäre B. In den drei Tsr-CyaG-Rv1625c Proteinen wurde das Vorzeichen der Regulation (Hemmung bzw. Stimulation durch Serin) von der An- und Abwesenheit der S-Helix beeinflusst. Sie waren vergleichbar exprimiert und auf ihrer mit 60,0 kDa (A) und 57,1 kDa (B, C) erwarteten Laufhöhe ohne Proteolyse detektiert (Abb. 3.4).

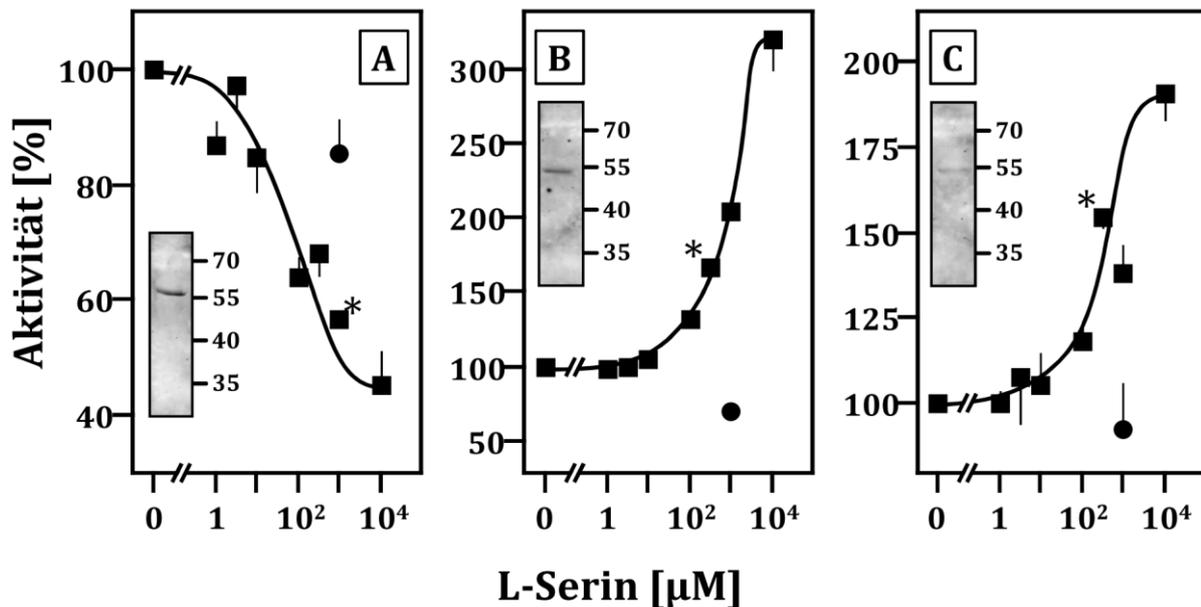


Abb. 3.4 Konzentrations-Wirkungskurven der Tsr-CyaG-Rv1625c Dreifachchimären. 100% Aktivität entspricht der Basalaktivität. Die AS Sequenzen von A, B und C sind in Tab. 3.4 angegeben. Maximale Regulation: A: -54,7 ± 5,7%, B: +219,9 ± 21,3%, C: +90,8 ± 8,4%. Quadrate: Serin, Kreis: Aspartat (Negativkontrolle). n=2, ± S.E.M. \*, p<0,05 zur Basalaktivität. 0,5 bis 3 µg Membranprotein. Inserts: Western Blot mit 1 µg Membranprotein.

Ein identischer Sequenzaufbau mit der CHD von CyaG statt Rv1625c war von K. Winkler durchgeführt worden [151]. Die Ergebnisse waren hinsichtlich der Regulation und der Basalaktivitäten ähnlich: Bei Chimäre A (mit S-Helix) trat Hemmung, bei Chimären B und C Stimulation auf, wobei die halbmaximale effektive Ligandenkonzentration (IC<sub>50</sub>

bzw. EC<sub>50</sub>) bei Chimäre B höher war. Auch besaß Chimäre C eine höhere Basalaktivität als Chimäre B.

### 3.2 LqsS - Rv1625c Chimären

Im Gegensatz zum Tsr Rezeptor mit 2 TM und einer großen extramembranaln Schleife besitzt der Quorum Sensing Rezeptor LqsS aus *Legionella pneumophila* eine 6 TM Rezeptordomäne mit kurzen extramembranaln Schleifen. Der 6 TM Rezeptor von LqsS ähnelt damit im Aufbau den 6 TM Membranankern von tierischen ACn sowie der mykobakteriellen AC Rv1625c (Abb. 1.4). Da von einer unterschiedlichen Dynamik der Signaltransduktion über 2 TM bzw. 6 TM Rezeptoren ausgegangen werden kann, wurde im nachfolgenden Teil der Dissertation mit LqsS ein neuer Rezeptor für chimäre ACn eingesetzt. LqsS-Rv1625c Chimären stellen aufgrund ihres ähnlichen Aufbaus ein Modellsystem für ACn von Säugetieren dar.

Ein Plasmid mit dem Gen der LqsS Histidinkinase kam von Hubert Hilbi (LMU, München), der Ligand LAI-1 wurde institutsintern synthetisiert [130, 154]. Die mykobakterielle AC Rv1625c war bereits biochemisch untersucht worden [75]. Die ersten enzymatisch aktiven und durch LAI-1 regulierten Chimären mit dem Rezeptor von LqsS und der CHD von Rv1625c wurden von S. Beltz getestet [138]. Die Chimären mit den Verknüpfungspositionen Y178, M182 und M191 seitens LqsS wurden verwendet. Die Daten waren vergleichbar und wurden zugunsten höherer n-Werte zusammengefasst (Tab. 3.5 und Abb. 3.5).

Alle LqsS Konstrukte waren, soweit nicht anders angegeben, in pQE80L kloniert und wurden *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Die Expression erfolgte bei 22°C mit 100 µM IPTG für 3-4 Stunden, anschließend wurde die Membranpräparation und der Aktivitätstest durchgeführt. In normalisierten Konzentrations-Wirkungskurven entspricht 100% Aktivität der Basalaktivität. Für den Western Blot wurde stets 1 µg Membranprotein aufgetragen.

Tab. 3.5 Übersicht über die ersten drei Chimären aus LqsS und Rv1625c. Sequenzauszüge sind mit jeweiligen Positionsnummern angegeben. Negative Regulation bedeutet Hemmung, positive Regulation bedeutet Stimulation durch LAI-1 (siehe auch Abb. 3.5). n = 3-10, ± S.E.M. †, p<0,001 zur Basalaktivität. 1,5 µg Membranprotein im AC-Test.

LqsS	Rv1625c	Basalaktivität [nmol mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	Regulation bei 1µM LAI-1 [%]	
LNY <sub>178</sub>	R <sub>218</sub> SEAL	4,9 ± 1,1	-64,5 ± 4,1†	IC <sub>50</sub> =65nM
LNYKTAM <sub>182</sub>		14,8 ± 3,4	-24,3 ± 3,3†	IC <sub>50</sub> =431nM
LNYKTAMLQQQLAGM <sub>191</sub>		26,4 ± 3,8	+19,5 ± 2,6†	EC <sub>50</sub> =48nM

Bei Tyrosin Y178 handelt es sich um die vermutlich letzte Aminosäure der sechsten TM-Helix, die Anknüpfung der CHD von Rv1625c erfolgte demnach direkt am Membranausgang von LqsS. Die Chimäre wurde durch 100  $\mu$ M LAI-1 zu 72,8% gehemmt. Auch bei der Anknüpfung vier ASn weiter vom Membranausgang entfernt (M182) wurde die Chimäre durch 100  $\mu$ M LAI-1 gehemmt, allerdings nur zu 51,4%. Im Gegensatz zu diesen beiden Chimären wurde die Chimäre mit Verknüpfungsposition M191 durch 10  $\mu$ M LAI-1 leicht, aber signifikant stimuliert (Abb. 3.5).

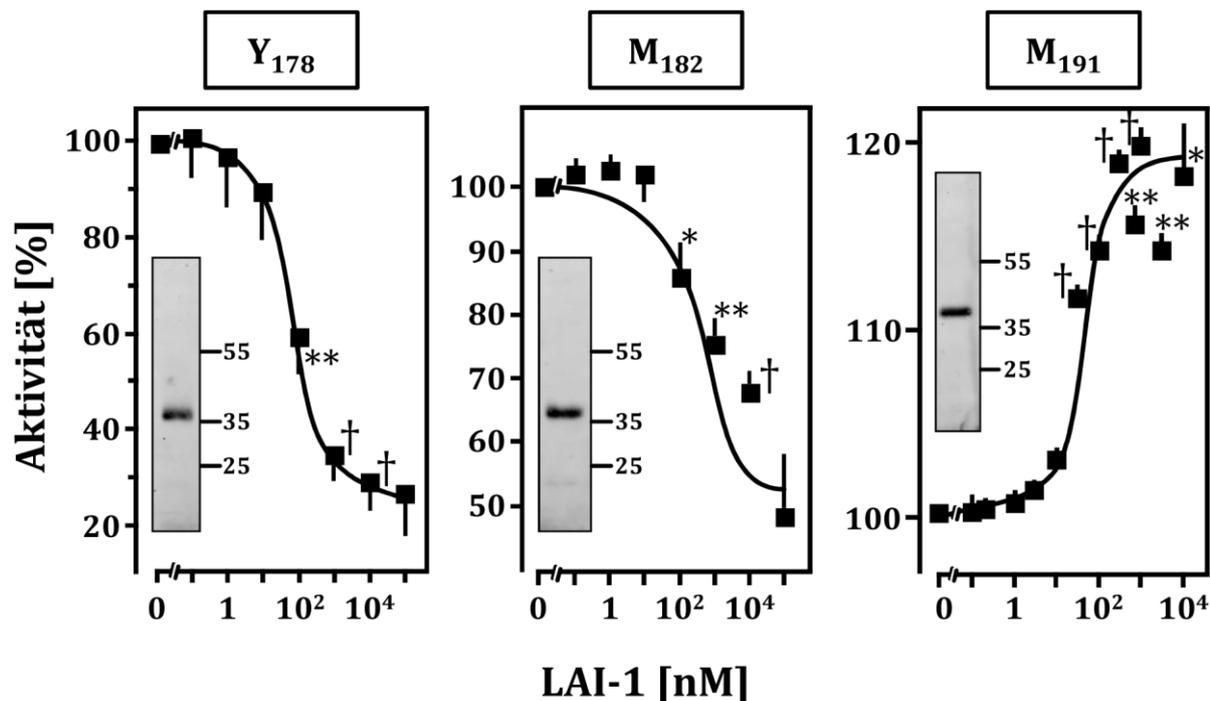


Abb. 3.5 Konzentrations-Wirkungskurven der drei initialen Chimären aus LqsS Rezeptor und Rv1625c CHD. 100% Aktivität entspricht der Basalaktivität.  $n = 3-10$ ,  $\pm$  S.E.M. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , †,  $p < 0,001$  zur Basalaktivität (Tab. 3.5). Im AC-Test wurden 1,5  $\mu$ g Membranprotein eingesetzt. Inserts: Western Blots mit 1  $\mu$ g Membranprotein.

Eine Zunahme der Basalaktivität wurde beobachtet, je weiter entfernt von der Membran die Anknüpfung an LqsS erfolgt war. Es wurde sowohl Hemmung als auch Stimulation durch LAI-1 beobachtet. Die  $IC_{50}$  bzw.  $EC_{50}$  Konzentrationen lagen mit 65, 431 und 48 nM LAI-1 (Y178, M182 bzw. M191) beieinander und deuteten auf eine ähnliche Ligandenaffinität hin. Im Western Blot war keine Proteolyse erkennbar, die Expressionslevel waren vergleichbar (Abb. 3.5). Die drei Chimären Y178, M182 und M191 waren bei 46,6, 47,0 und 48,0 kDa erwartet worden, wurden jedoch mit 36,3, 38,1 und 41,5 kDa detektiert. Dieser Shift in der Laufhöhe wurde bereits häufiger bei Membranproteinen mit mehreren TM-Helices beobachtet, sowohl in diesem Labor als auch in anderen Laboratorien weltweit [155]. Bei allen nachfolgenden 6 TM Proteinen wurde dieser Shift beobachtet, es wurden jedoch unterschiedliche Laufhöhen in Abhängigkeit der Proteingröße beobachtet.

### 3.2.1 Optimierung der Verknüfungsposition des LqsS-Rezeptors

Es sollte mit weiteren Chimären die Anknüpfpositionen seitens LqsS als auch seitens Rv1625c optimiert werden. Bei den drei initialen Chimären war der cytosolische Rezeptorbereich von LqsS verschieden lang, die Rv1625c AC war unverändert. Daher wurde hier zunächst die Verknüfungsposition seitens des LqsS Rezeptors untersucht. Hierfür wurde die Länge von LqsS variiert, während die Länge von Rv1625c (R<sub>218</sub>-V<sub>443</sub>) unverändert blieb. Interessant waren die Anknüpfpositionen zwischen M182 und M191, da diese beiden Chimären durch LAI-1 unterschiedlich reguliert wurden (Abb. 3.5). Es wäre denkbar, dass sich mit einer Verlängerung der LqsS Sequenz eine graduelle Abschwächung der Hemmung zeigt, die sich in eine zunehmende Stimulation umwandelt, oder, dass die Inversion bei einer bestimmten Länge von LqsS eintritt.

Tab. 3.6 Übersicht der in diesem Kapitel verwendeten Domänen (links) und die entsprechende AS Sequenzen mit relevanten Positionsnummern. Der LqsS Rezeptor wurde in variabler Länge eingesetzt, die Rv1625c CHD war konstant.

<b>LqsS Rezeptor</b>	M <sub>1</sub> SQLKKIVKHLDESMQRSLNSNSAHQLVAVGAIAFVGFPLFYVIWAFWLPQPY ENLPLRLIGSLLGLGLMLTPYWPLKWKQYLSWYWFLTLTLLFTLPYFFTFLLFLMN QASVISAMSLLCGVFLLVLLVDLLSIVLILGFSLALVSYLLVSPQMYFGEEHIQ MTLVIIFTIIAGSTLNY <sub>178</sub> KTAM <sub>182</sub> LQQQK <sub>187</sub> LAGM <sub>191</sub> AAAAGMIAHEL <sub>R203</sub> SPLLGKSG <sub>G212</sub> AQAL <sub>L216</sub>
<b>Rv1625c CHD</b>	R <sub>218</sub> SEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPA DLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFA LDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVWGDVNVA SRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKKGKGMRTWYLLIGRKV AADPGEVRGAEPRTAGV <sub>443</sub>

Die Anknüpfpositionen R203, G212 und L216 befinden sich inmitten bzw. C-terminal der sogenannten H-Box, der Phosphorylierungsregion der Histidinkinase. Auf diese drei Chimären wird in 3.3.2 eingegangen.

Tab. 3.7 Übersicht der Chimären von LqsS an R218-Rv1625c. Anknüpfung an LqsS war an der mit Positionsnummer angegebenen ASn erfolgt. n = 2-10, ± S.E.M. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, †, p<0,001 zur Basalaktivität. Negative Regulation bedeutet Hemmung, positive Regulation bedeutet Stimulation durch LAI-1 (siehe auch Abb. 3.6 und Abb. 3.7).

LqsS [Sequenzauszug]	Basalaktivität [nmol cAMP·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	Regulation bei 1 µM LAI-1 [%]	IC <sub>50</sub> [nM]	EC <sub>50</sub> [nM]
Y <sub>178</sub>	4,9 ± 1,1	-64,5 ± 4,1†	65	-
YKTAM <sub>182</sub>	14,8 ± 3,4	-24,3 ± 3,3**	431	-
YKTAML <sub>183</sub>	18,9 ± 2,0	+11,7 ± 6,9	-	250
YKTAMLQ <sub>184</sub>	57,8 ± 16,6	-18,7 ± 3,1*	62	-
YKTAMLQQ <sub>185</sub>	32,1 ± 1,9	+22,1 ± 3,5*	-	5
YKTAMLQQQ <sub>186</sub>	26,2 ± 3,9	-36,8 ± 3,3**	107	-
YKTAMLQQQK <sub>187</sub>	20,7 ± 1,7	+86,7 ± 3,7†	-	32
YKTAMLQQQKL <sub>188</sub>	45,6 ± 6,6	<i>nicht reguliert</i>	-	-
YKTAMLQQQKLA <sub>189</sub>	63,3 ± 2,9	<i>nicht reguliert</i>	-	-
YKTAMLQQQKLAGM <sub>191</sub>	26,4 ± 3,8	+19,5 ± 2,6†	-	48
YKTAMLQQQKLAGMA <sub>192</sub>	64,4 ± 19,1	+30,3 ± 5,3*	-	30
YKTAMLQQQKLAGMAAAA <sub>195</sub>	21,3 ± 2,1	<i>nicht reguliert</i>	-	-
YKTAMLQQQKLAGMAAAAAGM <sub>197</sub>	6,8 ± 0,1	<i>nicht reguliert</i>	-	-
R203	48,9 ± 4,0	<i>nicht reguliert</i>	-	-
G212	0,58 ± 0,04	<i>nicht reguliert</i>	-	-
L216	1,08 ± 0,18	<i>nicht reguliert</i>	-	-

Alle LqsS-Rv1625C<sub>218-443</sub> Chimären mit Anknüpfpositionen zwischen Y178 und M197 waren mit Basalaktivitäten zwischen 5 und 65 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> aktiv (Tab. 3.7). Es wurden keine Tendenzen oder Muster erkannt, auch nicht im Zusammenhang mit der Regulation. Die meisten der Chimären waren durch LAI-1 reguliert, es wurde sowohl Hemmung als auch Aktivierung beobachtet (Abb. 3.6). Die EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> Konzentrationen waren in derselben Größenordnung (Tab. 3.7).

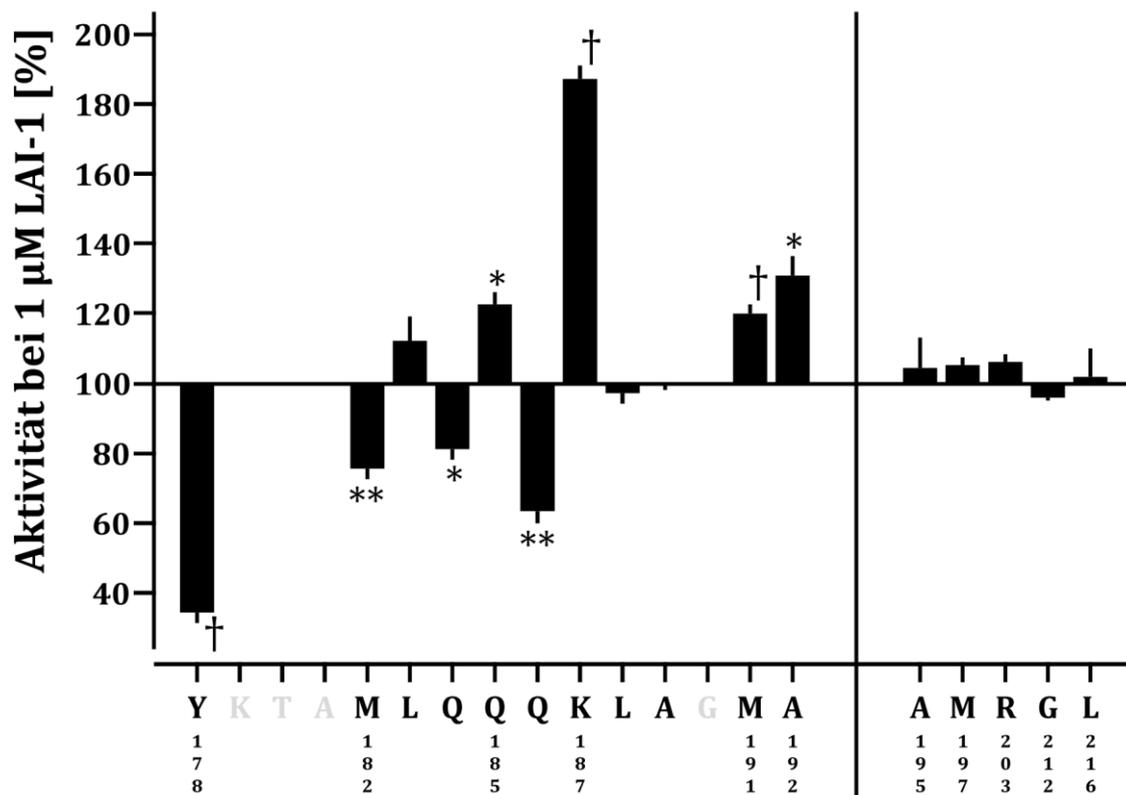


Abb. 3.6 Aktivitäten der Chimären von LqsS an R218-Rv1625c in % bei 1  $\mu$ M LAI-1; 100% Aktivität entspricht der Basalaktivität (Tab. 3.7). Die AS Sequenz von LqsS ist mit Positionsnummern fortlaufend (Y178-A192, links) und mit größeren Abständen (rechts) angegeben. In Schwarz dargestellte ASn repräsentieren jeweils die Anknüpfposition seitens LqsS. In Grau dargestellte ASn wurden nicht zur Generation von Chimären verwendet.  $n = 2-10$ ,  $\pm$  S.E.M. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , †,  $p < 0,001$  zur Basalaktivität.

Die LqsS-Rv1625c Chimären mit Anknüpfung an M182 bis K187 waren abwechselnd gehemmt und stimuliert. M182, Q184 und Q186 waren signifikant durch LAI-1 gehemmt mit -24,3, -18,7 und -36,8%, während L183, Q185 und K187 mit +11,7, +22,1 und +86,7% stimuliert waren (Abb. 3.6). Die Vorhersage der Sekundärstruktur weist diesem Bereich eine helikale Struktur zu ([www.compbio.dundee.ac.uk/jpred](http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred)). Interessanterweise war bei Chimären aus Kapitel 3.1.2 ebenfalls ein alternierendes Muster bei Veränderung der Anknüpfposition um eine ASn aufgetreten. Die Verkürzungen am Ende der HAMP Domäne lagen auch hier in einer helikalen Struktur.

Anknüpfungen an M191 und A192 resultierten in mit +19,5 und +30,3% signifikant stimulierten Chimären, wobei die Basalaktivität bei A192 mit  $64,4 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  höher lag, als bei M191 mit  $26,4 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (Tab. 3.7). Weitere Anknüpfungen, an A195, M197, R203, G212 und L216 (Abb. 3.6, rechts), wurden durch LAI-1 nicht signifikant reguliert.

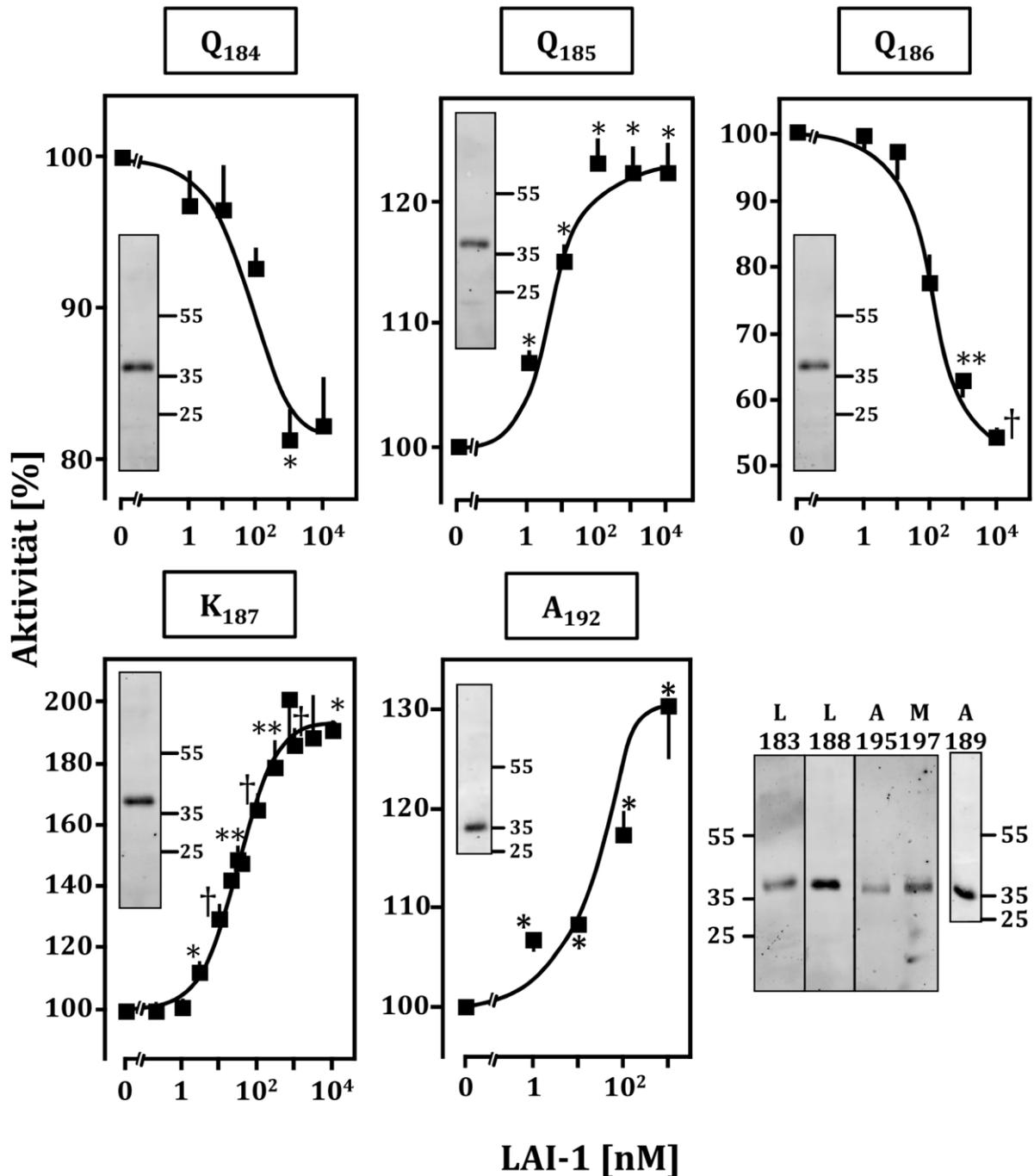


Abb. 3.7 Konzentrations-Wirkungskurven für Chimären mit unterschiedlicher Länge von LqsS-Rezeptor bei Anknüpfung an Rv1625C<sub>218-443</sub>. 100% Aktivität entspricht der Basalaktivität (Tab. 3.7). n = 3-6, ± S.E.M. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, †, p<0,001 zur Basalaktivität. Western Blot mit 1 µg Membranprotein sind als Insert der jeweiligen Chimäre dargestellt sowie von weiteren Chimären rechts unten. Es wurden 12,5%ige SDS-PAGE Gele verwendet (A189: 10%iges Gel).

Im Vergleich aller Anknüpfpositionen wurde die Chimäre Y178 mit 64,5% signifikant und am stärksten durch LAI-1 gehemmt, besaß aber mit 4,9 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> die niedrigste der Basalaktivitäten. Die Chimäre K187 war zu 86,7% signifikant und am stärksten durch LAI-1 stimuliert und besaß mit 20,7 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> eine moderate Basalaktivität. Schlussfolgernd wurde daher in LqsS-Rv1625c Chimären die Verknüpfung an K187 seitens des LqsS-Rezeptors als optimal bestimmt.

### 3.2.2 Optimierung der Verknüfungsposition der Rv1625c AC

Es wurde die optimale Anknüpfposition von Rv1625c untersucht. Dazu wurden Chimären mit verschiedenen Längen von Rv1625c erzeugt, während die Länge von LqsS unverändert blieb (Übersicht der Sequenzen in Tab. 3.8).

Tab. 3.8 Übersicht der in diesem Kapitel verwendeten Domänen (links) und die entsprechende AS Sequenzen mit relevanten Positionsnummern. Rv1625c CHD wurde in variabler Länge eingesetzt, LqsS war unverändert.

<b>LqsS Rezeptor</b>	M <sub>1</sub> SQLKKIVKHLDESMQRSLNSAHQLVAVGAIAFVGFPLFYVIWAFWLPQPY ENLPLRLIGSLLGLGLMLTPYWPLKWKQYLSWYWFLTLLFTLPYFFTFLLFLMN QASVISAMSLLCGVFLLVLLVDLLSIVLILGFSALVSYLLVSPQMYFGEEHIQ MTLVIIIFTIAGSTLNYKTAMLQQK <sub>187</sub>
<b>Rv1625c CHD</b>	<b>A<sub>214</sub>EHDR<sub>218</sub>SEALLANMLPASIAERLKE<sub>237</sub>PERNIIADKYDEASVLFADIVG</b> FTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRP DHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVLRLVGLATGPVVAGVVGSRFFYD VWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGV RTWYLIGRKVAADPGEVARGAEPRTAGV <sub>443</sub>

Tab. 3.9 Übersicht der Chimären von Rv1625c mit LqsS-K187. Anknüpfung an Rv1625c war an der mit Positionsnummer angegebenen ASn erfolgt. n = 2-6, ± S.E.M. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, †, p<0,001 zur Basalaktivität. Negative Regulation bedeutet Hemmung, positive Regulation bedeutet Stimulation durch LAI-1. Bei R218 handelt es sich um eine im vorangegangenen Kapitel angegebene Chimäre (fett).

<b>Rv1625c [Anknüpfposition]</b>	<b>Basalaktivität [nmol cAMP·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>]</b>	<b>Regulation bei 1 µM LAI-1 [%]</b>	<b>IC<sub>50</sub> [nM]</b>	<b>EC<sub>50</sub> [nM]</b>
A <sub>214</sub>	92,6 ± 40,3	nicht reguliert	-	-
E <sub>215</sub>	74,2 ± 21,6	nicht reguliert	-	-
H <sub>216</sub>	75,6 ± 20,2	nicht reguliert	-	-
D <sub>217</sub>	102,4 ± 30,2	nicht reguliert	-	-
<b>R<sub>218</sub></b>	<b>20,7 ± 1,7</b>	<b>+86,7 ± 3,7†</b>	-	<b>32</b>
S <sub>219</sub>	19,2 ± 3,0	-36,0 ± 1,8**	44	-
E <sub>220</sub>	5,0 ± 0,6	+97,2 ± 6,4**	-	100
A <sub>221</sub>	5,6 ± 1,9	+54,0 ± 22,3	-	35
L <sub>222</sub>	3,7 ± 0,5	+16,3 ± 1,1**	-	112
L <sub>223</sub>	0,44 ± 0,05	-14,9 ± 3,0*	40	-
A <sub>224</sub>	0,40 ± 0,04	nicht reguliert	-	-
K <sub>236</sub>	0,17 ± 0,01	nicht reguliert	-	-
E <sub>237</sub>	0,15 ± 0,01	nicht reguliert	-	-
P <sub>238</sub>	0,18 ± 0,01	nicht reguliert	-	-
E <sub>239</sub>	0,18 ± 0,02	nicht reguliert	-	-

Die Basalaktivitäten variierten zwischen 102,4 und 0,15 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, wobei eine deutliche Tendenz erkennbar war: Je weiter C-terminal die Anknüpfposition gewählt war, desto geringer war die gemessene Basalaktivität (Abb. 3.8).

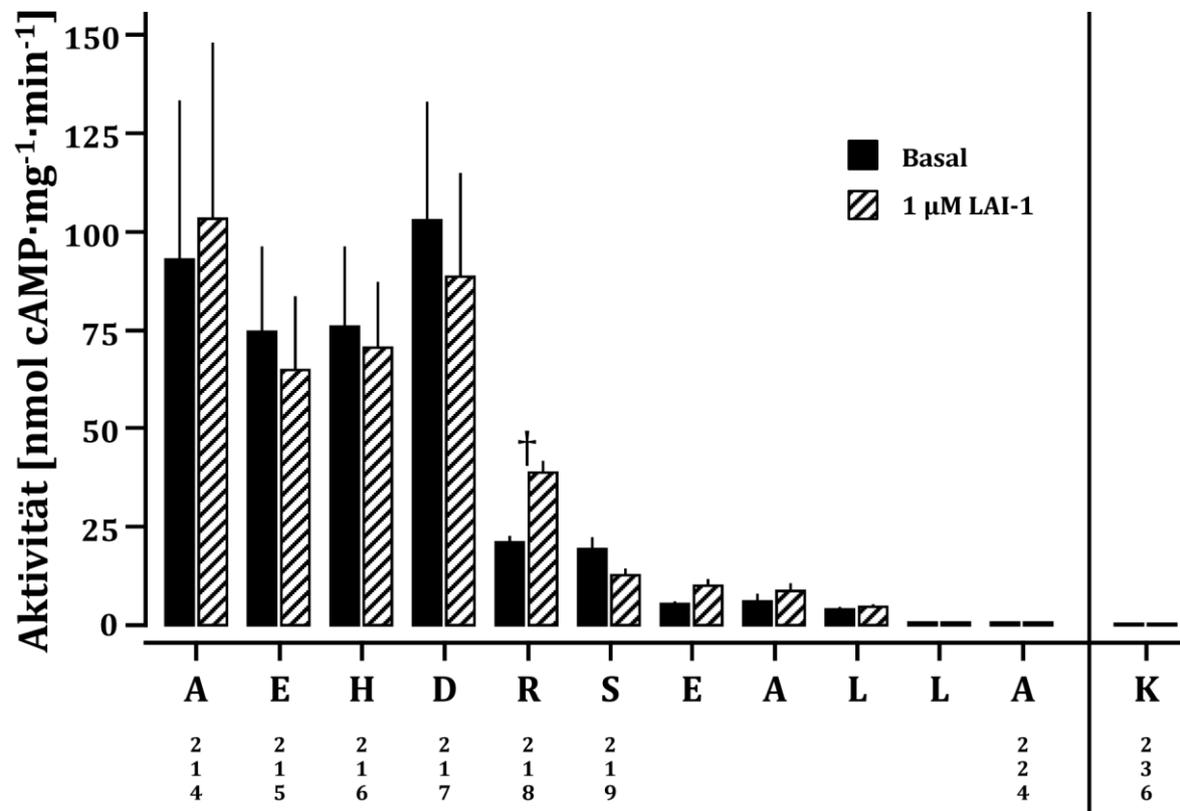


Abb. 3.8 Aktivitäten der Chimären von LqsS-Lys187 verknüpft mit Rv1625c an verschiedenen Positionen. Für jede Verknüpfungsposition ist unter Angabe der Aminosäure und Positionsnummer die Basalaktivität (schwarze Balken) und die Aktivität bei 1 μM LAI-1 (gestreifte Balken) angegeben (n = 2-6, ± S.E.M.). Nur die Chimäre LqsS-Lys187-Rv1625c<sub>218-443</sub> wurde signifikant stimuliert durch LAI-1 (†, p < 0,001).

Die vier Chimären mit den Anknüpfpositionen A214 bis D217 waren nicht durch LAI-1 reguliert und wiesen mit über 70 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> sehr hohe Basalaktivitäten auf. Bei den Anknüpfpositionen von R218 bis A224 wurde eine stetige Abnahme der Basalaktivität von 20,7 auf unter 0,5 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> beobachtet. Die Chimären R218 und E220 zeigten mit etwa 90% eine vergleichbare Stimulation, allerdings lag die Basalaktivität bei R218 mit 20,7 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> vierfach höher als bei E220 mit 5,0 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. In Abb. 3.9 sind von S219 bis L223 Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt. Bis auf A221 waren alle signifikant durch LAI-1 reguliert. Bei den Chimären von LqsS-Lys187 mit den Anknüpfpositionen an R218, E220, A221 und L222 trat Stimulation durch 1 μM LAI-1 von +86,7, +97,2, +54,0 bzw. +16,3% auf, während an S219 und L223 Hemmung durch 1 μM LAI-1 von -36,0 bzw. -14,9% auftrat. Wie bei den LqsS-Rv1625c<sub>218-443</sub> Chimären wurde auch hier eine Umkehr des Signals durch Verlängerung der Anknüpfpositionen um eine AS beobachtet (mit Ausnahme von A221). Bei Anknüpfung an K236 bis E239 lag die Basalaktivität bei unter 200 pmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, diese vier Chimären waren nicht reguliert durch LAI-1 (in Abb. 3.8 nur K236 gezeigt).

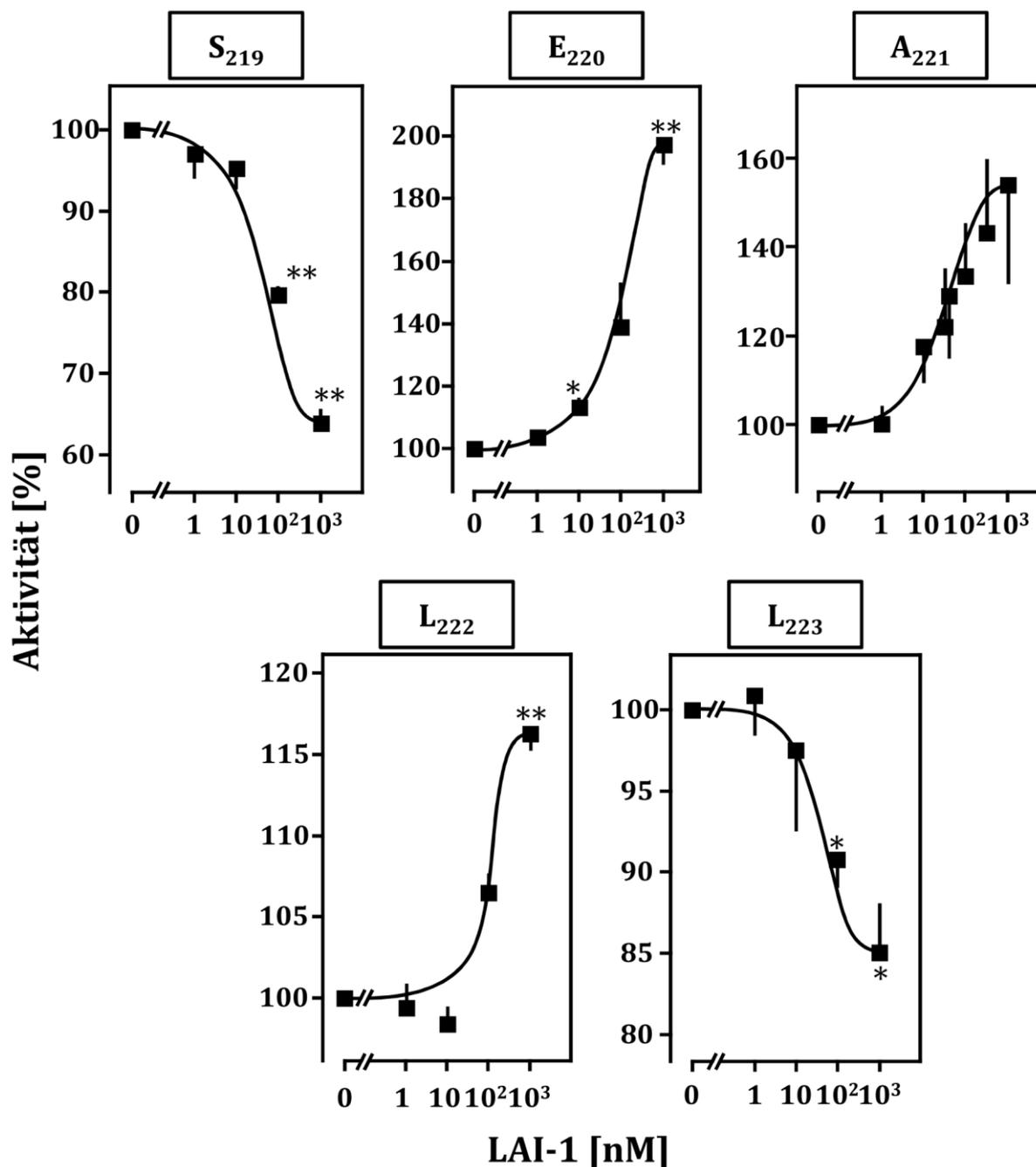


Abb. 3.9 Konzentrations-Wirkungskurven für Chimären mit unterschiedlicher Länge der Rv1625c Cyclase bei Anknüpfung an LqsS<sub>1-187</sub>. 100% Aktivität entspricht der Basalaktivität (Tab. 3.9). n = 3 ± S.E.M. \*, p < 0,05, \*\*, p < 0,01, †, p < 0,001 zur Basalaktivität. Standardtestbedingungen mit 1,5 µg Membranprotein.

In den Western Blots war keine Proteolyse erkennbar, die Expressionslevel variierten leicht (Abb. 3.10). Die Proteine waren bei Bandenhöhen zwischen 48,1 kDa (A214) und 45,3 (E240) erwartet worden, die Banden liefen jedoch auf einer Höhe von 36,2 kDa bis 35,0 kDa.

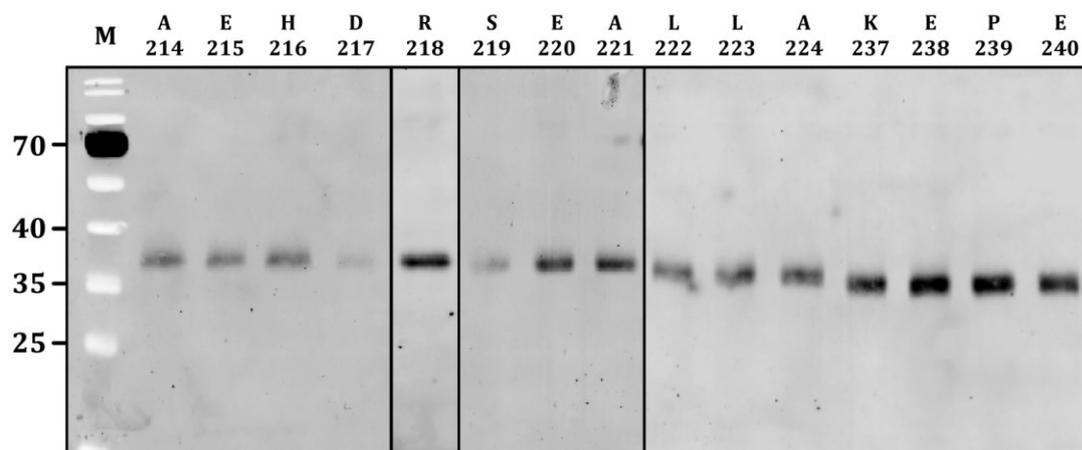


Abb. 3.10 Western Blots für die Chimären LqsS-Lys187 an Rv1625c, oben ist die AS mit Positionsnummer angegeben, an der Rv1625c angeknüpft wurde. Es wurde jeweils 1 µg Membranprotein aufgetragen. Spur M= Marker pEQLab IV.

Bei zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse aus den Versuchen zur optimalen Verknüpfungsposition zwischen LqsS und Rv1625c wurde das Konstrukt mit der Verknüpfung von **LqsS-Lys187 an Rv1625c-Arg218** als beste Chimäre gewertet und als Referenzchimäre für weitere Versuche eingesetzt.

### 3.3 Interaktionen LqsS Rezeptor mit CyaG HAMP und S-Helix

Die Histidinkinase LqsS aus *Legionella pneumophila* besitzt einen 6 TM Rezeptor, gefolgt von der cytosolischen Kinase/Phosphatase Domäne. Viele ACn besitzen weitere cytosolische Domänen zwischen Rezeptor- und Effektor-domäne, die als Signalwandler dienen wie beispielsweise die HAMP Domäne oder die S-Helix. Es sollte untersucht werden, ob das Signal des LqsS-Rezeptors durch solche zusätzlichen Domänen moduliert wird.

#### 3.3.1 LqsS-CyaG Chimären

CyaG aus *Arthrospira maxima* gehört wie die mykobakterielle Rv1625c zu den Klasse IIIa ACn und besitzt zwischen Rezeptor und CHD eine HAMP Domäne, auf die eine S-Helix folgt. Diese beiden Regionen sollten zwischen LqsS Rezeptor- und AC Effektor-domäne eingesetzt werden. Für eine größtmögliche Kompatibilität der cytosolischen CyaG Domänen wurde zunächst die CHD von CyaG verwendet. Es waren bisher keine LqsS-CyaG Chimären generiert worden. Ein Hinweis auf erfolgreiche, funktionelle Chimären war die bereits erfolgreiche Substitution der CHDn von CyaG und Rv1625c in Tsr Chimären (3.1.3), sowie die auffällige Sequenzähnlichkeit der beiden CHDn am N-Terminus. Sie lauten "RSEELLLNVLP" bzw. "RSEALLANMLP".

Es wurde der cytosolische Teil der CyaG an LqsS angeknüpft, einmal ab der HAMP Domäne (Domänenfolge D), einmal ab der S-Helix (Domänenfolge B) und einmal ab der CHD (Domänenfolge A). Da bisher noch keine LqsS-CyaG Chimäre erzeugt worden war, wurde für LqsS neben K187 noch Y178 und M191 als Anknüpfposition gewählt (Tab. 3.10).

Tab. 3.10 Domänenorganisation A - D der LqsS-CyaG Chimären. Der LqsS Rezeptor wurde jeweils mit den Anknüpfpositionen Y178, K187 und M191 eingesetzt. Es wurden elf von 12 Chimären untersucht, die in Grau angegebene Chimäre wurde nicht erzeugt.

	Rezeptor	HAMP	25 ASn	CHD
<b>A</b>	LqsS <sub>1-178</sub>	-	-	CyaG <sub>456-672</sub>
	LqsS <sub>1-187</sub>	-	-	CyaG <sub>456-672</sub>
	LqsS <sub>1-191</sub>	-	-	CyaG <sub>456-672</sub>
<b>B</b>	LqsS <sub>1-178</sub>	-	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	CyaG <sub>456-672</sub>
	LqsS <sub>1-187</sub>	-	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	CyaG <sub>456-672</sub>
	LqsS <sub>1-191</sub>	-	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	CyaG <sub>456-672</sub>
<b>C</b>	LqsS <sub>1-178</sub>	-	LqsS <sub>179-203</sub>	CyaG <sub>456-672</sub>
	LqsS <sub>1-187</sub>	-	LqsS <sub>188-212</sub>	CyaG <sub>456-672</sub>
	LqsS <sub>1-191</sub>	-	LqsS <sub>192-216</sub>	CyaG <sub>456-672</sub>
<b>D</b>	LqsS <sub>1-178</sub>	CyaG <sub>370-430</sub>	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	CyaG <sub>456-672</sub>
	LqsS <sub>1-187</sub>	CyaG <sub>370-430</sub>	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	CyaG <sub>456-672</sub>
	LqsS <sub>1-191</sub>	CyaG <sub>370-430</sub>	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	CyaG <sub>456-672</sub>

Es wurden aktive und durch LAI-1 regulierte LqsS-CyaG Chimären gefunden. Wie zuvor bei den LqsS-Rv1625c Chimären wurde sowohl Stimulation als auch Hemmung beobachtet. Wenige Chimären waren signifikant durch 1  $\mu$ M LAI-1 reguliert (Abb. 3.11). Festgestellt wurden höhere Aktivitäten und Regulationen bei weiter von der Membran entfernten Verknüpfungspositionen von LqsS. Bei gleicher Anknüpfposition an LqsS besaßen die Chimären mit Domänenfolge B die jeweils höchsten Basalaktivitäten, während diejenigen mit Domänenfolge C kaum aktiv waren. Die insgesamt aktivste LqsS-CyaG Chimäre war M191-B mit 32,5  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  (Tab. 3.11).

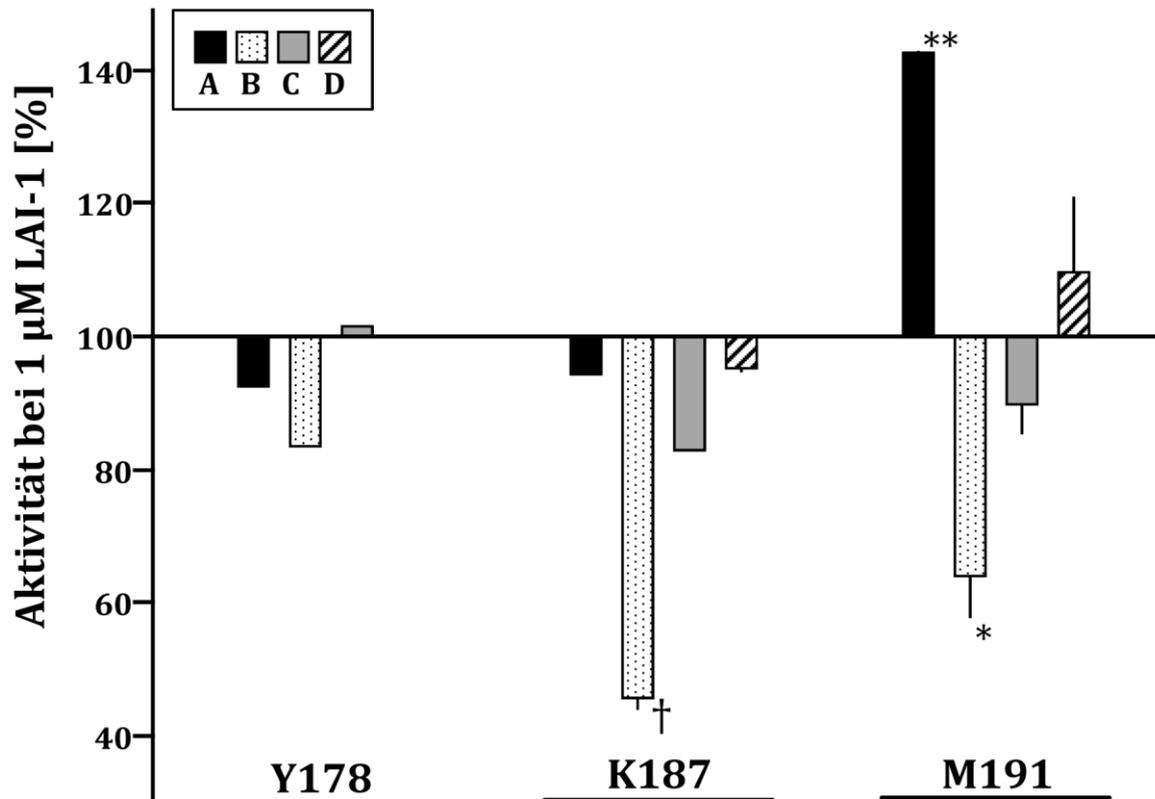


Abb. 3.11 AC-Aktivitäten der elf LqsS-CyaG Chimären bei 1 µM LAI-1, gruppiert nach den drei Längen des LqsS-Rezeptors (Y178, K187, M191) mit Domänenfolgen A bis D (Tab. 3.10). 100% Aktivität entspricht der Basalaktivität (Tab. 3.11). n = 1-4, ± S.E.M. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, †, p<0,001 zur Basalaktivität.

Eine Signalinversion durch die An- und Abwesenheit der S-Helix könnte innerhalb der gleichen LqsS Länge zwischen den Domänenfolgen A (CHD) und B (S-Helix und CHD) auftreten (Abb. 3.11, schwarze und gepunktete Balken). Die Chimäre mit Domänenfolge C ist identisch zu B, außer, dass die 25 ASn von LqsS statt von der S-Helix stammen. Würden sich die Chimären B und C gleich verhalten, könnte die Signalinversion auch auf die eingefügte Länge von 25 ASn zurück zu führen sein.

Tab. 3.11 Basalaktivitäten der elf LqsS-CyaG Chimären in nmol cAMP·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> ± S.E.M, n = 1-4. Domänenorganisation A - D siehe Tab. 3.10. n = 1 für Chimären ohne Fehlerangabe.

LqsS bis	Y178				K187				M191			
Domänen	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Basal-aktivität	1,0	9,0	0,6	-	4,9	8,2	0,12	1,8	2,3	32,5	0,16	2,9
						±1,9		±0,1	±0,3	±8,2	±0,04	±0,4

Alle Anknüpfungen von CyaG unmittelbar nach Austritt der letzten α-Helix der Membran (Y178) von LqsS resultierten in gering aktiven, nicht regulierten Chimären (Abb. 3.11 und Tab. 3.11). Am weiter von der Membran entfernten K187 waren die Chimären mit Domänenfolge A und D nicht reguliert, die Chimären mit B und C durch LAI-1 gehemmt.

Mit der S-Helix (B) wurde eine signifikante Hemmung von  $54,3 \pm 1,9\%$  festgestellt, mit 25 ASn von LqsS (C) fiel die Hemmung mit  $17,2\%$  geringer aus.

Bei den M191 Chimären mit Domänenfolgen A und B wurde eine Signalinversion beobachtet: beide Chimären wurden signifikant durch  $1 \mu\text{M}$  LAI-1 reguliert; ohne S-Helix (A) wurde zu  $42,4 \pm 0,3\%$  stimuliert, mit S-Helix (B) zu  $36,0 \pm 6,3\%$  gehemmt. Da beide Chimären identisch sind mit Ausnahme der zusätzlichen S-Helix in B, wurde diese Signalinversion auf die S-Helix zurückgeführt. Als Kontrolle sind statt der S-Helix die 25 ASn von LqsS gewertet worden (Domänenfolge C, Tab. 3.10), die Kontrollchimäre war mit  $0,2 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  nur schwach aktiv und nicht reguliert. Für M191 wurde auch eine tendenzielle Signalinversion zwischen den Domänenfolgen B und D beobachtet, die Chimäre D mit zusätzlicher HAMP Domäne war unreguliert.

In den Western Blots war keine Proteolyse erkennbar, die Expressionslevel variierten leicht (Abb. 3.12).

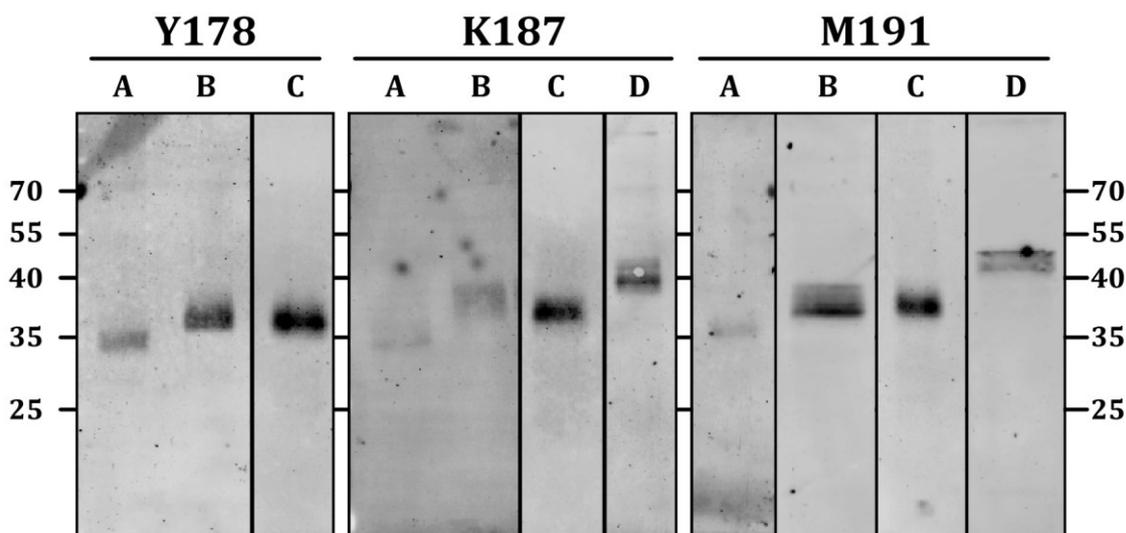


Abb. 3.12 Western Blots der elf LqsS-CyaG Chimären (Tab. 3.10). Es wurde jeweils  $1 \mu\text{g}$  Membranprotein aufgetragen. Erwartete Bandenhöhe der Proteine A: 45,6 kDa (Y), 46,6 kDa (K), 47,0 kDa (M). Proteine B und C: 2,9 kDa höher als A. Proteine D: 9,7 kDa höher als A. Relative Unterschiede im Molekulargewicht wurden beobachtet.

### 3.3.2 LqsS-CyaG-Rv1625c Dreifach-Chimären

Funktionelle Chimären aus LqsS Rezeptor und Rv1625c AC waren bereits erfolgreich generiert worden (3.2). Weder LqsS noch Rv1625c besitzen cytosolische Signalwandler-domänen wie die HAMP oder S-Helix. Es ergab sich die Fragestellung, wie LqsS-Rv1625c Chimären auf die Insertion der HAMP Domäne und/oder der S-Helix reagieren würden. Die Dreifachchimären wurden im gleichen Muster wie im vorherigen Kapitel erzeugt: Die Anknüpfung an LqsS erfolgte an Y178, K187 und M191, die CHD wurde von Rv1625

statt von CyaG verwendet (Tab. 3.12). Die Chimären mit Domänenfolge A entsprechen den direkten Verknüpfungen von LqsS an R218-Rv1625c (3.2.1). Sie waren signifikant durch LAI-1 gehemmt (Y178: 64,5%) oder stimuliert (K187: 86,7% und M191: 19,5%) und sind hier zum Vergleich erneut dargestellt. Bei K187-A handelt es sich um die Referenzchimäre LqsS<sub>1-187</sub>-Rv1625c<sub>218-443</sub>.

Tab. 3.12 Domänenorganisation A - D der LqsS-CyaG Chimären. Der LqsS Rezeptor wurde jeweils mit den Anknüpfpositionen Y178, K187 und M191 eingesetzt. Es wurden elf von 12 Chimären untersucht, die in Grau angegebene Chimäre wurde nicht erzeugt.

	Rezeptor	HAMP	25 ASn	CHD
<b>A</b>	LqsS <sub>1-178</sub>	-	-	Rv1625c <sub>218-443</sub>
	LqsS <sub>1-187</sub>	-	-	Rv1625c <sub>218-443</sub>
	LqsS <sub>1-191</sub>	-	-	Rv1625c <sub>218-443</sub>
<b>B</b>	LqsS <sub>1-178</sub>	-	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	Rv1625c <sub>218-443</sub>
	LqsS <sub>1-187</sub>	-	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	Rv1625c <sub>218-443</sub>
	LqsS <sub>1-191</sub>	-	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	Rv1625c <sub>218-443</sub>
<b>C</b>	LqsS <sub>1-178</sub>	-	LqsS <sub>179-203</sub>	Rv1625c <sub>218-443</sub>
	LqsS <sub>1-187</sub>	-	LqsS <sub>188-212</sub>	Rv1625c <sub>218-443</sub>
	LqsS <sub>1-191</sub>	-	LqsS <sub>192-216</sub>	Rv1625c <sub>218-443</sub>
<b>D</b>	LqsS <sub>1-178</sub>	CyaG <sub>370-430</sub>	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	Rv1625c <sub>218-443</sub>
	LqsS <sub>1-187</sub>	CyaG <sub>370-430</sub>	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	Rv1625c <sub>218-443</sub>
	LqsS <sub>1-191</sub>	CyaG <sub>370-430</sub>	CyaG S-Helix <sub>431-455</sub>	Rv1625c <sub>218-443</sub>

Die Basalaktivitäten lagen bei allen elf Chimären mit der CHD von Rv1625c höher als bei den entsprechenden Chimären mit der CHD von CyaG (vgl. Tab. 3.11 mit Tab. 3.13). Auffällig waren die höheren Basalaktivitäten der jeweiligen Chimären mit Domänenfolge B sowie die geringen Basalaktivitäten bei Domänenfolge C.

Tab. 3.13 Basalaktivitäten der elf LqsS-CyaG-Rv1625c Chimären in nmol cAMP·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> ± S.E.M. n = 2-10. Domänenorganisation A - D siehe Tab. 3.12.

LqsS bis	Y178				K187				M191			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
<b>Basal-aktivität</b>	4,9 ±1,1	84,5 ±31,6	48,9 ±4,0	-	20,7 ±1,7	49,3 ±4,7	0,58 ±0,04	19,8 ±2,9	26,4 ±3,8	95,0 ±7,5	1,1 ±0,2	11,0 ±1,7

Eine Signalinversion durch die S-Helix (Domänenfolge B) wurde für die beiden Anknüpfpositionen K187 und M191 beobachtet, die Chimären waren signifikant durch LAI-1 gehemmt (42,7 ± 0,7% und 28,6 ± 3,3%). Das Einfügen von 25 ASn von LqsS als Kontrolle (Domänenfolge C) führte in beiden Fällen zu gering aktiven und unregulierten Chimären (Abb. 3.13, schwarze und gepunktete Balken). Die Signalinversion wurde

folglich auf die S-Helix zurückgeführt. Bei Anknüpfposition Y178 führte weder S-Helix (B) noch LqsS (C)- Insertion zu regulierten Enzymen, allerdings war die Basalaktivität in beiden Fällen relativ hoch. Hier könnte die Nähe zum Membranausgang die Unterschiede in der Regulation bedingen.

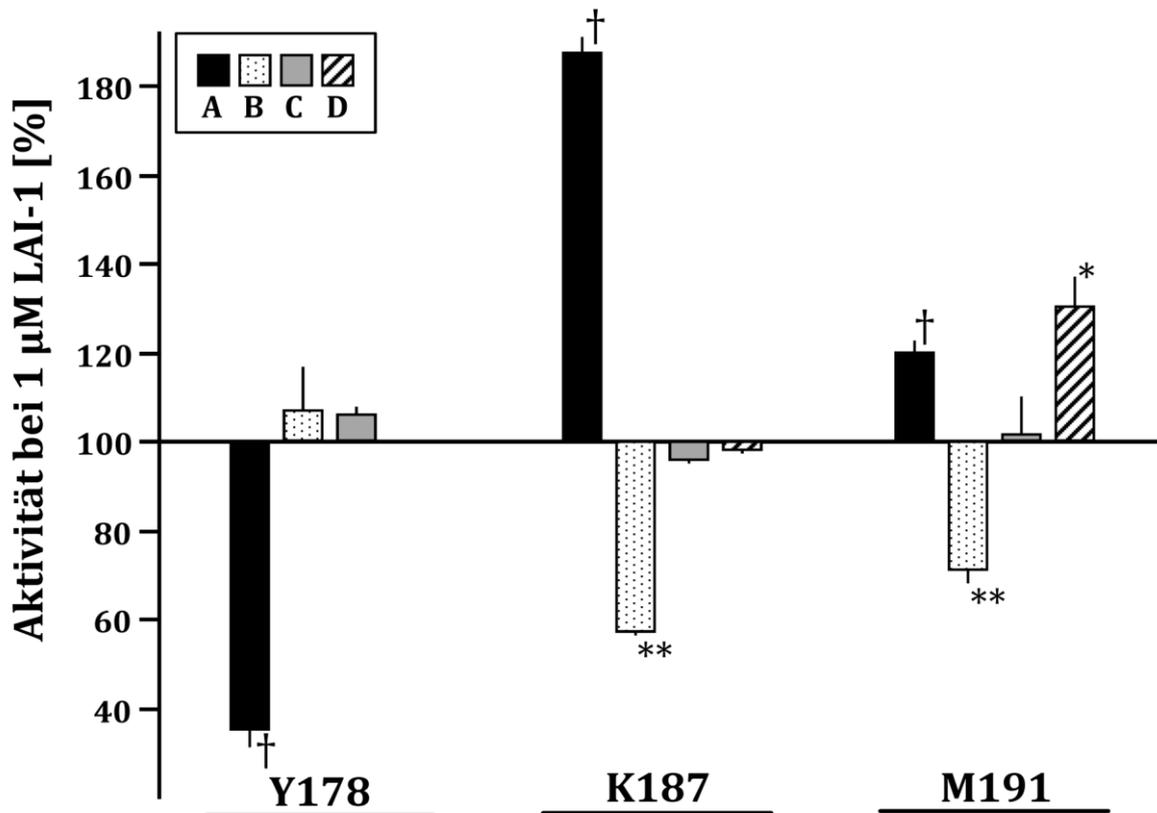


Abb. 3.13 AC-Aktivitäten der elf LqsS-CyaG-Rv1625c Chimären bei 1 µM LAI-1, gruppiert nach den drei Längen des LqsS-Rezeptors (Y178, K187, M191) mit Domänenfolgen A bis D (Tab. 3.12). 100% Aktivität entspricht der Basalaktivität (Tab. 3.13). n=2-10, ±S.E.M. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, †, p<0,001 zur Basalaktivität.

Das Einfügen von HAMP und S-Helix aus CyaG (Domänenfolge D) wurde nur für K187 und M191 untersucht. Während die Chimäre ab K187 aktiv, aber unreguliert war, wurde die Chimäre ab Met191 mit  $29,8 \pm 6,8\%$  signifikant durch LAI-1 stimuliert. Wie zuvor bei den LqsS-CyaG Chimären wurde bei den Chimären ab M191 für jede zusätzlich eingeführte Domäne eine Signalinversion beobachtet (Domänenfolgen A - B - D Tab. 3.12 und Abb. 3.13).

In den Western Blots war keine Proteolyse erkennbar, die Expressionslevel variierten leicht (Abb. 3.14).

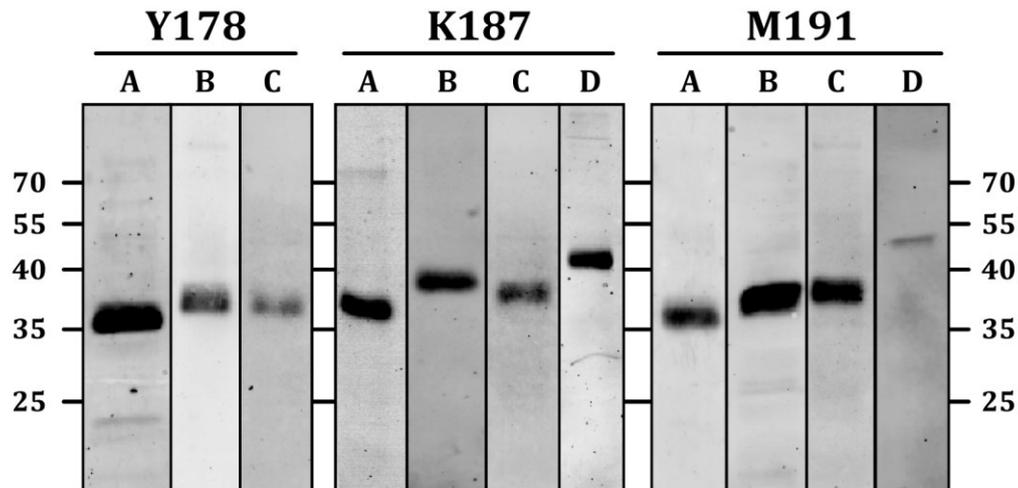


Abb. 3.14 Western Blots der elf LqsS-CyaG-Rv1625c Chimären (Tab. 3.12). Es wurde jeweils 1  $\mu$ g Membranprotein aufgetragen. Erwartete Bandenhöhe der Proteine A: 46,6 kDa (Y), 47,6 kDa (K), 48,0 kDa (M). Proteine B und C: 2,9 kDa höher als A. Proteine D: 9,7 kDa höher als A. Relative Unterschiede im Molekulargewicht wurden beobachtet.

### 3.4 Identifizierung des neuen Cyclase-Transducer-Elements (CTE)

Erste Sequenzalignments von Klasse IIIa ACn wurden 2015 von Joachim Schultz durchgeführt. Sie enthielten etwa 700 Sequenzen von Klasse IIIa ACn von Bakterien und allen neun membrangebundenen Isoformen der ACn von Wirbeltieren. Während bakterielle ACn als Homodimere aktiv sind, liegen bei den pseudoheterodimeren ACn von Wirbeltieren beide Membrandomänen (M) und katalytische Domänen (C) auf einer Peptidkette. Die Domänen sind nach dem Schema M1-C1-Linker-M2-C2 angeordnet und sind sequentiell verschieden. Für die Alignments wurden die neun Isoformen der ACn von Wirbeltieren in die beiden "Monomere" M1-C1-Linker sowie M2-C2 aufgeteilt. In den Alignments wurde eine geringe Konservierung im Bereich der Membrandomänen sichtbar, im Bereich der katalytischen Domänen war jedoch eine hohe Konservierung erkennbar. Am N-Terminus der CHD, vor dem Bereich des katalytischen Aspartat im 'FAD'-Motiv, war eine Region von 20 bis 25 ASn hochkonserviert, die exklusiv in Klasse IIIa, weniger in IIIb ACn zu finden ist. Sie wurde 2008 von S. Dunin entdeckt und bisher unter der Bezeichnung C-Helix (cyclase activity modulating helix) als hypothetisches Element behandelt. Beim Vergleich der AS Sequenzen in diesem Bereich war in C1 sowie C2 eine absolute Sequenzübereinstimmung über alle Spezies in jeder der neun Isoformen festgestellt worden. Die meisten bisher verfügbaren Kristallstrukturen von ACn beginnen erst hinter dieser Region, kurz vor dem katalytischen Aspartat ('FAD'-Motiv). Verfügbare Kristallstrukturen von Klasse IIIa Guanylatcyclasen und der Wirbeltier Klasse IIIb AC X zeigen eine helikale Struktur. Auch Sekundärstrukturvorhersagen interpretieren die Region als  $\alpha$ -Helix. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese

Region biochemisch charakterisiert, sie erhielt schließlich die Bezeichnung CTE, für **C**yclase-**T**ransducer-**E**lement. Ein Alignment von ausgewählten ACn im relevanten Bereich ist in Abb. 3.15 abgebildet, im Anhang befindet sich ein umfangreicheres Alignment (Abb. 7.1 und Abb. 7.2).

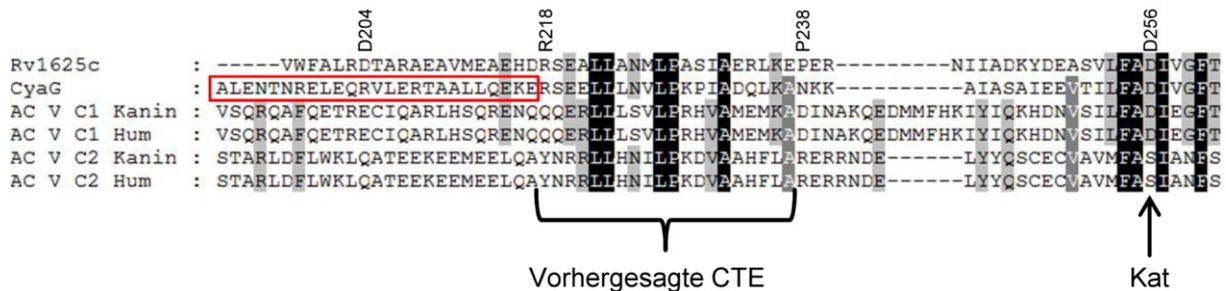


Abb. 3.15 Alignment eines Teilbereiches der Sequenzen der bakteriellen Rv1625c und CyaG sowie der eukaryotischen AC Isoform V aus Kaninchen und Mensch. Die AS Nummerierung bezieht sich auf Rv1625c. Die Aminosäuren sind in Graustufen hinterlegt, um den Grad der Konservierung hervorzuheben (weiß = nicht konserviert, schwarz = hoch konserviert). Der Bereich der CTE ist markiert. Der Pfeil zeigt auf das Metallion bindende Aspartat (D, 'Kat'), der in allen bakteriellen sowie den eukaryotischen katalytischen C1 Domänen essentiell ist, in eukaryotischen katalytischen C2 Domänen befindet sich an dieser Stelle ein Serin (S). Bei den ersten 25 ASn von CyaG handelt es sich um die S-Helix (umrandet).

### 3.4.1 Bioinformatische Untersuchung der CTE

Für eine genauere bioinformatische Untersuchung bezüglich der CTE wurde mit Jens Baßler und Andrei Lupas vom Max Planck Institut, Tübingen, kooperiert. Die Ergebnisse sind zur Veröffentlichung eingereicht [38] und werden hier in Kopie dargestellt. Mit dem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Algorithmus wurden Alignments von vielen Sequenzen von Nukleotidcyclasen der Klasse IIIa erstellt und zusätzlich nach ihrer Phylogenie und ihren Untereinheiten gruppiert. Zur Veranschaulichung der Häufigkeit bestimmter ASn an entsprechenden Positionen wurden Sequenzlogos im Bereich der CTE (umrahmt) erstellt (Abb. 3.16).

Auffällig war bei allen Cyclasen ein zentral gelegenes, invariantes Prolin. Die AS Paare LL und VA sind hoch konserviert. Beim Vergleich der eukaryotischen C1 und C2 fällt ein Unterschied im mittig gelegenen SVLP bzw. NILP Motiv auf. Die bakteriellen ACn ähneln mit ihrem NILP-Motiv hier eher den C2-CTE's. Ein weiterer Unterschied zwischen C1 und C2 ist das in C1 stark konservierte, negativ geladene Glutamat (E) auf N-terminaler Seite sowie das positiv geladene Lysin (K) am C-Terminus. Hier ähneln bakterielle ACn eher den C1-CTE's. Die bakterielle CTE zeigt somit AS Charakteristika beider eukaryotischen CTE's.



Unklar war die Länge der CTE. Versuche zur Interaktion mit der S-Helix sollten weiteren Aufschluss geben.

### 3.4.3 Interaktion der CTE mit der S-Helix

Durch die Identifizierung der CTE erfolgte eine **Unterteilung** der bisher eingesetzten **Rv1625c CHD (R218-V443)** in die beiden Regionen CTE (**R218-E237**) und CHD (**P238-V443**).

Als eigenständiges Element sollte die CTE auch mit anderen Signalwandlern wie der S-Helix aus CyaG kommunizieren können. Für die Interaktionsstudien wurde die S-Helix entweder N- oder C-terminal der CTE eingesetzt, als Kontrolle wurden 25 ASn aus LqsS fortlaufend von K187 eingesetzt (Tab. 3.14). Eine Auflistung der Aktivitäten findet sich zusätzlich im Anhang in Tab. 7.1.

Tab. 3.14 Übersicht der in diesem Kapitel verwendeten Domänen mit AS Sequenzen. Es wurde Insert A oder Insert B entweder an Pos. 1 oder an Pos. 2 eingefügt.

Rezeptor LqsS	Pos.1	CTE 20 ASn Rv1625c	Pos.2	CHD Rv1625c
M1-K187	Insert	R <sub>218</sub> SEALLANMLPASIAERLKE <sub>237</sub>	-	P238-V443
M1-K187	-	R <sub>218</sub> SEALLANMLPASIAERLKE <sub>237</sub>	-	P238-V443
M1-K187	-	R <sub>218</sub> SEALLANMLPASIAERLKE <sub>237</sub>	Insert	P238-V443
Insert A: CyaG S-Helix (A <sub>431</sub> LENTNRELEQQRVLERTAALLQEKE <sub>455</sub> )				
Insert B: LqsS 25 ASn (L <sub>188</sub> AGMAAAAGMIAHELRSPLLGIKSG <sub>212</sub> )				

Die Referenzchimäre LqsS<sub>1-187</sub>-Rv1625c<sub>218-443</sub> zeigte eine Basalaktivität von 20,7 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> und wurde zu 86,7% stimuliert (Abb. 3.17, schwarze Quadrate). Wie bereits aus Kapitel 3.3.2 bekannt, führte das Einfügen der S-Helix zwischen LqsS-Rezeptor und N-terminal der Rv1625c-CTE zu einer Signalumkehr, die Chimäre war mit 49,3 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> aktiv und wurde zu 42,7% durch 1 µM LAI-1 gehemmt (Abb. 3.17, graue Quadrate). Das Einfügen von 25 ASn von LqsS führte zu einer gering aktiven, nicht regulierten Chimäre (Abb. 3.17, offene Quadrate).

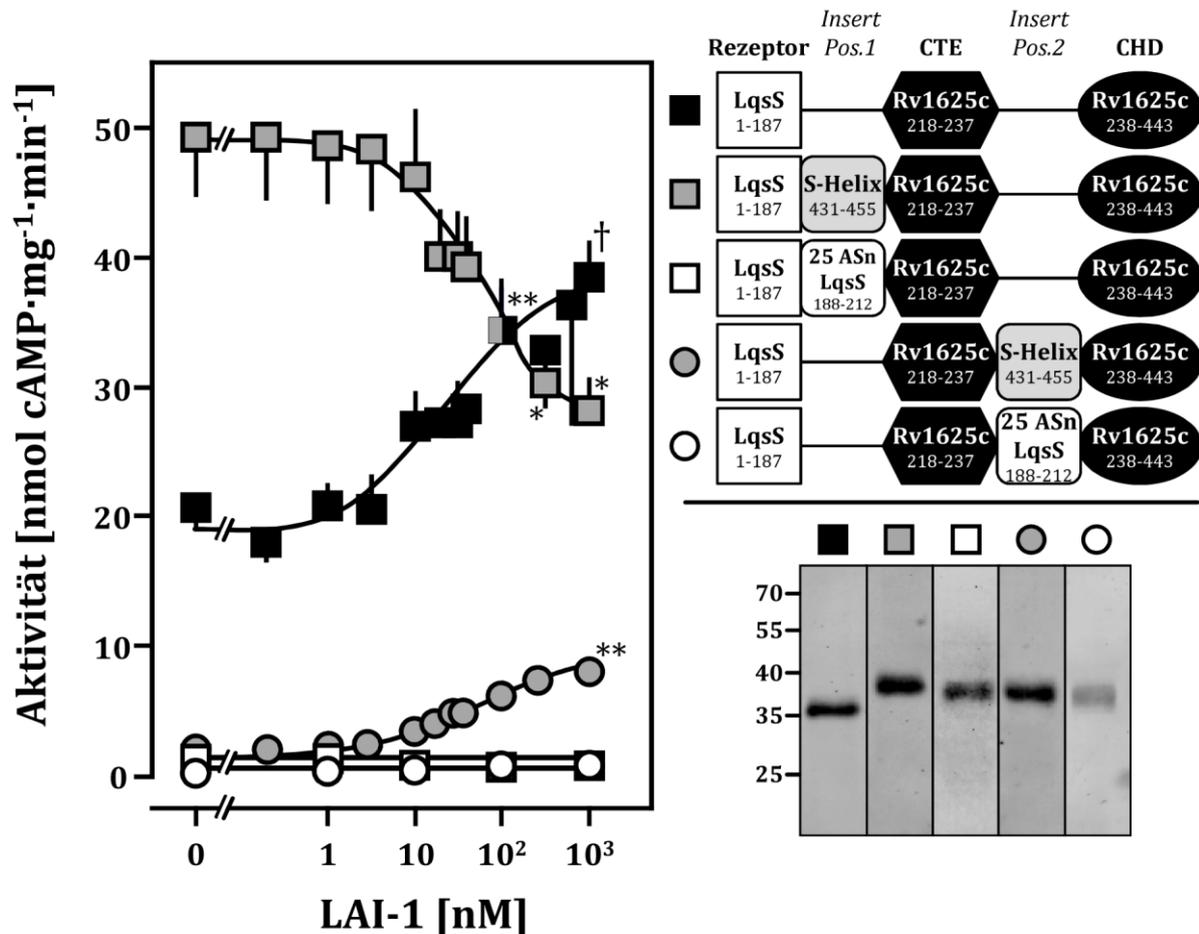


Abb. 3.17 Links: Konzentrations-Wirkungskurven der LqsS-Chimären mit 20 ASn langer CTE. Die Kurve für LqsS<sub>187</sub> wurde aus Abb. 3.7 übernommen. Es wurden 1,5 µg Membranprotein im AC-Test eingesetzt, n = 2-6, ± S.E.M. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, †, p<0,001 zur Basalaktivität. Rechts oben: Schematische Darstellung der Sequenzfolge der Chimären. Die S-Helix aus CyaG bzw. 25 ASn aus LqsS war N- oder C- terminal der CTE eingefügt. Rechts unten: Western Blots mit jeweils 1 µg Membranprotein. Erwartete Bandenhöhen v.l.n.r.: 47,6 kDa, 50,6 kDa, 50,0 kDa, 50,6 kDa, 50,0 kDa.

Wurde die S-Helix C-terminal der CTE eingefügt (Abb. 3.17, graue Kreise), zeigte die Chimäre eine mit  $1,9 \pm 0,4$  nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> niedrige Basalaktivität, sie wurde jedoch zu  $219,6 \pm 38,6\%$  stimuliert. Das Einfügen der 25 ASn von LqsS zwischen CTE und CHD führte zu einem ähnlichen Ergebnis, die Chimäre war mit  $0,19 \pm 0,4$  nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> gering aktiv, wurde jedoch zu  $277,8 \pm 5,8\%$  stimuliert (Abb. 3.17, offene Kreise). In den Western Blots war keine Proteolyse erkennbar (Abb. 3.17 unten rechts).

Zusammenfassend betrachtet wirkt sich das Einfügen der 25 ASn langen Inserts von CyaG bzw. LqsS positionsspezifisch aus, N-terminal der CTE zusätzlich auch sequenzspezifisch. Eine normalisierte Darstellung der gleichen Ergebnisse verdeutlicht den Effekt der unterschiedlichen Regulation (Abb. 3.18).

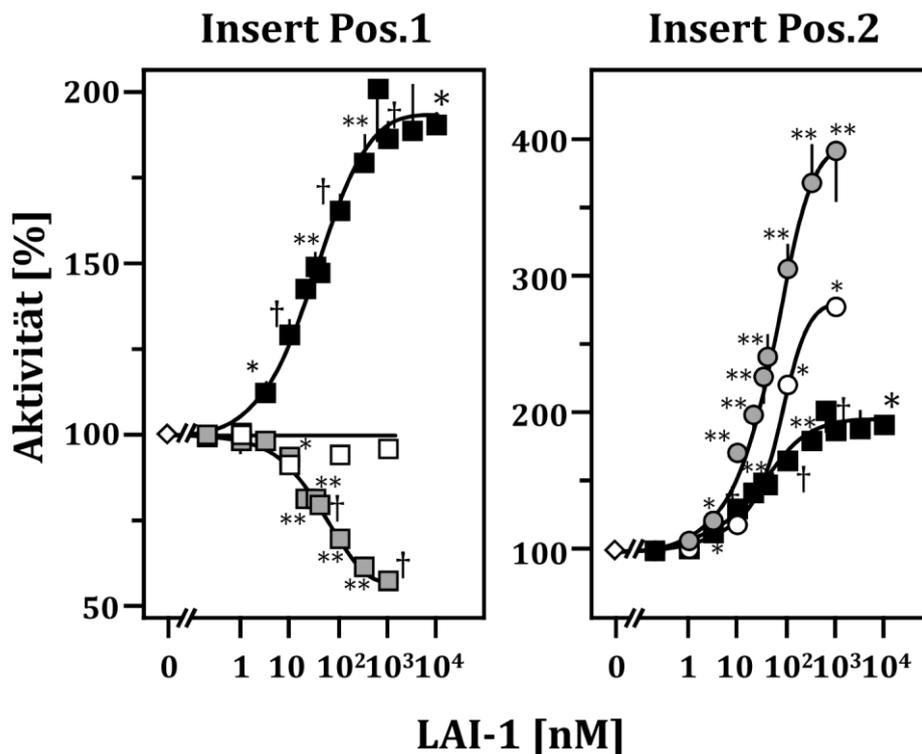


Abb. 3.18 Normalisierte Konzentrations-Wirkungskurven der LqsS-Chimären mit 20 ASn langer CTE aus Abb. 3.17, gruppiert nach der Position der Insertionen. Schwarze Symbole: Kein Insert, entspricht Referenzchimäre aus Abb. 3.7. Graue Symbole: S-Helix eingefügt, offene Symbole: 25 ASn von LqsS eingefügt, Raute: Aktivität ohne Ligand (100%). Zu beachten ist die unterschiedliche Skala in % der y-Achse.  $n = 2-6$ ,  $\pm$  S.E.M. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , †,  $p < 0,001$  zur Basalaktivität.

An Position 1, N-terminal der CTE, vermag die S-Helix das Signal zu invertieren, während die Insertion von 25 ASn von LqsS zum Verlust der Sensitivität auf LAI-1 führt. An Position 2, C-terminal der CTE, ist diese Signalmodulation nicht zu beobachten, die Insertion beider 25 ASn-Varianten führt zu einer Verstärkung der Stimulation. Die  $EC_{50}/IC_{50}$  Werte lagen mit Werten von 41 nM (S-Helix Pos.1), 32 nM (keine Inserts), 54 nM (S-Helix Pos.2) und 72 nM (LqsS Pos.2) nahe beieinander, was auf eine unveränderte Ligandenaffinität deutet.

Die bioinformatischen Ergebnisse sagen für die CTE eine Länge von 19 ASn voraus. Daher wurde untersucht, wie sich eine Verkürzung der CTE auf ihre Kommunikation mit der S-Helix auswirkt. Es wurden entweder 18 oder 19 ASn lange CTE's eingesetzt, als Insert wurde die S-Helix entweder N- oder C-terminal der jeweiligen CTE eingesetzt (Tab. 3.15). Eine Auflistung der Aktivitäten findet sich zusätzlich im Anhang in Tab. 7.1.

Die Chimären ohne Inserts mit 18 bzw. 19 ASn langer CTE (Abb. 3.19, offene Symbole) entsprachen sequenziell der Referenzchimäre mit 20 ASn langer CTE bis auf ein bzw. zwei deletierten ASn (vgl. Tab. 3.14). Die drei Chimären waren signifikant durch LAI-1 stimuliert. Die 18 ASn Chimäre war vergleichbar mit  $80,6 \pm 9,6\%$ , die 19 ASn Chimäre mit  $247 \pm 13,2\%$  fast dreimal so stark stimuliert wie die Referenzchimäre (Abb. 3.18). Allerdings lagen die Basalaktivitäten der beiden verkürzten CTE Chimären mit  $1,3 \pm 0,1$

und  $1,8 \pm 0,3 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  deutlich niedriger als bei der Referenzchimäre mit  $20,7 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Tab. 3.15 Übersicht der in diesem Kapitel verwendeten Domänen (oben) mit AS Sequenzen (unten). Es wurde das Insert A entweder an Pos. 1 oder Pos. 2 eingefügt.

Rezeptor LqsS	Pos.1	CTE Rv1625c	Pos.2	CHD Rv1625c
M1-K187	(Insert)	18 ASn (R <sub>218</sub> SEALLANMLPASIAERL <sub>235</sub> )	(Insert)	P238-V443
M1-K187	(Insert)	19 ASn (R <sub>218</sub> SEALLANMLPASIAERLK <sub>236</sub> )	(Insert)	P238-V443
Insert A: CyaG S-Helix (A <sub>431</sub> LENTNRELEQRVLERTAALLQEKE <sub>455</sub> )				

Das Einfügen der S-Helix N-terminal der 19 bzw. 18 ASn langen CTE führte bei beiden Chimären zu einer Signalinversion, die Chimären waren zu  $50,1 \pm 0,1$  und  $38,1 \pm 1,7\%$  gehemmt (Abb. 3.19, schwarze Symbole), die Basalaktivitäten betragen  $6,0 \pm 1,8$  bzw.  $0,57 \pm 0,03 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Wie bei den Chimären ohne Inserts war auch hier die Regulation vergleichbar mit der Referenzchimäre, während die Basalaktivitäten deutlich niedriger lagen. Die Signalinversion durch die S-Helix ist folglich nicht von der C-terminalen Länge der CTE beeinflusst. Das C-terminale Einfügen der S-Helix führte bei der Chimäre mit 19 ASn langer CTE wie bei der Referenzchimäre nicht zu einer Signalumkehr. Die Chimäre war signifikant mit  $322 \pm 11,4\%$  stimuliert durch LAI-1 (Abb. 3.19) bei einer Basalaktivität von  $1,0 \pm 0,5 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Die Chimäre mit 18 ASn langer CTE mit C-terminaler S-Helix konnte im Western Blot nicht detektiert werden (Abb. 3.19) und zeigte keine Aktivität. Eine Überprüfung auf Sequenzrichtigkeit des Gens mit flankierenden Vektorbereichen auch direkt nach der Expression war erfolgreich, nach Umklonierung und erneuter Expression mit Sequenzüberprüfung wurde wiederholt kein Protein detektiert. Die anderen fünf Chimären wurden im Western Blot ohne Proteolyse detektiert (Abb. 3.19). Die Expressionslevel waren vergleichbar, wobei etwas weniger Protein bei der Chimäre mit C-terminal der 19 ASn langen CTE eingefügten S-Helix nachgewiesen wurde. Wie bei der 20 ASn langen CTE waren die  $EC_{50}/IC_{50}$  Werte mit 27 nM und 53 nM vergleichbar, sodass von einer unveränderten Ligandenaffinität ausgegangen wurde. Zusammenfassend betrachtet wurde bei den Chimären mit 20, 19 bzw. 18 ASn langer CTE sowohl bei N- als auch bei C-terminaler Insertion der S-Helix eine vergleichbare Regulation durch LAI-1 erzielt. Bei allen Chimären mit verkürzten CTE's wurden niedrigere Basalaktivitäten gemessen.

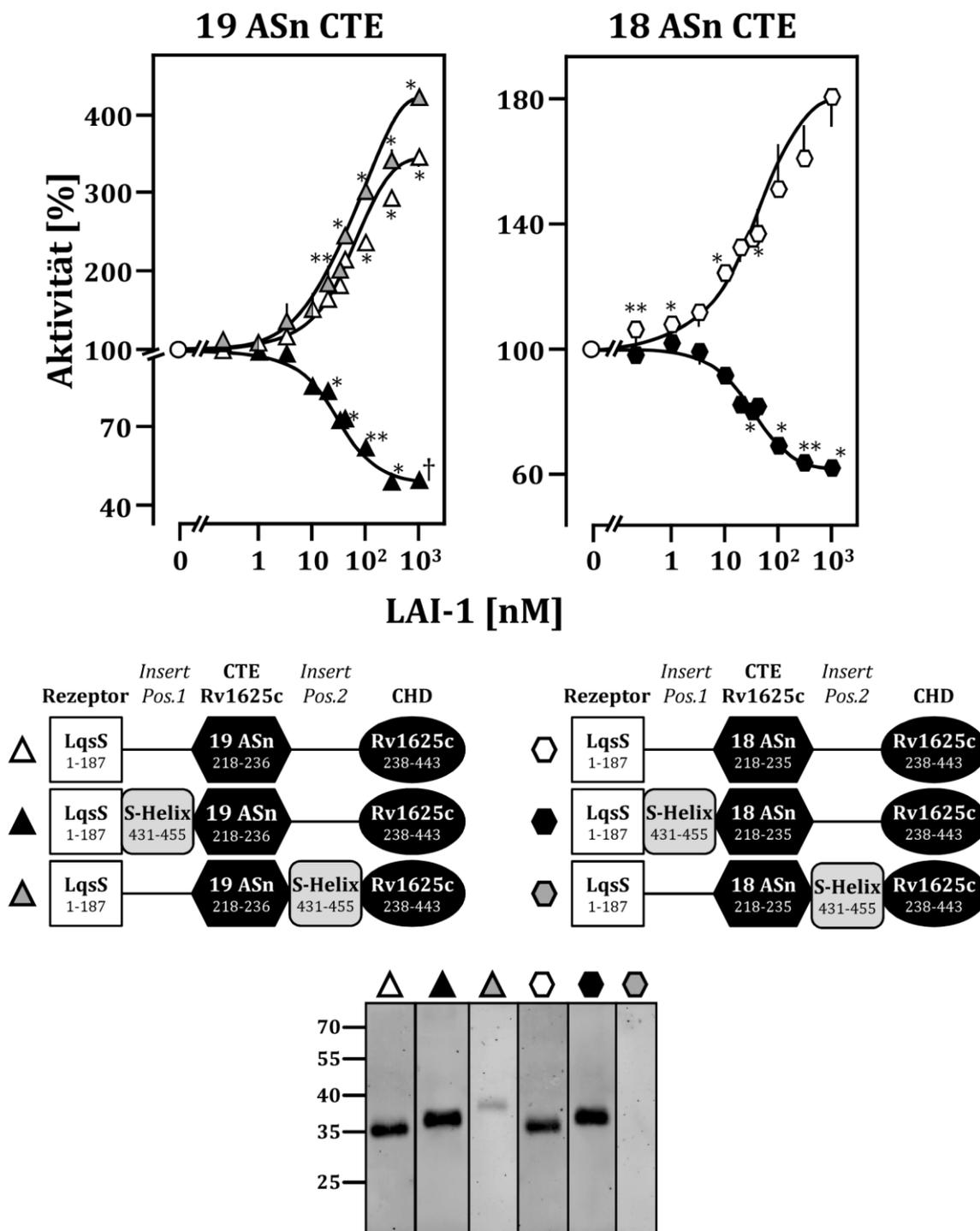


Abb. 3.19 Oben: Konzentrations-Wirkungskurven der LqsS-Chimären mit verkürzten CTE's, links 19 ASn CTE, rechts 18 ASn CTE. Zu beachten ist die unterschiedliche Skala in % der y-Achse.  $n = 2$ ,  $\pm$  S.E.M. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , †,  $p < 0,001$  zur Basalaktivität. Kreis: Aktivität ohne Ligand (100%). Mitte: Symbollegende mit schematischer Darstellung der Sequenzfolge der Chimären. Unten: Western Blot der entsprechenden Chimären mit 1  $\mu$ g Membranprotein, erwartete Bandenhöhe v.l.n.r.: 47,5 kDa, 50,4 kDa, 50,4 kDa, 47,4 kDa, 50,3 kDa, 50,3 kDa. Die Chimäre mit 18 ASn CTE und S-Helix an Position 2 (graue Hexagone) konnte nicht nachgewiesen werden und besaß keine AC-Aktivität.  $IC_{50}/EC_{50}$  Werte v.l.n.r. (wie unten rechts): 53 nM, 27 nM, 52 nM, 33 nM, 33 nM.



In den homodimeren Membranproteinen resultierte die Substitution der Rv1625c-CTE durch ACV\_CTE1 bzw. ACV\_CTE2 in Chimären mit Basalaktivitäten von  $0,28 \pm 0,01$  bzw.  $0,24 \pm 0,05 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , d.h. deutlich geringer als die Basalaktivität der Referenzchimäre mit Rv1625c-CTE ( $20,7 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Trotz geringer Basalaktivitäten waren beide Substitutionschimären signifikant sensitiv auf LAI-1 Konzentrationen (Abb. 3.21).

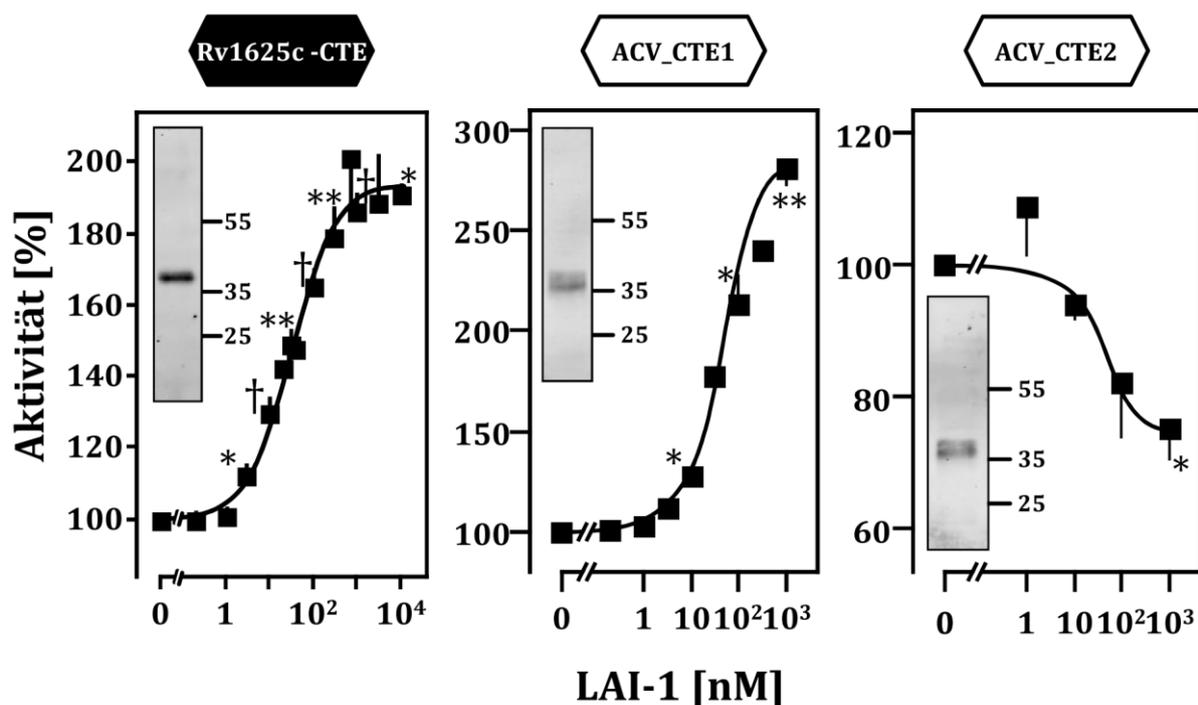


Abb. 3.21 Konzentrations-Wirkungskurven der LqsS1-187-CTE-Rv1625c238-443 Homodimeren. Über den Diagrammen ist die eingesetzte CTE angegeben. Links: Referenzchimäre mit Rv1625c-CTE aus Abb. 3.7. 100% Aktivität entspricht der Basalaktivität.  $n = 2-5$ ,  $\pm$  S.E.M. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , †,  $p < 0,001$  zur Basalaktivität.  $1,5 \mu\text{g}$  Membranprotein im AC-Test. Inserts: Western Blot mit  $1 \mu\text{g}$  Membranprotein.

Die ACV\_CTE1 Chimäre wurde zu  $181,3 \pm 9,2\%$  signifikant stimuliert, ab einer LAI-1 Konzentration von  $10 \text{ nM}$ , der  $EC_{50}$  lag bei  $53 \text{ nM}$ . Sie zeigte damit eine stärkere Stimulation als die Referenzchimäre ( $86,7 \pm 3,7\%$ ), war aber mit einem  $EC_{50}$  Wert von  $32 \text{ nM}$  vergleichbar sensitiv auf LAI-1. Im Gegensatz dazu wurde die ACV\_CTE2 Chimäre durch LAI-1 signifikant zu  $24,7 \pm 4,9\%$  gehemmt. Der  $IC_{50}$  Wert war mit  $44 \text{ nM}$  ähnlich. Für den Western Blot waren  $1 \mu\text{g}$  Membranprotein aufgetragen worden, es war keine Proteolyse erkennbar (Inserts in Abb. 3.21). Die erwarteten Bandenhöhen betragen  $47,6 \text{ kDa}$  (Rv1625c-CTE) sowie  $47,8 \text{ kDa}$  (ACV\_CTE1 und ACV\_CTE2).

In beiden CTE Substitutionschimären wurde anschließend eine AS substituiert. Bei ACV\_CTE1 wurde E446 durch H, bei ACV\_CTE2 wurde K1049 durch A ersetzt. In beiden Fällen waren die Homodimeren nicht aktiv, die Proteine konnten jedoch im Western Blot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### CTE Substitution: Heterodimere Membranproteine

Die CHD von Rv1625c codiert für alle sechs katalytisch essentiellen ASn und bildet als Homodimer zwei aktive Zentren. In den heterodimeren ACn der Isoformen I bis IX von Wirbeltieren existiert nur ein aktives Zentrum, die sechs ASn sind über beide katalytischen Domänen, CHD1 und CHD2 verteilt. Die ACV\_CTE1 und ACV\_CTE2 liegen natürlicherweise paarweise vor, daher sollte dies auch in den LqsS-Rv1625c-Chimären durch entsprechende Segmentaustausche untersucht werden. Hierfür war es erforderlich, der Rv1625c CHD durch Einfügen gezielter Punktmutationen einen heterodimeren Charakter zuzuweisen. Eine heterodimer aktive Rv1625c wurde bereits 2001 durch die minimal erforderlichen Mutationen von R376A und D300A untersucht [75], von A. Schultz wurden zusätzlich alle katalytischen ASn der Rv1625c an die C1 bzw. C2 von Wirbeltieren angeglichen. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit waren nur wenige ASn verändert worden (Abb. 3.22).

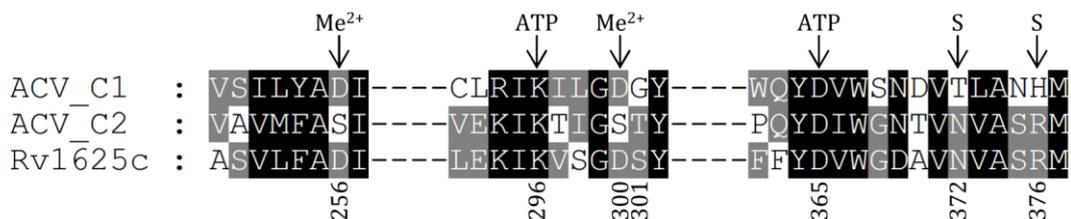


Abb. 3.22 Ausschnitte des Alignments der katalytischen Domänen C1 und C2 der ACV von Wirbeltieren und der mykobakteriellen Rv1625c. Über dem Alignment sind die katalytischen ASn markiert (Me<sup>2+</sup> = Bindestelle für Metallionen, ATP = Substraterkennung, S = Stabilisierung des Übergangszustandes von ATP zu cAMP). Die Nummerierung entspricht Rv1625c. Adaptiert nach [51].

Zur Angleichung an die ACV\_C1 war Rv1625c\_C1 aus Rv1625c durch die Mutationen N372T und R376H erzeugt worden. Das Rv1625c\_C1 Homodimer kann den Übergangszustand des Substrates nicht mehr stabilisieren. Zur Angleichung an ACV\_C2 war Rv1625c\_C2 aus Rv1625c durch die Mutationen D256S, D300S, S301T erzeugt worden. Das Rv1625c\_C2 Homodimer kann kein ATP und keinen Metallkofaktor mehr binden (vgl. Abb. 1.5). Nur bei Heterodimerisierung von Rv1625c\_C1 und Rv1625c\_C2 komplementieren sich die Mutationen und das Heterodimer besitzt ein katalytisch aktives Zentrum.

Die heterodimeren Membranproteine wurden für den Aktivitätstest koexprimiert. Hierfür wurde der durch A. Schultz modifizierte pETDuet-3 Vektor eingesetzt, der zwei gleichwertig durch IPTG induzierbare MCS's besitzt. Es wurde stets Rv1625c\_C1 in die MCS1 und Rv1625c\_C2 in die MCS2 eingesetzt. Modifizierungen durch Klonierung der Monomere erfolgten aufgrund der hohen DNA Sequenzähnlichkeit getrennt. Die klonierten Monomere wurden durch Restriktionsverdau in die jeweilige MCS eingesetzt (2.11.4). Die Induktion der Proteinexpression erfolgte hier mit 0,5 mM IPTG (statt mit 0,1 mM IPTG beim pQE80L Vektor).

An den LqsS Rezeptor wurde eine der drei CTE's angehängt, die Rv1625c CHD wurde ersetzt durch Rv1625c\_C1 oder Rv1625c\_C2 (Tab. 3.17).

Tab. 3.17 Übersicht der Domänen der Heterodimeren. Oben: Monomer in MCS1 mit Rv17625c\_C1. Darunter: Monomer in MCS2 mit Rv1625c\_C2. Unten: Drei CTE's, welche an CTE Position 1 bzw. 2 gesetzt wurden.

Rezeptor LqsS	CTE	CHD Rv1625c
M1-K187	CTE Position 1	Rv1625c_C1: P238-V443 (N372T und R376H)
M1-K187	CTE Position 2	Rv1625c_C2: P238-V443 (D256S, D300S, S301T)
CTE's: Rv1625c-CTE (R <sub>218</sub> SEALLANMLPASIAERLKE <sub>237</sub> ) ACV_CTE1 (Q <sub>430</sub> QERLLLSVLPRHVAMEMKA <sub>449</sub> ) ACV_CTE2 (Y <sub>1038</sub> NRLLHNILPKDVAAHFLA <sub>1057</sub> )		

Die heterodimere Chimäre A entspricht bis auf die fünf Punktmutationen in den CHDn der homodimeren Referenzchimäre (Abb. 3.7, 'K187'). Chimäre A hatte eine mit  $6,6 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  geringere AC Aktivität, bei einer signifikanten Stimulation durch  $1 \mu\text{M}$  LAI-1 von  $34,6 \pm 5,2\%$  (Abb. 3.23).

Die Substitutionen der Rv1625c-CTE durch die CTE's von ACV konnten nur in den Paarungen B: ACV\_CTE1 & Rv1625c-CTE, C: ACV\_CTE1 & ACV\_CTE2, D: Rv1625c-CTE & ACV\_CTE2 und E: ACV\_CTE2 & ACV\_CTE2 kloniert werden (Abb. 3.23). Bei den Chimären B, C und D lag die CTE heterodimer vor, die Basalaktivitäten lagen zwischen  $36$  und  $383 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Die Aktivität des Leervektors betrug  $25 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  und wurde nicht abgezogen. Trotz geringer Basalaktivität von  $189 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  wies die heterodimere Chimäre B (ACV\_CTE1 & Rv1625c-CTE) eine signifikante Stimulation bei  $1 \mu\text{M}$  LAI-1 von  $102,2 \pm 11,5\%$  auf (Abb. 3.23). Alle Chimären mit der ACV\_CTE2 waren nicht reguliert (Chimären C und D, Abb. 3.23), mit Ausnahme der Chimäre mit doppelter ACV\_CTE2 (Chimäre E, Abb. 3.23). Chimäre E zeigte mit einer  $23,4 \pm 1,4\%$  signifikanten Hemmung durch  $1 \mu\text{M}$  LAI-1 und einer Basalaktivität von  $160 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  vergleichbare Werte wie das entsprechende Homodimer (vgl. Abb. 3.21). Im Allgemeinen wurde sowohl bei den Homodimeren als auch bei den Heterodimeren ein Abfall der Basalaktivität beobachtet, sobald die Rv1625c-CTE substituiert war.

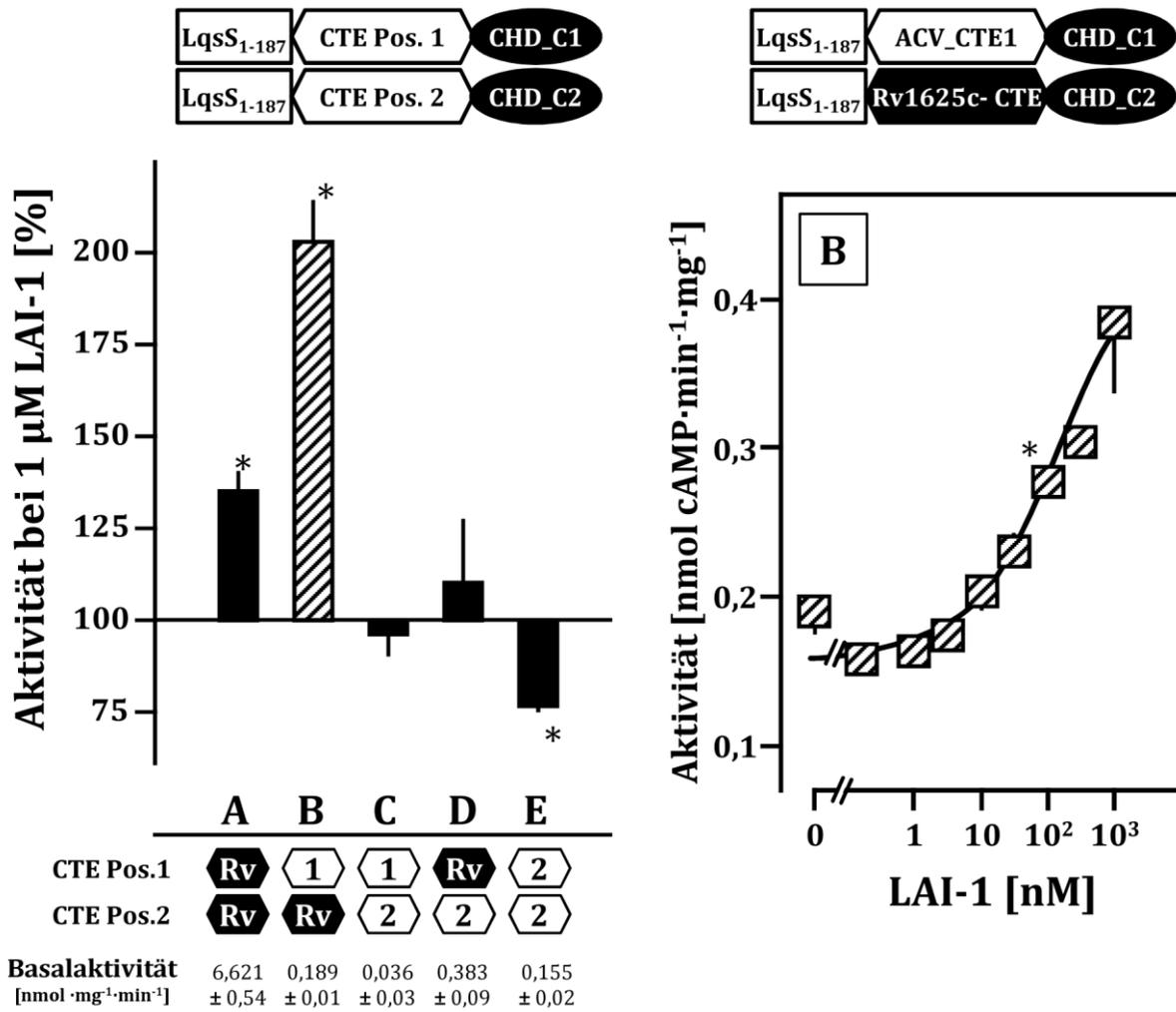


Abb. 3.23 Oben: Schema der Domänensequenzen. CHD\_C1=Rv1625C<sub>238-443</sub>(N372T R376H), CHD\_C2=Rv1625C<sub>238-443</sub>(D256S D300S S301T). Links: Aktivitäten der heterodimeren Membranproteine bei 1  $\mu$ M LAI-1 in %, 100% Aktivität entspricht der Basalaktivität. Darunter sind die Basalaktivitäten angegeben sowie die eingesetzten CTE's an den Positionen 1 und 2 (Rv = Rv1625c-CTE, 1 = ACV\_CTE1, 2 = ACV\_CTE2, vgl. Tab. 3.17). n = 2-3  $\pm$  S.E.M. 1,5  $\mu$ g Membranprotein; außer bei Heterodimer C: 20  $\mu$ g. \*, p<0,05. Das gestreift angegebene Heterodimer B ist rechts als Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt, EC<sub>50</sub> = 81 nM.

In den Western Blots war keine Proteolyse erkennbar, die beiden Monomere wurden mit Tag-spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 3.24).

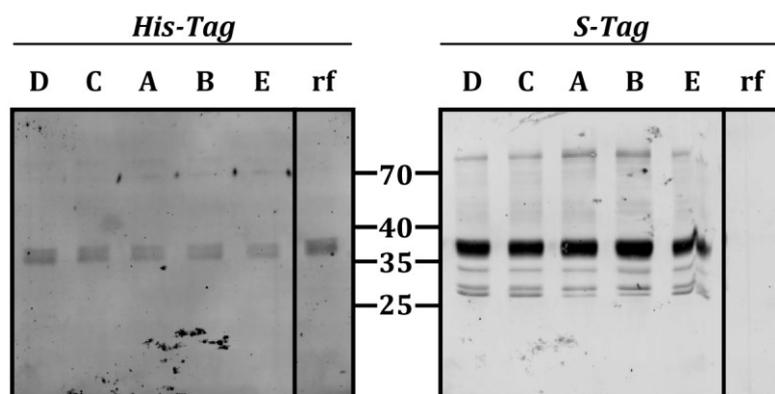


Abb. 3.24 Western Blot mit 1  $\mu\text{g}$  Protein der heterodimeren Membranproteine. Links: Das C1 Monomer wurde über den His-Tag detektiert. Erwartete Bandenhöhe: 47,6 kDa. Rechts: das C2 Monomer wurde über den S-Tag detektiert. Erwartete Bandenhöhe: 49,2 kDa. Spuren A bis E entsprechen den Konstrukten wie in Abb. 3.23 links unten angegeben. Spur rf = Homodimere Referenzchimäre mit His-Tag, 47,6 kDa.

#### CTE Substitution: cytosolische Pseudoheterodimere

In Rv1625c ist D204 die erste Aminosäure im Cytosol nach der letzten Transmembranhelix. Die auf den cytosolischen Teil reduzierte AC Rv1625c (204-443) hat eine Aktivität von  $101 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , bei Verkürzung um 9 bzw. 17 ASn ist eine Abnahme auf 22 bzw.  $1,4 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  beschrieben worden [75]. Weiterhin sind zwei Monomere mit einem 14 ASn langen Peptidlinker verbunden und die Punktmutationen R376A oder D300A eingeführt worden. Es wurde gezeigt, dass nur die Komplementation der beiden Mutationen in einer aktiven AC resultierte, das Heterodimer "R376A-Linker-D300A" hat eine Aktivität von  $253 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  [75].

Die Austauschbarkeit der CTE's sollte in solchen Heterodimeren untersucht werden, allerdings mit den fünf oben angeführten Komplementationsmutationen (Tab. 3.18). S. Breitkopf zeigte im Rahmen ihrer Dissertation, dass bei separater Expression der beiden cytosolischen Domänen Rv1625c\_C1 mit den Mutationen N372T, R376H bzw. Rv1625c\_C2 mit den Mutationen D256S, D300S, S301T keine enzymatische Aktivität vorhanden war, bei einer Koexpression jedoch eine Aktivität ähnlich der unmutierten Variante erreicht wurde [51].

Tab. 3.18 Übersicht der cytosolischen Pseudoheterodimeren. An Pos.1 und Pos.2 war jeweils eine der drei CTE's eingefügt. Es wurden alle neun Kombinationsmöglichkeiten generiert und getestet (siehe Abb. 3.25).

Rv1625c	CTE	Rv1625c_C1	Linker	Rv1625c	CTE	Rv1625c_C2
D204-D217	Pos.1	P238-V443 (N372T, R376H)	TRAAGGPPAAGGRS	D204-D217	Pos.2	P238-V443 (D256S, D300S, S301T)
eingesetzte CTE's: Rv1625c-CTE (R <sub>218</sub> SEALLANMLPASIAERLKE <sub>237</sub> ) ACV_CTE1 (Q <sub>430</sub> QERLLLSVLPRHVAMEMKA <sub>449</sub> ) ACV_CTE2 (Y <sub>1038</sub> NRLLHNLPKDVAAHFLA <sub>1057</sub> )						

Alle neun möglichen Heterodimere wurden kloniert (Tab. 3.18). Das Enzym mit der Rv1625c-CTE an Position 1 und 2 wurde als Wildtyp bezeichnet. Die durch den Linker verbundenen cytosolischen Monomere besaßen eine große DNA-Sequenz-übereinstimmung, daher wurden Mutationen separat kloniert. Die anschließende Zusammenführung der beiden Monomere erfolgte durch Restriktionsverdau unter Nutzung der isoschizomer schneidenden Enzyme BglII und BamHI (Abb. 2.6). Hierzu wurde der Linker TRAAGGPPAAGGRLE [75] zu TRAAGGPPAAGGRS mit einer C-terminalen BglII Schnittstelle modifiziert. Die WT-Enzyme mit je einem der beiden Linkern besaßen eine vergleichbare Aktivität von  $307,9 \pm 75,1 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  (..LE) und  $381,5 \pm 31,5 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  (..RS). Es wurde daher angenommen, dass die Veränderung des Linkers keine Auswirkungen auf die AC Aktivität hat. Die Enzyme wurden über ihren N-terminalen His-Tag aufgereinigt (2.9.5). Sie waren weder bei 4°C, -20°C noch bei -80°C lagerstabil, deshalb wurden sie direkt im Anschluss an die Dialyse auf Aktivität ohne Ligandenzugabe getestet.

Die Substitution einer oder beider Rv1625c-CTE's durch ACV\_CTE1 oder ACV\_CTE2 führte in allen Fällen zu einem Verlust an Basalaktivität um 80-90% (Abb. 3.25). Das Dimer mit zweimaliger ACV\_CTE1 war mit  $43,9 \pm 3,1 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  signifikant aktiver als das mit zweimaliger ACV\_CTE2 mit  $25,7 \pm 1,3 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Die Dimere ACV\_CTE1-ACV\_CTE2 und ACV\_CTE2-ACV\_CTE1 waren mit  $20,3 \pm 3,3 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  bzw.  $18,2 \pm 2,7 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  nicht signifikant unterschiedlich aktiv.

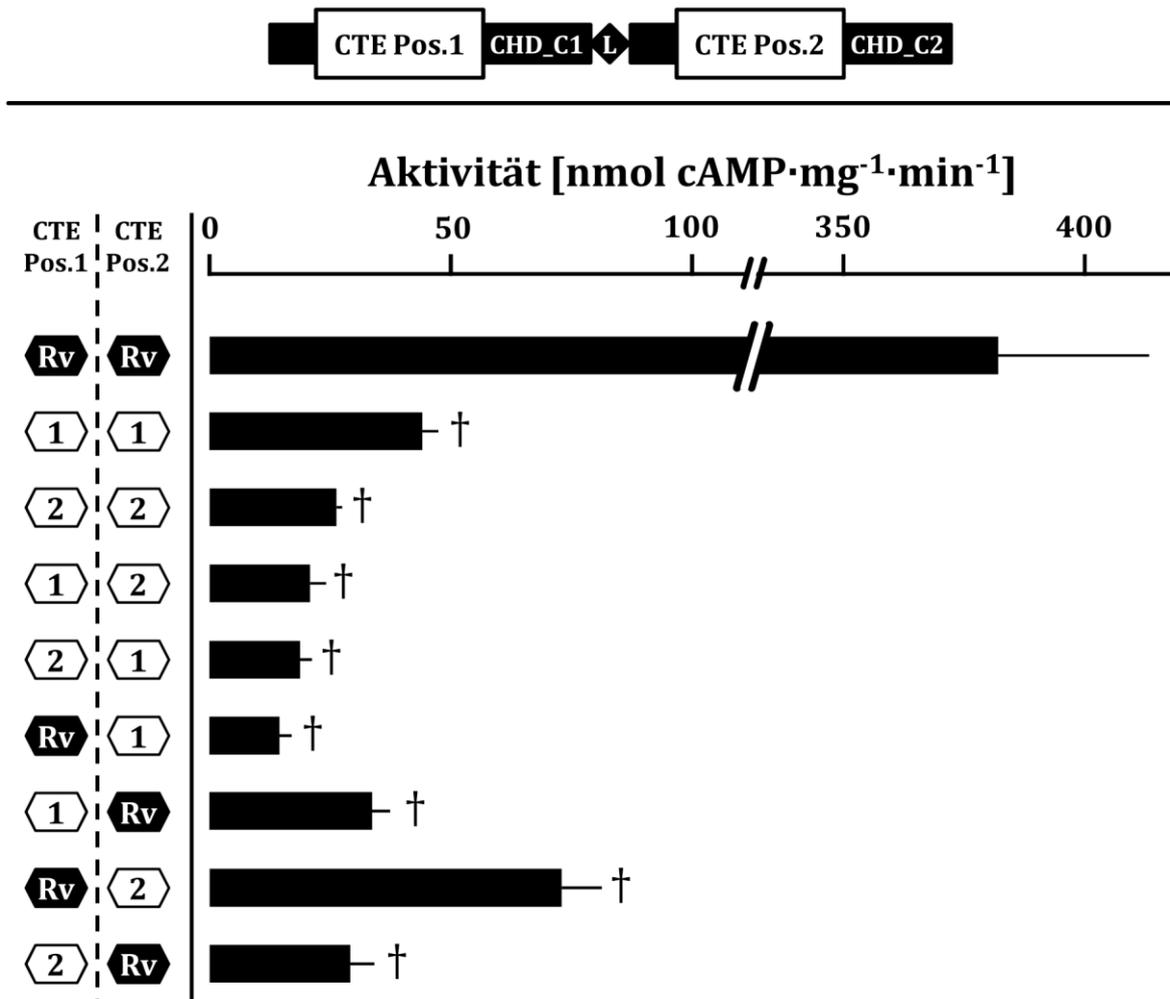


Abb. 3.25 Aktivitäten der cytosolischen Pseudoheterodimeren. Schema der Konstrukte oben, links sind die an beiden Positionen eingesetzten CTE's angegeben, 1 = ACV\_CTE1, 2 = ACV\_CTE2, Rv = Rv1625c-CTE (Sequenzen in Tab. 3.18). n = 2-20 (jeder erhaltene Wert im AC-Test wurde separat gewertet), ± S.E.M, 0,5 µg Protein mit 5 µg BSA Zusatz zur Stabilität. †, p < 0,001 zur Rv-Rv (=Wildtyp) Chimäre.

Die Dimere mit einer CTE von Rv1625c zeigten zueinander signifikant unterschiedliche Aktivitäten in Abhängigkeit der eingesetzten CTE Reihenfolge von Position 1 und Position 2. Rv1626c-CTE-ACV\_CTE1 war mit  $14,1 \pm 2,6$  nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> aktiv, hingegen zeigte ACV\_CTE1-Rv1625c-CTE mit  $33,2 \pm 3,9$  nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> eine etwa doppelt so hohe Aktivität. Ebenso war Rv1625c-CTE-ACV\_CTE2 mit  $72,3 \pm 8,3$  nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> aktiv, ACV\_CTE2-Rv1625c-CTE dagegen mit  $28,8 \pm 4,9$  nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> nur halb so aktiv.

Die Substitution der Rv1625c-CTE durch ACV\_CTE1 bzw. ACV\_CTE2 entsprach sequenziell dem Austausch von lediglich 13 bzw. 14 ASn, daher sollte der Grund des Aktivitätsverlustes genauer eingegrenzt werden. Es wurden zunächst Mutationen an der ACV\_CTE1 durchgeführt. Hierfür wurde das Dimer **ACV\_CTE1-Rv1625c-CTE** verwendet (Abb. 3.26 und Tab. 3.19), da hier eine maximale Aktivitätssteigerung durch die Dimerisierung mit Rv1625c-CTE zu erwarten war.

Tab. 3.19 Sequenzübersicht der ACV\_CTE1 Modifikationen (vgl. Abb. 3.26). In 1 B und 1 C wurde je zur Hälfte ACV\_CTE1 und Rv1625c-CTE (grau hinterlegt) eingesetzt. In Chimären 1 D und 1 E wurden Punktmutationen eingefügt (Kleinbuchstaben). N = 6-12, ± S.E.M. \*\*, p<0,01 zu Chimäre 1 A.

	AS Sequenzen der ACV_CTE1 Modifikationen	Aktivität [nmol cAMP·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	Relative Aktivität zu Konstrukt 1 A
<b>1 A</b>	QQERLLLSVLPRHVAMEMKA	33,2 ± 3,9	100%
<b>1 B</b>	QQERLLLSVLPASIAERLKE	45,4 ± 4,3	137%
<b>1 C</b>	RSEALLANMLPRHVAMEMKA	63,4 ± 6,8	191%**
<b>1 D</b>	QQrRLLhSVLPRHVAMEMKA	25,1 ± 2,9	76%
<b>1 E</b>	QQERLLLSVLPRHVAMhMKA	23,8 ± 2,8	72%

Für die Mutationen 1 B und 1 C wurden die letzten bzw. ersten zehn ASn von ACV\_CTE1 mit den entsprechenden ASn aus Rv1625c-CTE ersetzt. Beide Enzyme zeigten mit 45,4 ± 4,3 bzw. 63,4 ± 6,8 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> eine höhere Aktivität als ihr Ausgangskonstrukt (1 A, 33,2 ± 3,9 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>), sie betrug allerdings weniger als 20% der Aktivität des Rv1625c Wildtyps (381,5 ± 2,7 nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) (Abb. 3.26 und Abb. 3.25).

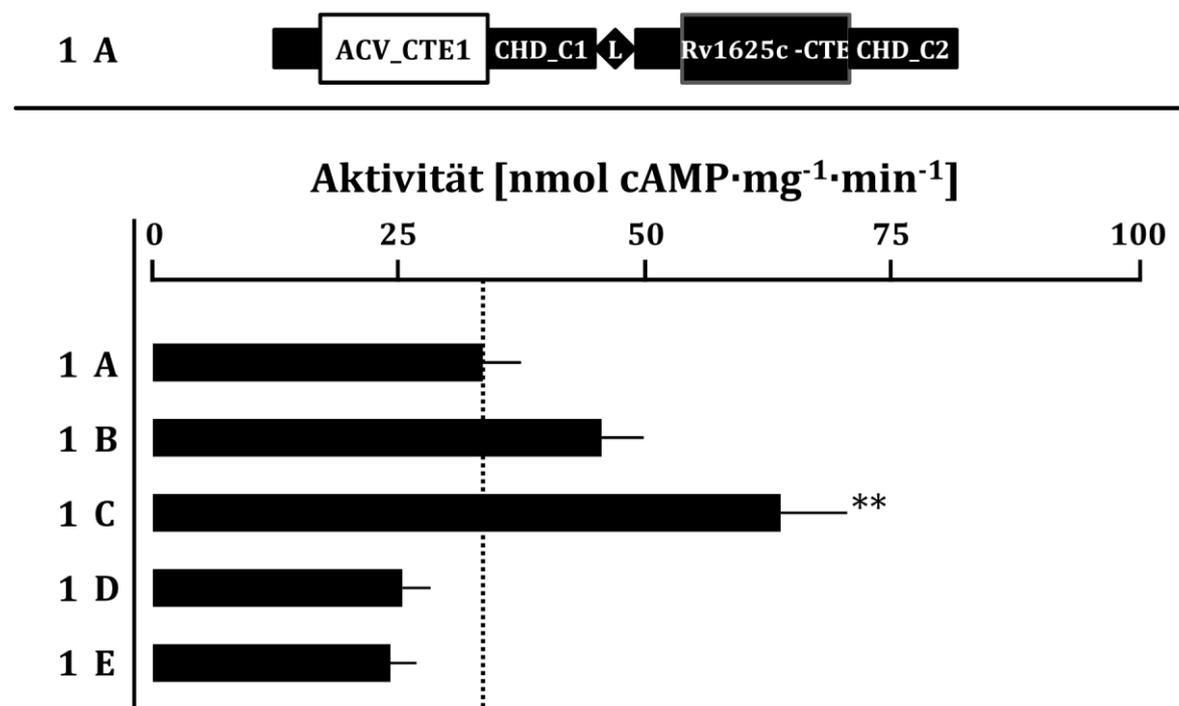


Abb. 3.26 Aktivitäten der cytosolischen Pseudoheterodimere. Schematische Darstellung der Chimäre 1 A oben, die Chimären 1 B bis 1 E sind identisch zu 1 A mit Ausnahme von Modifikationen in der ACV\_CTE1 (Sequenzen in Tab. 3.19). n = 6-12 (jeder erhaltene Wert im AC-Test wurde separat gewertet), ± S.E.M. 0,5 µg Protein mit 5 µg BSA Zusatz zur Stabilität. \*\*, p<0,01 zu Chimäre 1 A.

Bei den Dimeren 1 D und 1 E wurden Punktmutationen eingeführt, um die Ladungsverteilung innerhalb der CTE an die der ACV\_CTE2 bzw. der Rv1625c-CTE anzupassen. In beiden Fällen war die Aktivität geringer als bei der unveränderten ACV\_CTE1. Von Dimeren 1 B bis 1 E war Dimer 1 C als einziges signifikant unterschiedlich aktiv gegenüber 1 A.

Als weiteres Dimer wurde **Rv1625c-CTE-ACV\_CTE2** für Modifikationen an der ACV\_CTE2 ausgewählt (Abb. 3.27 und Tab. 3.20).

Tab. 3.20 Sequenzübersicht der ACV\_CTE2 Modifikationen (vgl. Abb. 3.27). In Chimäre 2 B wurde die Sequenz der CTE bis einschließlich des 'FAS' substituiert. Chimären 2 C bis 2 G wurden in der Länge bzw. der Position der CTE modifiziert. In Chimäre 2 H wurde eine Punktmutation eingeführt (Kleinbuchstabe). n = 2-12, ± S.E.M. \*, p<0,05, †, p<0,001 zu Chimäre 2 A.

	AS Sequenzen der ACV_CTE2 Modifikationen	Aktivität [nmol cAMP·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	Relative Aktivität zu Konstrukt 2 A
<b>2 A</b>	YNRLLHNILPKDVAAHFLA	72,3 ± 8,3	100%
<b>2 B</b>	YNRLLHNILPKDVAAHFLA RERRNDELYYQSCECVAVMFAS	20,2 ± 1,8	28%†
<b>2 C</b>	YNRLLHNILPKDVAAHFL-	50,7 ± 10,5	70%
<b>2 D</b>	AYNRLLHNILPKDVAAHFL-	41,5 ± 9,7	57%
<b>2 E</b>	AYNRLLHNILPKDVAAHFLA	36,6 ± 9,8	51%*
<b>2 F</b>	QAYNRLLHNILPKDVAAHFLA	51,8 ± 4,6	72%*
<b>2 G</b>	LQAYNRLLHNILPKDVAAHFLA	54,8 ± 4,3	76%
<b>2 H</b>	YNRLLHNILP <b>a</b> DVAAHFLA	55,6 ± 5,1	77%

Alle modifizierten Enzyme zeigten eine geringere Aktivität als das Ausgangsenzym 2 A, davon waren 2 B, E und F signifikant geringer aktiv. Da die Distanz zwischen der CTE und dem katalytisch relevanten "FAS"-Motiv bei ACV\_C2 und Rv1625c unterschiedlich ist, ist in der Mutante 2 B zusätzlich zur CTE die gesamte AS Sequenz bis einschließlich dem FAS-Motiv ersetzt worden. Dies resultierte in einem signifikant geringer aktiven Enzym. Bei den Mutanten 2 C, E, F und G wurde die Länge der CTE2 von 20 ASn auf 19, 21, 22 und 23 ASn verändert, bei 2 D die AS Sequenz um eine ASn Richtung N-Terminus verschoben. Auch die Einführung einer Punktmutation in 2 H führte zu einem geringer aktiven Enzym.

2 A

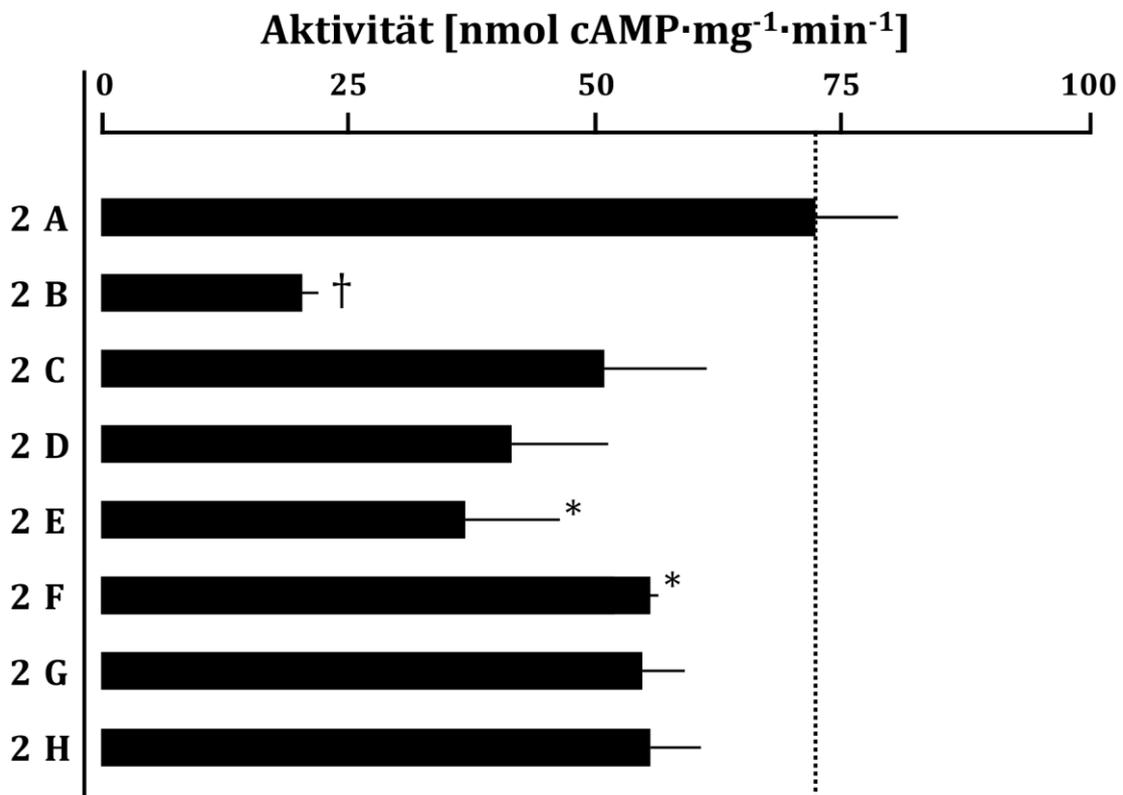



Abb. 3.27 Aktivitäten der cytosolischen Pseudoheterodimere. Schematische Darstellung der Chimäre 2 A oben, die Chimären 2 B bis 2 H sind identisch zu 2 A mit Ausnahme von Modifikationen in der ACV\_CTE2 (Sequenzen in Tab. 3.20). n = 2-12 (jeder erhaltene Wert im AC-Test wurde separat gewertet), ± S.E.M. 0,5 µg Protein mit 5 µg BSA Zusatz zur Stabilität. \*, p<0,05, †, p<0,001 zu Chimäre 2 A.

Alle cytosolischen Heterodimere wurden im Western Blot bei einem Molekulargewicht von 55,4 kDa detektiert (Abb. 3.28). Es wurden häufig weitere Banden mit niedrigerer Laufhöhe entdeckt. Da die cytosolischen Proteine nicht lagerstabil waren und bereits nach wenigen Tagen ein deutlicher Aktivitätsverlust messbar war, handelt es sich hier vermutlich um lysiertes Protein. Über Coomassie gefärbte SDS-PAGE Gele wurde der Reinigungserfolg überprüft (Abb. 3.28, rechts unten).

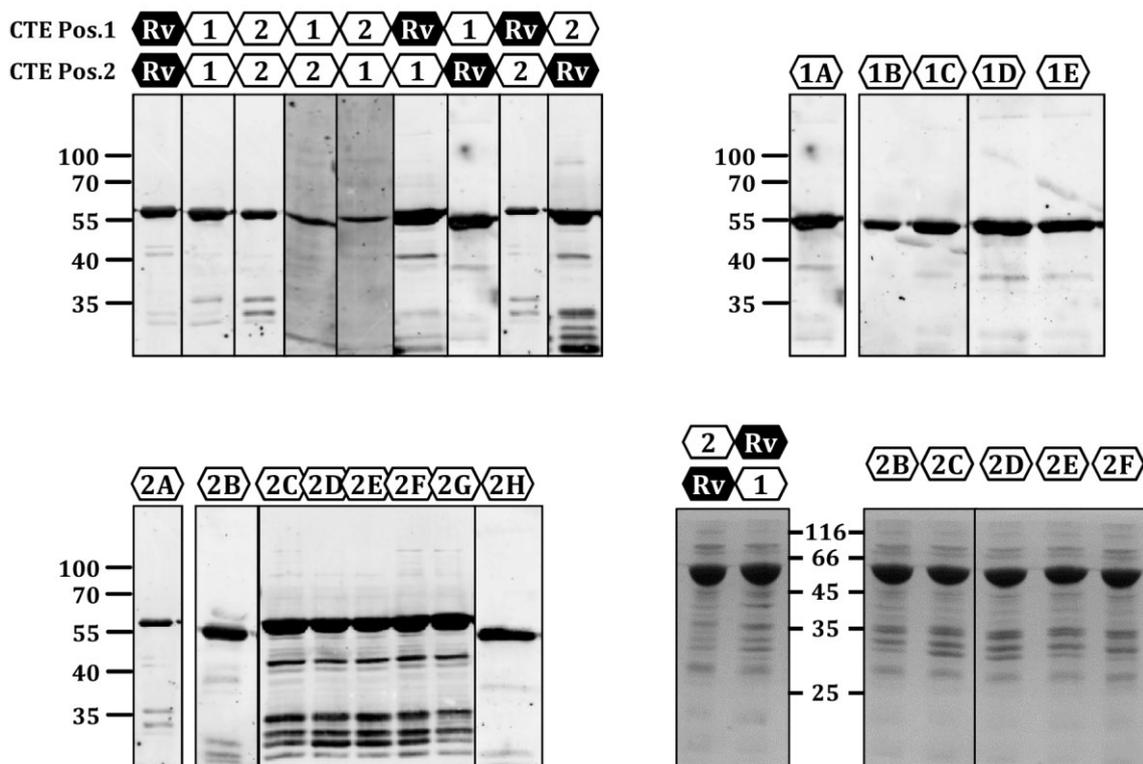


Abb. 3.28 Oben sowie unten links: Western Blots mit je 1  $\mu$ g Protein der cytosolischen Pseudoheterodimeren. Marker pEQLab IV. Unten rechts: Coomassie gefärbte SDS-PAGE Gele mit 5  $\mu$ g Protein. Marker: pEQLab I. Über jeder Spur ist das entsprechende Konstrukt wie in Abb. 3.25, Tab. 3.19 bzw. Tab. 3.20 angegeben. Erwartete Bandenhöhe jeweils 55,4 kDa.

### 3.5 Vergleich der Regulation durch LAI-1 und CAI-1

In dieser Arbeit wurde der QS Rezeptor LqsS von *Legionella pneumophila* mit dem Liganden LAI-1, einem S-3-Hydroxypentadecan-4-on, eingesetzt. Der Ligand CAI-1 für den QS Rezeptor CqsS von *Vibrio cholerae* ist S-3-Hydroxytridecan-4-on. Es wird vermutet, dass die Liganden in eine Bindetasche des Rezeptors binden, deren Größe auf den entsprechenden Liganden angepasst ist [156]. Da CAI-1 um zwei Kohlenstoffatome kürzer ist als LAI-1 (Abb. 1.8), könnten beide Liganden in eine solche Bindetasche passen.

Bei allen Chimären dieser Arbeit wurde zusätzlich zu den verschiedenen LAI-1 Konzentrationen auch immer die AC Aktivität bei 1  $\mu\text{M}$  CAI-1 gemessen. Beide Liganden waren in DMSO gelöst, daher wurde die durch DMSO Zugabe gemessene Aktivität als Basalaktivität für beide Liganden gewertet. Es werden abschließend die Aktivitäten beider Liganden bei der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  verglichen (Abb. 3.29).

Bei etwa 40% aller Chimären bewirkten LAI-1 und CAI-1 eine vergleichbare Regulation, zumeist handelte es sich hier um schwache bzw. unregulierte Chimären. Bei etwa 25% der Chimären war durch LAI-1 eine deutlich stärkere Regulation als durch CAI-1 messbar, bei etwa 18% verhielt es sich umgekehrt. Nur bei etwa 18% der Chimären wurde durch LAI-1 und CAI-1 eine gegensätzliche Regulation beobachtet. Es handelt sich vorrangig um Chimären aus Kapitel 3.2, in dem die Anknüpfposition von LqsS mit Rv1625c untersucht wurde, zumeist waren die Aktivitäten bei 1  $\mu\text{M}$  LAI-1 und 1  $\mu\text{M}$  CAI-1 allerdings gering.



## 4 Diskussion

Die Signaltransduktion über die Zellmembran ist ein effektiver und effizienter Mechanismus für eine Zelle, auf äußere Reize zu reagieren, ohne das auslösende Signal energetisch aufwendig zu prozessieren. Trotz der hohen Spezifität ist vielen signaltransduzierenden Proteinen ein ähnlicher modularer Aufbau gemein. Die zuständigen Proteine besitzen eine Rezeptordomäne in der Membran, sowie eine Effektordomäne im Cytosol. Dazwischen sind häufig weitere Domänen und Module wie beispielsweise die HAMP, die S-Helix und die CTE lokalisiert, die als Signalmodulatoren wirken. Mit Untersuchungen zur Interaktion dieser verschiedenen Module und Domänen werden Erkenntnisse für das bessere Verständnis des Mechanismus der Signaltransduktion gewonnen.

Der Mechanismus der Signaltransduktion der häufig vorkommenden HAMP Domäne wurde zwar ausführlich bearbeitet, ist jedoch nicht vollständig geklärt [27]. Die S-Helix ist ein konserviertes Segment von etwa 40 ASn, das häufig zwischen zwei signalisierenden Domänen vorkommt und wie die HAMP Domäne ein für coiled coils typisches Heptadenmuster besitzt [28]. In dieser Arbeit wurden eingangs Experimente zur Kommunikation zwischen **HAMP Domäne**, **S-Helix** und CHD durchgeführt, um die Frage nach der Eigenständigkeit der S-Helix als Signaltransduktionsmodul zu beantworten. Bei der Untersuchung der Verknüpfungspositionen bei Chimären aus LqsS und Rv1625c wurde ein völlig neues Modul, das Cyclase-Transducer-Element (**CTE**) biochemisch charakterisiert.

### 4.1 Die S-Helix in Tsr Chimären

Die S-Helix der Klasse IIIa AC CyaG aus *A. maxima* ist 25 ASn lang und zwischen der HAMP und der CHD lokalisiert [28]. Ihre biochemische Charakterisierung erfolgte in Tsr-CyaG chimären Proteinen, der signalinvertierende Einfluss wurde auf ein Baumuster von Heptade plus Stutter (7 ASn + 4 ASn) zurückgeführt [151]. Ein Stutter wurde auch in der S-Helix des NarX Sensors in *E. coli* identifiziert. Ihm wurde eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion zugeordnet [26, 157].

Eine spannende Frage war, ob die S-Helix auch mit der **Klasse IIIb AC Rv3645** funktionell ist. In Klasse IIIb ACn wurde bisher keine S-Helix identifiziert. In der vorliegenden Arbeit führte das Einfügen der S-Helix in verschiedenen Längen zwischen HAMP und Rv3645 CHD meist zu aktiven, aber unregulierten Enzymen. Folglich unterbinden die zusätzlichen ASn der S-Helix die katalytische Aktivität nicht. Allerdings waren die Chimären durch die resultierende Struktur mit wenigen Ausnahmen nicht

mehr in der Lage, das Signal der variierenden Ligandenkonzentrationen weiterzuleiten. Wurde eine Regulation durch Serin beobachtet, handelte es sich nicht um eine Signalinversion. Den Ergebnissen zufolge konnte der S-Helix in dieser Domänenkonfiguration der Status eines Signaltransduktionsmoduls, der weitgehend Kontext unabhängig ist, nicht bestätigt werden. Für die Herstellung funktioneller Chimären ist es wichtig, die Verknüpfung an den entscheidenden Positionen vorzunehmen. Es ist allerdings möglich, dass die Anknüpfpositionen für die Drei- bis Vierfachchimären nicht optimal gewählt waren. Da die Chimären aber ohne S-Helix durch Serin reguliert waren [1, 82] und hier 'nur' verschiedenlange S-Helices eingesetzt wurden, ist dies eher unwahrscheinlich. Es wäre auch möglich, dass die Klasse IIIb AC Rv3645 inkompatibel mit einer S-Helix ist. Bisher gibt es dafür keine sicheren Hinweise. Die Klasseneinteilung von ACn beruht vorrangig auf bioinformatischen Erkenntnissen von speziellen Peptidmotiven, z.B. von bestimmten ASn an der katalytischen Position der Substratbindung.

Die Klasse IIIb AC Rv3645 besitzt einen 6 TM Membrananker, gefolgt von einer HAMP Domäne und der CHD. Die Distanz zwischen HAMP und dem katalytischen Aspartat beträgt 36 ASn. Bei der Klasse IIIa AC CyaG ohne S-Helix ist dieser Abstand mit 37 ASn vergleichbar, somit ist eine ähnliche Flexibilität der Struktur grundsätzlich zu erwarten. Nach den jetzigen Ergebnissen handelt es sich bei dem beschriebenen Linker von Rv3645 um eine CTE (Abb. 7.2).

Nachfolgend wurde die **CHD** der **Klasse IIIa AC CyaG** eingesetzt, um die Anzahl verschiedener Enzymdomänen zu reduzieren und die Fragestellung der Interaktion auf die HAMP Domäne und die S-Helix zu begrenzen. Dimere HAMP Domänen besitzen eine charakteristische coiled-coil Struktur aus vier  $\alpha$ -Helices, bei der die hydrophoben ASn im Inneren lokalisiert sind und zumeist die Positionen a und d nach der Nummerierung in Heptaden (abcdefg) einnehmen. Auch die vorhergesagte Struktur der S-Helix von CyaG ist eine  $\alpha$ -Helix. Eine gelöste Struktur einer S-Helix aus der  $\beta$ 1 Untereinheit der löslichen Guanylatcyclase der Ratte (pdb: 3hls) stimmt hiermit überein [158]. Es wäre denkbar, dass die S-Helix die helikale Drehung der zweiten Helix der HAMP Domäne fortsetzt und die dimere S-Helix ebenfalls eine coiled-coil Struktur ausbildet, bei der möglicherweise hydrophobe ASn an charakteristischen Positionen auftreten [28]. Durch den Einsatz der um bis zu vier ASn verkürzten HAMP Domäne von Af1503<sub>S288I/A291I</sub> waren verschiedene ASn der S-Helix auf die entsprechenden Positionen a und d gesetzt worden. Ausschließlich bei den Chimären mit vollständiger Af1503 HAMP Domäne wurde eine Signalinversion durch die An- bzw. Abwesenheit der S-Helix beobachtet.

Die Insertion der auf 18 ASn verkürzten S-Helix zeigte jedoch einen unerwarteten Effekt. Mit jeder zusätzlich C-terminal entfernten AS der HAMP Domäne waren die Chimären mit 18 ASn langer S-Helix abwechselnd stimuliert und gehemmt durch Serin. Eine Erklärung für dieses Verhalten ist mit den experimentell ermittelten Daten zu diesem Zeitpunkt nicht abschließend möglich. Da die Enzyme jedoch aktiv sind, müssen die

katalytischen Zentren im Grundzustand dimerisieren. Davon ausgehend, dass die S-Helix die  $\alpha$ -helikale Drehung der HAMP Domäne fortsetzt, müsste die Deletion jeder weiteren AS der HAMP Domäne zu einer Über- bzw. Unterdrehungen der Helix führen. Das Signal von Serin sollte dann zu einer Entspannung bzw. Spannung führen, wodurch die Positionierung der katalytischen Domänen zueinander so verändert wird, dass die entsprechend umgekehrte Regulation auftritt. Würde die S-Helix hingegen in einer random coil Struktur vorliegen, dürfte aufgrund der hohen Variabilität der Struktur keine Regulation durch Serin erwartet werden.

Eine weitere Fragestellung war, wie eine AC ohne HAMP auf ein Signal durch eine HAMP bzw. HAMP mit S-Helix reagieren würde. Hierfür wurde die CHD von CyaG der Tsr-CyaG Chimären von K. Winkler in der vorliegenden Arbeit durch die **Rv1625c CHD** ab R218 ersetzt. Es wurde von einer guten Kompatibilität ausgegangen, da beide CHDn zu den Klasse IIIa ACn gehören, die N-Termini jeweils mit den ASn "RSE" beginnen und sie weitere auffällige Sequenzähnlichkeiten besitzen (4.3). Anders als bei CyaG befindet sich bei Rv1625c zwischen dem 6 TM Membrananker und der CHD lediglich ein 14 ASn kurzer Linker (D204-D217). Die Dreifachchimären aus Tsr Rezeptor, CyaG HAMP und S-Helix sowie Rv1625c CHD wurden durch Serin signifikant gehemmt, die Chimären ohne S-Helix signifikant stimuliert. Ein Versatz der Deletion der 25 ASn im Raster von vier ASn in N-terminale Richtung führte ebenfalls zu einer signifikanten Stimulation durch Serin. Somit war die Länge der Deletion entscheidend bzw. die ausgebildete Struktur der jeweils verbleibenden vier ASn (DSFI bzw. QEKE) muss extrem ähnlich sein. Diese drei Chimären (Tab. 3.4) waren bis auf die CHD sequenzidentisch zu drei Chimären von K. Winkler [151]. Die Regulation durch Serin war jedoch vergleichbar, folglich sind die beiden CHDn funktionell austauschbar. Mit der CHD von Rv1625c wurden jedoch stets höhere Basalaktivitäten gemessen (siehe auch Tab. 3.11 und Tab. 3.13), was möglicherweise an einer generell höheren Affinität der Rv1625c CHDn zueinander liegen könnte.

Bereits 2011 waren Chimären aus Tsr Rezeptor, CyaG HAMP mit S-Helix und Rv1625c erzeugt worden, allerdings mit anderen Anknüpfpositionen [82]. Beide Chimären waren aktiv, aber nicht durch Serin reguliert. Es war einmal die Rv1625c ab L202 an die CyaG HAMP angeschlossen worden. Nach aktuellen Strukturvorhersagen befindet sich L202 noch in der Membran, während D204 die erste AS im Cytosol ist und die CHD erst ab R218 beginnt. Ein andermal war an den Tsr Rezeptor die CyaG bis E485, und anschließend die Rv1625c ab E249 angeschlossen worden. Die Verknüpfungsstelle zwischen CyaG und Rv1625c befand sich hier jeweils kurz vor dem katalytischen Aspartat im 'FAD'-Motiv [82].

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse unterstreichen die bisherigen Erkenntnisse, dass Domänen aus unterschiedlichen Proteinen kombiniert in einem chimären Enzym zu einer koordinierten und regulierten intramolekularen

Signaltransduktion fähig sind. Wie bei verschiedenen Sprachen, deren Aufbau sich ähnelt, können einzelne Bausteine ausgetauscht und die Kommunikation aufrecht erhalten werden. Die inaktiven Chimären weisen allerdings darauf hin, dass es auf ein gewisses Feintuning, auf die richtige Anknüpfposition ankommt. Modulartig vermag die S-Helix das Signal durch ihre An- bzw. Abwesenheit zu invertieren. Sie ist jedoch nicht mit allen umgebenden Domänen kompatibel. Es besteht offensichtlich eine gewisse Kontextspezifität.

## 4.2 LqsS als Rezeptor für Adenylatcyclasen

Die bisher in Chimären eingesetzte Rezeptordomäne von Tsr besitzt 2 TM Helices, die mit einer großen periplasmatischen Schleife verbunden sind, in welcher der Ligand Serin bindet. Jedoch besitzen neun der zehn Isoformen der ACn in Wirbeltieren sowie etliche bakterielle ACn der Klasse IIIa Membrandomänen aus 6 TM Helices, die mit kurzen extramembranal Schleifen verbunden sind. Sie besitzen damit eine große Ähnlichkeit mit den Quorum Sensing (QS) Rezeptoren LqsS und CqsS von *L. pneumophila* bzw. *V. cholerae*.

Da eine unterschiedliche Dynamik der Signaltransduktion bei 2 TM und 6 TM Rezeptoren wahrscheinlich ist, sollte der Membrananker der für Wirbeltiere prototypischen mykobakteriellen AC Rv1625c durch einen QS Rezeptor ausgetauscht werden. Die chimären Proteine aus QS Rezeptor und Rv1625c Cyclase sind in ihrem Domänen-aufbau den tierischen ACn ähnlich. Erste Verknüpfungen von LqsS und CqsS Rezeptor mit der Rv1625c CHD wurden von S. Beltz durchgeführt mit dem Ziel, chimäre Proteine zu generieren, die durch den jeweiligen Liganden reguliert wurden. Hier zeigten sich Unterschiede zwischen den Rezeptoren. CqsS-Rv1625c Chimären waren stets durch CAI-1 stimuliert, während bei LqsS-Rv1625c Chimären sowohl Stimulation als auch Hemmung durch LAI-1 beobachtet wurde [138]. Eine Erklärung könnte in den unterschiedlichen QS Systemen von Vibrionen und Legionellen begründet sein. In Vibrionen gibt es zwei bis vier QS Systeme. Jedes System besitzt einen ligandenspezifischen Rezeptor, dessen Signal im Cytosol im Antwortregulator LuxO konvergiert [123, 125]. In *L. pneumophila* wurde bislang hingegen nur ein QS System identifiziert. Mit LqsS und LqsT besitzt es zwei zu 31% identische Rezeptoren für den Liganden LAI-1, sie werden in unterschiedlichen Wachstumsphasen exprimiert. Ihre Signale wirken auf den gleichen Antwortregulator (LqsR) und sind dabei teilweise antagonistisch [131, 159, 160]. Drei Chimären von LqsS-Rv1625c wurden von S. Beltz zur Verfügung gestellt, exprimiert und getestet. Die Aktivitäten waren vergleichbar und wurden hier zusammengefasst.

Die drei Chimären besaßen mit R218 eine identische Anknüpfposition seitens der Rv1625c AC. Für die drei verschiedenen Längen von LqsS wurde beim Membranausgang

Y178 eine starke Hemmung, beim vier ASn entfernten M182 eine etwas geringere Hemmung und beim neun ASn entfernten M191 schließlich eine Aktivierung beobachtet. Hier wurde daher die Vermutung untersucht, ob es einen linearen Verlauf zwischen Regulation und Rezeptorlänge gibt. Mit acht weiteren Chimären von LqsS (L183 bis A192) an R218-Rv1625c wurde diese Vermutung widerlegt. Zunächst fiel eine relative große Varianz der gemessenen Basalaktivitäten auf. Eine unterschiedliche Proteinexpression konnte als Grund ausgeschlossen werden, da die Proteinbandenintensitäten im Western Blot vergleichbar waren. Tendenziell besaßen unregulierte oder gehemmte Chimären eher höhere, stimulierte eher niedrigere Basalaktivitäten. Insgesamt konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Basalaktivität, Regulation und der Länge von LqsS definiert werden. Dies erschwerte einen Rückschluss auf die im Dimer vorherrschende Struktur zwischen Membran und katalytischen Zentren. Da alle Chimären bis A192 aktiv und reguliert waren, konnte von einer strukturell funktionellen Dimerisierung der Rezeptoren und katalytischen Zentren ausgegangen werden. Folglich müssten die Unterschiede durch die Längendifferenzen der Verknüpfungspositionen bewirkt werden. Zwischen M182 und K187 wurde sogar eine alternierende Regulation durch LAI-1 beobachtet, ein Muster, welches zuvor schon bei Tsr Chimären mit verkürzter HAMP Domäne beobachtet wurde. Wie die HAMP Domäne war auch der cytosolische Bereich von LqsS direkt hinter dem Membranausgang mit helikaler Struktur vorhergesagt worden. Wenn der verbindende Bereich im Dimer als helikale Struktur erhalten bliebe, sollte sich diese Helix durch die zusätzlichen ASn über- bzw. unterdrehen. Dementsprechend würde das LAI-1 Signal eine Spannung bzw. Entspannung bewirken. Dann wäre dieses alternierende Muster der Regulation als ein Charakteristikum für solch eine helikale Struktur zu werten. Da es allerdings nicht durchgängig bei allen Anknüpfpositionen beobachtet wurde, kann dies nicht alleine als Erklärung dienen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine stabilisierende bzw. destabilisierende Interaktion der CHD mit den verbindenden ASn, beispielsweise ein struktureller Wechsel zwischen Helix und random coil. Eine solche wurde in der gelösten Struktur von Rv1264 beobachtet. Dort stellt diese Form der Interaktion den Regulationsmechanismus der Cyclase dar [76]. Die genaue Struktur zu kennen, die die Signaltransduktion derart beeinflusst, ist eine zentrale Fragestellung, die am besten mit strukturellen Untersuchungen zu klären wäre. Chimären mit noch längerer LqsS Sequenz als A192 waren nicht durch LAI-1 reguliert. Der cytosolische Teil von LqsS reichte hier schon bis in die Region der H-Box, in der das bei Histidinkinasen für die Phosphorylierung essentielle Histidin lag. Eine funktionelle Struktur dieses langen Bereiches wird möglicherweise in Histidinkinasen von anderen cytosolischen Elementen stabilisiert, die in diesen Chimären fehlen. Daher wäre es möglich, dass die für die Signaltransduktion erforderliche Struktur in dieser Länge mit der Rv1625c CHD nicht ausgebildet werden kann.

Für LqsS war die optimale Anknüpfposition mit K187 bestimmt worden, es folgten Untersuchungen zur optimalen Anknüpfposition von Rv1625c an LqsS-K187. Die Basalaktivitäten der Chimären besaßen hier eine stärkere Varianz als die der LqsS

Chimären zuvor. Es war außerdem eine deutliche Tendenz erkennbar. Wie bereits für größere Abstände gezeigt worden war [75], war die Basalaktivität desto geringer, je kürzer die CHD war. Alle Anknüpfpositionen vor R218 führten zu hochaktiven, unregulierten Chimären, sowie nach L223 zu gering aktiven, unregulierten Chimären (siehe Abb. 3.8). Folglich wurde nur ein kurzer Sequenzbereich für die Erzeugung funktioneller Rv1625c Chimären toleriert. In diesem Bereich wurde mit Ausnahme von A221 wie zuvor ein alternierendes Muster von Stimulation und Hemmung beim Längeninkrement von einer AS beobachtet. Nach bisherigen Vermutungen müsste daher auch der N-terminale Bereich der CHD helikal vorliegen, was Strukturvorhersagen entspricht. Dass die Chimäre an A221 eine Stimulation anstatt der erwarteten Hemmung zeigt, kann zwei Ursachen haben. Möglicherweise ist die Struktur hier nicht helikal, was jedoch unwahrscheinlich ist, da Alanin eher zu den Helix begünstigenden ASn gehört. Wahrscheinlicher ist, dass die kleine AS Alanin im Gegensatz zu den größeren ASn wie Leucin, Glutamat und Lysin eine weniger starke Interaktion mit den ASn der nächsten Helixwindung ausbildet und somit eine größere Strukturflexibilität zulässt. Bei allen regulierten Chimären mit variablen Anknüpfpositionen von LqsS oder Rv1625c lag die halbmaximal effektive Ligandenkonzentration im mittleren zwei- bis dreistelligen nanomolaren Bereich. Die Ligand-Rezeptor Affinitäten waren damit vergleichbar. Dies spricht für eine Unabhängigkeit der Interaktion der cytosolischen Module von der Rezeptordomäne und demonstriert die Plastizität der Signaltransduktion über die Membran [11, 151].

### 4.3 Ein neues Cyclase-Transducer-Element, CTE

2008 wurde von S. Dunin eine in einigen Adenylatcyclasen stark konservierte Region von etwa 22 ASn am N-Terminus der CHD mit bioinformatischen Methoden identifiziert (Kooperation mit Prof. Dr. A. Lupas, MPI Tübingen). Bisher wurde sie in Dissertationen als mögliches Element unter der Bezeichnung C-Helix geführt. A. Lupas benannte allerdings in Histidinkinasen eine andere Region ebenfalls als C-Helix [161]. Diese Region in ACn wurde hier biochemisch identifiziert und charakterisiert. Es wurde untersucht, ob es sich um ein eigenständiges Element handelt oder um eine Teilstruktur der CHD. Etliche dieser Ergebnisse sind in einer Publikation derzeit in Überarbeitung [38]. Die Region erhielt die Bezeichnung CTE, für Cyclase-Transducer-Element.

Die bioinformatischen Untersuchungen wurden von Jens Baßler (MPI, Tübingen) durchgeführt. In der Datenbank der Nukleotidcyclasen wurde die CTE ausschließlich in Klasse IIIa und b ACn gefunden, nicht in Klasse IIIc und d ACn. Die CTE stellt folglich ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der vier AC Subklassen dar. Die CTE wurde auch in den verwandten Guanylatcyclasen von Wirbeltieren, nicht aber in bakteriellen Diguanylatcyclasen gefunden [38]. Strukturvorhersagen zufolge besitzt die CTE eine

$\alpha$ -helikale Struktur, mit einer Beugung oder Unterbrechung durch ein mittig lokalisiertes, hochkonserviertes Prolin. Gelöste Strukturen mit der CTE sind lediglich von der GC der Ratte (pdb: 3hls) mit S-Helix sowie von der AC Isoform X des Menschen (pdb: 4clf) als Heterodimer bekannt. In beiden Fällen bilden die CTE's eine helikale Struktur aus, mit einer etwa mittig gelegenen Unterbrechung. Dies stimmt mit Strukturvorhersagen überein. Zur Gruppe der Klasse IIIa ACn gehören die neun membran gebundenen pseudoheterodimeren ACn von Wirbeltieren (Isoformen I bis IX) sowie viele bakterielle ACn. Eine ebenfalls von J. Baßler durchgeführte Cluster Analyse der Klasse IIIa ACn mit der CLANS Software zeigte eine deutliche Aufteilung der CTE's nach ihrer Herkunft von Wirbeltier C1, C2 und bakteriellen CTE's. Während bei bakteriellen CTE's keine Gruppierung erkennbar war, zeigten C1 und C2 CTE's eine zusätzliche Gruppierung in ihre neun Isoformen. Auch ihre Unterteilung nach Sequenzeigenschaften und Regulation in vier Gruppen (I, III, VIII; II, IV, VII; V, VI und IX) spiegelte sich wider [53, 162]. Eine Cluster Analyse mit den Sequenzen der CHDn ohne CTE's resultierte in einer ähnlichen Aufteilung. Dies wurde als ein deutlicher Hinweis für eine Koevolution von CTE und CHD gedeutet.

Nach den Untersuchungen zum optimalen Verknüpfungspunkt zwischen LqsS und Rv1625c (3.2) wurde klar, dass die CTE in Rv1625c mit R218 beginnt. Im Alignment mit der CyaG AC ist das entsprechende R456 die erste AS nach der S-Helix und markiert dort den Beginn der CTE bzw. der bisher notierten CHD. Obwohl in diesen beiden bakteriellen ACn die CTE's mit Arginin beginnen, war diese AS nicht auffällig in Klasse IIIa ACn konserviert (Abb. 3.16). Wie erwartet führten daher AS-Substitutionen von R218 in der LqsS-Rv1625c Referenzchimäre zu vergleichbar aktiven und regulierten Chimären. Die Deletion von R218 hingegen führte zu einer invers regulierten Chimäre (S219, Abb. 3.9). Es scheint hier demnach nicht eine spezielle Aminosäure essentiell zu sein, wohl aber ihr Vorhandensein.

Zu Beginn der Anfertigung dieser Arbeit wurde aufgrund bisheriger Vermutungen die CTE mit einer Länge von 20 ASn angenommen, bei Rv1625c von R218 bis E237. Im Sequenzlogo zeigte sich allerdings die 20. AS Position trotz häufigen Vorkommens von Alanin kaum konserviert, während die 19. AS Position hoch konserviert war. Zur Untersuchung der tatsächlichen Länge wurde die CTE daher in einigen weiteren Versuchen sowohl mit 19 als auch mit 20 ASn eingesetzt.

### **4.3.1 Interaktion von S-Helix und CTE in LqsS-Chimären**

Sollte es sich bei der CTE um ein funktionell eigenständiges Modul handeln, müsste sie mit anderen Signaltransduktionsmodulen wie der S-Helix oder der HAMP Domäne differenziert interagieren können. Um dies zu untersuchen, wurden die HAMP Domäne und die 25 ASn lange S-Helix von CyaG N-terminal der CTE von sowohl Rv1625c CHD als

auch CyaG CHD eingesetzt. Die CTE blieb folglich mit ihrer natürlichen katalytischen Domäne verbunden. Obwohl bereits erfolgreich LqsS-Rv1625c Chimären generiert worden waren, war unklar, wie sie auf ein dazwischengeschaltetes Modul reagieren. Die CyaG CHD interagiert natürlich mit den Modulen HAMP und S-Helix, es waren aber bisher keine LqsS-CyaG Chimären generiert worden. Basierend auf den LqsS-Rv1625c Chimären wurden für die Insertionsversuche jeweils drei Längen von LqsS verwendet, Y178, K187 und M191. Mit beiden CHDn wurden aktive und größtenteils ähnlich regulierte Chimären erzeugt, folglich sind sie funktionell austauschbar. Im Vergleich der LqsS-Chimären wurden bei Chimären mit Rv1625c CHD stets höhere Basalaktivitäten gemessen als mit CyaG CHD, den Western Blots zufolge schienen jedoch die CyaG Chimären stärker exprimiert als die Rv1625c Chimären. Es ist denkbar, dass die katalytischen Domänen von Rv1625c eine höhere Affinität zueinander besitzen als die von CyaG.

In allen Chimären, die ohne S-Helix stimuliert waren, führte die Insertion der S-Helix von CyaG N-terminal zur CTE zu einer Signalinversion. Die Möglichkeit bestand, dass die Signalinversion lediglich durch eine Insertion von 25 ASn und nicht zwingend von der S-Helix selbst bewirkt wurde. Als Kontrolle erfolgte daher der Einsatz von 25 ASn, die sich sequenziell von der S-Helix unterschieden, es handelte sich jeweils um die 25 ASn von LqsS fortlaufend von der nominellen Anknüpfposition. Hier wurde keine Regulation durch LAI-1 beobachtet. Weiterhin führte die Insertion der S-Helix zu deutlich erhöhten Basalaktivitäten, während die Insertion der 25 ASn von LqsS in geringen Basalaktivitäten resultierte. Folglich müssen S-Helix und die 25 ASn von LqsS unterschiedliche Strukturen ausbilden, obwohl beide Sequenzen mit einer helikalen Struktur vorhergesagt werden. Aufschlussreich wäre der Einsatz anderer 25 ASn mit anderen strukturellen Eigenschaften an dieser Stelle, weiterhin könnten Kristallstrukturen Hinweise über die Funktionsweise dieser Segmente geben.

Das Einfügen der HAMP Domäne zwischen Rezeptor und S-Helix führte nur bei LqsS-M191 zu regulierten Chimären, sie wurden durch LAI-1 stimuliert. Es war ein Muster erkennbar: Lediglich aus Rezeptor- und Effektor-domäne bestehende Chimären waren stimuliert, mit eingefügter S-Helix trat Hemmung auf, mit zusätzlich eingefügter HAMP Domäne trat erneut Stimulation auf. Jedes weitere eingefügte Modul bewirkte also eine Signalumkehr. Dieses Schema wurde auch in chimären Tandem-HAMP Enzymen beobachtet, bei dem jede HAMP Domäne als Modul eine Signalumkehr bewirkt und sich die Vorzeichenwechsel in Tandem-HAMPs somit wieder aufheben [163]. Auffällig war, dass die Chimären mit beiden Cyclasen eher mit einem weiteren Modul kompatibel waren, je länger LqsS eingesetzt worden war. Vermutlich erfordert die Signaltransduktion von LqsS über mehrere funktionelle Strukturen der Signalwandler eine gewisse Flexibilität durch eine Art Linker am Membranausgang.

Zur weiteren Untersuchung der Kommunikation der Module wurden die S-Helix, aber auch die vormals verwendeten 25 ASn von LqsS C-Terminal der CTE (zwischen CTE und CHD) der Referenzchimäre eingesetzt. Beide Insertionen bewirkten eine hohe Stimulation und damit keine Signalinversion. Auch waren in beiden Fällen die Basalaktivitäten niedrig bei vergleichbaren Expressionslevel. Dies lässt sich gut erklären mit der Vermutung, dass beide 25 ASn hier wie eine Verlängerungshelix wirken. Bezüglich der Dimerisierung der CHDn bedeutet dies mehr Freiheitsgrade für die Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichtes, was möglicherweise in einer weniger starren Struktur des Dimers resultiert und folglich die geringe Basalaktivität erklärt. In den Chimären lagen die Ligandenkonzentrationen für halbmaximale Regulation im vergleichbaren zweistelligen nanomolaren Bereich. Dies spricht für eine Unabhängigkeit der Interaktion der cytosolischen Module von der Rezeptordomäne und demonstriert die Plastizität der Signaltransduktion über die Membran [11, 151].

Die CTE wurde in der Referenzchimäre am C-Terminus auf 19 bzw. 18 ASn verkürzt und anschließend die S-Helix N- bzw. C-terminal eingefügt (Abb. 3.19), um anhand möglicher unterschiedlicher Interaktionen Rückschlüsse auf die Länge der CTE zu ziehen. Die C-terminal verkürzten Chimären waren etwas stärker durch LAI-1 stimuliert, allerdings waren die Basalaktivitäten gering. Im Gegensatz dazu waren bei den Chimären mit N-terminal um ein bis zwei ASn verkürzten CTE's für jede zusätzlich deletierte AS eine Signalinversion bei vergleichbarer Basalaktivität beobachtet worden (S219 und E220, Abb. 3.9). Die N- bzw. C-terminale Insertion der S-Helix bei 19 und 20 ASn langer CTE führte zu vergleichbaren Regulationen. Im Hinblick auf die geringeren Basalaktivitäten der kürzeren CTE wäre es allerdings wahrscheinlicher, dass die Länge der CTE 20 ASn beträgt, wohingegen nach bioinformatischen Analysen eine Sequenzlänge von 19 ASn angenommen wurde, da die 20. Position nicht hochkonserviert war. Zu bedenken gilt hier, dass eine hohe Sequenzkonservierung nicht zwangsläufig mit Domänengrenzen einhergehen muss, beispielsweise zeigt die erste Position der CTE (R218 in Rv1625c) eine hohe Variabilität. Mit 18 ASn langer CTE konnte kein Protein mit C-terminaler Insertion der S-Helix exprimiert werden. Auf Sequenzrichtigkeit und Vektorintegrität wurde geprüft, weiterhin zeigten die *E. coli* Zellen bei der Expression ein normales Wachstum, die Expression des Proteins war folglich nicht toxisch. Das exprimierte Protein war daher entweder instabil oder wurde falsch gefaltet, sodass es sofort abgebaut wurde. Die N-terminale Insertion der S-Helix resultierte zwar in einer Signalinversion, untypischerweise war die Basalaktivität jedoch nicht höher, sondern niedriger als ohne S-Helix. Zusammenfassend lässt sich somit schlussfolgern, dass eine funktionelle CTE länger als 18 ASn sein muss, nach Erkenntnissen aus den biochemischen Experimenten ist sie 20 ASn lang.

Während die Deletion der S-Helix in Signalinversion resultiert, führt die Deletion der CTE in LqsS-Rv1625c Chimären zum Verlust von Aktivität. Die relativ kleinen Module CTE und S-Helix besitzen folglich unterschiedliche Funktionen. Die S-Helix wird als

durchgängige helikale Struktur vorausgesagt, die CTE nimmt hingegen wahrscheinlich die Struktur einer durch einen Knick unterbrochene Helix an. Bei der Nummerierung der ASn in Heptaden wurde bei der S-Helix die für coiled-coil typische Häufung von hydrophoben ASn an den Positionen a und d gefunden, nicht aber bei der CTE. Aufgrund ihrer Kürze können beide Elemente keine komplexe Struktur annehmen, im Dimer könnten jedoch beide entscheidend zur Dimerisierung beitragen und eine Schalterfunktion übernehmen. Beispielsweise agiert die  $\alpha$ -N10 Helix in der pH sensitiven Rv1264 durch Ausbildung bzw. Zusammenbruch der helikalen Struktur ("regulated unfolding") wie ein Schalter, der katalytische Aktivität unterbindet oder zulässt [60].

Zusammenfassend kann der S-Helix aus CyaG mit nur wenigen Ausnahmen eine eigenständige Funktion als Modul bestätigt werden. Ihre Fähigkeit zur Signalinversion ist unabhängig von den eigenen direkt benachbarten Domänen HAMP und CHD. Aus den Experimenten kann man ableiten, dass die Reihenfolge cytosolischer Module für die Signaltransduktion von Rezeptor- auf Effektordomäne eine entscheidende Rolle spielt. Folglich ist die Eigenschaft der S-Helix, das Vorzeichen des Signals umzukehren, positionsabhängig, das weitergeleitete Signal ist unidirektional.

### 4.3.2 CTE Substitutionen

Bakterielle Klasse IIIa ACn sind als Homodimere aktiv, bei der Bildung des katalytischen Zentrums sind zwei identische CTE's und CHDn beteiligt. Im Gegensatz dazu sind alle neun Isoformen der membranständigen Klasse IIIa ACn von Wirbeltieren Pseudo-heterodimere. Die beiden CTE's und CHDn liegen auf einer Peptidkette und sind sequenziell verschieden. Die Sequenzen von CTE1 bzw. CTE2 der jeweiligen Isoform sind in allen Wirbeltieren identisch, besitzen aber untereinander einen hohen Konservierungsgrad (Abb. 7.1). CTE1 und CTE2 von AC Isoform V sowie die CTE von Rv1625c stimmen beispielsweise in fünf von 20 ASn überein, zwei bis vier ASn sind ähnlich (Abb. 3.20). Nach der bioinformatischen Analyse wurde eine Koevolution der CTE mit ihrer katalytischen Domäne für wahrscheinlich befunden [38]. Mit Substitutionen der Rv1625c-CTE durch die ACV\_CTE1 bzw. ACV\_CTE2 wurde in der Referenzchimäre LqsS-Rv1625c sowie in der löslichen Rv1625c AC überprüft, ob die CTE's funktionell austauschbar sind. In den membrangebundenen Chimären führte dies zu einem Aktivitätsverlust von über 94%, bei den cytosolischen Chimären zu mindestens 80%. Übereinstimmend mit den vorangegangenen Versuchen waren sowohl CTE-Modifikationen als auch die Trennung der CTE von der eigenen CHD stets mit einem deutlichen Aktivitätsverlust verbunden. Ähnliches war bei der CTE der Klasse IIIb AC Rv3645 beobachtet worden: Obwohl die Länge des dort Linker genannten Segments unterschiedlich war, führte eine Punktmutation am N-terminalen Ende zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust [1]. Es wurde daher spekuliert, dass dieser Linker bei der

Regulation der AC-Aktivität von Bedeutung sei. Die aktuellen Ergebnisse bestätigen diese Vermutung.

Trotz der verminderten Aktivitäten wurden die membrangebundenen Substitutionschimären zumeist durch LAI-1 reguliert. Als Homodimere wurden die ACV\_CTE1 Chimären stimuliert, im Gegensatz dazu wurden die ACV\_CTE2 Chimären gehemmt. Da in den Wirbeltier ACn die beiden CTE's als Paar interagieren, ist es möglich, dass jeder Partner auf das Signal unterschiedlich reagiert. Es wäre denkbar, dass beide CTE's auf ihre jeweilige Membrandomäne abgestimmt unterschiedliche Signale empfangen, da die Membrandomänen ihrerseits sequenzverschieden sind. Beide Erklärungen deuten auf eine Asymmetrie in der Struktur der CTE hin. Eine differenziertere Untersuchung der CTE's erfolgte anschließend als heteromeres Paar. Durch insgesamt fünf Modifikationen der katalytischen ASn in der Rv1625c CHD wurden die beiden katalytischen Domänen C1 und C2 von Wirbeltieren imitiert. Nur bei Paarung von Rv1625c\_C1 (N372T, R376H) und Rv1625c\_C2 (D256S, D300S, D301T) entsteht durch Komplementierung ein aktives Zentrum [51, 75], wodurch auch die erforderliche Paarung der eingefügten CTE's erfolgt. Wie auch beim Homodimer wurde die Chimäre mit doppelter ACV\_CTE2 gehemmt. Interessanterweise war die ACV\_CTE2 als Heterodimer mit ACV\_CTE1 oder der Rv1625c-CTE unreguliert durch LAI-1. Insbesondere bei der Kombination von ACV\_CTE1 mit ACV\_CTE2 war die Basalaktivität im Vergleich zu allen anderen CTE-Substitutionschimären noch niedriger und lag mit  $40 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  nur gering über der Empfindlichkeitsgrenze des AC-Assays. Dies war unerwartet, da es der Kombination der CTE's in der ACV entspricht. Im Hinblick auf die gegensätzliche Regulation durch LAI-1 als Homodimere kann man folglich mit Sicherheit annehmen, dass beide CTE's bei der Signaltransduktion unterschiedliche Aufgaben erfüllen und in der ACV aufeinander abgestimmt zur Signaltransduktion beitragen. Die Stimulation des Heterodimers aus ACV\_CTE1 und Rv1625c-CTE durch LAI-1 untermauert diese Annahme, da beide CTE's als Homodimere bereits stimuliert wurden.

Um zu prüfen, ob die Abnahme der Basalaktivitäten mit dem Signal von der Membrandomäne verknüpft war, wurden CTE Substitutionen auch im löslichen Teil von Rv1625c durchgeführt. Ein Pseudoheterodimer aus zwei cytosolischen Teilen von Rv1625c der Positionen D204-G443 mit einem 14 ASn langen Linker verbunden zeigte eine höhere Aktivität, dies wurde der erzwungenen räumlichen Nähe der beiden katalytischen Einheiten zugeschrieben [75]. Von A. Schultz war nach gleichem Schema ein Heterodimer der löslichen Teile (D204-G443) von Rv1625c\_C1 und Rv1625c\_C2 verbunden mit dem Tetradekapeptidlinker generiert worden. Rv1625c\_C1 und Rv1625c\_C2 besaßen die gleichen fünf Mutationen im katalytischen Zentrum wie die oben verwendeten membrangebundenen Heterodimeren. S. Breitkopf demonstrierte die essentielle Dimerisierung der CHDn dieses Heterodimers für enzymatische Aktivität [51]. Weil die cytosolischen pseudoheterodimeren Enzyme keine Rezeptordomäne besaßen, wurde keine Information zur Regulation erhalten. Aufgrund ihrer Löslichkeit konnten sie

allerdings über ihren N-terminalen His-Tag aufgereinigt werden. Wie auch bei den membrangebundenen Chimären führte jede Substitution einer oder beider CTE's zu Enzymen mit deutlich reduzierter Aktivität. Der Verlust betrug im Vergleich zum WT-Enzym 80 bis 95%. Es verdeutlicht, dass die Aktivitätsabnahme nicht durch die Membranverankerung beeinflusst wird, sondern speziell auf Veränderungen im Bereich der CTE's zurückzuführen ist und deutet folglich auf Funktionen bei der Dimerisierung hin. Es ist eine asymmetrische Struktur der CTE Paare vorstellbar, da bei den Paarungen der Rv1625c-CTE mit ACV\_CTE1 oder ACV\_CTE2 signifikant unterschiedliche Aktivitäten erhalten wurden in Abhängigkeit der Positionierung im Rv1625c\_C1 oder Rv1625c\_C2 Segment. Es wurden jedoch bei der Paarung von ACV\_CTE1 und ACV\_CTE2 unabhängig von der Positionierung vergleichbare Aktivitäten erhalten. Dies wurde so gedeutet, dass die beiden Helices ihre dimere Struktur ausbilden können. Dafür spricht auch, dass hier die mögliche direktionale strukturelle Beschränkung durch die Membrandomäne fehlt.

Zu Rv1625c-CTE ist die ACV\_CTE1 in 13 von 20 ASn verschieden, die ACV\_CTE2 in 14 von 20 ASn. Um den Einfluss dieser Unterschiede genauer zu untersuchen, wurden ACV\_CTE1 bzw. ACV\_CTE2 Modifikationen jeweils im Dimer mit der Rv1625c-CTE durchgeführt. Diese Paarung versprach die größtmögliche Aktivitätssteigerung, da Rv1625c-CTE als Homodimer (WT) die höchste Aktivität aller CTE Paarungen aufwies (Abb. 3.25). Der Austausch der N- bzw. C-terminalen Hälfte der ACV\_CTE1 durch die entsprechenden ASn der Rv1625c-CTE resultierte in 91 bzw. 37% aktiveren Enzymen. Die Aktivität betrug jedoch nur 17 bzw. 12% der Aktivität des WT, obwohl nur noch sieben bzw. sechs ASn unterschiedlich waren. Es stellt nur scheinbar einen Widerspruch dar, dass weniger verschiedene ASn eine größere Differenz der Aktivität bewirken. Unter Einbezug aller bisherigen Erkenntnisse bekräftigen diese die Vermutung, dass die N- und C-terminalen Hälften der CTE unterschiedliche Funktionen einnehmen.

Bei Betrachtung der geladenen ASn in den CTE's fiel deren gehäuftes Auftreten im Randbereich auf. Es ist möglich, dass sie durch ionische Wechselwirkungen die dimere Struktur stabilisieren. Durch Substitution einzelner ASn wurde versucht, die Ladungsverteilung in der CTE1 bzw. CTE2 anzugleichen. In allen Versuchen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zur nicht modifizierten Variante festgestellt werden. In den homodimeren Membranchimären bewirkten die gleichen Punktmutationen hingegen den Verlust der Aktivität. Obwohl nur ein oder zwei ASn verändert worden waren, wirkte sich das in den beiden Testsystemen völlig unterschiedlich aus. Möglicherweise besitzen die CTE's im cytosolischen System durch die Verbindung über einen Linker eine etwas höhere Flexibilität bezüglich ihrer Ausrichtung als im System der membrangebundenen Chimären. Daher könnte die durch AS-Substitution induzierte strukturelle Veränderung im cytosolischen System toleriert werden, während diese in membrangebundenen Dimeren zum Aktivitätsverlust führt.

Ein weiterer Aspekt, der im cytosolischen Dimer der Rv1625c-CTE mit ACV\_CTE2 untersucht wurde, war die Länge der CTE und damit verbunden der Abstand der ersten AS der CTE zum katalytischen Aspartat (D) im 'FAD'-Motiv in C1 CHDn. Dieser Abstand beträgt bei Rv1625c 37 ASn, bei der ACV\_CTE2 40 ASn. Die Substitution dieses gesamten Bereiches sowie der Einsatz der ACV\_CTE2 in den Längen von 19 bis 23 ASn resultierten jedoch lediglich in weiterem Aktivitätsrückgang, weshalb daraus kein Rückschluss auf die Länge der CTE gezogen werden konnte. Obwohl die absolute Länge der Mutanten 2 B und 2 G (Tab. 3.20) identisch waren, unterschieden sich die Aktivitäten signifikant. Dies verdeutlicht erneut, dass in diesem Bereich wenige ASn entscheidend zur Signaltransduktion beitragen.

Die ursprüngliche Unterteilung der Wirbeltier ACn in die neun Isoformen erfolgte aufgrund sequenzieller Unterschiede in den Membrandomänen, ihr Vorkommen ist gewebspezifisch. Die CTE ist direkt vor dem  $\beta$ -Faltblatt mit dem 'FAD'- bzw. 'FAS'-Motiv der CHDn positioniert, daher ist eine Beteiligung der CTE's an der Dimerisierung der CHDn sehr wahrscheinlich. Die gewonnenen Erkenntnisse, dass die Modifikation der CTE oder die Trennung der CTE von ihrer natürlichen katalytischen Domäne zu einem dramatischen Aktivitätsverlust führt, deuten auf ein abgestimmtes System von Membrandomäne, CTE und CHD in der direkten Signaltransduktion hin. Eine solche würde die unterschiedliche AS Sequenz der Isoformen bei hoher Konservierung in verschiedenen Spezies plausibel erklären. Dass die CTE eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion einnehmen könnte, wurde in der Vergangenheit nie in Betracht gezogen. Möglicherweise gestaltete sich die erfolgreiche Kristallisation einer dimeren AC deshalb schwierig. Von der CTE sowie von der S-Helix mit der CTE sind bisher keine Strukturen in Kombination mit der HAMP bzw. der katalytischen Domäne bekannt. Es gelang lediglich die Kristallisation der katalytischen Domänen ab dem 'FAD'/'FAS' Motiv als Dimere verschiedener Isoformen [67, 164–166]. Aufgrund von Strukturen der löslichen, menschlichen AC X (pdb: 4clf) sowie einer GC der Ratte (pdb: 3hls) wurde von J. Baßler, Max Planck Institut, Tübingen, ein 3D Strukturmodell zur möglichen Signaltransduktion durch die CTE erstellt (Abb. 4.1). Beide CTE's wechseln dabei zwischen einer geknickten und einer gestreckten helikalen Struktur über einen asymmetrischen Zwischenschritt.

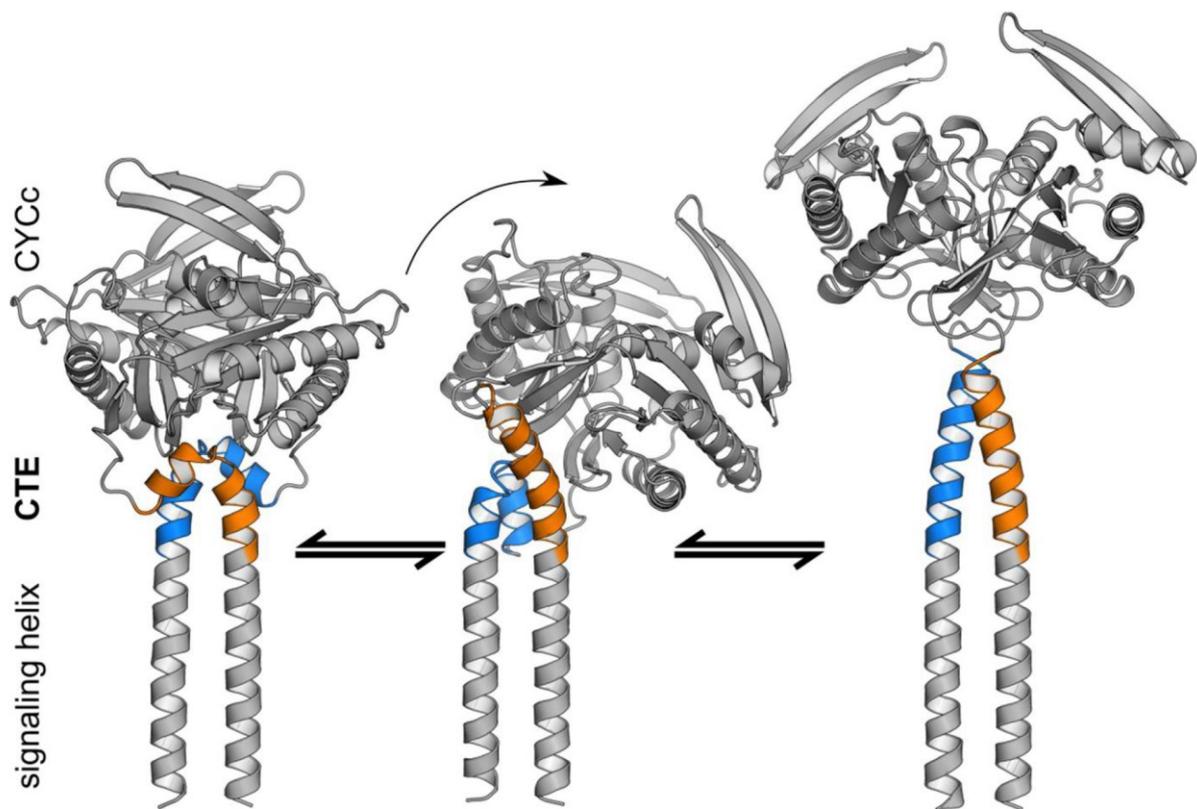


Abb. 4.1 Modell der CTE's für die Signaltransduktion (J. Baßler, MPI, Tübingen) aus [38]. N-Terminus unten (signaling helix), C-terminus oben (CYCc). Die CTE's (blau und orange hervorgehoben) liegen im Dimer entweder als abgeknickte (links) oder gestreckte Helix (rechts) vor. Den Übergangszustand (Mitte) zeichnet eine asymmetrische Struktur beider Helices aus. Eine mögliche Interaktion der hydrophoben AS Reste der C-terminalen Helix führen vermutlich zur Verlängerung der N-terminal gebildeten coiled-coils. Signaling helix = S-Helix, CYCc = CHD.

#### 4.4 Vergleich von LAI-1 und CAI-1

Die  $\alpha$ -Hydroxyketone CAI-1 und LAI-1 unterscheiden sich in der Länge ihrer hydrophoben Kette, LAI-1 ist zwei C-Atome länger [119]. Es wurde für CqsS gezeigt, dass der Rezeptor in vivo und in vitro auf kurzkettingere Varianten von CAI-1 reagiert, nicht aber auf längerkettingere wie LAI-1 [127, 128, 167]. Umgekehrt wurde für LqsS demonstriert, dass der Rezeptor sowohl auf LAI-1 als auch auf das kurzkettingere CAI-1 reagiert, allerdings antagonistisch [131]. Erst kürzlich wurde mit LqsT ein zweiter, homologer Rezeptor für LAI-1 entdeckt, LqsT zeigte keine Reaktion auf CAI-1 [131, 159]. Während in Vibrionen vier verschiedene Autoinducer (AI) Systeme konvergieren, erfolgt die differenzierte Regulation in *L. pneumophila* offenbar durch das gleiche AI-Molekül über teilweise antagonistisch signalisierende Rezeptoren. Es wurde daher spekuliert, dass die Signalisierung über  $\alpha$ -Hydroxyketone komplexer als bisher bekannt sein muss [159].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle LqsS Chimären zusätzlich zu LAI-1 auch mit 1  $\mu\text{M}$  CAI-1 getestet. Anders als bei den Chemotaxis Rezeptoren für Serin (Tsr) und Aspartat (Tar), bei denen der jeweils andere Ligand keine Reaktion auszulösen vermochte und als Negativkontrolle verwendet werden konnte, war 1  $\mu\text{M}$  CAI-1 als Ligand aktiv. Auf diese Aktivitäten wurde separat in Kapitel 3.5 eingegangen. Die meisten Chimären zeigten bei beiden Liganden eine vergleichbare Regulation gleichen Vorzeichens (Stimulation, Hemmung bzw. keine Regulation). Nur selten wurde eine unterschiedliche Regulation beobachtet, sie trat vorrangig bei Chimären auf, die im Rahmen der Untersuchung der Anknüpfpositionen von LqsS und Rv1625c erzeugt wurden (Abb. 3.29). Es war kein Muster erkennbar, in zwei Fällen war der Unterschied signifikant.

Die Ursache für die unterschiedliche Regulation durch LAI-1 und CAI-1 könnte im Ruhezustand der Chimären liegen, bei dem das unterschiedliche Signal von der Membrandomäne stimulierend bzw. hemmend interpretiert werden kann. Der tatsächliche Bindemechanismus von Ligand und Rezeptor ist unbekannt. Aufgrund der Hydrophobizität könnte der Ligand in die Membran selbst eintauchen, es wird jedoch derzeit von einer Bindetasche ausgegangen, bei der der Ligand entweder fast senkrecht oder waagrecht in der Membrandomäne steht [119, 156]. Davon ausgehend, dass die Ligandenbindung die nötige Energie für die cytosolische Konformationsänderung bereitstellt, müssten beide Liganden unterschiedliche thermodynamische Eigenschaften besitzen. Dies ist nur möglich, wenn die Liganden vollständig in den Rezeptor, nicht aber in die Membran eintauchen [154]. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Theorie einer Ligandenbindetasche.

Die Kreuzreaktivität deutet außerdem auf eine mögliche Inter-Spezies Kommunikation zwischen Legionellen und Vibrionen hin [120, 137, 168, 169]. Beide Organismen besetzen allerdings verschiedene ökologische Nischen, daher ist eine Kommunikation über die QS Systeme in diesem Fall unwahrscheinlich [121, 137, 170]. Das *lqs*-Gencluster wurde allerdings auch in anderen Spezies wie *Nitrococcus*, *Burkholderia* und *Polaromonas* gefunden. Es wurde die Annahme formuliert, dass die Einzeller über das Signalisieren durch  $\alpha$ -Hydroxyketone sowohl die Anwesenheit von Bakterien der gleichen sowie fremder, möglicherweise feindlicher Spezies registrieren können. Eine umfangreiche Inter-Spezies Kommunikation ist demnach prinzipiell möglich [137, 171].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen, dass die Signaltransduktion über die Membran nach einem Mechanismus erfolgt, der einer universellen Sprache gleicht. Domänen von verschiedenen Enzymen können zu einem aktiven, funktionellen und regulierten chimären Enzym zusammensetzt werden, vergleichbar wie Wörter zu Sätzen zusammengesetzt werden. Es wird allerdings auch deutlich, dass die einzelnen Bauteile fein aufeinander abgestimmt sind und kleine Änderungen leicht zu Missverständnissen führen können.

## 5 Zusammenfassung

Signaltransduzierende Membranproteine besitzen zwischen Rezeptor- und Effektor-domäne oft signalmodulierende Domänen wie HAMP, S-Helix oder Cyclase-Transducer-Element (CTE). Aufgrund dieses Aufbaus wird ein ähnlicher Mechanismus der Signaltransduktion vermutet, der funktionelle Austausch von Domänen wurde mit einer möglichen universellen Sprache gedeutet. Auch Adenylatcyclasen besitzen solche Signalwandlermodule, eine direkte Regulation von ACn durch Liganden wurde bislang nicht bewiesen.

Hier wurden funktionelle chimäre ACn hergestellt, bei denen der hexahelikale TM 'Quorum-Sensing Receptor' LqsS aus *Legionella pneumophila* den hexahelikalen TM Membrananker der mykobakteriellen AC Rv1625c ersetzt. Als Verknüpfungsposition des LqsS Rezeptors an die Rv1625c AC wurden auf der LqsS Seite viele Anknüpfpositionen toleriert. Dabei trat sowohl Stimulation als auch Hemmung durch den Liganden LAI-1 auf. Auf der Rv1625c Seite wurden nur wenige Anknüpfpositionen toleriert. Mit abnehmender Länge von Rv1625c nahm die Basalaktivität der AC drastisch ab.

Es wurde die Fragestellung der funktionellen Eigenständigkeit der S-Helix bearbeitet. Hierfür wurde die S-Helix mit HAMP Domänen von Tsr, Af1503 und CyaG sowie den CHD Effektordomänen von Rv3645, Rv1625c und CyaG kombiniert. Mit den N-terminalen Rezeptoren Tsr bzw. LqsS wurde die Regulation durch die Liganden Serin bzw. LAI-1 untersucht. Meist wurde die signalinvertierende Eigenschaft der S-Helix bestätigt, d.h. ihre Funktion als eigenständiges Modul. Mit der CHD von Rv3645 wurden keine regulierten Chimären erhalten, vielleicht mangels Kompatibilität zwischen S-Helix und einer Klasse IIIb AC. Bei der Untersuchung der Kommunikation von S-Helix und CTE wurde die signalinvertierende Eigenschaft der S-Helix als positionsabhängig festgestellt.

Unter Einbezug aller Ergebnisse wurde erstmals das 20 ASn lange Cyclase-Transducer-Element biochemisch charakterisiert. Neben einem mittig gelegenen, invarianten Prolin, das vermutlich die helikale Struktur unterbricht, besitzt die CTE eine ausgeprägte Sequenzkonservierung. Die Austauschbarkeit der bakteriellen Rv1625c-CTE mit der ACV\_CTE1 bzw. der ACV\_CTE2 von Wirbeltieren wurde untersucht. Jede Veränderung der Rv1625c-CTE resultierte in einem Aktivitätsverlust. Es wurde gezeigt, dass sich N- bzw. C-terminale Modifikationen der CTE unterschiedlich auswirken. Die Daten deuten darauf hin, dass CTE's auf ihre umgebenden Domänen abgestimmt sind und eine asymmetrische Funktion in der Signaltransduktion einnehmen. Dies stützt die Hypothese der direkten Regulation von ACn, welche in Eukaryoten zusätzlich zur indirekten Regulation durch GPCRn erfolgen würde.

## 6 Summary

Between receptor and effector domains of signaling proteins signal transducing or modifying domains like HAMP, S-Helix or Cyclase-Transducer-Element (CTE) are frequently found. Because of this common domain organisation, similarities in the mechanism of signal transduction are likely. The functional replacement and exchangeability of these domains indicates a universal language in signal transduction. Such signal modifying modules are also present in adenylate cyclases, albeit a direct receptor regulation has yet to be shown.

Here, functional chimeric ACs between the quorum-sensing receptor LqsS from *Legionella pneumophila* and the mycobacterial AC Rv1625c were generated. The hexahelical TM receptor domain of LqsS replaced the hexahelical TM membrane domain of Rv1625c. On the side of LqsS, several linkage points were accepted. The ligand LAI-1 regulated cAMP production, both inhibition and stimulation were observed. On the AC side, only few linkage points were tolerated. Further truncated Rv1625c AC resulted in drastically lower basal AC activities.

The S-Helix as a stand-alone module was investigated by combining it with domains from various proteins, e.g. HAMP domains from Tsr, Af1503 and CyaG and CHD domains from Rv3645, Rv1625c and CyaG. As receptors, Tsr (serine) or LqsS (LAI-1) were used. The S-Helix inverted the output signal in most cases, thereby attesting its property as a stand-alone module. With Rv3645 CHD no regulated chimeras were observed, possibly due to an incompatibility with class IIIb ACs. Studying the communication between S-Helix and CTE, the ability of the S-Helix to invert the signal was demonstrated to be position dependent.

Taken together, the 20 amino acid long segment Cyclase-Transducer-Element was biochemically characterized for the first time. A central invariant proline is likely to disrupt the helical structure. Unlike HAMP domains, the CTE amino acid sequence is conserved in both bacterial and vertebrate ACs. The mycobacterial Rv1625c-CTE was replaced by either vertebrate ACV\_CTE1 or ACV\_CTE2 to investigate if CTEs are exchangeable between bacteria and mammalia. Any modification resulted in decrease of basal AC activity. Additionally, differences were observed if modifications were aimed at the N- or the C-terminus of the CTE. The data illustrate the fine tuning of each CTE to its flanking input and output domains. In conclusion, CTEs likely result in asymmetric signal transduction. This supports the hypothesis of a direct regulation of ACs which would exist additionally to the established indirect regulation by GPCRs in eukaryotes.

## 7 Anhang

### Zu Kapitel 3.4 Identifizierung des neuen Cyclase-Transducer-Elements (CTE)

	◇	▽
Mensch ACI-C1	: EDRRLREDEENEKQERLLMSLLERNVAMEMKEDFLKPPE-----RIFFKIYIQRHDNVSILFADIVGFT	
Maus ACI-C1	: EDRRLREDEENEKQERLLMSLLERNVAMEMKEDFLKPPE-----RIFFKIYIQRHDNVSILFADIVGFT	
Ratte ACI-C1	: EDRRLREDEENEKQERLLMSLLERNVAMEMKEDFLKPPE-----RIFFKIYIQRHDNVSILFADIVGFT	
Mensch ACII-C1	: KSRIKLEFEBKROQERLLLSLLEPAHTAMEMKAEIQRLOGPKAGQMENT-----NNFNLYVVKRHTNVSILYADIVGFT	
Maus ACII-C1	: KSRIKLEFEBKROQERLLLSLLEPAHTAMEMKAEIQRLOGPKAGQMENT-----NNFNLYVVKRHTNVSILYADIVGFT	
Ratte ACII-C1	: KSRIKLEFEBKROQERLLLSLLEPAHTAMEMKAEIQRLOGPKAGQMENT-----NNFNLYVVKRHTNVSILYADIVGFT	
Mensch ACIII-C1	: EVKMNLEEGSQOQENLMLSILPKHVADEMLKDKKDESQKQD-----QQENTMYMYRHNVSILFADIVGFT	
Maus ACIII-C1	: EVKMNLEEGSQOQENLMLSILPKHVADEMLKDKKDESQKQD-----QQENTMYMYRHNVSILFADIVGFT	
Ratte ACIII-C1	: EVKMNLEEGSQOQENLMLSILPKHVADEMLKDKKDESQKQD-----QQENTMYMYRHNVSILFADIVGFT	
Mensch ACIV-C1	: HSRRRLDTEKKHQBELLSSILPAYLAREMKAETMARLQAGQSRPEST-----NNFSLYVVKRHQGVSVLYADIVGFT	
Maus ACIV-C1	: HSRRRLDTEKKHQBELLSSILPAYLAREMKAETMARLQAGQSRPEST-----NNFSLYVVKRHQGVSVLYADIVGFT	
Ratte ACIV-C1	: HSRRRLDTEKKHQBELLSSILPAYLAREMKAETMARLQAGQSRPEST-----NNFSLYVVKRHQGVSVLYADIVGFT	
Mensch ACV-C1	: QARLHSCRENQOQERLLSVLPRHVAMEMKADINAKQED-----MMFKIYIQKHDNVSILFADIEGFT	
Maus ACV-C1	: QARLHSCRENQOQERLLSVLPRHVAMEMKADINAKQED-----MMFKIYIQKHDNVSILFADIEGFT	
Ratte ACV-C1	: QARLHSCRENQOQERLLSVLPRHVAMEMKADINAKQED-----MMFKIYIQKHDNVSILFADIEGFT	
Kaninchen ACV-C1	: QARLHSCRENQOQERLLSVLPRHVAMEMKADINAKQED-----MMFKIYIQKHDNVSILFADIEGFT	
Mensch ACVI-C1	: QARLHSCRENQOQERLLSVLPRHVAMEMKADINAKQED-----MMFKIYIQKHDNVSILFADIEGFT	
Maus ACVI-C1	: QARLHSCRENQOQERLLSVLPRHVAMEMKADINAKQED-----MMFKIYIQKHDNVSILFADIEGFT	
Ratte ACVI-C1	: QARLHSCRENQOQERLLSVLPRHVAMEMKADINAKQED-----MMFKIYIQKHDNVSILFADIEGFT	
Mensch ACVII-C1	: QIRRRIRVEKROQENLLSVLPAHTSMGKLAETIERLKEGGDRRCMPD-----NNFSLYVVKRHQNVSILYADIVGFT	
Maus ACVII-C1	: QIRRRIRVEKROQENLLSVLPAHTSMGKLAETIERLKEGGDRHYMPD-----NNFSLYVVKRHQNVSILYADIVGFT	
Ratte ACVII-C1	: QIRRRIRVEKROQENLLSVLPAHTSMGKLAETIERLKEGGDRHYTPD-----NNFSLYVVKRHQNVSILYADIVGFT	
Mensch ACVIII-C1	: EARLRLETFNQROERLVLVSLPRFVVLVLEINDVTNVEDEHLQ-----HQFRIRYIHRHENVSILFADVKGFT	
Maus ACVIII-C1	: EARLRLETFNQROERLVLVSLPRFVVLVLEINDVTNVEDEHLQ-----HQFRIRYIHRHENVSILFADVKGFT	
Ratte ACVIII-C1	: EARLRLETFNQROERLVLVSLPRFVVLVLEINDVTNVEDEHLQ-----HQFRIRYIHRHENVSILFADVKGFT	
Mensch ACIX-C1	: MHGKDEVEFKALKERMHISVMRRIADDDIMKQGDDEESNSVVKRHATSSPKNRKKKSSIQKAPIARPFPMQOIEEVSILFADIVGFT	
Maus ACIX-C1	: MHGKDEVEFKALKERMHISVMRRIADDDIMKQGDDEESNSVVKRHATSSPKNRKKKSSIQKAPIARPFPMQOIEEVSILFADIVGFT	
Ratte ACIX-C1	: MHGKDEVEFKALKERMHISVMRRIADDDIMKQGDDEESNSVVKRHATSSPKNRKKKSSIQKAPIARPFPMQOIEEVSILFADIVGFT	
	◇	▽
Mensch ACI-C2	: EERDDMERVKLDNKRILLENLLEPAHVAQHFLMSNPRNMDLYYQSYSQVGMVFASIPNFN	
Maus ACI-C2	: EERDDMERVKLDNKRILLENLLEPAHVAQHFLMSNPRNMDLYYQSYSQVGMVFASIPNFN	
Ratte ACI-C2	: EERDDMERVKLDNKRILLENLLEPAHVAQHFLMSNPRNMDLYYQSYSQVGMVFASIPNFN	
Mensch ACII-C2	: KEREETETMENLNRVLEENVLLEPAHVAEHFLARSLKNEELYHOSYDCVGMVFASIPDFK	
Maus ACII-C2	: KEREETETMENLNRVLEENVLLEPAHVAEHFLARSLKNEELYHOSYDCVGMVFASIPDFK	
Ratte ACII-C2	: KEREETETMENLNRVLEENVLLEPAHVAEHFLARSLKNEELYHOSYDCVGMVFASIPDFK	
Mensch ACIII-C2	: DOKERVYEMRRWNEALVTNMLEBEHVARHFLGSKKREELYSQSYDEIGVMFASIPNFA	
Maus ACIII-C2	: DOKERVYEMRRWNEALVTNMLEBEHVARHFLGSKKREELYSQSYDEIGVMFASIPNFA	
Ratte ACIII-C2	: DOKERVYEMRRWNEALVTNMLEBEHVARHFLGSKKREELYSQSYDEIGVMFASIPNFA	
Mensch ACIV-C2	: QEREETEIMENLTRLLENVLEPAHVAPOEIGQNRNREEDLYHOSYECVGLFASVPDFK	
Maus ACIV-C2	: QEREETEIMENLTRLLENVLEPAHVAPOEIGQNRNREEDLYHOSYECVGLFASVPDFK	
Ratte ACIV-C2	: QEREETEIMENLTRLLENVLEPAHVAPOEIGQNRNREEDLYHOSYECVGLFASVPDFK	
Mensch ACV-C2	: EEKEEMEBEQAYNRRLLENLLEKDVAAHFLARERRNDELYYQSECEVAVMFASIANFS	
Maus ACV-C2	: EEKEEMEBEQAYNRRLLENLLEKDVAAHFLARERRNDELYYQSECEVAVMFASIANFS	
Ratte ACV-C2	: EEKEEMEBEQAYNRRLLENLLEKDVAAHFLARERRNDELYYQSECEVAVMFASIANFS	
Kaninchen ACV-C2	: EEKEEMEBEQAYNRRLLENLLEKDVAAHFLARERRNDELYYQSECEVAVMFASIANFS	
Mensch ACVI-C2	: GEKEEMEBEQAYNRRLLENLLEKDVAAHFLARERRNDELYYQSECEVAVMFASIANFS	
Maus ACVI-C2	: GEKEEMEBEQAYNRRLLENLLEKDVAAHFLARERRNDELYYQSECEVAVMFASIANFS	
Ratte ACVI-C2	: GEKEEMEBEQAYNRRLLENLLEKDVAAHFLARERRNDELYYQSECEVAVMFASIANFS	
Mensch ACVII-C2	: KEHEEETEMENVRILLENVLEPAHVAHFIG-DKLNEDWYHOSYDCVGMVFASVPDFK	
Maus ACVII-C2	: KEHEEETEMENVRILLENVLEPAHVAHFIG-DKAAEDWYHOSYDCVGMVFASVPDFK	
Ratte ACVII-C2	: KEHEEETEMENVRILLENVLEPAHVAHFIG-DKAAEDWYHOSYDCVGMVFASVPDFK	
Mensch ACVIII-C2	: EEINEMKEDREHNENMLRNILESHVARHFLKDRDNEELYSQSYDAVGMVFASIPGFA	
Maus ACVIII-C2	: EEINEMKEDREHNENMLRNILESHVARHFLKDRDNEELYSQSYDAVGMVFASIPGFA	
Ratte ACVIII-C2	: EEINEMKEDREHNENMLRNILESHVARHFLKDRDNEELYSQSYDAVGMVFASIPGFA	
Mensch ACIX-C2	: LHRTKIQSMRDQADWLLRNIIIEYHVAEQLKVSQTYSTY-----KNHDSGGVIFASIVNFS	
Maus ACIX-C2	: LHRTKIQSMRDQADWLLRNIIIEYHVAEQLKVSQTYSTY-----KNHDSGGVIFASIVNFS	
Ratte ACIX-C2	: LHRTKIQSMRDQADWLLRNIIIEYHVAEQLKVSQTYSTY-----KNHDSGGVIFASIVNFS	

Abb. 7.1 Alignments von Sequenzauszügen. Gruppirt in eukaryotische C1 (oben) und C2 (unten). Die Aminosäuren sind in Graustufen hinterlegt, um den Grad der Konservierung hervorzuheben (weiß = nicht konserviert, schwarz = hoch konserviert). Die CTE ist durch eine Raute markiert, umrandet sind die in dieser Arbeit verwendeten CTE-Sequenzen. Das Dreieck markiert das in C1 hochkonservierte FAD bzw. in C2 das hochkonservierte FAS Motiv. Die Gruppierung der Säugetier-ACn in vier Gruppen (I, III, VIII; II, IV, VII; V, VI und IX) spiegelt sich hier wider [53, 162].

UniProtKB/TrEMBL Nummern für alle Sequenzen in Abb. 7.1: Mensch: ADCY1: Q08828, ADCY2: Q08462, ADCY3: O60266, ADCY4: Q8NFM4, ADCY5: O95622, ADCY6: O43306, ADCY7: P51828, ADCY8: P40145, ADCY9: O60503. Maus: ADCY1: O88444, ADCY2: Q80TL1, ADCY3: Q8VHH7, ADCY4: Q91WF3, ADCY5: P84309, ADCY6: Q01341, ADCY7: P51829, ADCY8: P97490, ADCY9: P51830. Ratte: ADCY1: D4A3N4, ADCY2: P26769, ADCY3: P21932, ADCY4: Q66HK5, ADCY5: Q04400, ADCY6: Q03343, ADCY7: F1LQT1, ADCY8: P40146, ADCY9: M0R5U4. Kaninchen: ADCY5: P40144.

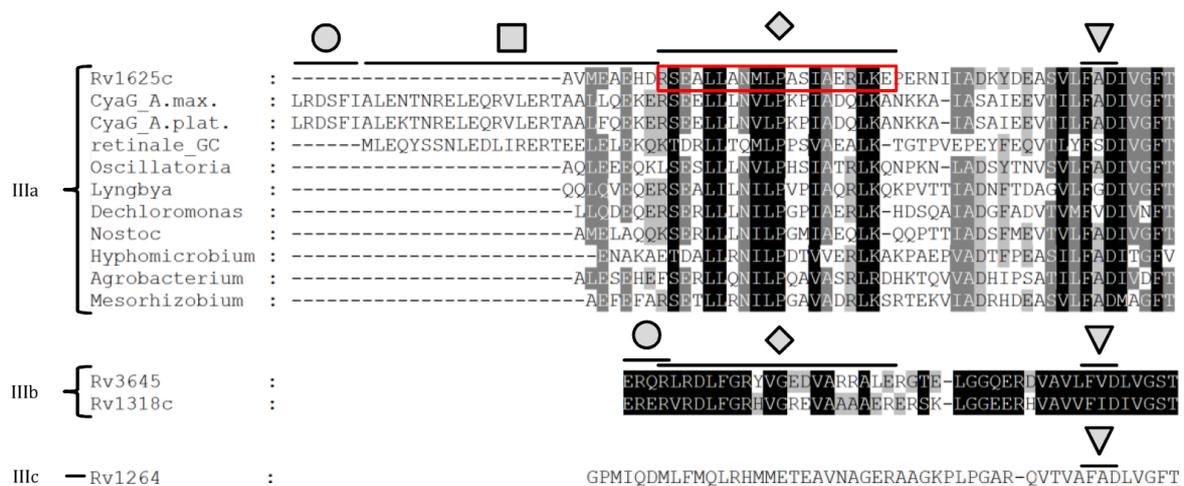


Abb. 7.2 Alignments von Sequenzauszügen von bakteriellen ACn der Klassen IIIa, IIIb und IIIc sowie der eukaryotischen, retinalen Guanylatcyclase (GC). Die Aminosäuren sind in Graustufen hinterlegt, um den Grad der Konservierung hervorzuheben (weiß = nicht konserviert, schwarz = hoch konserviert). Die CTE ist durch eine Raute markiert, umrandet ist die in dieser Arbeit verwendete CTE-Sequenz. Das Dreieck markiert das hochkonservierte FAD Motiv. Quadrat: S-Helix in *Arthrospira* (*A. max.* und *A. plat.*) und retinale GC, Kreis: Ende der HAMP Domäne in *Arthrospira* (*A. max.* und *A. plat.*), Rv3645 und Rv1318c.

UniProtKB/TrEMBL Nummern für alle Sequenzen in Abb. 7.2: Rv1625c *Mycobacterium tuberculosis*: P9WQ35, CyaG *Arthrospira maxima*: B5VYJ6, CyaG *Arthrospira platensis*: Q9EXQ2, retinale\_GC *Homo sapiens*: Q02846, *Oscillatoria acuminata*: K9TD27, *Lyngbya* sp.: A0YQ82, *Dechloromonas aromatica*: Q47AI8, *Nostoc punctiforme*: B2J1Y6, *Hyphomicrobium nitratorans*: V5SB69, *Agrobacterium albertimagni*: K2QX48, *Mesorhizobium alhagi*: H0HZC1, Rv3645 *Mycobacterium tuberculosis*: I6X7Z3, Rv1318c *Mycobacterium tuberculosis*: P9WQ33, Rv1264 *Mycobacterium tuberculosis*: P9WMU9.

### Zu Kapitel 3.4.3 Interaktion der CTE mit der S-Helix

Tab. 7.1 Übersicht der Ergebnisse der Chimären unterschiedlich langer CTE. Insert A: S-Helix<sub>431-455</sub> aus CyaG, Insert B: LqsS<sub>188-212</sub> wurden an Pos. 1 oder Pos. 2 eingefügt. Negative Regulation bedeutet Hemmung, positive Regulation bedeutet Stimulation. n=2, ± S.E.M \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, †, p<0,001 zur Basalaktivität. Bei der Chimäre mit 20 ASn CTE ohne Inserts handelt es sich um die Referenzchimäre (kursiv).

Insert	Basalaktivität [nmol cAMP·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]	Regulation bei 1 µM LAI-1 [%]	EC <sub>50</sub> [nM]	IC <sub>50</sub> [nM]
<b>LqsS<sub>1-187</sub> - Pos. 1 - CTE 20 ASn - Pos. 2 - Rv1625C<sub>238-443</sub></b>				
Pos. 1, Insert A	49,3 ± 4,7	- 42,7 ± 0,7†	-	41
Pos. 1, Insert B	0,58 ± 0,04	nicht reguliert	-	-
<i>kein Insert</i>	<i>20,7 ± 1,7</i>	<i>+86,7 ± 3,7†</i>	32	-
Pos. 2, Insert A	1,9 ± 0,4	+219,6 ± 38,6**	54	-
Pos. 2, Insert B	0,19 ± 0,4	+277,8 ± 5,8*	72	-
<b>LqsS<sub>1-187</sub> - Pos. 1 - CTE 19 ASn - Pos. 2 - Rv1625C<sub>238-443</sub></b>				
Pos. 1, Insert A	6,0 ± 1,8	-50,1 ± 0,1†	-	27
kein Insert	1,8 ± 0,3	+247,6 ± 13,2*	53	-
Pos. 2, Insert A	1,0 ± 0,5	+322,9 ± 11,4**	52	-
<b>LqsS<sub>1-187</sub> - Pos. 1 - CTE 18 ASn - Pos. 2 - Rv1625C<sub>238-443</sub></b>				
Pos. 1, Insert A	0,57 ± 0,03	-38,1 ± 1,7**	-	33
kein Insert	1,3 ± 0,1	+80,6 ± 9,6**	33	-
Pos. 2, Insert A	nicht aktiv	-	-	-

## 8 Literaturverzeichnis

1. García Mondéjar, L. (2012) HAMP Domänen-vermittelte Signalübertragung: Mutagenese Untersuchungen und biochemische Charakterisierung. *Dissertation der Universität Tübingen*
2. Ulrich, L. E., Koonin, E. V., Zhulin, I. B. (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* **13**, 52–56
3. Parkinson, J. S. (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell.* **73**, 857–871
4. Stock, A. M., Robinson, V. L., Goudreau, P. N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183–215
5. Wuichet, K., Cantwell, B. J., Zhulin, I. B. (2010) Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 219–225
6. Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M.-E., Ramos, J. L. (2010) Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 539–559
7. Galperin, M. Y. (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ. Microbiol.* **6**, 552–567
8. Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N., Koonin, E. V. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 11–21
9. Bourret, R. B., Stock, A. M. (2002) Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **277**, 9625–9628
10. Parkinson, J. S., Kofoed, E. C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 71–112
11. Schultz, J. E., Kanchan, K., Ziegler, M. (2015) Intraprotein signal transduction by HAMP domains: A balancing act. *Int. J. Med. Microbiol.* **305**, 243–251
12. Zhulin, I. B., Nikolskaya, A. N., Galperin, M. Y. (2003) Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* **185**, 285–294
13. Dunin-Horkawicz, S., Lupas, A. N. (2010) Comprehensive analysis of HAMP domains: implications for transmembrane signal transduction. *J. Mol. Biol.* **397**, 1156–1174
14. Meena, N., Kaur, H., Mondal, A. K. (2010) Interactions among HAMP domain repeats act as an osmosensing molecular switch in group III hybrid histidine kinases from fungi. *J. Biol. Chem.* **285**, 12121–12132
15. Appleman, J. A., Chen, L.-L., Stewart, V. (2003) Probing conservation of HAMP linker structure and signal transduction mechanism through analysis of hybrid sensor kinases. *J. Bacteriol.* **185**, 4872–4882
16. Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J. U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J. E., Lupas, A. N., Coles, M. (2006) The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell.* **126**, 929–940
17. Zhu, Y., Inouye, M. (2003) Analysis of the role of the EnvZ linker region in signal transduction using a chimeric Tar/EnvZ receptor protein, Tez1. *J. Biol. Chem.* **278**, 22812–22819
18. Ames, P., Zhou, Q., Parkinson, J. S. (2008) Mutational analysis of the connector segment in the HAMP domain of Tsr, the *Escherichia coli* serine chemoreceptor. *J. Bacteriol.* **190**, 6676–6685

19. Gruber, M., Lupas, A. N. (2003) Historical review: another 50th anniversary--new periodicities in coiled coils. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 679–685
20. Crick, F. H. C. (1953) The packing of  $\alpha$ -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallogr.* **6**, 689–697
21. Swain, K. E., Falke, J. J. (2007) Structure of the conserved HAMP domain in an intact, membrane-bound chemoreceptor: a disulfide mapping study. *Biochemistry* **46**, 13684–13695
22. Airola, M. V., Watts, K. J., Bilwes, A. M., Crane, B. R. (2010) Structure of concatenated HAMP domains provides a mechanism for signal transduction. *Struct. Lond. Engl. 1993.* **18**, 436–448
23. Falke, J. J., Hazelbauer, G. L. (2001) Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 257–265
24. Ottemann, K. M., Xiao, W., Shin, Y. K., Koshland, D. E., Jr (1999) A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science.* **285**, 1751–1754
25. Airola, M. V., Sukomon, N., Samanta, D., Borbat, P. P., Freed, J. H., Watts, K. J., Crane, B. R. (2013) HAMP domain conformers that propagate opposite signals in bacterial chemoreceptors. *PLoS Biol.* **11**, e1001479
26. Ames, P., Hunter, S., Parkinson, J. S. (2016) Evidence for a helix-clutch mechanism of transmembrane signaling in a bacterial chemoreceptor. *J. Mol. Biol.* **428**, 3776–3788
27. Parkinson, J. S. (2010) Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 101–122
28. Anantharaman, V., Balaji, S., Aravind, L. (2006) The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins. *Biol. Direct.* **1**, 25
29. Singh, M., Berger, B., Kim, P. S., Berger, J. M., Cochran, A. G. (1998) Computational learning reveals coiled coil-like motifs in histidine kinase linker domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2738–2743
30. Lupas, A. N., Gruber, M. (2005) The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv. Protein Chem.* **70**, 37–78
31. Brown, J. H., Cohen, C., Parry, D. A. (1996) Heptad breaks in alpha-helical coiled coils: stutters and stammers. *Proteins.* **26**, 134–145
32. Ramamurthy, V., Tucker, C., Wilkie, S. E., Daggett, V., Hunt, D. M., Hurley, J. B. (2001) Interactions within the coiled-coil domain of RetGC-1 guanylyl cyclase are optimized for regulation rather than for high affinity. *J. Biol. Chem.* **276**, 26218–26229
33. Shiga, T., Suzuki, N. (2005) Amphipathic alpha-helix mediates the heterodimerization of soluble guanylyl cyclase. *Zoolog. Sci.* **22**, 735–742
34. Kelsell, R. E., Gregory-Evans, K., Payne, A. M., Perrault, I., Kaplan, J., Yang, R. B., Garbers, D. L., Bird, A. C., Moore, A. T., Hunt, D. M. (1998) Mutations in the retinal guanylate cyclase (RETGC-1) gene in dominant cone-rod dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1179–1184
35. Winkler, K. (2012) Signal transduction in chimeras of the *E. coli* chemotaxis receptors and bacterial class III adenylyl cyclases. *Dissertation der Universität Tübingen*
36. Chinkers, M., Garbers, D. L. (1991) Signal transduction by guanylyl cyclases. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 553–575

37. Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H. A., Tang, W. J., Feinstein, P. G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R. R., Gilman, A. G. (1989) Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science*. **244**, 1558–1564
38. Ziegler, M., Baßler, J., Beltz, S., Schultz, A., Lupas, A. N., Schultz, J. E. Characterization of a novel signal transducer element intrinsic to class IIIa/b adenylate cyclases and guanylate cyclases. *in revision*
39. Rall, T. W., Sutherland, E. W. (1962) Adenyl cyclase. II. The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3',5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* **237**, 1228–1232
40. Sutherland, E. W., Rall, T. W., Menon, T. (1962) Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation, and properties. *J. Biol. Chem.* **237**, 1220–1227
41. Bârză, O., Danchin, A. (1994) Adenylyl cyclases: a heterogeneous class of ATP-utilizing enzymes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **49**, 241–283
42. Linder, J. U., Schultz, J. E. (2003) The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell. Signal.* **15**, 1081–1089
43. Cotta, M. A., Whitehead, T. R., Wheeler, M. B. (1998) Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D31d. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**, 257–260
44. Gallagher, D. T., Smith, N. N., Kim, S.-K., Heroux, A., Robinson, H., Reddy, P. T. (2006) Structure of the class IV adenylyl cyclase reveals a novel fold. *J. Mol. Biol.* **362**, 114–122
45. Sismeiro, O., Trotot, P., Biville, F., Vivares, C., Danchin, A. (1998) *Aeromonas hydrophila* adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* **180**, 3339–3344
46. Téllez-Sosa, J., Soberón, N., Vega-Segura, A., Torres-Márquez, M. E., Cevallos, M. A. (2002) The *Rhizobium etli* cyaC product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *J. Bacteriol.* **184**, 3560–3568
47. Steegborn, C. (2014) Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases - similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1842**, 2535–2547
48. Sunahara, R. K., Taussig, R. (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol. Interv.* **2**, 168–184
49. Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin, L. R., Buck, J. (2000) Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*. **289**, 625–628
50. Guo, Y. L., Kurz, U., Schultz, A., Linder, J. U., Dittrich, D., Keller, C., Ehlers, S., Sander, P., Schultz, J. E. (2005) Interaction of Rv1625c, a mycobacterial class IIIa adenylyl cyclase, with a mammalian congener. *Mol. Microbiol.* **57**, 667–677
51. Breilkopf, S. (2015) Chimäre Adenylatcyclasen aus *Mycobacterium* und *Mammalia*: Versuche zur Solubilisation und Regulation. *Dissertation der Universität Tübingen*
52. Linder, J. U., Schultz, J. E. (2008) Versatility of signal transduction encoded in dimeric adenylyl cyclases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 667–672
53. Sunahara, R. K., Dessauer, C. W., Gilman, A. G. (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 461–480

54. Sunahara, R. K., Dessauer, C. W., Whisnant, R. E., Kleuss, C., Gilman, A. G. (1997) Interaction of G $\alpha$  with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **272**, 22265–22271
55. Kaupp, U. B., Seifert, R. (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* **82**, 769–824
56. Meinkoth, J. L., Alberts, A. S., Went, W., Fantozzi, D., Taylor, S. S., Hagiwara, M., Montminy, M., Feramisco, J. R. (1993) Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biochem.* **127–128**, 179–186
57. de Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., Bos, J. L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* **396**, 474–477
58. Kleinboelting, S., Diaz, A., Moniot, S., Heuvel, J. van den, Weyand, M., Levin, L. R., Buck, J., Steegborn, C. (2014) Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 3727–3732
59. Steegborn, C., Litvin, T. N., Levin, L. R., Buck, J., Wu, H. (2005a) Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 32–37
60. Tews, I., Findeisen, F., Sinning, I., Schultz, A., Schultz, J. E., Linder, J. U. (2005) The structure of a pH-sensing mycobacterial adenylyl cyclase holoenzyme. *Science.* **308**, 1020–1023
61. Butcher, R. W., Sutherland, E. W. (1962) Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J. Biol. Chem.* **237**, 1244–1250
62. Steegborn, C., Litvin, T. N., Hess, K. C., Capper, A. B., Taussig, R., Buck, J., Levin, L. R., Wu, H. (2005b) A novel mechanism for adenylyl cyclase inhibition from the crystal structure of its complex with catechol estrogen. *J. Biol. Chem.* **280**, 31754–31759
63. Findeisen, F., Linder, J. U., Schultz, A., Schultz, J. E., Brügger, B., Wieland, F., Sinning, I., Tews, I. (2007) The structure of the regulatory domain of the adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* with bound oleic acid. *J. Mol. Biol.* **369**, 1282–1295
64. Sinha, S. C., Wetterer, M., Sprang, S. R., Schultz, J. E., Linder, J. U. (2005) Origin of asymmetry in adenylyl cyclases: structures of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1900c. *EMBO J.* **24**, 663–673
65. Topal, H., Fulcher, N. B., Bitterman, J., Salazar, E., Buck, J., Levin, L. R., Cann, M. J., Wolfgang, M. C., Steegborn, C. (2012) Crystal structure and regulation mechanisms of the CyaB adenylyl cyclase from the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **416**, 271–286
66. Martinez, S. E., Bruder, S., Schultz, A., Zheng, N., Schultz, J. E., Beavo, J. A., Linder, J. U. (2005) Crystal structure of the tandem GAF domains from a cyanobacterial adenylyl cyclase: modes of ligand binding and dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3082–3087
67. Tesmer, J. J., Sunahara, R. K., Gilman, A. G., Sprang, S. R. (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G $\alpha$ .GTP $\gamma$ S. *Science.* **278**, 1907–1916
68. Tesmer, J. J., Dessauer, C. W., Sunahara, R. K., Murray, L. D., Johnson, R. A., Gilman, A. G., Sprang, S. R. (2000) Molecular basis for P-site inhibition of adenylyl cyclase. *Biochemistry* **39**, 14464–14471

69. Zhang, G., Liu, Y., Ruoho, A. E., Hurley, J. H. (1997) Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature*. **386**, 247–253
70. Knapp, G. S., McDonough, K. A. (2014) Cyclic AMP signaling in mycobacteria. *Microbiol. Spectr.* **2**, 1–14
71. McCue, L. A., McDonough, K. A., Lawrence, C. E. (2000) Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* **10**, 204–219
72. Shenoy, A. R., Visweswariah, S. S. (2006) New messages from old messengers: cAMP and mycobacteria. *Trends Microbiol.* **14**, 543–550
73. Abdel Motaal, A., Tews, I., Schultz, J. E., Linder, J. U. (2006) Fatty acid regulation of adenylyl cyclase Rv2212 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS J.* **273**, 4219–4228
74. Castro, L. I., Hermsen, C., Schultz, J. E., Linder, J. U. (2005) Adenylyl cyclase Rv0386 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv uses a novel mode for substrate selection. *FEBS J.* **272**, 3085–3092
75. Guo, Y. L., Seebacher, T., Kurz, U., Linder, J. U., Schultz, J. E. (2001) Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases. *EMBO J.* **20**, 3667–3675
76. Linder, J. U., Schultz, A., Schultz, J. E. (2002) Adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an autoinhibitory N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 15271–15276
77. Linder, J. U., Hammer, A., Schultz, J. E. (2004) The effect of HAMP domains on class IIIb adenylyl cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Biochem. FEBS.* **271**, 2446–2451
78. Reddy, S. K., Kamireddi, M., Dhanireddy, K., Young, L., Davis, A., Reddy, P. T. (2001) Eukaryotic-like adenylyl cyclases in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* **276**, 35141–35149
79. Barathy, D., Mattoo, R., Visweswariah, S., Suguna, K. (2014) New structural forms of a mycobacterial adenylyl cyclase Rv1625c. *Int. Union Crystallogr.* **1**, 338–348
80. Ketkar, A. D., Shenoy, A. R., Kesavulu, M. M., Visweswariah, S. S., Suguna, K. (2004) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the catalytic domain of adenylyl cyclase Rv1625c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr. Sect. D.* **60**, 371–373
81. Shenoy, A. R., Sivakumar, K., Krupa, A., Srinivasan, N., Visweswariah, S. S. (2004) A survey of nucleotide cyclases in actinobacteria: unique domain organization and expansion of the class III cyclase family in *Mycobacterium tuberculosis*. *Comp. Funct. Genomics.* **5**, 17–38
82. Kanchan, K. (2011) The transmembrane signaling in chimeras of the *E. coli* chemotaxis receptors and bacterial class III adenylyl cyclases. *Dissertation der Universität Tübingen*
83. Natarajan, J. (2014) Signal transduction in tandem HAMP domains. *Dissertation der Universität Tübingen*
84. Ciferri, O. (1983) *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* **47**, 551–578
85. Holland, H. D. (2006) The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **361**, 903–915
86. Kebede, E. (1997) Response of *Spirulina platensis* (= *Arthrospira fusiformis*) from Lake Chitu, Ethiopia, to salinity stress from sodium salts. *J. Appl. Phycol.* **9**, 551–558

87. Mullineaux, C. W. (2001) How do cyanobacteria sense and respond to light? *Mol. Microbiol.* **41**, 965–971
88. Ohmori, M., Okamoto, S. (2004) Photoresponsive cAMP signal transduction in cyanobacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 503–511
89. Zeng, M.-T., Vonshak, A. (1998) Adaptation of *Spirulina platensis* to salinity-stress. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **120**, 113–118
90. Adams, D. G., Duggan, P. S. (1999) Tansley Review No. 107. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.* **144**, 3–33
91. Buikema, W. J., Haselkorn, R. (1993) Molecular genetics of cyanobacterial development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 33–52
92. Belay, A. (2007) *Spirulina (Arthrospira)*: production and quality assurance. *Spirulina in Human Nutrition and Health*. 1–25
93. Ohmori, K., Hirose, M., Ohmori, M. (1993) An increase in the intracellular concentration of cAMP triggers formation of an algal mat by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* **34**, 169–171
94. Fujisawa, T., Narikawa, R., Okamoto, S., Ehira, S., Yoshimura, H., Suzuki, I., Masuda, T., Mochimaru, M., Takaichi, S., Awai, K., Sekine, M., Horikawa, H., Yashiro, I., Omata, S., Takarada, H., Katano, Y., Kosugi, H., Tanikawa, S., Ohmori, K., Sato, N., Ikeuchi, M., Fujita, N., Ohmori, M. (2010) Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA Res.* **17**, 85–103
95. Kasahara, M., Yashiro, K., Sakamoto, T., Ohmori, M. (1997) The *Spirulina platensis* adenylate cyclase gene, *cyaC*, encodes a novel signal transduction protein. *Plant Cell Physiol.* **38**, 828–836
96. Katayama, M., Ohmori, M. (1997) Isolation and characterization of multiple adenylate cyclase genes from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **179**, 3588–3593
97. Yashiro, K., Sakamoto, T., Ohmori, M. (1996) Molecular characterization of an adenylate cyclase gene of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Mol. Biol.* **31**, 175–181
98. Sunahara, R. K., Beuve, A., Tesmer, J. J., Sprang, S. R., Garbers, D. L., Gilman, A. G. (1998) Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenyl and guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* **273**, 16332–16338
99. Kasahara, M., Unno, T., Yashiro, K., Ohmori, M. (2001) CyaG, a novel cyanobacterial adenyl cyclase and a possible ancestor of mammalian guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* **276**, 10564–10569
100. Adler, J. (1966) Chemotaxis in bacteria. *Science.* **153**, 708–716
101. Adler, J. (1969) Chemoreceptors in bacteria. *Science.* **166**, 1588–1597
102. Hazelbauer, G. L. (2012) Bacterial chemotaxis: the early years of molecular studies. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 285–303
103. Parkinson, J. S., Hazelbauer, G. L., Falke, J. J. (2015) Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends Microbiol.* **23**, 257–266
104. Bourret, R. B., Borkovich, K. A., Simon, M. I. (1991) Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 401–441
105. Grebe, T. W., Stock, J. (1998) Bacterial chemotaxis: the five sensors of a bacterium. *Curr. Biol.* **8**, R154-157

106. Ames, P., Studdert, C. A., Reiser, R. H., Parkinson, J. S. (2002) Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7060–7065
107. Maddock, J. R., Shapiro, L. (1993) Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science*. **259**, 1717–1723
108. Briegel, A., Ortega, D. R., Tocheva, E. I., Wuichet, K., Li, Z., Chen, S., Müller, A., Iancu, C. V., Murphy, G. E., Dobro, M. J., Zhulin, I. B., Jensen, G. J. (2009) Universal architecture of bacterial chemoreceptor arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 17181–17186
109. Amin, D. N., Hazelbauer, G. L. (2010) The chemoreceptor dimer is the unit of conformational coupling and transmembrane signaling. *J. Bacteriol.* **192**, 1193–1200
110. Hazelbauer, G. L., Falke, J. J., Parkinson, J. S. (2008) Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 9–19
111. Falke, J. J., Bass, R. B., Butler, S. L., Chervitz, S. A., Danielson, M. A. (1997) The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 457–512
112. Manson, M. D., Armitage, J. P., Hoch, J. A., Macnab, R. M. (1998) Bacterial locomotion and signal transduction. *J. Bacteriol.* **180**, 1009–1022
113. Kim, K. K., Yokota, H., Kim, S. H. (1999) Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature*. **400**, 787–792
114. Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, S. M., McDade, J. E., Shepard, C. C., Brachman, P. S. (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **297**, 1189–1197
115. McDade, J. E., Brenner, D. J., Bozeman, F. M. (1979) Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Ann. Intern. Med.* **90**, 659–661
116. Bentivoglio, M., Pacini, P. (1995) Filippo Pacini: a determined observer. *Brain Res. Bull.* **38**, 161–165
117. Vanden Broeck, D., Horvath, C., De Wolf, M. J. S. (2007) *Vibrio cholerae*: cholera toxin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1771–1775
118. Rutherford, S. T., Bassler, B. L. (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a012427
119. Tiaden, A., Hilbi, H. (2012)  $\alpha$ -Hydroxyketone synthesis and sensing by *Legionella* and *Vibrio*. *Sensors*. **12**, 2899–2919
120. Waters, C. M., Bassler, B. L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 319–346
121. Ng, W.-L., Bassler, B. L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 197–222
122. Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., Cámara, M. (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **362**, 1119–1134
123. Henke, J. M., Bassler, B. L. (2004) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **186**, 6902–6914
124. Jung, S. A., Chapman, C. A., Ng, W.-L. (2015) Quadruple quorum-sensing inputs control *Vibrio cholerae* virulence and maintain system robustness. *PLOS Pathog.* **11**, e1004837

125. Miller, M. B., Skorupski, K., Lenz, D. H., Taylor, R. K., Bassler, B. L. (2002) Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*. **110**, 303–314
126. Bassler, B. L., Wright, M., Silverman, M. R. (1994) Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* **12**, 403–412
127. Higgins, D. A., Pomianek, M. E., Kraml, C. M., Taylor, R. K., Semmelhack, M. F., Bassler, B. L. (2007) The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature*. **450**, 883–886
128. Spirig, T., Tiaden, A., Kiefer, P., Buchrieser, C., Vorholt, J. A., Hilbi, H. (2008) The *Legionella* autoinducer synthase LqsA produces an alpha-hydroxyketone signaling molecule. *J. Biol. Chem.* **283**, 18113–18123
129. Tiaden, A., Spirig, T., Sahr, T., Wälti, M. A., Boucke, K., Buchrieser, C., Hilbi, H. (2010a) The autoinducer synthase LqsA and putative sensor kinase LqsS regulate phagocyte interactions, extracellular filaments and a genomic island of *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* **12**, 1243–1259
130. Bolitho, M. E., Perez, L. J., Koch, M. J., Ng, W.-L., Bassler, B. L., Semmelhack, M. F. (2011) Small molecule probes of the receptor binding site in the *Vibrio cholerae* CAI-1 quorum sensing circuit. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 6906–6918
131. Schell, U., Simon, S., Sahr, T., Hager, D., Albers, M. F., Kessler, A., Fahrnbauer, F., Trauner, D., Hedberg, C., Buchrieser, C., Hilbi, H. (2016) The  $\alpha$ -hydroxyketone LAI-1 regulates motility, Lqs-dependent phosphorylation signalling and gene expression of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **99**, 778–793
132. Wei, Y., Ng, W.-L., Cong, J., Bassler, B. L. (2012) Ligand and antagonist driven regulation of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing receptor CqsS. *Mol. Microbiol.* **83**, 1095–1108
133. van Kessel, J. C., Ulrich, L. E., Zhulin, I. B., Bassler, B. L. (2013) Analysis of activator and repressor functions reveals the requirements for transcriptional control by LuxR, the master regulator of quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *mBio*. **4**, e00378-13
134. Showalter, R. E., Martin, M. O., Silverman, M. R. (1990) Cloning and nucleotide sequence of luxR, a regulatory gene controlling bioluminescence in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **172**, 2946–2954
135. Jung, K., Fried, L., Behr, S., Heermann, R. (2012) Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 118–124
136. West, A. H., Stock, A. M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 369–376
137. Tiaden, A., Spirig, T., Hilbi, H. (2010b) Bacterial gene regulation by alpha-hydroxyketone signaling. *Trends Microbiol.* **18**, 288–297
138. Beltz, S. (2016) Direkte Regulation der mykobakteriellen Adenylatcyclase Rv1625c durch den Quorum-Sensing Rezeptor CqsS von *Vibrio harveyi*. *Dissertation der Universität Tübingen*
139. Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. J., Deerfield, D. W. (1997) GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnew News*. **4**, 1–4
140. Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., Barton, G. J. (2015) JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* **43**, W389-394
141. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* **10**, 845–858

142. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M., Brenner, S. E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190
143. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263–273
144. Liu, H., Naismith, J. H. (2008) An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol.* **8**, 91
145. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* **77**, 51–59
146. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature.* **258**, 598–599
147. 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
148. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685
149. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354
150. Salomon, Y., Londos, C., Rodbell, M. (1974) A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* **58**, 541–548
151. Winkler, K., Schultz, A., Schultz, J. E. (2012) The S-helix determines the signal in a Tsr receptor/adenylyl cyclase reporter. *J. Biol. Chem.* **287**, 15479–15488
152. Mondéjar, L. G., Lupas, A., Schultz, A., Schultz, J. E. (2012) HAMP domain-mediated signal transduction probed with a mycobacterial adenylyl cyclase as a reporter. *J. Biol. Chem.* **287**, 1022–1031
153. Kanchan, K., Linder, J., Winkler, K., Hantke, K., Schultz, A., 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
154. Ng, W.-L., Wei, Y., Perez, L. J., Cong, J., Long, T., Koch, M., Semmelhack, M. F., Wingreen, N. S., Bassler, B. L. (2010) Probing bacterial transmembrane histidine kinase receptor-ligand interactions with natural and synthetic molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 5575–5580
155. Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., Deber, C. M. (2009) Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1760–1765
156. Perez, L. J., Ng, W.-L., Marano, P., Brook, K., Bassler, B. L., Semmelhack, M. F. (2012) Role of the CAI-1 fatty acid tail in the *Vibrio cholerae* quorum sensing response. *J. Med. Chem.* **55**, 9669–9681
157. Stewart, V., Chen, L.-L. (2010) The S helix mediates signal transmission as a HAMP domain coiled-coil extension in the NarX nitrate sensor from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **192**, 734–745
158. Ma, X., Beuve, A., van den Akker, F. (2010) Crystal structure of the signaling helix coiled-coil domain of the beta1 subunit of the soluble guanylyl cyclase. *BMC Struct. Biol.* **10**, 2

159. Kessler, A., Schell, U., Sahr, T., Tiaden, A., Harrison, C., Buchrieser, C., Hilbi, H. (2013) The *Legionella pneumophila* orphan sensor kinase LqsT regulates competence and pathogen-host interactions as a component of the LAI-1 circuit. *Environ. Microbiol.* **15**, 646–662
160. Schell, U., Kessler, A., Hilbi, H. (2014) Phosphorylation signalling through the *Legionella* quorum sensing histidine kinases LqsS and LqsT converges on the response regulator LqsR. *Mol. Microbiol.* **92**, 1039–1055
161. Ferris, H. U., Dunin-Horkawicz, S., Hornig, N., Hulko, M., Martin, J., Schultz, J. E., Zeth, K., Lupas, A. N., Coles, M. (2012) Mechanism of regulation of receptor histidine kinases. *Struct. Lond. Engl. 1993.* **20**, 56–66
162. Hanoune, J., Pouille, Y., Tzavara, E., Shen, T., Lipskaya, L., Miyamoto, N., Suzuki, Y., Defer, N. (1997) Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol. Cell. Endocrinol.* **128**, 179–194
163. Natarajan, J., Schultz, A., Kurz, U., Schultz, J. E. (2014) Biochemical characterization of the tandem HAMP domain from *Natronomonas pharaonis* as an intraprotein signal transducer. *FEBS J.* **281**, 3218–3227
164. Dessauer, C. W., Tesmer, J. J., Sprang, S. R., Gilman, A. G. (1998) Identification of a G $\alpha$  binding site on type V adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **273**, 25831–25839
165. Tang, W. J., Gilman, A. G. (1995) Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs  $\alpha$  and forskolin. *Science.* **268**, 1769–1772
166. Yan, S. Z., Hahn, D., Huang, Z. H., Tang, W. J. (1996) Two cytoplasmic domains of mammalian adenylyl cyclase form a Gs  $\alpha$ - and forskolin-activated enzyme in vitro. *J. Biol. Chem.* **271**, 10941–10945
167. Beltz, S., Bassler, J., Schultz, J. E. (2016) Regulation by the quorum sensor from *Vibrio* indicates a receptor function for the membrane anchors of adenylate cyclases. *eLife.* **5**, e13098
168. Ke, X., Miller, L. C., Ng, W.-L., Bassler, B. L. (2014) CqsA-CqsS quorum-sensing signal-receptor specificity in *Photobacterium angustum*. *Mol. Microbiol.* **91**, 821–833
169. Simon, S., Schell, U., Heuer, N., Hager, D., Albers, M. F., Matthias, J., Fahrnbauer, F., Trauner, D., Eichinger, L., Hedberg, C., Hilbi, H. (2015) Inter-kingdom signaling by the *Legionella* quorum sensing molecule LAI-1 modulates cell migration through an IQGAP1-Cdc42-ARHGEF9-dependent pathway. *PLoS Pathog.* **11**, e1005307
170. Manske, C., Hilbi, H. (2014) Metabolism of the vacuolar pathogen *Legionella* and implications for virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 125
171. Tiaden, A., Spirig, T., Weber, S. S., Brüggemann, H., Bosshard, R., Buchrieser, C., 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. *Cell. Microbiol.* **9**, 2903–2920