

**Chimäre Adenylatcyclasen aus *Mycobacterium* und
Mammalia:
Versuche zur Solubilisation und Regulation**

Dissertation

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

vorgelegt von
Simone Breitkopf
aus Kempten (Allgäu)

Tübingen
2015

Tag der mündlichen Qualifikation:

21.07.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Joachim E. Schultz

Danksagung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2011 bis Februar 2015 unter der Anleitung von Prof. Dr. Joachim E. Schultz am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich möchte mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Joachim E. Schultz, für die interessante Doktorarbeit bedanken, die mir Einblick in verschiedene Themenbereiche ermöglicht hat. Seine Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen waren für mich und meine Arbeit von großem Wert. Ich danke ihm sehr für sein Vertrauen in meine Arbeit.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Peter Ruth für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. Klaus Hantke und Herrn Prof. Dr. Harald Groß danke ich sehr für die Bereitschaft zur Abnahme meiner Promotionsprüfung. Außerdem danke ich Herrn Hantke für die hilfreiche, fachliche Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung verschiedener *E. coli* Stämme und Plasmide.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eric Beitz, Dr. Annika Müller-Lucks und Dr. Sinja Bock für die Einführung in das zellfreie System und die freundliche Aufnahme an der Universität Kiel. Ich möchte mich bei Annika Müller-Lucks und Sinja Bock besonders für die Austestung einiger meiner Konstrukte und für die vielen guten Ratschläge bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Anita Schultz für die immense Arbeit rund um die Rv1625c-Konstrukte und für jedwede Hilfestellung bei Klonierungsproblemen.

Herzlichen Dank an Ursula Kurz, die mich sowohl fachlich als auch freundschaftlich enorm unterstützt hat.

Ich danke Clement Kabagema-Bilan und Isolde Breuning, die mir im Labor mit Rat und Tat zur Seite standen.

Vielen Dank an Dr. Anne Bausch für ihre Präparation der Mäusegehirne.

Allen Mitarbeitern der Arbeitskreise von Prof. Ruth und Prof. Drews danke ich für die freundliche Atmosphäre auf der 7. Ebene.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Kolleginnen Dr. Janani Natarajan, Stephanie Beltz und Miriam Ziegler für die schöne Zeit im und außerhalb des Labors bedanken. Ich danke auch allen übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schultz, Dr. Laura García Mondéjar, Dr. Karin Winkler, Dr. Ana Banjac, Dr. Kajal Kanchan, Dr. Yinlan Guo und Simon-Peter Skopek, für eure herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für eure Unterstützung und Hilfe im Labor.

Mein größter Dank gilt meinem Mann, der mich während der gesamten Zeit wundervoll unterstützt hat und mir immer zur Seite gestanden ist. Ebenso großer Dank gilt meiner Familie, die jederzeit für mich da ist.

Inhaltsangabe

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Mammalia</i> -ACn und G _{sa}	2
1.2	Mykobakterielle ACn Rv3645 und Rv1625c	6
1.3	<i>E. coli</i> Serinrezeptor Tsr.....	8
1.4	<i>Quorum sensing</i> Rezeptor CqsS.....	10
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	12
2.2	Ausstattung	13
2.3	<i>E. coli</i> Stämme	14
2.4	Plasmide	14
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	14
	Dauerkulturen	14
	Kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	14
	Transformation von DNA.....	15
	Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
	Miniprep (Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>)	16
	Restriktionsverdau	17
	Agarose-Gelelektrophorese	17
	DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen	17
	DNA-Entsalzung.....	18
	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	18
	Dephosphorylierung von Vektoren	18
	Ligation von DNA.....	18
	Sequenzierung von DNA.....	18
2.6	Proteinchemische Methoden.....	19
	Expression.....	19
	Expression von G _{sa} *	19
	Zellernte	20
	Zelllyse	20
	Proteinreinigung mit IMAC.....	20
	Gelfiltration	23
	Dialyse und Konzentrierung	23

Membranpräparation.....	23
Solubilisation der YaiN-/YbeL-Konstrukte	24
Gewebepräparation	24
Proteinkonzentration	24
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	24
Western Blot.....	25
2.7 Zellfreie Proteinbiosynthese	26
2.8 Adenylatcyclasetest.....	35
2.9 Klonierung der Konstrukte	37
2.10 Oligonukleotide	43
3 Ergebnisse.....	49
3.1 Solubilisation von Membranproteinen	49
3.1.1 Insertion geladener Aminosäuren in Membranhelices von Tsr	49
3.1.1.1 Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 [G19K]	50
3.1.1.2 Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 [V17E/G19K]	52
3.1.1.3 Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 [G19K/V203E], Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 [V17E/G19K/W194R/V203E], Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 [G19K/V202E], Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 [G19K/L204E].....	52
3.1.1.4 Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 [A16K]	54
3.1.1.5 Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 [A16K/V203E].....	54
3.1.2 Insertion hydrophiler Aminosäuren in die zweite Transmembranhelix von Tsr.....	55
3.1.2.1 Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 [A192S/L196Q/F208S]	56
3.1.2.2 Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 [A192S/W194R/L196Q/M200K/F208S]	57
3.1.3 Fusionsproteine zur Unterstützung der Solubilisation.....	58
3.1.3.1 T4* Lysozym	59
3.1.3.2 YaiN und YbeL.....	61
3.1.3.2.1 Expressionskassetten	62
3.1.3.2.2 N-YbeL	65
3.1.3.2.3 Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645	69
3.1.4 Solubilisation via zellfreier Proteinbiosynthese	72
3.1.4.1 Chimäre mit GFP.....	73
3.1.4.2 Chimäre ohne GFP	77
3.1.4.3 Bakterielle Expression	79
3.2 Untersuchungen zur Regulation von <i>Mammalia</i> - und mykobakteriellen ACn	81
3.2.1 Kontrolle der G _{sα} *- und Forskolin-Regulation in <i>Mammalia</i> -ACn	81

3.2.2	<i>Quorum sensing</i> Rezeptor Chimären.....	82
3.2.2.1	Kaninchen ACV C1 – Ratte ACII C2	83
3.2.2.2	hACII C1 – hACII C2	87
3.2.3	Regulierung von Rv1625c-Konstrukten durch $G_{s\alpha}^*$	95
3.2.3.1	Mutationen zur Bildung von Rv1625c-C1 und Rv1625c-C2.....	96
3.2.3.2	Mutationen für ein $G_{s\alpha}^*$ -stimuliertes Rv1625c-C1/-C2-Heterodimer	97
4	Diskussion.....	107
4.1	Solubilisation von Membranproteinen	107
4.1.1	Insertion geladener Aminosäuren in Membranhelices von Tsr	107
4.1.2	Insertion hydrophiler Aminosäuren in die zweite Transmembranhelix von Tsr.....	109
4.1.3	Fusionsproteine zur Unterstützung der Solubilisation.....	111
4.1.3.1	T4* Lysozym	111
4.1.3.2	YaiN und YbeL.....	113
4.1.4	Solubilisation via zellfreier Proteinbiosynthese	115
4.2	Untersuchungen zur Regulation in <i>Mammalia</i> - und mykobakteriellen ACn	118
4.2.1	<i>Quorum sensing</i> Rezeptor Chimären.....	118
4.2.2	Regulierung von Rv1625c-Konstrukten durch $G_{s\alpha}^*$	121
5	Zusammenfassung.....	124
6	Anhang.....	126
7	Literaturverzeichnis.....	147

Abkürzungen

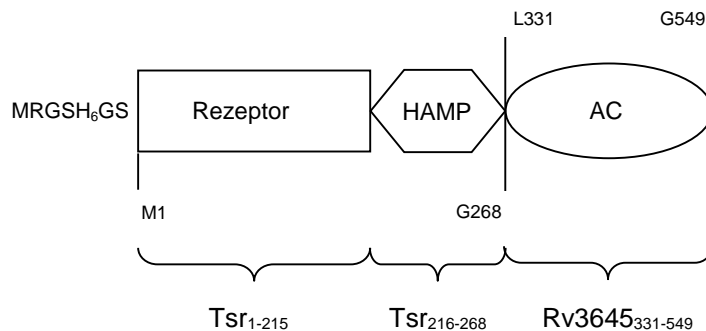
AC(n)	Adenylatcyclase(n)
AS(n)	Aminosäure(n)
Brij35	Polyoxyethylen-(23)-lauryl-ether
Brij58	Polyoxyethylen-(20)-cetyl-ether
Brij78	Polyoxyethylen-(20)-stearyl-ether
Brij98	Polyoxyethylen-(20)-oleyl-ether
BSA	Bovines Serumalbumin
C1, C2	katalytische Domänen in <i>Mammalia</i> -ACn
C ₁₂ E ₈	Octaethylen-glycol-monododecyl-ether
CAI-1	<i>Cholerae autoinducer</i> 1
CHD	<i>cyclase homology domain</i>
CqsS	<i>V. cholerae quorum sensing</i> Sensor
DDM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
DTT	1,4-Dithiothreitol
FM	Nährstoffmix (<i>feeding mixture</i>)
FSK	Forskolin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G _{sa} *	stimulierende α-Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins, konstitutiv aktiv durch Q213L Mutation
hACII	humane ACII
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
LqsS	<i>Legionella quorum sensing</i> Sensor
M1, M2	Membrananker (hier in <i>Mammalia</i> -ACn)
MCP(e)	Methyl-akzeptierende(s) Chemotaxisprotein(e)
MNG-3	Lauryl-maltose-neopentyl glycol
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
QS	<i>Quorum sensing</i>
RBS	Ribosomale Bindestelle
RM	Reaktionsgemisch (<i>reaction mixture</i>)
T4L*	T4 Lysozym, inaktiv durch E11N Mutation
Tar	Aspartatrezeptor von <i>E. coli</i>
T _M	Anlagerungstemperatur für Primer (<i>annealing</i>)
TM	Transmembranhelix
Tsr	Serinrezeptor von <i>E. coli</i>
ÜN	über Nacht
ZS	zellfreies System

Nomenklatur, Aminosäuresequenz und Domänenübersicht der eingesetzten Konstrukte

Für eine bessere Übersichtlichkeit werden hier die Kurzbezeichnungen der verwendeten chimären Konstrukte und die einzelnen Domänen mit der jeweiligen Aminosäuresequenz aufgeführt. In der Darstellung sind N- und C-terminale Tags und ASn, die bei der Verknüpfung der Domänen durch Schnittstellen entstanden sind, eingefügt. Die Nummerierung der Domänen erfolgte anhand der Holoenzyme. Die Konstrukte wurden z.T. weiter mutiert, was anhand der Nummerierung der Aminosäuresequenz nachverfolgt werden kann.

1) Chimäre aus Tsr Chemotaxisprotein und AC Rv3645: Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645

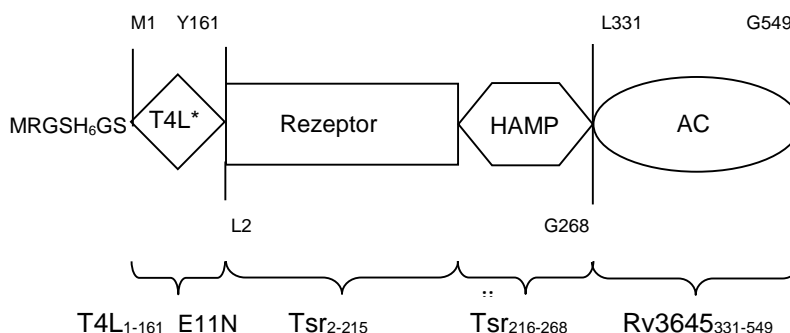
(Tsr + HAMP) _{M1-G268} (Chemotaxisrezeptor für Serin aus <i>E. coli</i>)	MLKRIKIVTSLLLVLAVFGLLQLTSGGLFFNALKNDKENFTVLQTRQQQSTLNGSWVALLQTRNTLNRAGIRYMMQDQNNIGSGSTVAELMESASISLKQAEKNWADYEALPRDPRQSTAAAAEIKRNYDIYHNALAEIQLLGAGKINEFFDQPTQGYQDGFQKQYVAYMEQNDRLHDIIVSDN
Rv3645 _{L331-G549} (AC aus <i>M. tuberculosis</i>)	NASYSQAMWILVGMIVVLAVIFAVWFGIKASLVAPMNRLLIDSIRHIAGGDLVKPIEVDGSNEMGQLAESLRHMQGELMRTVG LRDLFGRYVGEDVARRALERTGELGGQERDVAVLFDLVGSTQLAATRPPAEVVQLLNEFFRVVETVARHGGFVNKFQGDAAALAFGAPIEHPDGAGAALSAARELHDELIPVLGSAEFGIGVSAGRAIAGHIGAQARFEYTVIGDPVNEAARLTELAKLEDGHVLAIAVSGALDAEALCWDVGEVVELRGRAAPTQLARPMNLAPEEVSSEVRG



2) Chimären aus T4 Lysozym und Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645:

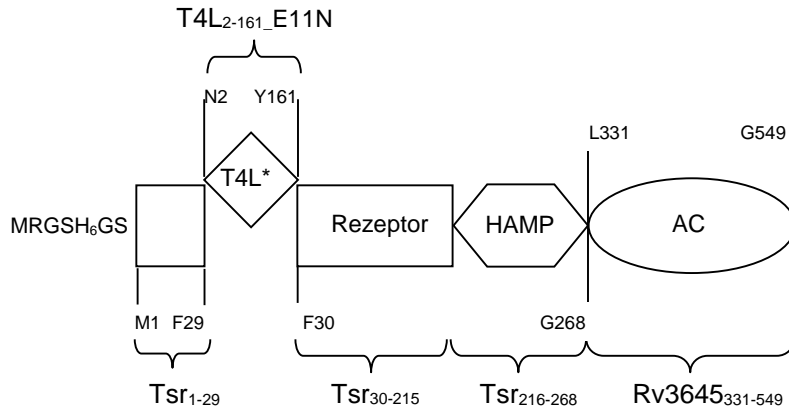
- T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645

T4 _{L_{M1}-Y₁₆₁_E₁₁₁N} (Lysozym des T4 Phagen, inaktiv)	MNIFEMLRIDNGLRLKIYKDTEGYTIGIGHLLTKSPSLNAAKSELDKAIGRNTNGVITKDEAEKLFNQDQVDAAVRGILRNAKLKPVYDSLDAVRRRAALINMVFQMGETGVAGFTNSLRMLQQRWDEAAVNLAKSRYWYNQTPNRAKRVITTFRTGTWDAY
(Tsr + HAMP) _{L2-G268} -Rv3645 _{L331-G549}	AS-Sequenz wie bei Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 ohne Startmethionin



- TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645

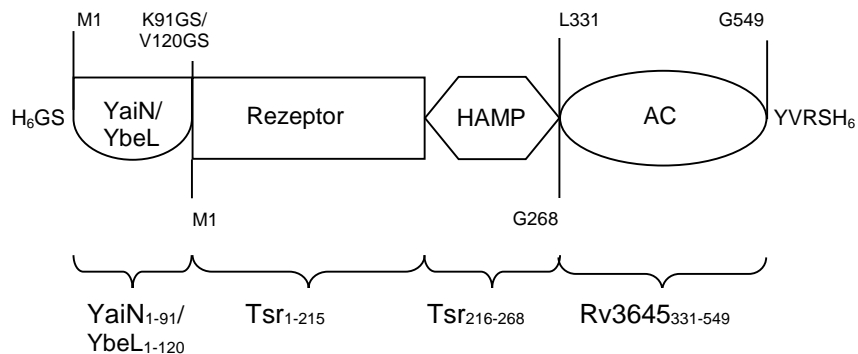
Tsr _{M1-F29}	MLKRIKIVTSLLLVLAVFGLLQLTSGGLF
T4L _{N2-Y161_E11N}	AS-Sequenz wie bei T4L-Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 ohne Startmethionin
(Tsr + HAMP) _{F30-G268}	FNALKNDKENFTVLQTRQQSTLNGSWVALLQTRNTLNRAGIRYMMDQNNIGSGSTVAEL MESASISLKQAEKNWADYEALPRDPRQSTAAAAEIKRNYDIYHNALAEIQLLGAGKINEFF DQPTQGYQDGFQYVAYMEQNDRLHDIASDNNASYSQAMWILVGVIMIVLAVIFAVWFG IKASLVAPMNRLLIDSIRHIAGGDLVKPIEVDGSENGQLAESLRHMQGELMRTVG
Rv3645 _{L331-G549}	AS-Sequenz wie bei Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645



3) Chimären aus YaiN und YbeL und Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645:

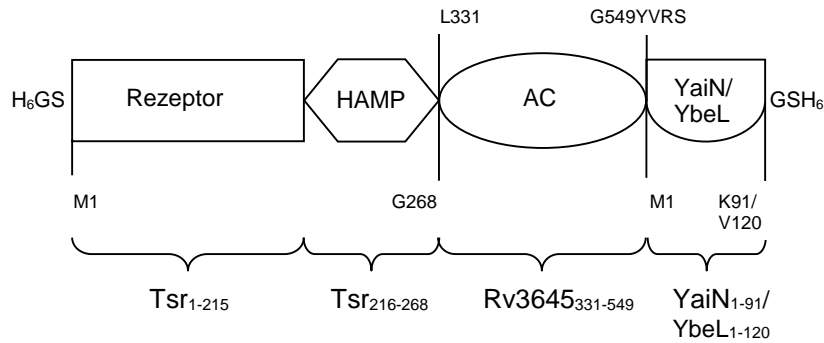
- YaiN-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 bzw. YbeL-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (N-YaiN/-YbeL)

YaiN _{M1-K91} (Protein aus <i>E. coli</i> Operon <i>frm</i>)	MPSTPEEKKKVLTRVRRIRGQIDALERSLEGDAECRAILQQIAAVRGAANGLMAEVLESHIR ETFDNRNDCYSREVSQSVDITIELVRLAYLK
bzw. YbeL _{M1-V120} (Teil des <i>E. coli</i> <i>YbeL</i> Gens)	MNKVAQYYRELVASLSERLRNGERDIDALVEQARERVIKTGELTRTEVDELTRAVRRDLEEF AMSYEESLKEESDSVFMVVIKESLWQELADITDKTQLEWREVFQDLNHHGVYHSGEVV
(Tsr + HAMP) _{M1-G268} -Rv3645 _{L331-G549}	AS-Sequenz wie bei Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645



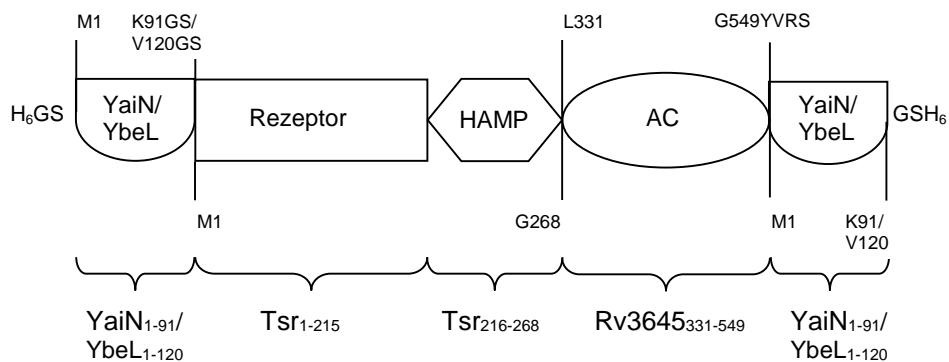
- Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-YaiN bzw. Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-YbeL (C-YaiN/-YbeL)

(Tsr + HAMP) _{M1-G268} -Rv3645 _{L331-G549}	AS-Sequenz wie bei Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645
YaiN _{M1-K91}	AS-Sequenz wie bei YaiN-Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645
bzw. YbeL _{M1-V120}	AS-Sequenz wie bei YbeL-Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645



- YaiN-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-YaiN bzw. YbeL-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-YbeL bzw. YaiN-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-YbeL bzw. YbeL-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-YaiN (N-YaiN/-YbeL_C-YaiN/-YbeL)

YaiN _{M1-K91}	AS-Sequenz wie bei YaiN-Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645
bzw. YbeL _{M1-V120}	AS-Sequenz wie bei YbeL-Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645
(Tsr + HAMP) _{M1-G268} -Rv3645 _{L331-G549}	AS-Sequenz wie bei Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645
YaiN _{M1-K91}	AS-Sequenz wie bei YaiN-Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645
bzw. YbeL _{M1-V120}	AS-Sequenz wie bei YbeL-Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645

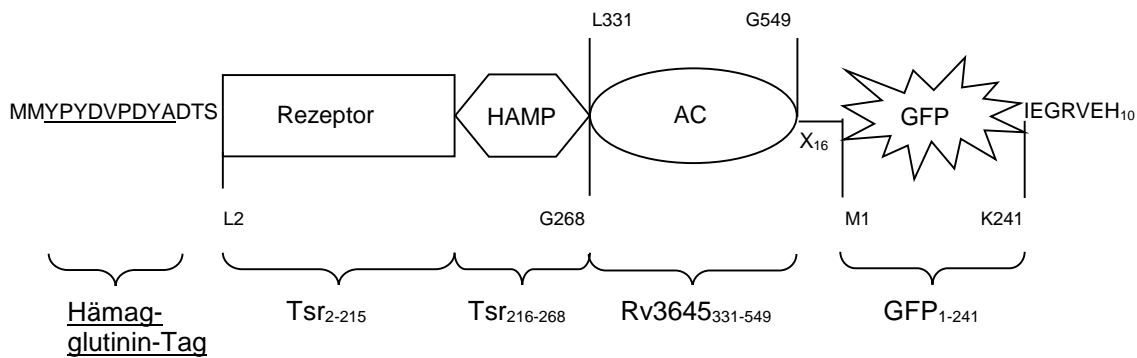


4) Chimären zur Expression im zellfreien System:

- Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-GFP

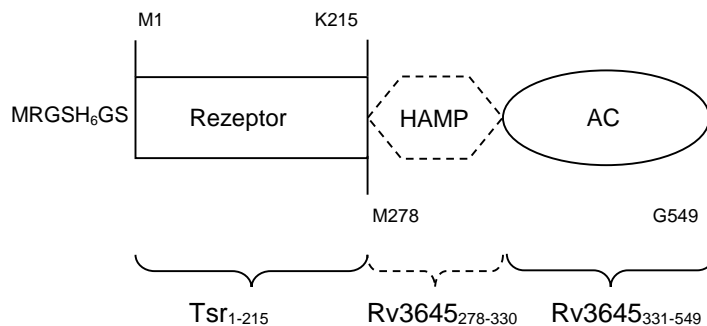
(Tsr + HAMP) _{L2-G268} -Rv3645 _{L331-G549}	AS-Sequenz wie bei Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645 ohne Startmethionin
GFP _{M1-K241} (grün fluoreszierendes Protein)	X ₁₆ MNHMSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVP WPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEG DTLVNRIELKIGDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKANFKTRHNIEDGGVQLA DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK

X₁₆ = LERPACKIPNDLKQKV wurde von B. Wu (Universität Kiel) eingeführt.



- Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645

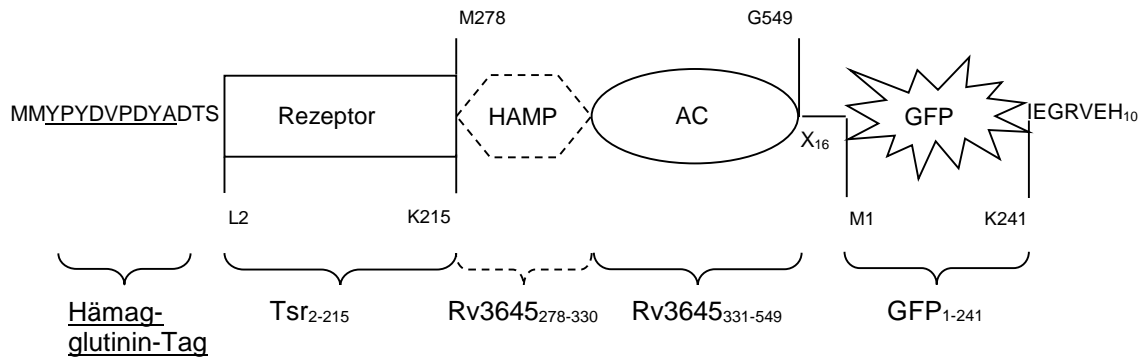
Tsr _{M1-K215}	MLKRIKIVTSLLLVLAVFGLLQLTSGGLFFNALKNDKENFTVLQTI RQQQSTLNGSWVALLQT RNTLNRAGIRYMMDQNNIGSGSTVAELMESASISLKQAEKNWADYEALPRDPRQSTAAAA EIKRNYDIYHNALAEIQLLGAGKINEFFDQPTQGYQDGFQKQYVAYMEQNDRLHDIASDN NASYSQAMWILVGMIVVLAVIFAVWFGIK
(HAMP + Rv3645) _{M278-G549}	MSIADPLRQLRWALSEVQRGNYNAMQIYDASELGLLQAGFNDMVRELSERQRLRDLFGR YVGEDVARRALERGTELGGQERDVAVLFVDLVGSTQLAATRPPAEVVQLNEFFR VVVETV ARHGGFVNKFQGDAAALIFGAPIEHPDGAGAALSAARELHDELIPVLSAEFGIGVSAGRAI AGHIGAQARFEYTVIGDPVNEAARLTELAKLEDGHVLSAIAVSGALDAEALCWDVGEVVE LRGRAAPTQLARPMNLAAP EESSEVRG



- Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645-GFP

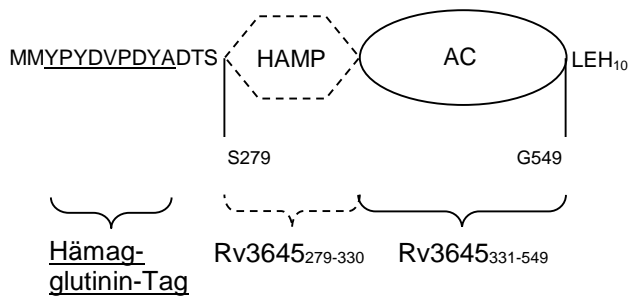
Tsr _{L2-K215} - (HAMP + Rv3645) _{M278-G549}	AS-Sequenz wie bei Tsr-HAMP ₃₆₄₅ -Rv3645 ohne Startmethionin
GFP _{M1-K241}	X ₁₆ -AS-Sequenz wie bei Tsr-HAMP _{Tsr} -Rv3645-GFP

X₁₆ = LERPACKIPNDLKQKV wurde von B. Wu (Universität Kiel) eingeführt.



- HAMP₃₆₄₅-Rv3645

(HAMP + Rv3645) _{S279-G549}	AS-Sequenz wie bei Tsr-HAMP ₃₆₄₅ -Rv3645 ohne Startmethionin
--------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------



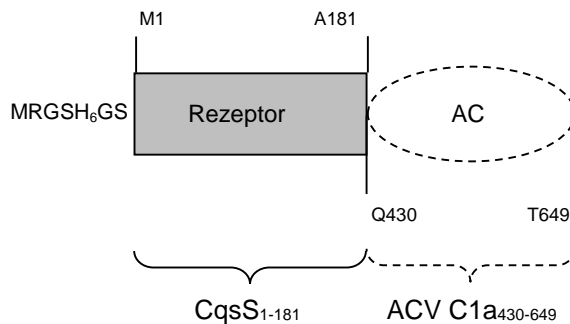
5) Chimären aus *quorum sensing* Rezeptor und *Mammalia*-Adenylatcyclasen:

- CqsS-ACV C1a

Bei CqsS handelt es sich um eine Variante mit C₁₆₀YF anstatt F₁₆₀YF. Die verwendete ACV C1a stammt aus Kaninchen.

CqsS _{M1-A181} (<i>Quorum sensing</i> Sensor aus <i>V. cholerae</i>)	MDAIRKVVYQYAEPNLSLVGWMGFIFPIIYVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPEWVRGFLPAYQVVTTLCLPCFFFYMLLMNNSNVVWMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKVSIA
ACV C1a _{Q430-T649}	QQRERLLSVLPRHVAEMKADINAKQEDMMFHKIYIQKHDNVSILFADIEGFTSLASQCTAQELVMTLNELFARFDKLAENHCLRIKILGDCYYCVSGLPEARADHAHCCVEMGMDMIEAISLVREVTGVNVNMRVGIHSGRVHCGVLGLRKWQFDVWSNDVTLANHMEAGGKAGRIHITKATLNYLNGDYEVEPGCGGERNAYLKEHSIETFLILRCT

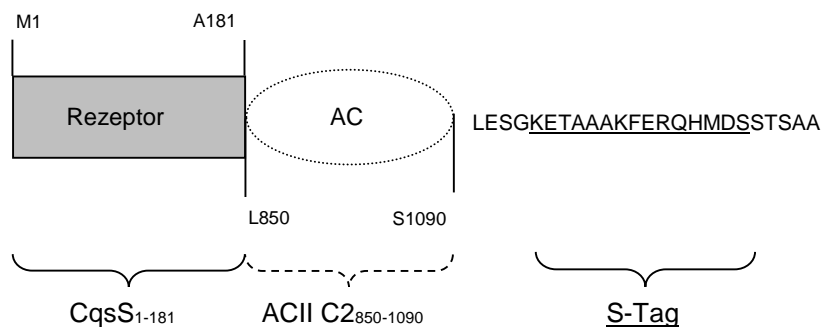
In einem Konstrukt wurde ACV C1a C-terminal um Q₆₅₀KRKEEK verlängert.



- CqsS-ACII C2

Die verwendete ACII C2 stammt aus der Ratte.

CqsS _{M1-A181}	AS-Sequenz wie bei CqsS-ACV C1a
ACII C2 _{L850-S1090}	LNRVLLENVLP AHVAEHFLARSLKNEELYHQSYDCVCMFASIPDFKEFYTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDLLSKPKFSGVEIKITIGSTYMAATGLSAIPSQEHAQEPERQYMHIGTMVEFAYALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPVIAGVIGAQPQYDIWGNVTNVVASRMDSTGVLDKIQVTEETSLILQTLGYTCTCRGIINVKGKGD LKTYFVNTEMSRSLSQSNLAS

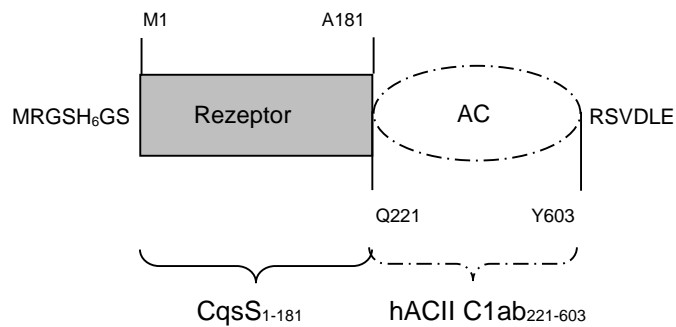


- CqsS-hACII C1ab

Die verwendete hACII wurde bei GenScript, USA, synthetisiert. Der *codon usage* wurde auf *E. coli* angepasst. Am N-Terminus wurde eine BamHI-Schnittstelle vorangestellt und am C-Terminus die Schnittstellen BglIII, Sall, XhoI und HindIII angefügt. Ein Stopp-Codon wurde vor HindIII eingeführt.

CqsS _{M1-A181}	AS-Sequenz wie bei CqsS-ACV C1a
hACII C1ab _{Q221-Y603}	<p>QDTCNCIKSRIKLEFEKRRQERLLL SLLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAGQMENTNNFHNLYV KRHTNVSILYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENECMRIKILGDCYYCVSG LPISLPNHAKNCVKMGLDMCEAIKKVRDATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVWS HDVTLANHMEAGGVPGRVHISSVTLLEHLNGAYKVEEGDGDIRDYPYLKQHLVKTYFVINPKGE RRSPQHLFRPRHTLDGAKMRASVRMTRYLESWGAAKPFAHLHHRDSMTTENGKISTTDVP MGQHNFNQRTLRTKSQKKRFEELNERMIQAIDGINAQKQWLKSEDIQRISLLFYNKVLEKE YRATALPAFKYY</p>

Varianten dieses Konstrukts beginnen in der hACII C1ab bei D₂₂₂, E₂₃₄, Q₂₃₉. Bei Verwendung von hACII C1a endet die AC bei P₄₈₉.

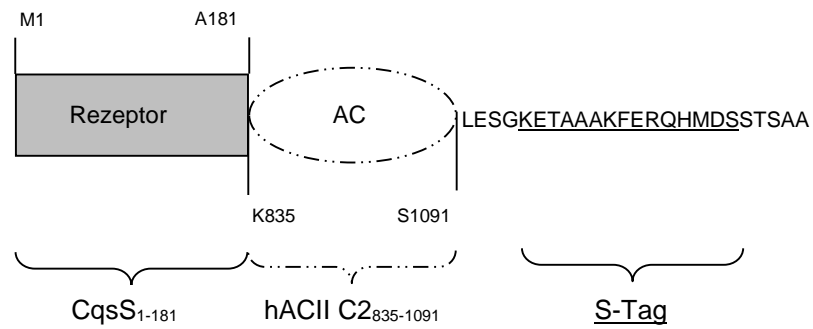


- CqsS-hACII C2

Aus Klonierungsgründen wurde N-terminal eine BamHI- und C-terminal eine XhoI- und HindIII-Schnittstelle eingeführt. Vor der HindIII-Schnittstelle befindet sich ein Stopp-Codon.

CqsS _{M1-A181}	AS-Sequenz wie bei CqsS-ACV C1a
hACII C2 _{K835-S1091}	<p>KNKFKKEREEIETMENLNRVLLNVLPAHVAEHFLARSLKNEELYHQSYDCVCMFASIPDF KEFYTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEH SQEPERQYMHIGTMVEFAFALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPIAGVIGAQPQYDIW GNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSLVLQTLGYTCTCRGIINVKGKGLKTYFVNTEMSRS LSQSNVAS</p>

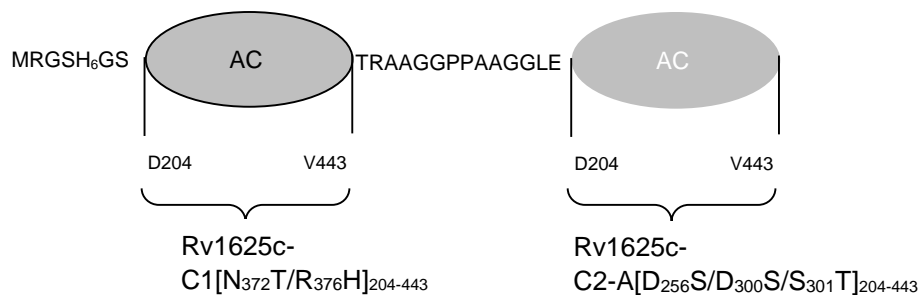
Varianten dieses Konstrukts beginnen in der hACII C2 bei N₈₃₆, I₈₄₅, L₈₅₁.



6) Rv1625c-Konstrukte

<p>Rv1625C_{D204-V443} (AC aus <i>M. tuberculosis</i>)</p>	<p>DTARAEAVMEAEHRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERAS STAPADLVRFLDRLYSADFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDM TNVAAQLKDPGRNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRFFFDVWGDVNVASRMESTDSVGQI QVPDEVYERLKDFFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVAADPGEVARGAEPRTAGV</p>
------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Diese Konstrukte bestehen aus der lösliche Domäne der AC Rv1625c. Jeweils zwei dieser Domänen wurden durch verschiedene Mutationen von A. Schultz verändert und durch den Linker TRAAGGPPAAGGLE verbunden. Da diese Mutationen zu einer Angleichung von Rv1625c an *Mammalia*-ACn dienen sollten, wurde die N-terminale Domäne vor dem Linker als Rv1625c-C1, die C-terminale Domäne nach dem Linker als Rv1625c-C2 bezeichnet. Alle Konstrukte tragen die Mutationen Rv1625c-C1[N₃₇₂T/R₃₇₆H] und Rv1625c-C2-A[D₂₅₆S/D₃₀₀S/S₃₀₁T]. Die Variation Rv1625c-C2-B enthält die Mutationen D₂₅₆S/D₃₀₀S. Eine Auflistung der mutierten Konstrukte erfolgt an entsprechender Stelle im Ergebnisteil (Tab. 20).



1 Einleitung

Alle Organismen leben in einer sich ständig verändernden Umwelt. Um zu überleben, muss es Organismen möglich sein, Reize von außen sowie interne Vorgänge wahrzunehmen, zu verarbeiten und in entsprechende Signale umzuwandeln. Rezeptoren auf Zelloberflächen dienen hierbei der Reizaufnahme und Weiterleitung. Ein besonders intensiv erforschter Mechanismus ist die Signalweiterleitung mittels Adenylatcyclasen (ACn). ACn finden sich sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten und bilden durch Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) unter Abspaltung von Pyrophosphat den universellen *second messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) (Linder and Schultz, 2003). Als Teil der Signalkaskade löst cAMP seinerseits Reaktionen in der Zelle aus, indem es in Eukaryoten z.B. an Proteinkinasen oder Ionenkanäle bindet. In Prokaryoten dient es unter anderem als Transkriptionsaktivator (Baker and Kelly, 2004). Das System wird durch den Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen zu Adenosinmonophosphat (AMP) in ständiger Balance gehalten (Francis et al., 2001).

Die Einteilung der ACn erfolgt anhand von Unterschieden in Sequenz und Struktur in sechs Klassen. ACn der Klasse I finden sich nur in γ -Proteobakterien und sind z.B. an der Katabolitrepression beteiligt (*Escherichia coli*) oder bei der Virulenz von Bedeutung (*Yersinia enterocolitica*). Klasse II ACn sind extrazelluläre Toxine, welche von *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis* und *Pseudomonas aeruginosa* sekretiert werden (Linder, 2006). Bei der Klasse III handelt es sich um universelle ACn sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten. Bezüglich ihrer katalytischen Domänen wird eine Unterteilung in die Unterklassen IIIa-d vorgenommen. Dies beruht auf konservierten Sequenzmotiven, der Anzahl von Aminosäuren (ASn) in einem bestimmten Bereich (Armregion) und Unterschieden bei der Katalyse (Linder and Schultz, 2003). Zu den Klassen IV, V und VI gehören bis jetzt nur wenige bakterielle Vertreter, die noch kaum untersucht wurden (Linder, 2006).

Bei ACn gibt es sowohl lösliche als auch membranständige Varianten. Unser Fokus richtet sich auf die Letzteren. Bis heute konnte nicht geklärt werden, ob die Membrandomänen von ACn eine weitere Funktion neben der bloßen Verankerung in der Membran besitzen. Folgende Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass die Membrandomänen möglicherweise auch regulatorische oder rezeptorähnliche Eigenschaften besitzen (Seebacher et al., 2001):

- Die Membrandomänen erscheinen mit ungefähr 40% Anteil am Gesamtprotein für eine bloße Ankerfunktion überdimensioniert.
- Die neun membranständigen AC-Isoformen aus *Mammalia* zeigen wenig Konservierung der Membrandomänen untereinander. Im Gegensatz dazu besitzen die Membrandomänen der jeweiligen AC-Isoform aus sehr unterschiedlichen Tierarten hingegen eine hohe evolutionäre Konservierung, was für eine spezifische Funktion jeder Isoform spricht.

- Jede *Mammalia*-AC besitzt zwei Membrandomänen. Hierbei ist bemerkenswert, dass sich die beiden Membrandomänen deutlich voneinander unterscheiden und nicht alignen lassen.
- Mutationen in der Membrandomäne oder ein Austausch von unterschiedlichen Membrandomänen im Experiment beeinflussen die Aktivität der AC.

Die Bestätigung für eine Regulation von ACn durch deren Membrandomänen würde ein weites Feld für die Forschung öffnen, da ACn in fast jedem Organismus vorkommen.

Ob es sich bei den AC-Membrandomänen um Rezeptoren handelt, kann erst bestätigt werden, wenn ein oder mehrere Liganden gefunden werden. Um die Suche nach Liganden einzugrenzen, sind weitere Erkenntnisse zu Struktur und Regulation der AC notwendig. Die Struktur eines Proteins wird vorzugsweise durch Kristallisation und anschließende Röntgendiffraktometrie entschlüsselt. Bei Membranproteinen gestaltet sich die Kristallisation besonders schwierig, da die Proteine aus ihrer Membran herausgelöst werden müssen, ohne jedoch ihre räumliche Struktur und dadurch auch ihre Aktivität zu verlieren. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht mit chimären mykobakteriellen ACn, welche einen kleineren Transmembrananteil besitzen, ein Protokoll für die Solubilisation von Membranproteinen zu erstellen. Diese Protokolle sollten später auch auf native ACn angewendet werden. Bezüglich der Regulation wurden Untersuchungen in *Mammalia*-ACn durchgeführt. Hierbei sollte ein bakterieller *quorum sensing* Rezeptor den *Mammalia*-AC Membrananker funktionell ersetzen. Ziel war die Regulation der Chimäre durch den *quorum sensing* Liganden. Dadurch sollten Rückschlüsse auf Liganden der AC ermöglicht werden. Auf Grund von Expressionsproblemen der *Mammalia*-ACn wurde ein mykobakterielles Modellsystem als Ersatz bearbeitet. Diese bakterielle AC wurde durch Mutationen an die *Mammalia*-AC angeglichen mit dem Ziel einer Regulation durch G-Proteine.

1.1 *Mammalia*-ACn und G_{sa}

Die zehn Isoformen der *Mammalia*-ACn werden der Klasse III zugeteilt. Hierbei handelt es sich um neun membranständige ACn (I-IX) mit Eingruppierung in die Unterklasse IIIa. Auf die einzige lösliche AC (X) wird hier nicht näher eingegangen (Linder, 2006). Anhand von ähnlichen Sequenzeigenschaften und Regulationsmechanismen erfolgt eine weitere Unterteilung der Isoformen I-IX in vier verschiedene Gruppen (Gruppe 1: I, III, VIII; 2: II, IV, VII; 3: V, VI; 4: IX) (Seebacher et al., 2001). Die membranständigen ACn besitzen einen pseudoheterodimeren Aufbau. Dieser besteht aus einem Membrananker M1 und einer katalytischen Domäne C1a, gefolgt von einem C1b genannten Linker, einer Membrandomäne M2 und einer katalytischen Domäne C2a (Guo et al., 2005). C2b bezeichnet den restlichen C-Terminus. Beide Membrandomänen bestehen aus jeweils sechs Transmembranhelices (TMs) (Fig. 1A). Die katalytischen Bereiche (C1a, C2a) sind sowohl untereinander als auch zwischen den unterschiedlichen AC-Isoformen stark konserviert (Tang and Gilman, 1995). Da sich Experimente an den

Membranproteinen als schwierig erwiesen, wurde in der Vergangenheit hauptsächlich mit den löslichen katalytischen Domänen gearbeitet, welche gelinkert oder titriert ebenfalls Aktivität und Regulation aufweisen. C1 und C2 stammen hierbei meistens von unterschiedlichen AC-Isoformen, seltener von derselben Isoform (Dessauer and Gilman, 1996; Hoffmann, 1999; Scholich et al., 1997). In der Veröffentlichung von Tesmer *et al.* 1997 (Tesmer et al., 1997) wurde erstmals die Struktur der katalytischen Domänen von ACV C1/ACII C2 analysiert. Der Komplex wurde zusammen mit der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins G_s ($G_{s\alpha}$) und Forskolin (FSK) kristallisiert. Alle *Mammalia*-ACn werden von $G_{s\alpha}$ und FSK (außer AC Typ IX (Linder et al., 2004a)) aktiviert und von Adenosinanaloga (*P-site inhibitors*) inhibiert (Tesmer et al., 1997). Zusätzlich kann die Aktivität mancher AC-Isoformen durch andere G-Proteinuntereinheiten, Ca^{2+} -Calmodulin, Ca^{2+} oder Phosphorylierung beeinflusst werden (Tesmer et al., 1997). Die katalytischen Einheiten C1a und C2a werden auch als *cyclase homology domain* (CHD) bezeichnet. Bei membranständigen ACn besitzt die CHD nur eine katalytisch aktive Tasche, in der ein Molekül ATP umgesetzt wird. Der Grund hierfür ist, dass es sich bei membranständigen *Mammalia*-ACn um Pseudoheterodimere handelt, bei denen die für die Katalyse verantwortlichen ASn sowohl von C1a als auch von C2a beigesteuert werden. Homodimere aus C1a oder C2a sind deshalb inaktiv. Es konnten sechs ASn identifiziert werden, die für die Katalyse verantwortlich sind. Zwei Aspartatreste in C1a positionieren zwei Metallkofaktoren (Mn^{2+} oder Mg^{2+}), welche einen nukleophilen Angriff der Ribose auf die α -Phosphatgruppe des ATP ermöglichen. Die übrigen vier ASn liegen in C2a. Hierbei handelt es sich um Lysin und Aspartat, welche für die Erkennung des Adeninringes verantwortlich sind, während Arginin und Asparagin für die Stabilisierung des Übergangszustandes von ATP zu cAMP benötigt werden (Linder and Schultz, 2003). Neben der katalytisch aktiven Tasche für die Umsetzung von ATP gibt es auch eine inaktive Tasche mit unbekannter physiologischer Rolle. Im Experiment wurde nachgewiesen, dass darin FSK, ein Diterpen aus Pflanzen, binden kann und dadurch die meisten ACn aktiviert (Fig. 1B) (Linder and Schultz, 2008).

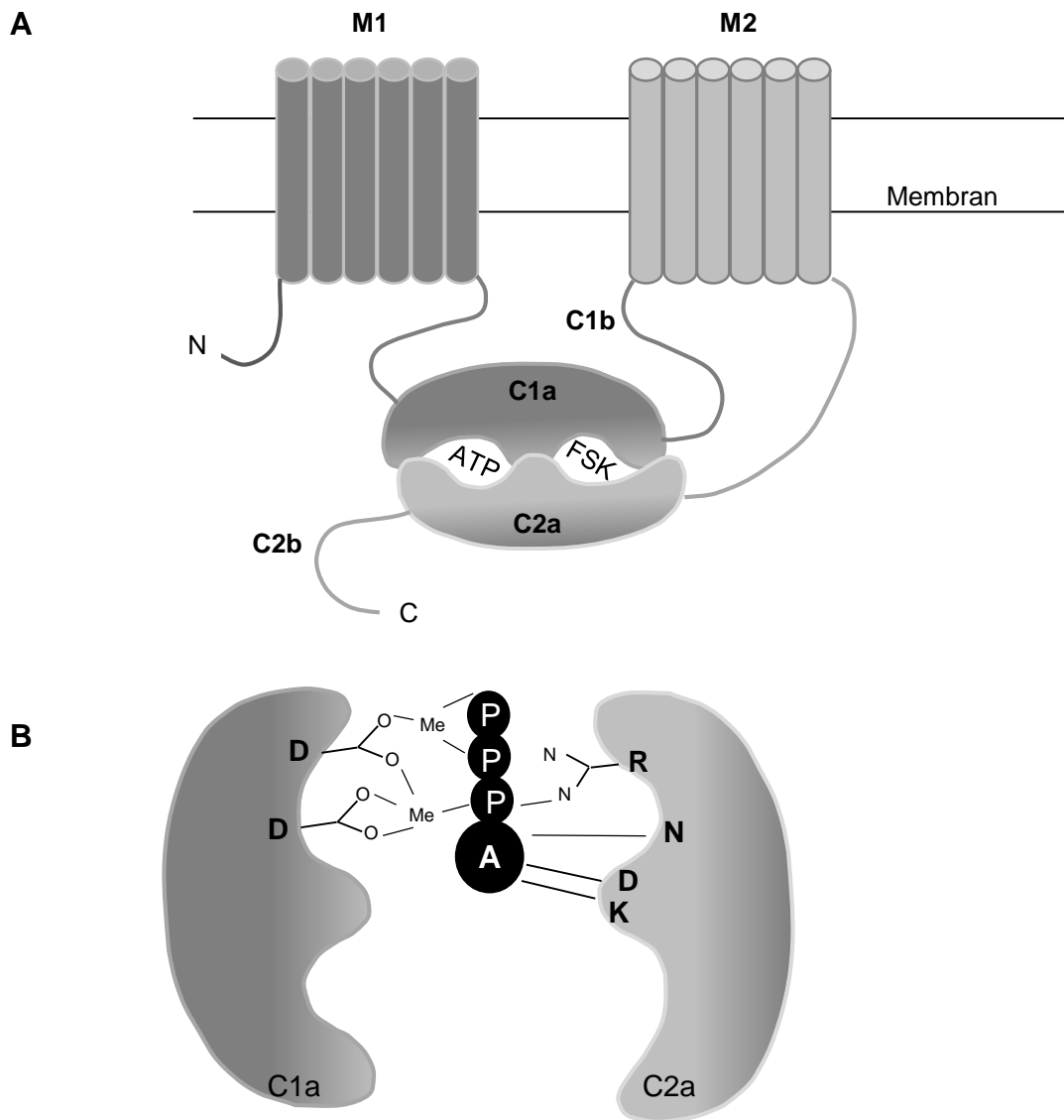


Fig. 1: A) Schematische Darstellung des Pseudoheterodimers einer membranständigen *Mammalia*-AC mit zwei Membrandomänen (M1, M2) und zwei katalytischen Domänen (C1a, C2a) mit je einer Bindestelle für Adenosintriphosphat (ATP) und Forskolin (FSK). Die cytosolischen Bereiche ohne katalytische Funktion heißen C1b bzw. C2b (adaptiert nach (Guo et al., 2001)).

B) Schematische Darstellung der cytosolischen Domänen (C1a, C2a) mit den an der Umsetzung von ATP beteiligten katalytischen Aminosäuren (D = Aspartat, K = Lysin, N = Asparagin, R = Arginin). Die beiden Aspartatreste aus C1a koordinieren zwei Metallionen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}), Lysin und Aspartat aus C2 erkennen den Adeninring, Arginin und Asparagin aus C2 stabilisieren den Übergangszustand von ATP zu cAMP. FSK fehlt in der inaktiven Tasche. A = Adenosin, P = Phosphatgruppe, Me = divalentes Metallkation (adaptiert nach (Linder and Schultz, 2003)).

Wie bereits erwähnt, ist $G_{s\alpha}$ ein Aktivator für *Mammalia*-ACn. $G_{s\alpha}$ bildet zusammen mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit das inaktive heterotrimere G-Protein. Hierbei ist das G-Protein mit der Membran assoziiert und hat GDP in der α -Untereinheit gebunden. Eine Aktivierung des G-Proteins, beispielsweise durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), bewirkt einen Austausch von GDP durch GTP. Im aktivierten

Zustand ist das heterotrimere G-Protein instabil und zerfällt in $G_{s\alpha}$ -GTP und $\beta\gamma$, wobei beide Komplexe an andere Proteine, u.a. auch an ACn, binden können. Durch eine langsame GTPase-Aktivität der α -Untereinheit fällt $G_{s\alpha}$ zurück in die inaktive Form und verbindet sich erneut mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit (Coleman and Sprang, 1996). Im Fall von $G_{s\alpha}$ -GTP sind mögliche Bindungsstellen an den löslichen Komplex aus ACV C1/ACII C2 aus der Kristallstruktur bekannt (Tesmer et al., 1997). Für die Kristallisation wurden nur die katalytischen Domänen der ACn und die unhydrolysierbare Form $G_{s\alpha}$ -GTPyS verwendet. Laut dieser Veröffentlichung zeigte sowohl ACV C1 an M378 und F379 als auch ACII C2 an V904, N905, E910, C911, R913, N916, E917, D921, I986, H989, F991 und N992 direkte Interaktion mit $G_{s\alpha}$ (Fig. 2). Diese Erkenntnisse wurden hier verwendet, um eine mykobakterielle AC Schritt für Schritt in eine *Mammalia*-AC mit $G_{s\alpha}$ -Regulation umzuwandeln. In den Aktivitätstests wurde eine konstitutiv aktive Variante von $G_{s\alpha}$ eingesetzt, was durch die Mutation Q213L ($G_{s\alpha}^*$) bewirkt wurde (Weitmann et al., 2001). Dadurch wurde die Zugabe von GTPyS zu $G_{s\alpha}$ in AC-Tests unnötig. Obwohl IIIa ACn generell über eine vernachlässigbare Guanylatcyclase-Aktivität verfügen (Linder, 2005; Sinha and Sprang, 2006), wurde ohne GTPyS-Zugabe jedwede Konkurrenz um die Bindestelle von ATP durch GTP ausgeschlossen.

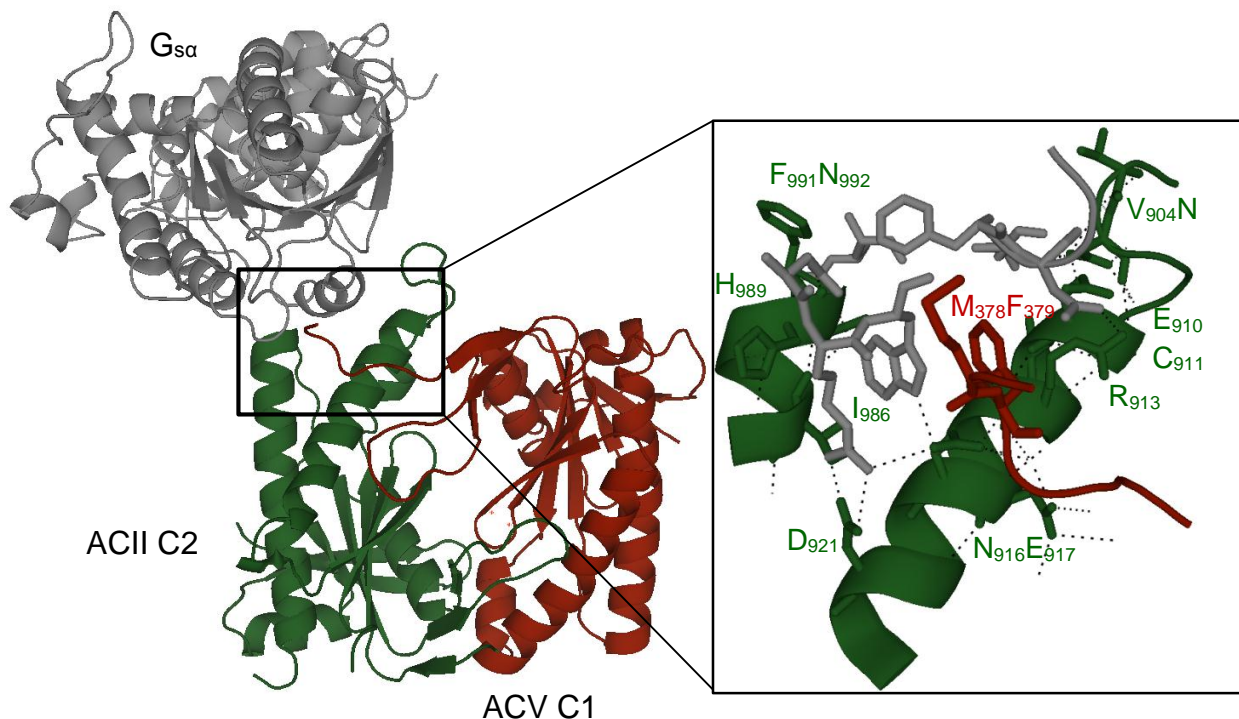


Fig. 2: Kristallstruktur des löslichen Komplexes von ACV C1 (rot), ACII C2 (grün) und $G_{s\alpha}$ -GTPyS (grau) (PDB Code 1CJU (Tesmer et al., 1997), dargestellt mit PyMOL). In dem vergrößerten Ausschnitt sind mögliche Bindungsstellen zwischen $G_{s\alpha}$ und C1 bzw. C2 laut Tesmer *et al.* (Tesmer et al., 1997) als Stäbchenmodelle hervorgehoben, die ASn von C1 und C2 sind beschriftet. Polare Kontakte sind als gestrichelte Linien dargestellt. In dieser Kristallstruktur zeigen nicht alle vorhergesagten Bindungsstellen $G_{s\alpha}$ -Kontakt (V904, E910, C911, N916, I986, F991).

1.2 Mykobakterielle ACn Rv3645 und Rv1625c

Die hier verwendeten bakteriellen ACn Rv3645 und Rv1625c sind zwei der 16 mutmaßlichen ACn aus *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Mykobakterien wie *M. tuberculosis* oder *M. leprae* sind als humanpathogene Keime für eine hohe Sterblichkeit bei betroffenen Patienten verantwortlich. Die Aufklärung des Pathogenitätsmechanismus soll dazu beitragen, geeignete Medikamente zur Heilung zu entwickeln (Shenoy and Visweswariah, 2006b). Als Besonderheit gelingt es diesen Bakterien in Makrophagen zu überleben und sich dort zu vermehren. Mutmaßungen, dass ACn Teil dieses Mechanismus sind, begründen sich auf der Tatsache, dass Makrophagen, infiziert mit *M. tuberculosis*, erhöhte cAMP-Werte haben und daher eine Fusion von Phagosomen und Lysosomen zur Abtötung der Bakterien nicht mehr erfolgen kann (Lowrie et al., 1975).

Bakterielle ACn lassen sich meistens besser in *E. coli* Expressionssystemen herstellen als *Mammalia*-ACn. Deshalb wurde für die meisten Experimente in dieser Arbeit auf Rv3645 und Rv1625c zurückgegriffen, da deren Handhabung bereits im Labor etabliert war. Rv3645 und Rv1625c gehören ebenfalls zu Klasse III ACn, jedoch zu unterschiedlichen Unterklassen. Rv3645 wird der Unterklasse IIIb zugeordnet, während Rv1625c wie die membrangebundenen *Mammalia*-ACn zu IIIa gezählt wird. Neben dem Austausch des substratbestimmenden Aspartats zu Threonin und einer um eine AS längeren Armregion gibt es auch strukturelle Unterschiede zwischen Rv3645 und Rv1625c (Linder et al., 2004b; Linder and Schultz, 2003). Rv3645 besteht aus einer Membrandomäne mit sechs TMs gefolgt von einer HAMP-Domäne und der cytosolischen katalytischen Domäne (Shenoy and Visweswariah, 2006a, b). Die HAMP-Domäne besitzt sowohl regulatorische Funktion als auch die Eigenschaft eines Signalwandlers. Die Abkürzung „HAMP“-Domäne leitet sich von ihrem Vorkommen in Histidinkinasen, ACn, Methyl-akzeptierenden Chemotaxisproteinen und Phosphatasen ab (Aravind and Ponting, 1999). Hierbei handelt es sich um eine ungefähr 55 ASn lange Sequenz bestehend aus zwei amphipathischen α -Helices verbunden durch einen Konnektor (Hulko et al., 2006; Mondejar et al., 2012). Das Vorkommen der HAMP-Domäne könnte als Hinweis dafür gewertet werden, dass die Membrandomäne der AC Rv3645 möglicherweise als Rezeptor für externe Stimuli dient, welcher Signale durch die HAMP-Domäne an die katalytische Domäne weiterleitet (Linder et al., 2004b). Rv1625c besitzt den gleichen Aufbau wie Rv3645 mit Ausnahme der HAMP-Domäne und entspricht somit genau der Hälfte einer membrangebundenen *Mammalia*-AC (Fig. 1A) (Guo et al., 2001). In bakteriellen ACn sind alle sechs katalytischen ASn im Monomer enthalten (Metallbindung: zwei Aspartatreste, Substraterkennung: Lysin, Aspartat (Rv1625c)/Threonin (Rv3645), Stabilisierung des Übergangszustands: Asparagin, Arginin). Das bedeutet, dass zwei aktive Taschen für die Umsetzung von ATP zur Verfügung stehen, wenn sich funktionelle Homodimere bilden (Fig. 3B) (Linder and Schultz, 2003). Umgekehrt konnte Rv1625c durch Mutation erfolgreich in eine C1 und C2 Variante umgewandelt werden. Rv1625c-C1 und Rv1625c-C2 bilden Heterodimere mit nur einer aktiven Tasche, genau wie *Mammalia*-ACn. Die Homodimere sind in diesem Fall inaktiv (Guo et al., 2001; Linder et al., 2004a). Im

Gegensatz zu den membranständigen *Mammalia*-ACn werden bakterielle ACn nicht durch G_{sa} oder FSK stimuliert. Ursache ist zum einen das Fehlen von G-Proteinen in Prokaryoten. Zum anderen entsprechen die FSK-bindenden ASn der *Mammalia*-ACn den katalytischen ASn der zweiten aktiven Tasche der bakteriellen ACn (Guo et al., 2001). Mutationen in Rv1625c zum Austausch der katalytischen ASn durch die jeweiligen FSK-bindenden ASn bildeten zwar Heterodimere, welche jedoch nicht durch FSK stimuliert wurden (Linder et al., 2004a).

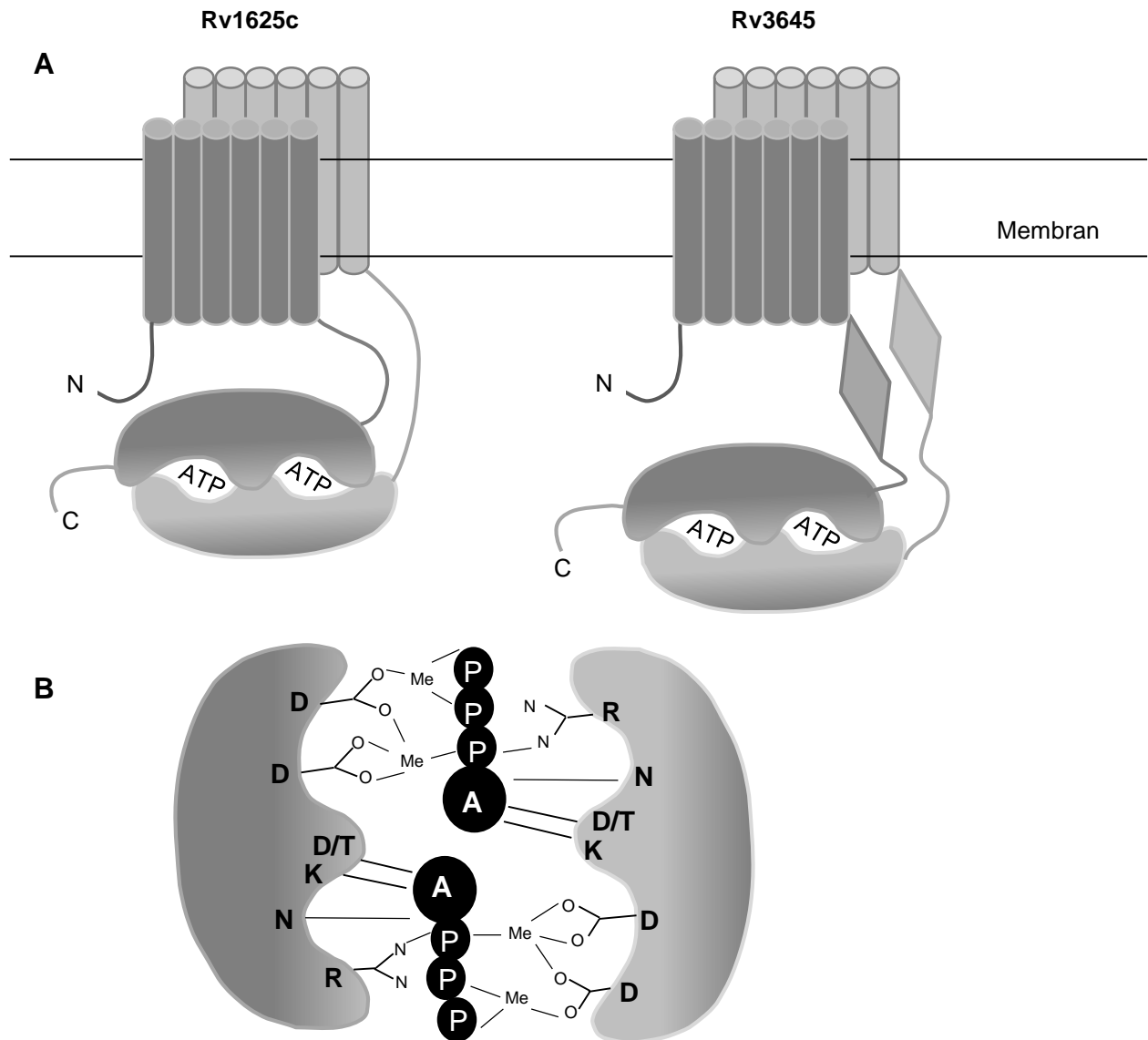


Fig. 3: A) Schematische Darstellung der mykobakteriellen Homodimeren von Rv3645 und Rv1625c bestehend aus einem Membranteil und cytosolischer Domäne zur Bildung von zwei katalytischen Zentren. Bei Rv3645 findet sich nach der Membrandomäne eine HAMP-Domäne (Raute) (adaptiert nach (Shenoy and Visweswariah, 2006b)).

B) Schematische Darstellung der katalytischen Domänen mit den an der Umsetzung von ATP beteiligten Aminosäuren. A = Adenosin, P = Phosphatgruppe, Me = divalentes Metallkation (adaptiert nach (Linder and Schultz, 2003)).

1.3 *E. coli* Serinrezeptor Tsr

Während es für die Membrananker von ACn keine Nachweise auf eine Rezeptorfunktion gibt, begannen die ersten Untersuchungen an den Chemotaxisrezeptoren von *E. coli* bereits in den späten 60er Jahren des letzten Jahrhunderts (Adler, 1966, 1969). Für *E. coli* konnten die fünf Chemotaxisrezeptoren Tsr, Tar, Trg, Tap und Aer charakterisiert werden (Li and Hazelbauer, 2004). Tsr erkennt sowohl den Lockstoff Serin als auch das Repellent Leucin, Tar die Lockstoffe Aspartat und Maltose sowie die Repellents Co^{2+} und Ni^{2+} , Trg ist für die Lockstoffe Ribose und Galaktose zuständig und Tap für diverse Dipeptide (Bourret et al., 1991). Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Methyl-akzeptierende Chemotaxisproteine (MCPs), die periplasmatische Liganden binden, wohingegen Aer einen Sauerstoff-, Energie- und Redoxsensor darstellt (Amin et al., 2006). MCPs erlauben es freibeweglichen Bakterien innerhalb eines chemischen Gradienten gezielt zu Lockstoffen und weg von Schreckstoffen zu schwimmen. Dieser als Chemotaxis bezeichnete Vorgang besteht aus einem Zwei-Komponenten-System, bei dem das Signal des Rezeptors auf ein Histidin-/Aspartat-Kinasesystem übertragen wird und gegebenenfalls durch sensorische Adaptation reguliert wird (Fig. 4). Bei MCPs handelt es sich um Homodimere, die aus einem Membranteil und einer cytosolischen Domäne bestehen. An diese cytosolische Domäne bindet das Protein CheW die homodimere Histidinkinase CheA und bildet so einen ternären Komplex (Falke et al., 1997). Die Bildung des Komplexes initiiert die Autophosphorylierung eines Histidinrestes von CheA durch ATP. Das Phosphat wird weiter auf einen Aspartatrest eines *response regulators*, CheY oder CheB, übertragen. Phosphoryliertes CheY bindet an den Geißelmotor und schaltet die Rotation der Geißel im Uhrzeigersinn, was die Zelle zum Taumeln bringt und so zu einer zufälligen Richtungsänderung führt. Die Phosphatase CheZ stimuliert eine schnelle Hydrolyse des phosphorylierten CheY, welches dann nicht mehr an den Geißelmotor bindet und eine Rotation gegen den Uhrzeigersinn zur Folge hat. In dieser Situation schwimmt die Bakterienzelle geradlinig. Befindet sich die Zelle in keinem chemischen Gradienten, löst die Kurzlebigkeit von phosphoryliertem CheY einen Wechsel zwischen Taumeln und Vorwärtsschwimmen aus. Führt diese zufällige Suche die Zelle zu einem entsprechenden Gradienten, hemmt die Bindung eines Lockstoffs die Autophosphorylierung von CheA, was weniger phosphoryliertes CheY zur Folge hat. Dadurch verlängert sich die Dauer des Schwimmtintervalls hin zur höheren Lockstoffkonzentration. Selbst bei hoher oder über lange Zeit gleichbleibender Lockstoffkonzentration kann die Zelle eine neue Konzentration mittels der zwei Proteine CheR und CheB feststellen. Dieser als Adaptation bezeichnete Mechanismus wird durch eine Rückkopplungsschleife kontrolliert. Die Methyltransferase CheR bindet Methylestergruppen an Glutamatreste im cytosolischen Teil des MCPs, wodurch die Kinaseaktivität erhöht wird. Die Methylestergruppen werden durch die Methylesterase CheB hydrolysiert. Hohe Lockstoffbindung führt neben der Hemmung von CheA auch zu weniger Phospho-CheB und so zu verstärkter Methylesterbindung durch CheR. Dadurch werden CheA und CheB wieder aktiviert und die Methylester hydrolysiert. Je nach Aktivitätszustand

der Kinase wird das Verhältnis von gerichteter Schwimmbewegung und Taumeln verändert. Durch den Vergleich von gebundenem Lockstoff am Rezeptor und dem Methylierungslevel erkennt die Zelle, ob sie sich in Richtung höherer oder niedrigerer Lockstoffkonzentration bewegt (Falke et al., 1997; Falke and Hazelbauer, 2001).

Tsr besitzt einen ähnlichen Aufbau wie die AC Rv3645. Es handelt sich um ein homodimeres Protein mit einer Membrandomäne aus zwei TMs mit einer periplasmatischen Rezeptordomäne, gefolgt von einer cytosolischen HAMP- und einer kinasekontrollierenden Domäne (Hazelbauer et al., 2008). Tsr unterscheidet sich von Rv3645 in der Anzahl seiner TMs (2-TMs im Vergleich zu 6-TMs). Trotz dieses Unterschieds war eine funktionale Kopplung beider Proteine möglich. Die entstandenen Proteine Tsr-HAMP_{Tsr}/HAMP₃₆₄₅-Rv3645 (Tsr Rezeptor + HAMP-Domäne von Tsr/Rv3645 + katalytische Domäne von Rv3645) zeigten sowohl AC-Aktivität als auch eine spezifische Regulation durch den Liganden Serin (Kanchan et al., 2010; Mondejar et al., 2012). Da Rv3645 in den chimären Konstrukten eine Regulation durch einen Rezeptor erfährt, kann dies als Hinweis auf eine mögliche Rezeptorfunktion der AC-Holoenzyme gewertet werden.

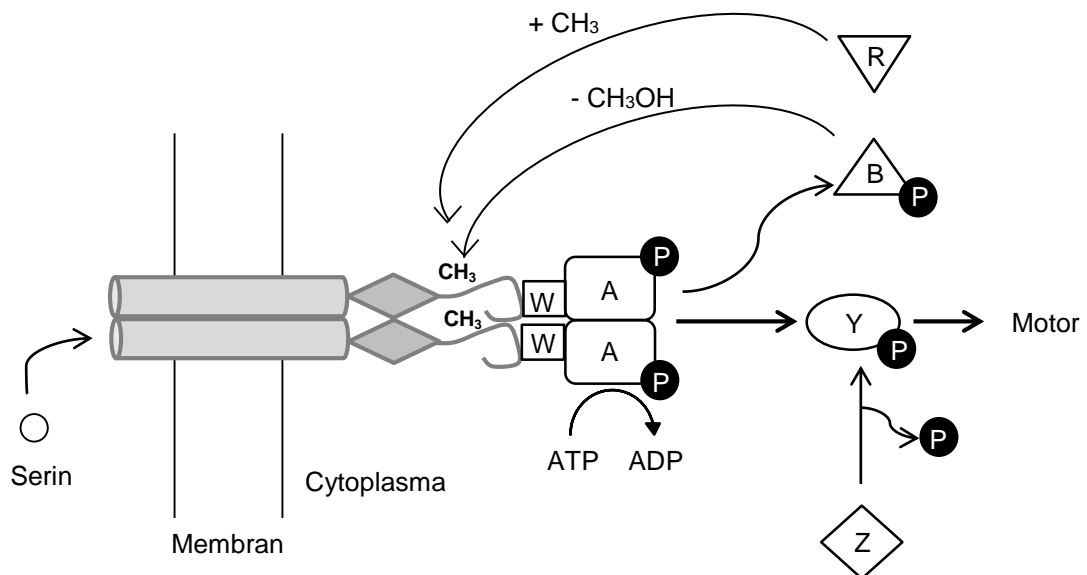


Fig. 4: Schematische Darstellung der an der Chemotaxis beteiligten Proteine in Prokaryoten am Beispiel des Serinrezeptors Tsr. Eine ausführliche Beschreibung der dargestellten Vorgänge sind dem Text zu entnehmen. Graue Symbole = Tsr Homodimer (Transmembrandomäne-HAMP-cytosolische Domäne mit Methylierungsstellen). W = Kopplungsprotein CheW, A = Histidinkinase CheA, Y = *response regulator* Aspartatkinase CheY, Z = Phosphatase CheZ, B = *response regulator* Methylesterase CheB, R = Methyltransferase CheR, P = anorganisches Phosphat (adaptiert nach (Falke and Hazelbauer, 2001)).

1.4 Quorum sensing Rezeptor CqsS

Quorum sensing (QS) bezeichnet einen Vorgang der Zell-Zell-Kommunikation zwischen Prokaryoten. Hierbei werden sog. Autoinduktoren von der Zelle synthetisiert und freigesetzt. Diese extrazellulären Signalmoleküle werden von anderen Bakterien detektiert und in eine spezifische zelluläre Antwort umgewandelt. Bei der Vermehrung einer Bakterienpopulation reichern sich die von ihnen abgegebenen Autoinduktoren im Medium an und veranlassen die Bakterien ab dem Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes kollektiv ihre Genexpression umzustellen (Rutherford and Bassler, 2012). Danach werden Gene für Prozesse exprimiert, welche nur bei einer großen Anzahl an Bakterien sinnvoll sind, wie z.B. Biofilmbildung, Biolumineszenz, Sporulation, Antibiotikasythese oder Bildung von Virulenzfaktoren (Perez et al., 2012). In dem marinen Bakterium *Vibrio harveyi* wurden drei parallele QS-Systeme identifiziert, die unter anderem für Biolumineszenz und Biofilmbildung zuständig sind (Henke and Bassler, 2004). Eines dieser drei Systeme wurde zuerst in dem humanen Pathogen *V. cholerae* entdeckt und wurde deswegen entsprechend nach ihm benannt. Hierbei bildet die Synthase CqsA (*cholerae quorum sensing autoinducer*) den Autoinduktor CAI-1 (*cholerae autoinducer 1*), welcher von CqsS (*cholerae quorum sensing Sensor*) detektiert wird (Miller et al., 2002). Bei CAI-1 handelt es sich um S-3-Hydroxytridecan-4-on (Ng et al., 2010). In *V. harveyi* reagiert CqsS je nach Ligandenkonzentration von CAI-1 als Histidinkinase oder als Phosphatase. CqsS arbeitet als Histidinkinase, wenn in einer kleinen Bakterienpopulation die Konzentration an gebildetem CAI-1 sehr niedrig ist. Hierbei wird durch Autophosphorylierung Phosphat auf LuxU übertragen, welches das Phosphat weiter an den *response regulator* LuxO gibt (Shikuma et al., 2009). Phosphoryliertes LuxO aktiviert die Expression bestimmter Gene für kleine regulatorische RNAs, die die Expression von *luxR* reprimieren. Ohne LuxR wird *luxCDABE* (Luziferase) nicht transkribiert, weshalb bei einer zu geringen Bakteriendichte keine Biolumineszenz auftritt (Henke and Bassler, 2004). Wächst die Bakterienpopulation, erhöht sich mit ihr die Konzentration an gebildetem CAI-1. Wenn CAI-1 an CqsS bindet, fungiert CqsS als Phosphatase und der Phosphatfluss kehrt sich um. Dadurch werden sowohl LuxU als auch LuxO dephosphoryliert (Wei et al., 2012). Da dephosphoryliertes LuxO inaktiv ist, wird die Bildung der kleinen regulatorischen RNAs gestoppt und erlaubt nun die Expression von LuxR. Damit können die nötigen Gene für die Biolumineszenz abgelesen werden (Fig. 5) (Henke and Bassler, 2004).

Aus diesem System ist CqsS für chimäre Konstrukte mit ACn interessant. Bei CqsS handelt es sich um eine Sensorhistidinkinase, bestehend aus einer membrangebundenen Rezeptordomäne, einer dimerisierenden Histidin-Phosphotransfer-Domäne und einer katalytischen ATP-bindenden Domäne (Wei et al., 2012). CqsS ist als Dimer funktionell. Aktive Fusionskonstrukte aus CqsS und anderen Proteinen werden nur anhand der 6-TM-Variante plausibel erklärt (Ng et al., 2010). Ähnlich zu den zuvor erwähnten chimären Tsr-AC-Konstrukten war es möglich, durch Fusion des CqsS-Rezeptorteils mit der katalytischen Domäne von Rv1625c aktive und durch CAI-1 spezifisch regulierte Konstrukte zu erhalten (S.

Beltz, unveröffentlicht). Deshalb stellte sich die Frage, ob die funktionale Kopplung von CqsS auch mit *Mammalia*-ACn erfolgreich wäre. Damit könnte durch Ersetzen des 6-Transmembranankers mit einem 6-Transmembranrezeptor auch die Regulierbarkeit von *Mammalia*-ACn untersucht werden.

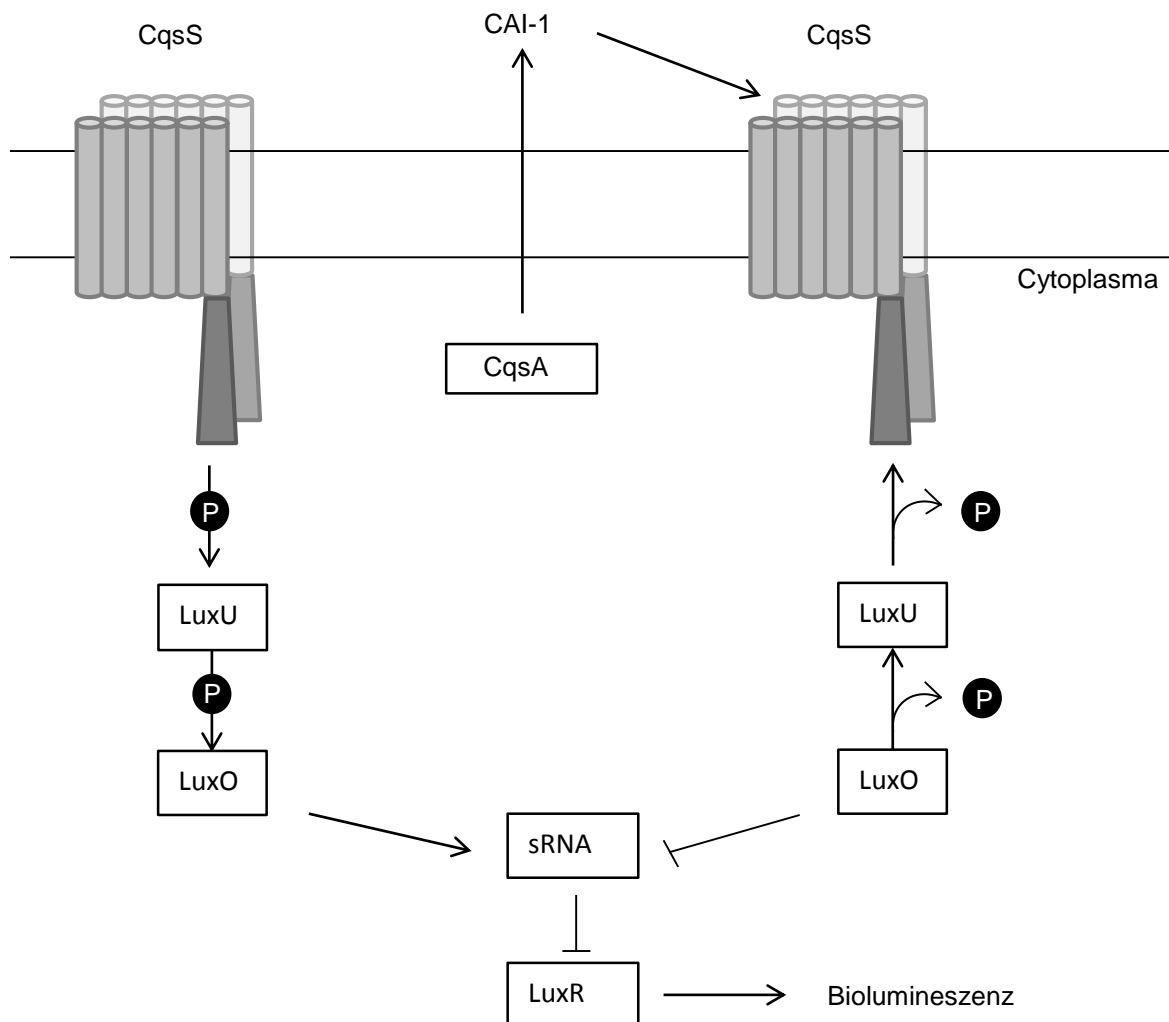


Fig. 5: Schematische Darstellung des CqsS/CAI-1-Quorum sensing Systems aus *Vibrio harveyi*. Die linke Seite entspricht einem Zustand mit sehr niedriger CAI-1-Konzentration, wobei CqsS als Histidinkinase reagiert. Die rechte Seite zeigt die Situation bei hoher CAI-1-Konzentration, wobei CqsS als Phosphatase reagiert. Die genaue Erläuterung der dargestellten Vorgänge sind dem Text zu entnehmen. sRNA = kleine regulatorische RNA, P = anorganisches Phosphat (adaptiert nach (Henke and Bassler, 2004; Wei et al., 2012))

2 Material und Methoden

Die meisten Methoden sind Routine im Labor, weshalb die nachfolgenden Beschreibungen in Anlehnung an die Dissertation von L. Mondéjar erfolgen. Soweit nicht anders angegeben, wurde für die verwendeten Puffer und Lösungen MilliQ-Wasser eingesetzt. Je nach Anwendung (RT oder 4°C) der Lösungen musste angesichts der Temperaturempfindlichkeit von Tris-basierten Puffern der pH-Wert bei der jeweiligen Temperatur eingestellt werden.

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

AppliChem, Darmstadt: Acrylamid 4K-solution 30% (37,5:1)

Biomers.net GmbH, Ulm: Oligonukleotide (Primer für PCR und Sequenzierung)

BIO-RAD, München: Profinity™ IMAC N^{2+} -charged Resin, BIO-RAD Proteinassay-Farbstoffkonzentrat

B. Braun Melsungen AG, Melsungen: Sterican® Kanülen Gr. 2, Gr.18

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe: Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 0,35 mm

GE Healthcare, Freiburg: Amersham ECL Plus *Western Blotting Detection System*, Amersham Hyperfilm ECL, ECL Plex Ziege-anti-Maus IgG-Cy3 Sekundärantikörper

Hartmann Analytik, Braunschweig: (α - ^{32}P)-ATP

Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove (USA): Sekundärantikörper Ziege anti-Maus IgG konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase

Macherey-Nagel, Düren: Porablot PDVF Membran (2 μ m Porengröße)

Merck Millipore, Darmstadt: Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten, Aluminiumoxid 90 aktiv neutral 0.063-0.200 mm (70-230 mesh ASTM)

New England Biolabs (NEB), Ipswich (USA): Restriktionsenzyme, T7 RNA Polymerase, T4 DNA Ligase, Taq DNA Polymerase

Novagen R&D systems, Wiesbaden: T7 RNA Polymerase monoklonaler Antikörper (IgG₁), S-Tag monoklonaler Antikörper

PEQ LAB, Erlangen: KAPA HiFi PCR Kit, peqGOLD Protein-Marker IV, Protein-Marker I, dNTPs

Perkin Elmer, Massachusetts (USA): LSC-Szintillator Cocktail Ultima Gold XR, [2,8- 3H]-cAMP (Ammoniumsalz)

Promega, Madison (USA): Wizard Plus SV Minipreps DNA *Purification System*

QIAGEN, Hilden: Ni-NTA Agarose, pREP4 Vektor, monoklonale Antikörper Maus-anti-RGS-His₄ bzw. Tetra-His™ (IgG1, BSA-frei)

Roche (Boehringer), Mannheim: Alkaline Phosphatase, dNTPs, λ -DNA, Restriktionsenzyme, Klenow-Polymerase, *Rapid DNA ligation Kit*, ATP, *Complete EDTA-free Protease Inhibitor* Tabletten, T7 RNA Polymerase

Serva, Heidelberg: Visking *dialysis tubing* 8/32 Durchmesser 16 mm

Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA): Dowex® 50WX4-400 *ion-exchange resin*

Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting: *HiYield PCR Clean-Up* und *Gel Extraction Kit*

Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts (USA): *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette* (10.000 MWCO)

2.2 Ausstattung

AGFA-Gevaert Group, Mortsel (Belgien): CP1000 Entwicklungskammer für Röntgenfilme

Applied biosystems, California (USA): *Sequence Scanner* v1.0

Beckman Coulter GmbH, Krefeld: Beckman L-60 Ultrazentrifuge mit Rotor *Type* 50.2 Ti

BINDER GmbH: Brutschränke

Biometra, Göttingen: T3000 Thermocycler, UVstar312 nm

BIO-RAD, München: *Blotting Apparat Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell*

DNASTAR, Wisconcin (USA): Lasergene® Software

Eberhard-Karls-Universität, Tübingen: Gelelektrophorese-Kammern, Kämmen und Gelschlitten für Agarosegele, zellfrei Reaktionsgefäße

Eppendorf, Hamburg: BioPhotometer, Tischzentrifugen Minispin und 5418, Thermomixer compact, Concentrator 5301

GE Healthcare, Freiburg: *Hoefler Mighty small SE245 gel casting apparatus*, *Mighty small II E250* Kammer, ÄKTA-FPLC™ mit Fraktionssammler frac-950, Superdex-200 10/30, Q-Sepharose HP 16/10, Mono Q, Szintillationszähler LKB Wallac 1209 Rackbeta ‚Primo‘, Ettan DIGE Imager

IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen: Ultra-Turrax T-8

Kontron-Hermle, Gosheim: Rotor A6.14 (SS34) und A8.24 (GSA)

SLM, instruments, Urbana (USA): *French Pressure Cell Press* FA-078-E1 mit Zubehör

Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold: Heraeus Megafuge 1.0 R Zentrifuge, Sorvall RC 5B Plus

2.3 E. coli Stämme

E. coli XL1-Blue für Klonierung, Stratagene

E. coli BL21(DE3) für Expression, Novagen

E. coli BLR(DE3) für Expression von Plasmiden mit repetitiven Sequenzen, Novagen

E. coli Rosetta (DE3) pLysS für Expression mit seltenen Codons, Novagen

E. coli DH5 α für Klonierung, Invitrogen

E. coli C43(DE3) für Expression von toxischen Proteinen, K. Hantke

Die Genotypen, Antibiotikaresistenzen und weitere Merkmale der verwendeten Stämme können auf den entsprechenden Seiten der genannten Unternehmen nachgelesen werden.

2.4 Plasmide

pBluescript II SK(-), Stratagene

pQE30, pQE80-L, pQE81-L, QIAGEN

pET28a(+), pETDuet-1, Novagen

pIVEX2.3w, pAR1219, E. Beitz (Kiel)

pETDuet-3, pACYCDuet-2, A. Schultz

Nähere Angaben zu den verwendeten Plasmiden finden sich auf den Seiten der Hersteller. pIVEX2.3w wurde im Labor von E. Beitz modifiziert. pETDuet-3 und pACYCDuet-2 wurden von A. Schultz bezüglich der *multiple cloning site* (MCS) verändert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

Die Lösungen für molekularbiologische Methoden mussten steril sein. Dies wurde durch Sterilfiltrieren (Porenweite 0,2 μm) oder durch Autoklavieren erreicht (120°C, 1 bar, 20 min).

Dauerkulturen

Zur dauerhaften Lagerung eines *E. coli*-Klons wurden 800 μl einer über Nacht (ÜN) Kultur mit 200 μl sterilem Glycerin (87%) versehen und bei -80°C aufbewahrt. Glycerin verhindert das vollständige Gefrieren der Suspension.

Kompetente *E. coli*-Zellen

100 ml LB-Medium wurden mit 5 ml ÜN-Kultur (ggf. mit Antibiotikum) der gewünschten Zellen angeimpft und für ca. 1,5 h bei 37°C unter Schütteln bis zu einer

OD₆₀₀ von 0,3-0,4 herangezogen. Anschließend wurden die Zellen mindestens 10 min auf Eis gekühlt und in sterilen Falcons zentrifugiert (2000 x g, 4°C, 10 min). Die Zellen wurden kompetent durch Suspendieren in 50 ml kaltem, sterilen 0,1 M CaCl₂, Lagerung für ca. 20 min auf Eis, Wiederholung der Zentrifugation und Suspendieren in 10 ml kaltem, sterilen 0,1 M CaCl₂/20% Glycerin. Die Zellen wurden für weitere 2–4 h unter gelegentlichem Schwenken auf Eis inkubiert und nach dem Aliquotieren (je 100 µl) bei -80°C gelagert. Kompetente Zellen dürfen vor Gebrauch nicht aufgetaut werden.

LB-Medium: 20 g/l LB Nährmedium

Transformation von DNA

Der gesamte Ligationsansatz wurde mit 10 µl CM-Puffer und 69 µl sterilem H₂O versetzt und zu 100 µl kompetenten Zellen gegeben. Wahlweise funktionierte auch die bloße Zugabe von 100-200 ng Plasmid-DNA. Die Aufnahme des Plasmids von den Zellen geschah durch Inkubation für 20 min auf Eis, Hitzeschock bei 42°C für genau 1 min und Inkubation für 10 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum wurde für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 70-200 µl des Ansatzes wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum gleichmäßig verteilt und für 15-17 h bei 37°C inkubiert.

CM-Puffer (10 x, steril):	100 mM CaCl ₂ , 100 mM MgCl ₂
LB-Platten:	35 g/l LB-Agar
LB-Platten mit Antibiotikum:	100 µg Ampicillin/ml LB-Agar, 50 µg Kanamycin/ml LB-Agar

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR diente der Amplifizierung von DNA-Fragmenten oder ganzen Plasmiden. Mittels Fusions-PCR konnten zwei DNA-Fragmente miteinander verbunden werden. Die Methode wurde in Anlehnung an die Vorgaben von Mullis durchgeführt (Mullis et al., 1986; Mullis and Faloona, 1987). Der 50 µl-Ansatz bestand aus ca. 50 ng Plasmid-DNA, PCR-Puffer mit MgCl₂, dNTPs (jeweils 250 µM), dem jeweiligen *sense*- bzw. *antisense*-Primer (jeweils 500 nM), 5-10% DMSO (falls erforderlich) und DNA-Polymerase (2 U KAPAHiFi). Durch unterschiedliche Temperaturzyklen im PCR-Gerät wurden die DNA-Doppelstränge voneinander getrennt, was eine Anlagerung (*annealing*) der DNA-Primer im nächsten Temperaturschritt erlaubte. In der Elongationsphase wurden beide Einzelstränge vom Primer beginnend mit dNTPs aufgefüllt und der Zyklus begann von neuem (Tab. 1). Die Elongationszeit musste auf die erwartete Produktlänge angepasst sein (30 s/1 kbp). Die Anlagerungstemperatur T_M wurde für jeden Primer mit folgender Formel berechnet, wobei nur die ersten 18 bindenden Basen berücksichtigt wurden:

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

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

Besaßen zwei Primer unterschiedliche T_M , wurde von der Durchschnittstemperatur eine um 5°C niedrigere T_M gewählt. Wenn nötig, konnte das Programm optimiert werden. Als Negativkontrolle wurde Wasser anstatt DNA-Template eingesetzt.

Tab. 1: PCR-Programm mit KAPAHiFi-Polymerase:

PCR-Programm mit KAPAHiFi-Polymerase			
Phase	T [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung	95	120	
Denaturierung	98	20	24
Primeranlagerung	T_M	15	
Elongation	68	30	
Auffüllen	68	300	
Kühlen	4	∞	

Für eine Fusions-PCR wurden abweichend davon zunächst fünf Zyklen mit einer um 5°C niedrigeren T_M als der errechneten Anlagerungstemperatur gewählt und anschließend 25 Zyklen bei der errechneten T_M durchgeführt.

In einigen Fällen wurde zur Erzeugung von Punktmutationen, zur Deletion, Insertion oder zum Austausch von ASn das QuikChange Protokoll (*site directed mutagenesis*) von Stratagene eingesetzt. Hierzu wurden je PCR zwei Primer mit der gewünschten Mutation verwendet, die an der gleichen Sequenz an den gegenüberliegenden Strängen des DNA-Templates binden. Die Primer wurden mit einer Länge von 25-45 Basenpaaren konstruiert. Das PCR-Programm wurde laut Tab. 1 mit 15 Zyklen durchgeführt. Bei geringer Ausbeute wurde die Temperatur für die Primeranlagerung und für die Elongation variiert. Nach der PCR wurde pro 50 µl Ansatz je 1 µl DpnI zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Dadurch wurde der methylierte, unmutierte DNA-Elternstrang verdaut. Nach DpnI-Verdau wurden 5 µl des PCR-Ansatzes zu 50 µl kompetenten *E. coli* XL1 zugegeben und eine Transformation durchgeführt. Aus den so erhaltenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert, sequenziert und auf die gewünschte Mutation überprüft.

dNTP-Mix: 25 mM pro dNTP

Miniprep (Plasmidisolierung aus *E. coli*)

3 ml einer ÜN-Kultur einer *E. coli*-Einzelkolonie oder einer Dauerkultur wurden abzentrifugiert und die DNA mit Hilfe des Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System laut Angaben von Promega isoliert. Die Elution der DNA erfolgte mit 50-100

µl sterilem H₂O. Bei weiterer Bearbeitung der Plasmide erfolgte die Lagerung auf Eis, ansonsten bei -20°C.

Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme schneiden definierte DNA-Sequenzen im Doppelstrang zu glatten oder überstehenden Enden, welche der Neuverknüpfung kompatibler DNA-Fragmente dienen. Die Verwendung der Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Angaben der Hersteller (NEB, Roche). Für Kontrollverdau genügte 100-300 ng Miniprep-DNA in einem Volumen von 10 µl mit 2 U der jeweiligen Schnittenzyme bei einer Inkubationszeit von 30-45 min bei 37°C. 3-5 µg BSA wurden zur Enzymstabilisierung bei BSA-freien Puffern zugesetzt. Für präparative Ansätze wurde ca. 1 µg DNA in einem Volumen von 20 µl mit 8-10 U Restriktionsenzym eingesetzt und für 1,5-3 h bei 37°C verdaut.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten (1% Agarose für ≥ 800 bp, 2% für 500-1000 bp, 4% für ≤ 500 bp). Die Agarose wurde in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und in einem Gelschlitten mit Kämmen abgekühlt. Das Gel wurde in eine Kammer mit TAE-Puffer gelegt, an die nach dem Beladen des Gels eine elektrische Spannung (80-105 V, 150 mA, 15 W) angelegt wurde. Die DNA-Proben wurden vor dem Beladen mit BX-Puffer versetzt. Zur Größenbestimmung wurde ein Marker bestehend aus einem definierten Bandenmuster aufgetragen (EcoRI-HindIII-verdaute λ-DNA). Nach ca. 20-40 min Elektrophorese wurde das Gel für ca. 5 min in ein Ethidiumbromidbad (10 mg/l) gelegt und für weitere 10 min elektrophoretisch aufgetrennt.

TAE-Puffer (unsteril): 40 mM Tris-Acetat (pH 8,0), 1 mM EDTA
BX-Puffer: 1 x TAE, 5% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau,
0,05% Xylencyanol

DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen

Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden präzise ausgeschnitten. Die DNA konnte mit Hilfe des *HiYield® Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* laut Angaben des Herstellers (Süd-Laborbedarf) aus dem Gelstück extrahiert werden. Die DNA wurde mit 34-50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und bei weiterer Bearbeitung auf Eis, ansonsten bei -20°C gelagert.

DNA-Entsalzung

Zur Reinigung bzw. Entsalzung von PCR-Produkten konnte ebenfalls der *HiYield® Gel/PCR DNA Fragments Extraction* Kit verwendet werden. Die Gelelektrophorese entfiel hierbei. Die DNA wurde mit 34-50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und bei weiterer Bearbeitung auf Eis, ansonsten bei -20°C gelagert.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Gereinigte DNA wurde mit einem Eppendorf Photometer unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bei $\lambda = 260$ nm gemessen. Mit dem Quotienten aus 260 nm/280 nm konnte die Reinheit der DNA festgestellt werden. Je näher der Wert an 2 reichte, desto weniger war die DNA mit Protein verunreinigt.

Dephosphorylierung von Vektoren

Um eine Religation von geschnittenen Vektoren zu vermeiden, wurden sie vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert. Das Enzym (0,5-1 U/10 µl Ansatz) wurde dem Restriktionsverdau für die letzten 1,5 h Inkubationszeit bei 37°C zugegeben.

Ligation von DNA

Nach der Dephosphorylierung wurden Vektor und Insert mit Hilfe des *Rapid DNA Ligation Kits* laut Angaben von Roche bei RT für 15-25 min ligiert. Für eine effiziente Ligation wurde ein molares Verhältnis von 1:3 (Vektor:Fragment) eingesetzt, wobei die Vektormenge üblicherweise 60 ng betrug.

Sequenzierung von DNA

Sequenzierung diente der Überprüfung der Richtigkeit von neu klonierten Plasmiden. Hierfür wurden ca. 500 ng Miniprep-DNA mit 5 µl Sequenzierprimer (5 µM) versehen und von GATC Biotech AG sequenziert. Mit Hilfe der Programme *Sequence Scanner* v 1.0 und *SeqMan* (Lasergene) wurden diese Sequenzen analysiert und mit der Zielsequenz verglichen.

2.6 Proteinchemische Methoden

Expression

Nach Transformation der gewünschten Plasmide in Expressionsstämme (z.B. *E. coli* BL21/BLR(DE3) oder C43(DE3)) wurden die jeweiligen Proteine produziert. Mit 5 ml ÜN-Kultur wurden 100-200 ml LB-Medium mit Antibiotikum (je nach verwendetem Vektor 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 34 µg/ml Chloramphenicol) angeimpft und bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,3 inkubiert. Innerhalb der nächsten 30 min wurden die Kulturen auf eine niedrigere Temperatur gekühlt. Je nach Vektor wurde ab einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 mit einer bestimmten Menge (s.u. Expressionsbedingungen) Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert, d.h. die Repression der Basalexpression durch den *lac*-Repressor wurde aufgehoben und die Expression des gewünschten Proteins begann. Die Proteinexpression wurde durch Anpassung der Temperatur, der IPTG-Konzentration und der Zeitdauer nach Induktion optimiert.

Antibiotikakonzentrationen: 100 mg Ampicillin/ml H₂O, 50 mg Kanamycin/ml H₂O, 34 mg Chloramphenicol/ml Ethanol

Expressionsbedingungen:

- Tsr-Transmembranmutanten, Konstrukte mit T4 Lysozym: in *E. coli* BL21(DE3) pREP4 pQE30 (nur [G19K/V203E]-Mutante in pQE80-L ohne pREP4) bei 22°C für 5 h, 100 µM IPTG
- Konstrukte mit YaiN und YbeL: in *E. coli* C43(DE3) pET28a(+) bei 18°C für ca. 16 h ÜN, 1 mM IPTG
- Konstrukte mit CqsS und ACV C1 bzw. ACII C2: in *E. coli* C43(DE3) und Rosetta pLysS pETDuet-3 bei 22°C für 3 h, 1 mM IPTG
- Konstrukte mit CqsS und hACII: Fusionsproteine in *E. coli* C43(DE3) pREP4 pQE80-L bei 18°C für 15 h ÜN, 1 mM IPTG oder bei 22°C für 3 h, 1 mM IPTG (laut pETDuet-Handbuch); geteilte Proteine (CqsS-C1/CqsS-C2) in *E. coli* BL21(DE3) pETDuet-3 und/oder pACYCDuet-2 bei 22°C für ~3,5 h, 1 mM IPTG
- Lösliche Konstrukte von hACII: in *E. coli* BL21(DE3) pQE80-L bei 20°C für ca. 16 h ÜN, 50 µM IPTG
- Lösliche Konstrukte von Rv1625c: in *E. coli* BL21(DE3) oder BLR(DE3) pREP4 pQE30 oder pQE80-L (ohne pREP4) bei 25°C für ~3,5 h, 30 µM IPTG

Expression von G_{sa}*

Die Expression von konstitutiv aktivem G_{sa}* (Weitmann et al., 2001) wurde von U. Kurz durchgeführt. Hierfür wurden frisch transformierte Zellen verwendet. Die Transformation wurde mit ca. 200 ng des Plasmids pQE30_G_{sa}* zu *E. coli* BL21(DE3) pREP4 durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde zu 20 ml „angereichertem“ Medium (s.u.) mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin gegeben und bei 30°C ÜN unter Schütteln inkubiert. Mit 500 µl dieser ÜN-Kultur wurden 40 ml „angereichertes“ Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach ca. 4 h wurde die Hauptkultur (16 x 200 ml

„angereichertes“ LB) angeimpft und die Proteinexpression nach weiteren 3-4 h bei einer $OD_{600} \sim 0,4$ mit 30 μM IPTG induziert. Die Expression erfolgte für 16-18 h ÜN. Nach der Zellernte wurden je zwei Kolben pro Falcon bei -80°C gelagert.

“Angereichertes” Medium (für 3,5 l): 70 g LB Nährmedium, 35 g Trypton, 17,5 g Hefeextrakt, 7,9 ml Glycerin, 175 ml KH_2PO_4 pH 7,2 (NaOH) 1M

Zellernte

Die Zellen wurden abzentrifugiert (3200 x g, 4°C , 10 min), der Überstand verworfen und die Pellets in 30-50 ml kaltem Waschpuffer suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (4300 x g, 4°C , 30 min) wurde der Überstand verworfen und die Pellets bei -80°C gelagert.

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

Zellyse

Die gefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 25 ml Zellsuspensionspuffer (Solubilisationspuffer bei YaiN-YbeL-Konstrukten) suspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit der French Press unter ständiger Kühlung mit einem Druck von ca. 1200 psi in 1-2 Durchgängen aufgebrochen. Durch Zentrifugation (4300 x g, 4°C , 30 min) wurden die unlöslichen Zellbestandteile entfernt und der Überstand weiter bearbeitet. Die Zellen mit den löslichen hACII- und Rv1625c-Konstrukten wurden in 20 ml Lysepuffer aufgenommen, in zwei Durchgängen mit der French Press aufgebrochen (1200 psi) und zentrifugiert (48.000 x g, 4°C , 30-60 min).

Zellsuspensionspuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 2 mM Thioglycerin (0,02%), 50 mM NaCl, 1 Tablette Protease Inhibitor/50 ml Puffer

Solubilisations-Puffer (Leviatan et al., 2010): 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM PMSF (100 mM in Isopropanol)

Lysepuffer (Guo et al., 2001): 50 mM Tris (pH 8,0), 50 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol (0,71 $\mu\text{l/ml}$ Puffer)

Proteinreinigung mit IMAC

Bei der Proteinreinigung durch IMAC handelt es sich um eine Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen (Porath et al., 1975), hier mit Ni^{2+} . Die Metallionen sind an Nitrilotriessigsäure (NTA) gebunden. Zwei freie Koordinationsstellen des Ni^{2+} -Ions interagieren mit den His-Tags der Proteine. His-

Tags bestehen aus 4-10 Histidinresten, welche je nach Vektor N- oder C-terminal an das gewünschte Konstrukt kloniert wurden. Nicht markierte Proteine binden nicht und werden ausgewaschen. Das gewünschte Protein wird mit einer hohen Imidazolkonzentration eluiert. Ni-NTA ist ein partikuläres Material und wird als 50%-Suspension mit Ethanol gelagert. Vor der Entnahme muss das Ni-NTA aufgewirbelt werden und als Suspension abpipettiert werden.

Reinigung der YaiN-/YbeL-Konstrukte

Für die Reinigung wurde eine entsprechende Menge an Minispin-Säulen mit Filter vorbereitet. Jede Säule wurde mit 1,5 ml suspendierter 50% Ni-NTA-Lösung gefüllt, das Ethanol durchgedrückt und das Ni-NTA mit 5 ml HEPES-Puffer (10 mM Imidazol) äquilibriert. Da für den Proteinüberstand nur eine kurze Bindungszeit eingeplant war, wurde eine große Ni-NTA Menge gewählt. Nach der Solubilisation wurde der Proteinüberstand (ca. 8 ml pro Säule) auf die Ni-NTA-Säule gegeben, tropfenweise durchgedrückt und ein zweites Mal zur Steigerung der Bindungseffizienz auf die Säule aufgetragen. Dies wurde noch einmal wiederholt. Nach dem Durchlauf wurde mit 1 ml HEPES-Puffer (10 mM Imidazol), zweimal 1,5 ml HEPES-Puffer (30 mM Imidazol) und 0,7 ml HEPES-Puffer (50 mM Imidazol) gewaschen. Das Protein wurde in zwei Schritten eluiert: 1 ml HEPES-Puffer (200 mM Imidazol) durchdrücken, Eluat auffangen, erneut auf die Säule geben und eluieren. Gleiche Prozedur wiederholen und Eluate vereinigen. Das Eluat wurde entweder ÜN dialysiert oder auf Eis bei 4°C gelagert. Da bei der folgenden Gelfiltration (Superdex 200 10/30) nur ein Volumen von ca. 250 µl aufgetragen werden konnte, musste das Eluat konzentriert werden. Hierfür wurden Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten (100 kDa MWCO) mit HEPES-Puffer (200 mM Imidazol) äquilibriert und dann das Eluat auf ca. 450 µl konzentriert. Anschließend musste das Eluat zentrifugiert werden (17.000 x g, 4°C, 20 min), damit keine Präzipitate die Gelfiltrationssäule verstopfen. Von dem Überstand wurden 250 µl auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und das restliche Volumen zur Bestimmung der Proteinkonzentration und für die SDS-PAGE verwendet.

HEPES-Puffer: 50 mM HEPES (pH 7,4), 1 M NaCl, 1 mM MnCl₂ (erst nach pH-Einstellen zugeben), 1 mM DTT (frisch zugeben), Imidazol (10, 30, 50, 200 mM), 0,1% Detergens (Brij58)

Keine Detergenzugabe im 10 mM Imidazol-HEPES-Puffer, da dieser nur für das Äquilibrieren der Ni-NTA-Säule verwendet wird.

Dialyse-Puffer: 20 mM Tris (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM KCl

Gelfiltrations-Puffer: 20 mM Tris (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 0,05% Brij58 (frisch zugeben), vor Anwendung filtrieren

Reinigung der löslichen hACII und Rv1625c-Konstrukte (Guo et al., 2001)

Der Proteinüberstand (ca. 20 ml) nach Zellaufschluss wurde mit 200 μ l suspendiertem 50% Ni-NTA versehen, 3 h auf Eis inkubiert und zentrifugiert (1500 x g, RT, 3 min). In diesem Fall wurde das geringe Ni-NTA-Volumen zuvor nicht gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Ni-NTA-Pellet in Minispin-Säulen mit Filter überführt. Nach Waschen der Säule mit je 2 ml der Wasch-Puffer A, B und C wurde das lösliche Protein mit 500 μ l Elutions-Puffer eluiert. Die Elution wurde nochmals auf die Säule aufgetragen, eluiert und mit 100 μ l Elutions-Puffer nachgewaschen. Die Elutionen wurden ÜN bei 4°C in Dialyse-Puffer dialysiert.

Wasch-Puffer A:	50 mM Tris (pH 8,0), 10 mM β -Mercaptoethanol, 2 mM $MgCl_2$, 400 mM NaCl, 5 mM Imidazol
Wasch-Puffer B:	Wasch-Puffer A mit 15 mM Imidazol
Wasch-Puffer C:	Wasch-Puffer A mit 10 mM NaCl und 15 mM Imidazol
Elutions-Puffer:	50 mM Tris (pH 8,0), 10 mM β -Mercaptoethanol, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, 150 mM Imidazol
Dialyse-Puffer:	50 mM Tris (pH 7,5), 2 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM NaCl, 20% Glycerin

Reinigung von G_{sa}^*

Die Reinigung von konstitutiv aktivem G_{sa}^* wurde von U. Kurz durchgeführt. Für eine lohnende Ausbeute wurden pro Reinigung die Zellpellets aus Expression von mindestens 1600 ml LB-Medium bearbeitet. Jedes Zellpellet (aus Expression in 200 ml LB-Medium) wurde in 20 ml Lysepuffer suspendiert und die Zellen mit zwei Durchgängen in der French Press unter ständiger Kühlung bei ca. 1200 psi aufgebrochen. Nach Zentrifugation (100.000 x g, 4°C, 1 h) wurden die 20 ml Überstand auf zwei 50 ml-Falcons verteilt und pro Falcon 200 mM NaCl, 5 mM Imidazol und 200 μ l suspendiertes IMAC (BIO-RAD) zugegeben. Nach Inkubation für 4-5 h unter Schütteln auf Eis wurde zentrifugiert (1500 x g, RT, 3 min) und der Überstand verworfen. Das IMAC-Pellet wurde auf Minispin-Säulen mit Filter überführt und mit 4 ml Wasch-Puffer A gewaschen. Das lösliche Protein wurde mit 500 μ l Elutions-Puffer eluiert, das Eluat ein zweites Mal auf die Säule aufgetragen und nach erfolgter Elution mit 100 μ l Elutions-Puffer nachgewaschen. Das Gesamtelutionsvolumen aller 16 Säulen betrug 9,6 ml und wurde auf eine Mono Q Säule aufgetragen (Programm: monoQ 1 DL GSA neu). Da die Mono Q Säule mit 150 mM NaCl äquilibriert war, konnte G_{sa}^* nicht binden und wurde aus dem Durchlauf gepoolt. Die meisten Verunreinigungen blieben an der Säule gebunden. Der G_{sa}^* -Pool (ca. 8 ml) wurde ÜN dialysiert und mit Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten (10 kDa MWCO) auf 0,5-1 mg/ml konzentriert. Die Aliquots wurden in flüssigem N_2 gefroren und bei -80°C gelagert. Die Ausbeute aus 1600 ml LB-Medium betrug ca. 1,5-2 mg G_{sa}^* .

Lysepuffer:	50 mM Tris (pH 8,0), 20 mM β -Mercaptoethanol, 0,1 mM PMSF
--------------------	------------------------------------------------------------------

Wasch-Puffer A:	50 mM Tris (pH 8,0), 20 mM β -Mercaptoethanol, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,1 mM PMSF
Elutions-Puffer:	50 mM Tris (pH 8,0), 20 mM β -Mercaptoethanol, 150 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 10% Glycerin, 0,1 mM PMSF
Reinigungspuffer für Mono Q:	50 mM Tris (pH 8,0), 20 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 20% Glycerin, 150 mM NaCl
Dialyse-Puffer:	50 mM Tris (pH 8,0), 20 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 20% Glycerin

Gelfiltration

Ein zusätzlicher Reinigungsschritt von löslichen Proteinen erfolgte über Gelchromatographie. In der ÄKTA-Anlage wurden Superdex 200 10/30, Q-Sepharose HP 16/10 und Mono Q verwendet. Die eingesetzten Puffer wurden filtriert (0,22 μ m Mikrofilter) und entgast. Das Gerät wurde von U. Kurz bedient. Fraktionen mit eluiertem Protein wurden gepoolt und einzelne Peaks auf Aktivität überprüft.

Dialyse und Konzentrierung

Dialyse dient der Entfernung störender Substanzen wie z.B. Imidazol oder zur Umpufferung. Die Dialyseschläuche (Visking Dialyse Schlauch) wurden in dest. Wasser eingeweicht, mit der Probe (ca. 600-8000 μ l) gefüllt und mit Klammern verschlossen. In 500-1000 ml Dialysepuffer wurde ÜN bei 4°C unter leichtem Rühren dialysiert. Am nächsten Tag wurden die Proben aus den Schläuchen pipettiert und weiter verarbeitet. Zur Konzentrierung größerer Volumina konnten auch Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten bei 4330 x g, 4°C (Megafuge 1.0 R) verwendet werden. Vor dem Einsatz mussten die Filter in dem jeweiligen Puffer gewaschen werden.

Membranpräparation

Der Proteinüberstand nach dem Zellaufschluss mittels French Press wurde zweimal zentrifugiert, einmal 4300 x g, 4°C, 30 min, dann 100.000 x g, 4°C, 1 h. Das Pellet wurde je nach Größe in 1-3 ml Membranpuffer (oder anderen geeigneten Puffern) aufgenommen und in einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Für die weitere Verwendung wurde die Membransuspension auf Eis gelagert, ansonsten bei -80°C.

Membranpuffer:	40 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1,6 mM Thioglycerin (0,16%), 20% Glycerin (87%)
-----------------------	--------------------------------------------------------------------------

Solubilisation der YaiN-/YbeL-Konstrukte

Das Pellet aus der Membranpräparation wurde in HEPES-Puffer homogenisiert und die Proteinkonzentration mittels Bradford auf 10 mg/ml eingestellt. Nach Zugabe von 0,5-2% Detergens (Brij58, DDM, C₁₂E₈) wurde für 3 h auf Eis unter Schwenken inkubiert. Nach Zentrifugation (100.000 x g, 4°C, 1 h) wurde der Überstand mit Ni-NTA gereinigt.

HEPES-Puffer: 50 mM HEPES (pH 7,4), 1 M NaCl, 1 mM MnCl₂ (erst nach pH-Einstellen zugeben), 1 mM DTT (frisch zugeben), 10 mM Imidazol

Gewebepräparation

Das Protokoll ist in Anlehnung an Schultz und Schmidt (Schultz and Schmidt, 1987). Pro Versuch wurde eine Maus durch CO₂-Begasung getötet und das Gehirn von A. Bausch entnommen. Das Gehirn wurde kurz in PBS-Puffer (Biochrom GmbH) gewaschen und mit einem Ultra-Turrax (IKA-Werke) in insgesamt 20 ml Homogenisierungspuffer auf Eis homogenisiert. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 15 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen, der Niederschlag in 5 ml 1 mM KHCO₃ suspendiert und erneut zentrifugiert (12.000 x g, 10 min, 4°C). Je nach Proteinkonzentration wurde das Zentrifugat in 2-2,5 ml 1 mM KHCO₃ aufgenommen und mittels Kanülen (Sterican® Gr.2, Gr. 18) homogenisiert. Die Zugabe von 1 mM des PDE-Inhibitors 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) zum anschließenden AC-Test war für die Aktivität unerheblich. Je nach Bedarf im AC-Test wurden weitere Verdünnungen in 1 mM KHCO₃ hergestellt.

Homogenisierungspuffer (Schultz and Schmidt, 1987): 48 mM Tris-HCl (pH 7,4), 12 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA

Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Für die Kalibrierkurve wurde BSA als Standard verwendet.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) diente der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts. Die Gele bestehen aus einem Sammelgel, mit dem Zweck der Konzentrierung aller in der Probe enthaltenen Proteine am Übergang zum Trenngel, in welchem die eigentliche Auftrennung erfolgt. Die Proben wurden mit Laufpuffer vermischt und 1:4 mit Probenpuffer verdünnt, so dass ein Auftragsvolumen von 20 µl erhalten wurde. Waren die Gele zur Auswertung in Coomassie-Färbung bestimmt, wurden die Taschen mit 5 µg Protein beladen.

Gele für Western Blots enthielten pro Tasche 0,5-2 µg Protein, in seltenen Fällen auch mehr, wenn die Banden zu schwach waren. Membranproteine wurden sofort aufgetragen, lösliche Proteine zuvor für 5-10 min bei 80-95°C denaturiert. Die Elektrophorese im Laufpuffer dauerte ca. 1 h (200 V, 20 mA pro Gel). Als Proteingrößenstandard dienten je 5 µl Protein-Marker I (PEQ LAB) für SDS-Gele oder 3 µl peqGOLD Protein-Marker IV (*prestained*, PEQ LAB) für Western Blots. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung gefärbt, mit Entfärberlösung behandelt und in Wasser gelagert.

Trenngelpuffer (4 x): 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4% SDS
Sammelgelpuffer (4 x): 500 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,4% SDS
Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS
Probenpuffer (4 x): 130 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% SDS, 10% β-Mercaptoethanol, 20% Glycerin, 0,06% Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung: 0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% Essigsäure, 40% Methanol
Entfärberlösung: 10% Essigsäure, 30% Ethanol

kDa	Trenngel				Sammelgel
	36-94	16-68	14-56	12-43	
Dichte [%]	7,5	10	12,5	15	
H ₂ O [ml]	6	5	4	3	2,4
Trenn-/Sammelgelpuffer [ml]	3	3	3	3	1
Acrylamid [ml]	3	4	5	6	0,6
TEMED [µl]	10	10	10	10	10
APS 10% [µl]	80	80	80	80	40

Western Blot

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Gel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Es wurde die Methode des *Semi-Dry*-Elektrotransfers nach Towbin (Towbin et al., 1979) angewandt. Der Blot bestand aus drei Lagen Whatmanpapier 3 MM (je 9,5 cm x 6 cm, getränkt in Towbinpuffer), aktivierter Nitrozellulosemembran (PVDF, 8 cm x 6 cm, gewaschen mit Methanol, Wasser, Towbinpuffer), dem SDS-Gel (kurz in Towbinpuffer gelagert) und wieder drei Lagen Whatmanpapier auf der Anodenplatte des Blot-Apparates (ohne Luftblasen). Beide Elektrodenplatten waren mit Towbinpuffer angefeuchtet. Das Blotten dauerte 3 h bei 20 V, 200 mA pro Blot (2,5 mA/cm²). Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen mit dem Erstantikörper wurde die Membran für 15 min-ÜN in 30 ml Milchpulverlösung inkubiert und so die unspezifische Proteinadsorption blockiert.

Towbinpuffer (Towbin et al., 1979): 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
Milchpulverlösung: 5% Milchpulver in TBS-T-Puffer
TBS-Puffer: 20 mM Tris/HCl (pH 7,6), 140 mM NaCl

TBS-T-Puffer:	0,1% Tween 20 in TBS-Puffer (filtriert)
Erstantikörperkonzentrationen:	1:2000 RGS-His ₄ , 1:2000 Tetra-His, 1:5000 S-Tag, 1:10000 T7 RNA Polymerase Antikörper
Zweitantikörperkonzentration:	1:5000 Ziege-anti-Maus polyklonaler Antikörper konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, 1:2500 ECL Plex Cy3

Western Blot mit ECL Plus *Western Blotting Detection System*

Nach dem Blockieren wurde die Membran für 2x 2 min in TBS-T gewaschen, mit Erstantikörper (in 30 ml 5%iger Milchpulverlösung) für ca. 1 h inkubiert und erneut (2x 5 min, 1 x 15 min) in TBS-T gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit einem Ziege-anti-Maus Zweitantikörper konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (in 30 ml 5%iger Milchpulverlösung) für ca. 1 h und Waschen (2x 5 min, 1 x 15 min) in TBS-T. Die Membran wurde auf Frischhaltefolie gelegt, mit ECL Entwicklungslösung (2 ml Lösung A + 50 µl Lösung B pro Membran) für ca. 1 min in der Dunkelkammer inkubiert und danach trocken getupft. Die Membran wurde wieder in Frischhaltefolie gelagert. Mit verschiedenen Zeiten (5 sec-10 min) wurden Filme (Hyperfilm ECL) belichtet und diese entwickelt (AGFA CP1000). Die Membran wurde getrocknet und in Coomassie-Färbelösung gefärbt, um den Größenstandard auf die Filme zu übertragen.

Western Blot mit Etnan DIGE Imager

Nach dem Blockieren wurde die Membran für 3x 10 min in TBS-T gewaschen, mit Erstantikörper (in 5 ml TBS-T + 5% BSA + 0,05% NaN₃) für ca. 1 h inkubiert und erneut (3x 10 min) in TBS-T gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper ECL Plex Cy3 (in 5 ml TBS-T) für ca. 1 h im Dunkeln und Waschen (5x 5 min, im Dunkeln) in TBS-T. Nach dem Trocknen der Membran (mindestens 20 min) konnte die Fluoreszenz mit dem Etnan DIGE Imager nach Herstellerangaben ca. drei Monate lang nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Programms ImageQuant TL konnten die Banden analysiert und quantifiziert werden.

2.7 Zellfreie Proteinbiosynthese

Die Methode des zellfreien Proteinbiosystems (ZS) wurde während eines zweiwöchigen Aufenthalts am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Kiel unter der Leitung von E. Beitz erlernt. Die Methode wurde nach F. Bernhard (Schwarz et al., 2007a) durchgeführt. Das System besteht aus einem so genannten *reaction mixture* RM (Reaktionsgemisch) und einem *feeding mixture* FM (Nährstoffmix). Im FM befinden sich die niedermolekularen Ausgangsstoffe wie z.B. Aminosäuren und Nukleotide, während sich die gebildeten Proteine im RM konzentrierten. RM und FM sind durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt, was zum einen eine gute Nährstoffversorgung des RM gewährleistet und zugleich das exprimierte Protein in einem kleinen Volumen zurückhält. Die

Transkription der DNA im RM erfolgte durch Zugabe der T7 RNA Polymerase. Im Prinzip waren drei verschiedene Expressionsformen möglich: die Expression der Proteine als Präzipitat ohne Zugabe von Detergenzien (P-Expression), die Expression der Proteine in Micellen mit Einsatz von Detergenzien (D-Expression) und die Expression der Proteine in Liposomen unter Zugabe von Lipiden (L-Expression).

DNA-Templates und Ethanol-fällung

Die DNA-Templates wurden in den pIVEX2.3w Vektor zwischen den T7 Promoter und den T7 Terminator kloniert. Das Template konnte N-terminal an das grün fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelt werden, um anhand der Fluoreszenz den Erfolg der Expression unmittelbar feststellen zu können. C-terminal enthielt der Vektor einen His-Tag für die Reinigung oder Antikörperdetektion mittels Western Blot. N-terminal wies der Vektor einen HA-Tag (Hämagglutinin-Tag) auf. Die zellfreie Expression von GFP als Standardprotein diente der Justierung der Reaktionsbedingungen.

Nach der Plasmidpräparation wurde das DNA-Template durch Ethanol-fällung gereinigt und konzentriert, um die erforderliche Mindestkonzentration von ca. 300 ng DNA zu erhalten. 5x 5 ml ÜN-Kultur wurden nach der Plasmidpräparation mit je 60 µl MilliQ-Wasser eluiert, gepoolt und die DNA-Konzentration gemessen. Zu den 300 µl Plasmidpräparation wurden 0,375 Vol NH₄Ac (10 M) zugegeben und zu dem neuen Volumen 2,5 Vol 100% Ethanol addiert. Nach Inkubation bei RT für 30-60 min (oder bei -20°C ÜN) wurde zentrifugiert (20.800 x g, 4°C, 20-30 min), der Überstand verworfen und das Pellet mit 80% Ethanol (0,5 Vol des vormals vorhandenen Volumens) gewaschen. Nach Zentrifugation (20.800 x g, 4°C, 15 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet (10 min bei 37°C oder 1 min im *Concentrator 5301*). Anhand der Ausgangskonzentration der DNA in der Plasmidpräparation konnte das getrocknete Pellet in der entsprechenden Menge MilliQ-Wasser für eine Endkonzentration von ca. 300 ng/µl gelöst werden. Die gereinigte DNA wurde bei -20°C gelagert.

Herstellung des S30-Extraktes

Die Herstellung des S30-Extraktes (Sedimentation bei 30.000 x g) wurde laut Schwarz *et. al.* (Schwarz et al., 2007a) durchgeführt. Der Extrakt verfügt über alle Bestandteile des Translationsprozesses, z.B. Ribosomen, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Translationsfaktoren, sowie Acetatkinase (Komponente des energieregenerierenden Systems) und in geringen Mengen *E. coli*-Lipide oder -Membranfragmente. Das Entfernen endogener mRNA führte zu einer Reduktion der Hintergrundproteinexpression. Durch Dialyse gingen endogene ASn verloren, welche der zellfreien Expression zugegeben werden müssen.

Am IMIT (Universität Tübingen) wurde von A. Kulik ein 10l-Fermenter mit YPTG-Medium (2x) mit 100 ml ÜN-Kultur *E. coli* BL21(DE3) angeimpft und das Wachstum bei 37°C unter Rühren überwacht. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde der Fermenter von außen möglichst schnell abgekühlt, die Zellen geerntet und auf Eis gelagert. Der Vorgang sollte nicht länger als 45 min dauern bzw. eine OD₆₀₀ ~ 4,0 nicht überschreiten, um möglichst viele Ribosomen zu erhalten. Das Zellpellet wurde in 300 ml S30-A-Puffer (4°C) suspendiert, zentrifugiert (8000 x g, 4°C, 10 min) und dieser Vorgang zweimal wiederholt, wobei die letzte Zentrifugation 30 min dauerte. Das Pellet wurde bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis wurde deren Gesamtgewicht (ca. 50-60 g Nassgewicht pro 10l-Fermenter) in 110% (vol/wt) S30-B-Puffer (4°C) suspendiert und die Zellen mit 2-4 Durchgängen in der French Press bei 1200 psi aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (30.000 x g, 4°C, 30 min) wurden die oberen 2/3 klarer Überstand in ein neues Röhrchen überführt und die Zentrifugation wiederholt. Die oberen 2/3 des klaren Überstandes wurden abgenommen, zum Entfernen der endogenen mRNA mit 400 mM NaCl versetzt und 45 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Der nunmehr trübe Extrakt (~30 ml) wurde in 5 l S30-C-Puffer (4°C) für mindestens 2 h bei 4°C dialysiert (rechtzeitig ca. 12 l Wasser für den 50 x S30-C-Puffer kühl stellen), dann der Puffer erneuert und ÜN bei 4°C weiter dialysiert. Am nächsten Tag wurde der Extrakt zentrifugiert (30.000 x g, 4°C, 30 min), die oberen 2/3 des Überstands (~20-25 ml) abgenommen und zur Lagerung bei -80°C in 100-200 µl Aliquots in flüssigem N₂ gefroren. Jedes Aliquot sollte zur Verwendung nur einmal aufgetaut werden. Nach jeder neuen S30-Extrakterstellung muss die optimale Magnesiumkonzentration durch die zellfreie Expression eines Standardproteins (z.B. GFP) bestimmt werden.

YPTG-Medium für 10l-Fermenter (2 x):	29,9 g KH ₂ PO ₄ und 91,3 g K ₂ HPO ₄ in 500 ml Wasser (autoklavieren), 198 g Glucose (= 40%) in 500 ml Wasser (autoklavieren), 100 g Hefeextrakt, 160 g Trypton und 50 g NaCl in eine 500 ml-Flasche abwiegen
S30-A/B-Puffer (50 x, 4°C):	10 mM Tris-Acetat (pH 8,2; mit Essigsäure einstellen), 14 mM Mg ²⁺ -Acetat, 0,6 mM KCl
S30-A-Puffer:	6 mM β-Mercaptoethanol zu S30-A/B-Puffer (frisch zugeben)
S30-B-Puffer:	1 mM DTT, 0,1 mM PMSF zu S30-A/B-Puffer (je frisch zugeben)
S30-C-Puffer (50 x, 4°C):	10 mM Tris-Acetat (pH 8,2; mit Essigsäure einstellen), 14 mM Mg ²⁺ -Acetat, 0,6 mM K ⁺ -Acetat, 0,5 mM DTT (frisch zum 1x S30-C-Puffer)

Herstellung der T7 RNA Polymerase

Die T7 RNA Polymerase erkennt nur den T7 Promoter und wurde zwecks Reduktion ungewollter Hintergrundtranskription im ZS verwendet. Hintergrundexpression war nur durch *E. coli*-Polymerase-Aktivität möglich, welche noch im S30-Extrakt enthalten

war. Wegen eines hohen Kaufpreises wurde die T7 RNA Polymerase im Labor hergestellt.

10x 200 ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin wurden mit je 2 ml ÜN-Kultur von *E. coli* BL21(DE3) pAR1219 (enthält Gen für T7 RNA Polymerase) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,6-0,8 inkubiert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wuchsen die Zellen für weitere 5 h bei 37°C. Die Zellen wurden zentrifugiert (4500 x g, 4°C, 15 min) und auf zwei 50 ml-Falcons verteilt (≅ 5x 200 ml LB-Medium/Falcon). Pro Falcon wurden die Zellen mit 30 ml T7-Puffer gewaschen, zentrifugiert (4500 x g, 4°C, 30 min) und ohne Puffer bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis wurde in jedes der beiden Falcons 30 ml T7-Puffer gegeben und die Zellen suspendiert. Die Zellen wurden in zwei Durchgängen mit der French Press bei 1200 psi aufgebrochen und zentrifugiert (20.000 x g, 4°C, 30 min). Der Überstand (insgesamt ~60 ml) wurde auf Eis gelagert. Dann wurde unter ständigem Schwenken tropfenweise eine 10% Streptomycinsulfatlösung (in T7-Puffer) bis zu einer Endkonzentration von 2% im Überstand zugegeben. Dadurch präzipitierte die enthaltene DNA und konnte aus dem trüben Überstand nach Zentrifugation (30.000 x g, 4°C, 30 min) entfernt werden. Der Überstand (~50 ml) wurde sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm) und mittels Anionenaustauschchromatographie auf einer Q-Sepharosesäule HP16 10 (äquiliert mit T7-Puffer) gereinigt. Die Flussrate betrug 1 ml/min und wurde bei der Elution mit einem NaCl-Gradienten (50 mM–500 mM) auf ca. 3 ml/min gesteigert. Ein Großteil eluierte bereits bei niedriger NaCl-Konzentration. Anhand des Elutionsprofils wurden die einzelnen Peaks gepoolt (~20-30 ml pro Peak) und ÜN auf Eis bei 4°C gelagert. Fraktionen mit hohem Anteil an T7 RNA Polymerase (~100 kDa) wurden im Western Blot mit T7 RNA Polymerase Antikörper (Novagen) identifiziert, mittels Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten (30 kDa MWCO) auf ca. 4 mg/ml konzentriert (4300 x g, 4°C) und ÜN in 1 l Dialysepuffer bei 4°C dialysiert. Als Positivkontrolle im Western Blot diente 1 µl T7 RNA Polymerase von Roche (5000 U, 50 U/µl). Am nächsten Tag wurde die Konzentration der T7 RNA Polymerase durch Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten (30 kDa MWCO) endgültig auf 4 mg/ml eingestellt, die Endkonzentration von Glycerin in den Fraktionen auf 50% erhöht (Endvolumen ~2-8 ml pro Fraktion) und in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Die Aktivität der T7 RNA Polymerase in jeder Fraktion wurde mittels zellfreier Expression eines Standardproteins (z.B. GFP) bestimmt und die einzusetzende Menge im ZS angepasst.

T7-Puffer: 30 mM Tris (pH 8,0), 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5% Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol

Dialyse-Puffer: 10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% Glycerin

Pipettierschema und zellfreie Expression

Im ZS musste das Zellinnere so gut wie möglich nachgestellt werden. Da die meisten Komponenten sowohl im RM als auch im FM vorkamen, wurde zunächst ein Mastermix pipettiert, der nach der Aufteilung in RM und FM um spezifische Komponenten ergänzt wurde. Das Verhältnis der Volumina von RM zu FM lag am besten zwischen 1:10 bis 1:30. Bei zellfreier Expression eines neuen Konstrukts wurden zunächst verschiedene analytische Ansätze (je 50 μ l RM) für die optimalen Bedingungen geprüft. Die ersten Ansätze dienten der Ermittlung der erforderlichen Magnesiumkonzentration. Erst danach wurden unterschiedliche Detergenzien und Detergenzkonzentrationen getestet. Für den analytischen Ansatz wurden selbst hergestellte Plexiglaszylinder zusammen mit 24-*well plates* verwendet. Das RM wurde in eine Rinne des Plexiglaszylinders pipettiert, das FM in die Vertiefungen der *well plate*. Um RM und FM nicht zu vermischen, wurde eine Dialysemembran faltenfrei und lückenlos über den Plexiglaszylinder gespannt. Ein Teflonring fixierte die Dialysemembran auf dem Plexiglaszylinder (Fig. 6).

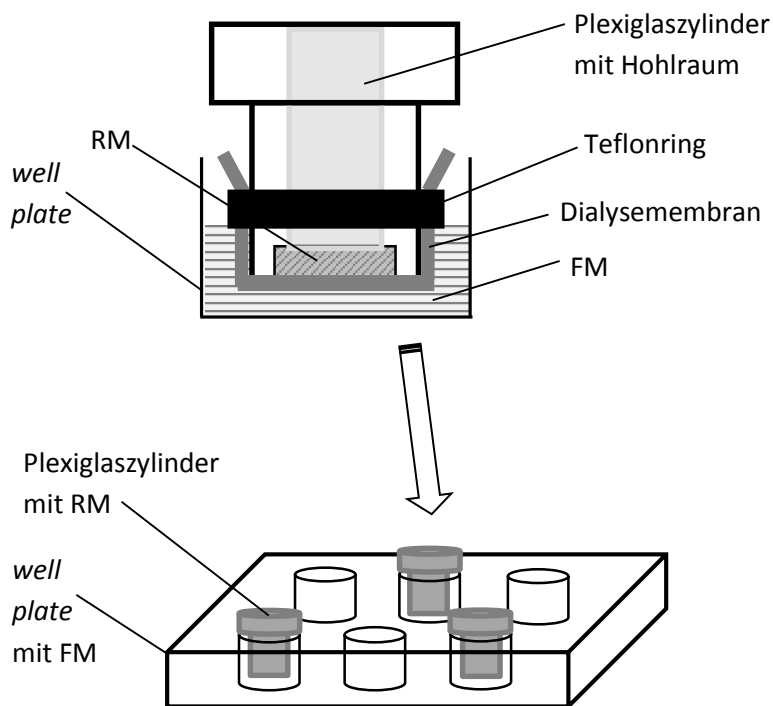


Fig. 6: Analytischer Ansatz im zellfreien System. Querschnitt durch einen mit *reaction mixture* (RM) gefüllten Plexiglaszylinder in der Vertiefung eines 24-*well plate* gefüllt mit *feeding mixture* (FM). Die durch einen Teflonring fixierte Dialysemembran verhindert ein Vermischen von RM und FM. Die Plexiglaszylinder wurden auf Lücke in das *well plate* gestellt.

Das Pipettierschema nach Schwarz *et al.* (Schwarz *et al.*, 2007a) ist in Tabelle 2 mit Beispielzahlen dargestellt. Erläuterungen zu den einzelnen Komponenten erfolgen im Anschluss. Zunächst wurden die benötigten Volumina einzeln für RM und FM

berechnet, um deren Summe als Mastermix in ein 15 ml-Falcon zu pipettieren. Von diesem Mastermix wurde ein berechnetes Volumen für den RM abgenommen und in einem Eppendorfcup auf Eis gelagert. Der restliche Mastermix wurde mit den fehlenden Komponenten des FM ergänzt. Im analytischen Ansatz wurde der FM je nach Anzahl der benötigten Ansätze auf Eppendorfcups aufgeteilt (Tab. 3), je nach Versuch entsprechend mit Magnesium oder Detergenzien versehen und auf Lücke in die Vertiefungen der *well plate* pipettiert. Dann wurden die Plexiglaszylinder vorbereitet. Hierfür wurden auf entsprechende Größe zurechtgeschnittene Dialysemembranen (10 kDa MWCO) kurz in MilliQ-Wasser gelegt, dann auf dem Teflonring platziert und der Zylinder so hindurchgesteckt, dass sich die Membran über dem Hohlraum spannte. Die fertigen Zylinder wurden zum Schutz vor Austrocknung bis zum Beladen im FM der *well plate* gelagert. Das RM wurde auf Eis mit den fehlenden Komponenten ergänzt, wobei die T7 RNA Polymerase und der S30-Extrakt zuletzt zugegeben wurden. Nach jeder neuen Herstellung von T7 RNA Polymerase und S30-Extrakt mussten die benötigten Konzentrationen angepasst werden. Der RM wurde ebenfalls auf die benötigte Anzahl Eppendorfcups aufgeteilt (Tab. 3), je nach Versuch mit Magnesium oder Detergenzien versehen und möglichst luftblasenfrei in die Plexiglaszylinder pipettiert ohne die Dialysemembran zu verletzen. Die gefüllten Zylinder wurden wieder in den *wells* mit FM platziert, woraufhin die *well plate* mit Parafilm abgedeckt wurde, um ein Austrocknen zu verhindern. Die *well plate* wurde ÜN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Dialysemembran mit der Pipettenspitze durchstoßen und der RM durch das Loch herauspipettiert. Zur Analyse im Western Blot wurden die 55 µl RM zentrifugiert (18.000 x g, 5 min, 4°C) und Überstand und Pellet separiert. Das Pellet wurde in 55 µl S30-C-Puffer suspendiert. Das gelöste Pellet und der Überstand wurden mit 19 µl Probenpuffer (4x) versehen, 30 min bei 37°C inkubiert und auf das SDS-Gel aufgetragen.

Waren die Bedingungen für die höchste Expressionsrate bekannt, konnte das gewünschte Protein in größerem Maßstab im präparativen Ansatz (je 3 ml RM) hergestellt werden. Hierfür gab es selbst hergestellte Gefäße mit Deckel, in die ein *Slide-A-Lyzer* (Thermo Fisher) gestellt wurde. Vor dem Befüllen wurde der *Slide-A-Lyzer* von außen und innen mit MilliQ-Wasser benetzt, bis sich die Membran wellte. Die oberen beiden Ecken des *Slide-A-Lyzer* konnten zum Befüllen oder Entleeren mit einer Kanüle durchstoßen werden ohne die beidseitigen Dialysemembranen zu verletzen. Bis zum Beladen mit RM wurde der vorbereitete *Slide-A-Lyzer* zum Schutz vor Austrocknen in den Gefäßen mit FM gelagert. Nach dem Vervollständigen des RM auf Eis wurde es mittels einer Spritze in den *Slide-A-Lyzer* gefüllt und in die Gefäße mit FM gestellt. Für einen guten Stoffaustausch sollten die Spiegel von FM und RM etwa auf derselben Höhe liegen (Fig. 7). Die Gefäße wurden mit den Deckeln verschlossen und ÜN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag konnte das RM mittels Spritze entnommen werden.

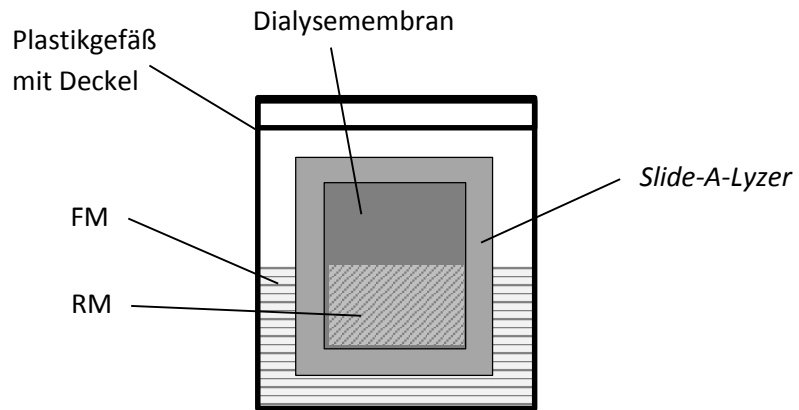


Fig. 7: Präparativer Ansatz im zellfreien System. Darstellung des verschließbaren Gefäßes gefüllt mit *feeding mixture* (FM) und mit *Slide-A-Lyzer* im Inneren. Der *reaction mixture* (RM) im *Slide-A-Lyzer* sollte auf etwa derselben Höhe wie der FM sein.

Tab. 2: Pipettierschema für analytischen und präparativen Ansatz im zellfreien System mit Beispielzahlen abgeändert von Schwarz *et al.* (Schwarz *et al.*, 2007a). Der analytische Ansatz diente in diesem Beispiel der Ermittlung der optimalen Mg^{2+} -Konzentration (Mg-Screen) und enthielt deswegen keine Detergenzien (P- oder Präzipitat-Expression). Das Pipettierschema für den Mg-Screen ist in Tab. 3 zu sehen.

Der präparative Ansatz mit ca. 1000 μl *reaction mixture* (RM) und 17.000 μl *feeding mixture* (FM) für die Expression im *Slide-A-Lyzer* enthielt Detergens (D-Expression). Die Werte für K^+ -Acetat und Mg^{2+} -Acetat wurden je nach Versuch angepasst. (MM = Mastermix, PEP = Phosphoenolpyruvat, DTT = 1,4-Dithiothreitol)

Komponente		Konzentration		Analytischer Ansatz (P-Expression)			Präparativer Ansatz (D-Expression)		
		Stock	Final	MM [μl]	RM [μl]	FM [μl]	MM [μl]	RM [μl]	FM [μl]
Na ₃	%	10	0,05	46			90		
PEG 8000	%	40	2	453			900		
K ⁺ -Acetat	mM	4000	150,8 ^{a)} /230,8 ^{b)}	341 ^{a)}			1039 ^{b)}		
Mg ²⁺ -Acetat	mM	1000	3,1 ^{a)} /9,1 ^{b)}	28 ^{a)}			164 ^{b)}		
HEPES Puffer	M	2,4	0,1	377			750		
Complete	x	50	1	181			360		
Folsäure	mg/ml	10	0,1	91			180		
DTT	mM	500	2	36			72		
NTP Mix	x	75	1	120			240		
PEP	mM	1000	20	181			360		
Acetylphosphat	mM	1000	20	181			360		
Aminosäure-Mix	mM	4	0,5	1132		1063	2250		2125
Arg/Cys/Trp/Met/ Asp/Glu-Mix	mM	16,7	1	542			1078		
Detergens	x	10	0,8	-			1440		
Summe				Σ 3709			Σ 9283		
Mastermix (MM)					227	3482		516	8767
S30-C Puffer (50x) mit DTT	%	100	35			2975			5950
Pyruvatkinase	mg/ml	10	0,04		2		4		
Plasmid-DNA/PCR	mg/ml	0,3	0,015		28		50		
RiboLock	U/ μl	40	0,3		4		8		
T7RNAP	U/ μl	200	15		41		75		
tRNA <i>E. coli</i>	mg/ml	40	0,5		7		13		
S30-Extrakt	%	100	35		193		350		
Milli-Q H ₂ O				Kein H ₂ O im Mg-Screen			-		158
Total				Σ 3709	Σ 502	Σ 7520	Σ 9283	Σ 1016	Σ 17000

^{a)} Werte für Reaktion mit 290 mM finaler K^+ -Konzentration und 8 mM finaler Mg^{2+} -Konzentration.

^{b)} Werte für Reaktion mit 370 mM finaler K^+ -Konzentration und 14 mM finaler Mg^{2+} -Konzentration.

Zur Ermittlung der endgültigen K^+ - und Mg^{2+} -Konzentration im Pipettierschema müssen alle Quellen der beiden Ionen berücksichtigt werden (Schwarz *et al.*, 2007a):

290 mM K^+ : 50 mM aus HEPES-KOH Puffer + 67 mM aus PEP + 22 mM aus Acetylphosphat + 0,21 mM aus S30-C Puffer/S30 Extrakt + 150,8 mM aus K^+ -Acetat

8 mM Mg^{2+} : 4,9 mM aus S30-C Puffer/S30 Extrakt + 3,1 mM aus Mg^{2+} -Acetat

Tab. 3: Pipettierschema mit Beispielzahlen zur Ermittlung der optimalen Mg^{2+} -Konzentration (Mg-Screen) als Doppelbestimmung abgeändert von Schwarz *et al.* (Schwarz *et al.*, 2007a). Der Mg-Screen ist die Fortführung des analytischen Ansatzes aus Tab. 2. Alle Ansätze wurden nach dem Pipettieren auf je zwei Plexiglaszylinder (RM, *reaction mixture*) bzw. je zwei Vertiefungen einer 24-well plate (FM, *feeding mixture*) aufgeteilt.

Mg ²⁺ -Konzentration [mM]	8	10	12	14	16
Ansatz (Doppelbestimmung)	1	2	3	4	5
µl FM	1504	1504	1504	1504	1504
µl von 100 mM Mg ²⁺ -Acetat	0	35	70	105	140
µl MilliQ-H ₂ O	246	211	176	141	106
Total	1750	1750	1750	1750	1750
µl RM	100	100	100	100	100
µl von 100 mM Mg ²⁺ -Acetat	0	2,6	5,2	7,8	10,4
µl MilliQ-H ₂ O	30,0	27,4	24,8	22,2	19,6
Total	130	130	130	130	130

Im ZS wurde eine lebende Zelle nachgestellt. NaN₃ diente der kurzfristigen Konservierung des Systems. PEG8000 simulierte das viskose Cytoplasma. Der HEPES-Puffer sorgte für einen neutralen pH. *Complete* (Roche) ist eine Mischung aus EDTA-freien Protease Inhibitoren. Folsäure wurde für die Bildung von Formylmethionin zur Initiation der Expression benötigt. Da die T7 RNA Polymerase oxidationsempfindlich reagiert, sorgt DTT für reduzierende Bedingungen. Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvatkinase dienten als ATP-regenerierendes System, genauso wie Acetylphosphat. Der von Acetylphosphat benötigte Partner Acetatkinase war in ausreichender Konzentration im S30-Extrakt vorhanden und musste nicht extra zugegeben werden. Da bei der Herstellung des S30-Extraktes während der Dialyseschritte endogen enthaltene ASn entfernt wurden, mussten alle 20 ASn dem ZS zugegeben werden. Zusätzlich wurde die Konzentration von ASn, die verstärktem Abbau unterlagen, nämlich Arg, Cys, Trp, Met, Asp, Glu, erhöht. Zum Schutz der gebildeten mRNA vor Abbau wurde der RNase Inhibitor RiboLock dem RM zugegeben. Zur Stabilisierung des ZS diente nicht nur der neutrale pH, sondern auch die im System enthaltene Konzentration an Mg²⁺- und K⁺-Ionen, die auch bei der Aktivität von Enzymen wie der Pyruvatkinase eine bedeutende Rolle spielen.

K⁺-Acetat:	4 M
Mg²⁺-Acetat:	1 M
PEG 8000 (Lagerung bei -20°C):	40% (wt/vol)
DTT:	500 mM
Acetylphosphat KOH (Lagerung bei -20°C):	1 M (pH 7,0; mit 10 M KOH einstellen), Lösung bleibt trüb
tRNA (Lagerung bei -20°C):	40 mg/ml (wt/vol) in nuclease-freiem Wasser
NaN₃ (Lagerung bei -20°C):	10% (wt/vol)
Folsäure (Lagerung bei -20°C):	10 mg/ml
HEPES-KOH-Puffer (Lagerung bei 4°C):	2,45 M (pH 8,0; mit 10 M KOH einstellen)
PEP-KOH (Lagerung bei -20°C):	1 M (pH 7,0; mit 10 M KOH einstellen)
ATP:	360 mM
CTP, UTP, GTP:	je 240 mM
	pH 7,0 mit 5 M NaOH, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

NTP-Mix (75 x, Lagerung bei -20°C): Mischung gleicher Volumina jedes NTP- Stocks

L-Aminosäure-Mix: 20 mM Tyr, je 100 mM Asn, Asp, Glu, Cys, Met, Trp in 100 mM HEPES (pH 7,4); je 100 mM Arg, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Gln, Lys, His, Gly

ASn mit schlechter Löslichkeit können bis 50°C erwärmt werden. Manche ASn müssen als Suspension pipettiert werden.

AS-Mix-Stock (4 mM, Lagerung bei -20°C): zu 10 ml Tyr (20 mM) je 2 ml der übrigen 19 ASn (100 mM Stock) zugeben, auf 50 ml auffüllen

Arg/Cys/Trp/Met/Asp/Glu-Mix-Stock (16,7 mM, Lagerung bei -20°C): gleiche Volumina der 100 mM AS-Stock-Lösungen von Arg, Cys, Trp, Met, Asp und Glu

2.8 Adenylatcyclasetest

Nach Expression der chimären ACn in *E. coli* wurden entsprechende Membranpräparationen oder lösliche ACn im AC-Test eingesetzt. Die AC-Aktivität wurde mittels Szintillationsmessung anhand der Umsetzung von [α - 32 P]-ATP zu radioaktivem cAMP bestimmt. Hierzu wurde das in der Enzymreaktion gebildete cAMP über ein Chromatographieverfahren von nicht umgesetztem ATP abgetrennt. Die Methode wurde nach Salomon *et al.* (Salomon *et al.*, 1974) durchgeführt. Dafür wurden 50 μ l 2x Cocktail auf Eiswasser vorgelegt, wenn nötig mit Liganden bzw. Stimulanzien (Ser, Asp, CAI-1, FSK, $G_{s\alpha}^*$) versehen und mit 40 μ l Proteinlösung gemischt (Doppelbestimmungen). Bei Membranpräparationen enthielt der Cocktail ein ATP-regenerierendes System aus Kreatinphosphat und Kreatinkinase. Für lösliche ACn war kein regenerierendes System nötig. Nach Zugabe von 10 μ l [α - 32 P]-ATP als Substrat erfolgte die Reaktion für 10 min bei 37°C unter mäßigem Schütteln. Je nach verwendeter AC enthielt der Cocktail Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} und die ATP-Konzentrationen waren an die jeweilige AC angepasst. Die Reaktion wurde auf Eiswasser durch Zugabe von 150 μ l AC-Stopp-Puffer beendet, weiter wurde mit 800 μ l Wasser aufgefüllt. Die Ansätze wurden auf Säulen (9x 1 cm Glassäule mit 1,2 g Dowex-50WX4-400) gegeben, nach dem Einsickern je nach Elutionsprofil der Säulen mit 3-4 ml Wasser gewaschen und das 32 P-cAMP mit 5 ml Wasser auf Alox-Säulen (10x 0,5 cm Plastiksäule mit 1,0 g Al_2O_3 90% aktiv, neutral) eluiert. Anschließend wurde das 32 P-cAMP mit 4,5 ml Elutionspuffer (0,1 M Tris/HCl, pH 7,5) in Szintillationsgefäße eluiert, die zuvor mit 4 ml *Ultima Gold XR* Szintillationsflüssigkeit gefüllt worden waren. Die Gefäße wurden geschüttelt und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Als Kontrollgröße zur Bestimmung der Ausbeute im Chromatographieverfahren wurde [2,8- 3 H]-cAMP als interner Standard eingesetzt. Um das Hintergrundrauschen der Säulen bestimmen zu können, wurden zusätzlich zwei Proben mit Wasser anstatt mit Protein getestet (Leerwert). Als unterer Grenzwert zum Nachweis von Enzymaktivität wurde der Blindwert angesetzt. Als Kontrolle diente die Vermehrung, Membranpräparation und Aktivitätsbestimmung von *E. coli* Zellen mit „leeren“ Vektoren. Hiermit wurde die Hintergrundaktivität von *E. coli*

Proteinen in Bezug auf den ATP-Umsatz ermittelt. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde die totale Menge an eingesetztem [2,8-³H]-cAMP und [α -³²P]-ATP gemessen (in 4,5 ml Elutionspuffer mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit). Mit nachfolgender Formel wurde die Enzymaktivität A [$\mu\text{mol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$] berechnet:

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

Aufgrund des Überstrahls vom ³²P-Zählkanal in den ³H-Kanal mussten laut Formel 3% der ³²P-Counts vom entsprechenden ³H-Wert subtrahiert werden. Wurden Membranpräparationen getestet, beziehen sich die berechneten Aktivitäten immer auf die Gesamtproteinmenge in der Probe.

Zur Regeneration der Dowex-Säulen erfolgte ein Waschschritt mit 5 ml HCl (2 N), welcher auch ÜN erfolgen konnte, und anschließend wurde mit 15 ml Wasser gespült. Bei zunehmender Verschlechterung der Ausbeute wurde vor dem HCl-Waschschritt mit 2 ml NaOH (5 N) und 30 ml Wasser gespült. Bei den Alox-Säulen erfolgte die Regeneration mit 2 x 4,5 ml Tris/HCl (0,1 M, pH 7,5).

AC-Cocktail (2x): 50% Glycerin (87%), 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 6 mM MnCl₂ für bakterielle ACn oder 20 mM MgCl₂ für *Mammalia*-ACn, 4 mM [2,8-³H]-cAMP (1,64x 10⁶ Bq/mmol)

Regenerierendes System (zusätzlich im Cocktail bei Membranpräparationen):

6 mM Kreatinphosphat (Stammlösung in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5),
0,46 mg/ml Kreatinkinase (Stammlösung in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5)

³H-cAMP-Stammlösung (als interner Standard): 40 mM cAMP mit Tris-Lösung auf pH 7,5 einstellen, inklusive 10-20 kBq/ml [2,8-³H]-cAMP (NH⁴⁺-Salz)

ATP-Substratlösung (10x, pH 7,5): 10 mM ATP für *Mammalia*-ACn oder 2 mM ATP für Rv3645 oder 750 μM ATP für Rv1625c, je inklusive 16-30 kBq [α -³²P]-ATP

AC-Stopp-Puffer (1,5x): 3 mM ATP, 1,5% SDS, mit gesättigter Tris-Lösung auf pH 7,5 einstellen

Die Auswertung der AC-Tests wird im Folgenden überwiegend in Balkendiagrammen dargestellt. Jeder Balken bzw. die angegebenen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus mindestens einer Doppelbestimmung (n=2). Für die statistische Verwertbarkeit wurden die Proteine mehrmals exprimiert und getestet (ab n=4, Mittelwert \pm SEM). Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der t-Test angewendet (* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001). Um Daten aus mehreren AC-Tests desselben

Konstrukts vergleichbar machen zu können, wurden die verschiedenen Testpunkte in Relation zur jeweiligen Basalaktivität auf Prozent-Basis gesetzt. Die Basalaktivität entspricht hierbei 100%.

2.9 Klonierung der Konstrukte

Die Klonierung der Konstrukte erfolgte nach gängigen Methoden. Einzelne Mutationen wurden durch entsprechende Primer in einer PCR in das DNA-Template eingeführt. Das entstandene Fragment wurde mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut und in den passenden Vektor ligiert. Große Fragmente wurden je nach Bedarf mittels Fusions-PCR verknüpft, bevor sie in den Vektor ligiert wurden. Bestimmte Restriktionsschnittstellen wurden häufig als Verknüpfungspunkt mit dem Vektor gewählt, um Konstrukte oder Teile davon beliebig auszutauschen. Diese Verknüpfungsstellen waren BamHI/HindIII in pQE30, pQE80-L, pQE81-L, pETDuet-3 (MCS1) und BglII/XhoI in pETDuet-3 (MCS2). Die einzelnen Schritte sind ausführlich meinem Laborbuch zu entnehmen.

Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 Chimären

Transmembranmutanten zur Ausbildung von Salzbrücken

Als Ausgangskonstrukt diente der Klon Tsr-HAMP_{Tsr(1-268)}-Rv3645 CHD₍₃₃₁₋₅₄₉₎ von L. Mondéjar. Hier liegt der erste Transmembranbereich TM1 zwischen AS I₇ bis AS F₂₉, der zweite Transmembranbereich TM2 zwischen AS A₁₉₂ bis AS K₂₁₅. Zwischen den beiden Transmembranbereichen findet sich die periplasmatische Schleife. Die Nummerierung der Mutationen bezieht sich auf den Tsr-Rezeptor. Alle Konstrukte wurden in pQE30 kloniert. In Tab. 4 sind die Konstrukte, Templates, Primer und Schnittstellen zur Verknüpfung mit pQE30 aufgelistet.

Tab. 4: Klonierungstabelle zur Erstellung der Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 Chimären. Als Ausgangsklon diente Tsr-HAMP_{Tsr(1-268)}-Rv3645 CHD₍₃₃₁₋₅₄₉₎ von L. Mondéjar. Die eingefügten Mutationen wurden zur Benennung der Konstrukte verwendet. Die Schnittstellen dienten, wenn nicht anders angegeben, der Verknüpfung mit pQE30.

Template	Mutation	Primer für PCR	Primer für Fusions-PCR	Schnittstellen	Vektor
Ausgangs-klon	Stul	Tsr_Stul_s		Stul/HindIII	29-3 Klon von L. Mondéjar
		R_pQE_as			
Stul-Chimäre	A16K	Tsr_Xcml_A16K_s		Xcml/HindIII	
		R_pQE_as			
Stul-Chimäre	V17E/G19K	Tsr_Xcml_V17E(w)_G19K_s		Xcml/Stul	
		R_pQE_as			
Stul-Chimäre	G19K	Tsr_Xcml_V17E(w)_G19K_s		Xcml/Stul	
		R_pQE_as			

Template	Mutation	Primer für PCR	Primer für Fusions-PCR	Schnittstellen	Vektor
V17E/ G19K bzw. G19K	V17E/ G19K/ V203E bzw. G19K/ V203E	Tsr_V203E_s	U_pQE_s	BamHI/HindIII	pQE80-L
		R_pQE_as			
		U_pQE_s	R_pQE_as		
		Tsr_V203E_as			
V17E/ G19K/ V203E	V17E/ G19K/ W194R/ V203E	Tsr_W194R_s	U_pQE_s	BamHI/HindIII	
		R_pQE_as			
		U_pQE_s	R_pQE_as		
		Tsr_W194R_as			
G19K	G19K/ V202E	Tsr_V202E_s	U_pQE_s	BamHI/HindIII	
		R_pQE_as			
		U_pQE_s	R_pQE_as		
		Tsr_V202E_as			
G19K	G19K/ L204E	Tsr_L204E_s	U_pQE_s	BamHI/HindIII	
		R_pQE_as			
		U_pQE_s	R_pQE_as		
		Tsr_L204E_as			
A16K	A16K/ V203E	Tsr_V203E_s	U_pQE_s	BamHI/HindIII	
		R_pQE_as			
		U_pQE_s	R_pQE_as		
		Tsr_V203E_as			

Transmembranmutanten zur Einführung hydrophiler Reste

Als Ausgangskonstrukt diente die Stul-Chimäre aus Tab. 4. Die Mutationen befinden sich nur in der TM2 des Tsr-Rezeptors und mussten über eine Zwischenstufe konstruiert werden.

Tab. 5: Klonierungstabelle zur Einführung hydrophiler Reste in die Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 Chimären. Ausgangsklon war die Stul-Chimäre (Tab. 4). Die eingefügten Mutationen wurden zur Benennung der Konstrukte verwendet. Die Schnittstellen dienen, wenn nicht anders angegeben, der Verknüpfung mit pQE30.

Template	Mutation	Primer für PCR	Primer für Fusions-PCR	Schnittstellen	Vektor
Stul- Chimäre	A192S/L196Q	Tsr_A192S_L196Q_s	U_pQE_s	BamHI/HindIII	pQE80-L
		R_pQE_as			
		U_pQE_s	R_pQE_as		
		Tsr_A192S_L196Q_s			
A192S/ L196Q	A192S/ L196Q/F208S	U_pQE_s		BamHI/Stul	Stul- Chimäre
		Tsr_Stul_F208_as			
A192S/ L196Q/ F208S	A192S/ W194R/ L196Q/ M200K/F208S	Tsr_W194R_M200K_s	U_pQE_s	BamHI/HindIII	
		R_pQE_as			
		U_pQE_s	R_pQE_as		
		Tsr_W194R_M200K_as			

Fusionsproteine

Die Fusion der Chimäre Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 mit dem T4* Lysozym und den Proteinen YaiN und YbeL sollte die Solubilisation der Konstrukte unterstützen. GFP als Fusionsdomäne diente als Indikator für die richtige Faltung der chimären Konstrukte im zellfreien System. Bei korrekter Faltung der Proteine wurde die Lösung grün fluoreszierend.

Fusionsproteine mit T4* Lysozym

Bei T4 Lysozym [E11N] (T4L₁₋₁₆₁*) handelte es sich um die enzymatisch inaktive Form, verursacht durch die angegebene Mutation. T4L* in pET28 wurde von Y. Guo zur Verfügung gestellt. Als Ausgangskonstrukt diente die Stul-Chimäre aus Tab. 4. Im ersten Konstrukt (1) wurde das Startmethionin des Tsr-Rezeptors entfernt und T4L* N-terminal davor kloniert. Im zweiten Konstrukt (2) wurde T4L* ohne Startmethionin zwischen die TM1 und die periplasmatische Schleife von Tsr kloniert. In (1) und (2) wurde das jeweilige „überzählige“ Startmethionin entfernt, um die Möglichkeit für einen zweiten Translationsstartpunkt zu minimieren.

Tab. 6: Klonierungstabelle der beiden Konstrukte (1) und (2) zur Einführung von T4L* in die Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 Chimäre. Ausgangsklon war die Stul-Chimäre (Tab. 4) bzw. T4L*. In (1) wurde T4L* N-terminal vor den Tsr-Rezeptor kloniert. In (2) wurde T4L* zwischen die TM1 und die periplasmatische Domäne des Tsr-Rezeptors kloniert. In beiden Konstrukten wurde das Startmethionin von Tsr entfernt. Wenn nicht anders angegeben, dienten die Schnittstellen der Verknüpfung mit pQE30.

Konstrukt	Template	Primer für PCR	Primer für Fusions-PCR	Primer für 2. Fusions-PCR	Schnittstellen	Vektor
(1)	T4L[E11N]	T4LE11N_BamHI_s	T4LE11N_BamHI_s		BamHI/Stul	
		T4LE11N_Tsr_as				
	Stul-Chimäre	T4LE11N_Tsr_s	Tsr_Stul_as			
		Tsr_Stul_as				
(2)	T4L[E11N]	T4LE11N_TM1_s	U_pQE_s	U_pQE_s	BamHI/Stul	Stul-Mutante
		T4LE11N_TM1_as				
	Stul-Chimäre	Switch oligo XmnI sense	T4LE11N_TM1_as			
		TM1_T4LE11N_as				
	Stul-Chimäre	Tsr_T4LE11N_s		Tsr_Stul_as		
		Tsr_Stul_as				

Fusionsproteine mit YaiN und YbeL

YaiN und YbeL wurden synthetisiert. A. Schultz klonierte acht Kombinationen von pQE30-Vektoren mit YaiN und YbeL. Die ausführliche Klonierung ist ihrem Laborbuch zu entnehmen. Zur Fusion war es nötig, Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 eine weitere Schnittstelle einzufügen. Im vorliegenden Fall wurde mit der Stul-Chimäre (Tab. 4) gearbeitet. Mit PCR (U_pQE_s, Rv364 SnaB1 as) wurde eine SnaBI Schnittstelle eingeführt und gleichzeitig das Stoppcodon vor HindIII entfernt. Über die bereits vorhandene Schnittstelle BamHI und die neu eingeführte SnaBI konnte die Stul-Chimäre mit den acht unterschiedlichen pQE30-Vektoren kombiniert werden. Zur Expression wurden diese YaiN- und YbeL-Konstrukte von A. Schultz über BamHI/HindIII in pET28a(+) kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) C43 transformiert. Als Kontrolle diente die Stul-Chimäre ohne Fusionsproteine in pET28a(+).

Fusionsproteine mit GFP im zellfreien System

Als Ausgangskonstrukte dienten die Stul-Chimäre (Tab. 4) und Tsr-Rezeptor₍₁₋₂₁₅₎-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 CHD₍₂₇₈₋₅₄₉₎ von K. Winkler. Mit PCR wurden die BamHI-Schnittstelle, das Startmethionin, das Stoppcodon und eine interne XhoI-Schnittstelle in der katalytischen Domäne von Rv3645 entfernt. Beide Chimären wurden mit SpeI/XhoI N-terminal vor GFP in pIVEX2.3w gesetzt. pIVEX2.3w wurde von A. Müller-Lucks (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt. Aus versuchstechnischen Gründen war es notwendig, zusätzlich Konstrukte ohne das Startmethionin von GFP und ohne GFP zu klonieren. Als eine Positivkontrolle diente der lösliche Teil von HAMP₃₆₄₅-Rv3645 ohne GFP.

Tab. 7: Klonierungstabelle für Konstrukte des zellfreien Systems mit oder ohne GFP. Als Ausgangskonstrukte dienten die Stul-Chimäre (Tab. 4) und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645. Die Schnittstellen dienten der Verknüpfung mit pIVEX2.3w. Δ bedeutet Entfernen der BamHI und einer internen XhoI-Schnittstelle, des Startmethionins der Chimäre bzw. von GFP und des Stoppcodons.

Konstrukt	Template	Primer für PCR	Primer für Fusions-PCR	Schnittstellen
Chimäre-GFP (ΔBamHI, ΔM, ΔStopp, ΔXhoI)	Stul-Chimäre bzw. Tsr- HAMP ₃₆₄₅ - Rv3645	U_pQE_s	Tsr_SpeI_s	SpeI/XhoI
		Rv3645_ΔXhoI_as	Rv3645_XhoI_as	
		R_pQE_as		
Chimäre-GFP (GFP ΔM)	Chimäre-GFP	GFPΔATG_s GFPΔATG_as	Nicht nötig, da Klonierung mittels <i>site-directed mutagenesis</i> (QuikChange PCR)	
Chimäre-ΔGFP	Chimäre-GFP	Δ_GFP_XhoI_s Δ_GFP_XhoI_as	Klonierung mittels <i>site-directed mutagenesis</i> (QuikChange PCR), Verdau mit XhoI, Religation	
HAMP ₃₆₄₅ (279-330)- Rv3645(331-549)		ΔTsr_SpeI_s pIVEX2.3w_as		SpeI/XhoI

CqsS-Mammalia AC Chimären

Auf Grund der pseudoheterodimeren Struktur der *Mammalia*-ACn wurden zwei verschiedene katalytische Domänen (C1, C2) bei der Klonierung von Chimären berücksichtigt.

CqsS-ACV C1a bzw. CqsS-ACII C2

Hierbei handelte es sich um Chimären mit dem *quorum sensing* Rezeptor CqsS₁₋₁₈₁ und der katalytischen Domäne C1a₄₃₀₋₆₄₉ aus ACV (Kaninchen) bzw. C2₈₅₀₋₁₀₉₀ aus ACII (Ratte). Die Ausgangskonstrukte waren CqsS-Rezeptor₍₁₋₁₈₁₎-Rv1625c CHD₍₂₁₈₋₄₄₃₎ von S. Beltz und das ACV bzw. ACII Holoenzym (von L. Mondéjar). Für aktive Konstrukte mussten beide katalytischen Domänen zusammen in einem Vektor vorkommen, weshalb pETDuet-3 mit zwei *multiple cloning sites* (MCS) verwendet wurde.

Tab. 8: Klonierungstabelle für chimäre Konstrukte aus CqsS und *Mammalia*-ACn ACV C1 und ACII C2. Die Ausgangskonstrukte waren CqsS-Rv1625c (S. Beltz) und ACV bzw. ACII (L. Mondéjar). Die Schnittstellen dienten der Verknüpfung mit der MCS1 bzw. 2 von pETDuet-3 (in Klammer die verwendeten Schnittstellen im Vektor). Für aktive Konstrukte mussten beide katalytischen Domänen zusammen in einem Vektor vorkommen.

Konstrukt	Template	Primer für PCR	Primer für Fusions-PCR	Schnittstellen	MCS (Schnittstellen)	Klonierung
CqsS-ACV C1a	CqsS-Rv1625c	U_pQE_s CqsS_ACV_as	U_pQE_s	BamHI/HindIII	1 (BamHI/HindIII)	
	ACV	CqsS_ACV_s ACV_HindIII_as	ACV_HindIII_as			
CqsS-ACV C1a (QKRKEE K)	CqsS-Rv1625c	U_pQE_s CqsS_ACV_as	U_pQE_s	BamHI/Sall	2 (BglII/XhoI)	U. Kurz
	ACV	CqsS_ACV_s ACV_C1_Sall_as	ACV_C1_Sall_as			
CqsS-ACII C2	CqsS-Rv1625c	U_pQE_s CqsS_ACII_as	U_pQE_s	BamHI/XhoI	2 (BglII/XhoI)	
	ACII	CqsS_ACII_s ACII_XhoI_as	ACII_XhoI_as			
CqsS-ACII C2 (MCS1)	CqsS-Rv1625c	U_pQE_s CqsS_ACII_as	U_pQE_s	BamHI/HindIII	1 (BamHI/HindIII)	U. Kurz
	ACII	CqsS_ACII_s ACII_XhoI_HindIII_as	ACII_XhoI_HindIII_as			

CqsS-hACII C1ab bzw. CqsS-hACII C2

Für diese Konstrukte wurde die Proteinsequenz (gi:115387102) des löslichen Teils der humanen ACII (hACII) C1ab und C2 mit Hilfe des Programms „EMBOSS Backtranseq“ (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/) in *E. coli* K12 *codon usage* übersetzt und modifiziert. Einige Schnittstellen wurden entfernt, die häufigsten Triplets aus CqsS übernommen und in der Sequenz maximal fünf Adenine hintereinander zur Vorbeugung einer Leserahmenverschiebung zugelassen. Die Genteilstücke wurden von GenScript (USA) synthetisiert.

Für die Chimären wurden unterschiedliche Verknüpfungspunkte zwischen dem Rezeptor CqsS und den löslichen Domänen hACII C1 bzw. C2 gewählt. CqsS A₁₈₁ wurde mit Q₂₂₁, D₂₂₂ und Q₂₃₉ von hACII C1ab bzw. K₈₃₅, N₈₃₆, L₈₅₁ von hACII C2 verknüpft, außerdem CqsS V₁₇₆ mit E₂₃₄ von hACII C1ab und CqsS Q₁₇₅ mit I₈₄₅ von hACII C2.

Tab. 9: Klonierungstabelle für chimäre Konstrukte aus CqsS und hACII C1ab und C2. Die Ausgangskonstrukte waren CqsS-Rv1625c (S. Beltz) und die synthetisierte hACII. Die Schnittstellen dienen der Verknüpfung mit dem Vektor. Für aktive Konstrukte mussten beide katalytischen Domänen zusammen in einem Vektor vorkommen oder in zwei kompatiblen Vektoren parallel exprimiert werden (z.B. pETDuet-3 und pACYCDuet-2).

Konstrukt (Verknüpfung CqsS-hACII)	Template	Primer für PCR	Primer für Fusions-PCR	Schnittstellen	Klonierung
CqsS-hACII C1ab (A ₁₈₁ -Q ₂₂₁ /D ₂₂₂ /Q ₂₃₉)	CqsS-Rv1625c	U_pQE_s	U_pQE_s	BamHI/HindIII	U. Kurz
		CqsS_C1_SIA_ΔQ_as bzw. CqsS_C1_QQER_as			
	hACII C1	CqsS_C1_SIA_Q_s bzw. CqsS_C1_QQER_s C1b_KYY_as	C1b_KYY_as		
CqsS-hACII C2 (A ₁₈₁ -K ₈₃₅ /N ₈₃₆ /L ₈₅₁)	CqsS-Rv1625c	U_pQE_s	U_pQE_s	BamHI/HindIII bzw. BamHI/XhoI (für pETDuet-3)	U. Kurz
		CqsS_C2_SIA_ΔK_as bzw. CqsS_C2_LNRV_as			
	hACII C2	CqsS_C2_SIA_K_s bzw. CqsS_C2_LNRV_s C2_VAS_as	C2_VAS_as		
CqsS-hACII C1ab (V ₁₇₆ -E ₂₃₄)	CqsS-Rv1625c	U_pQE_s	U_pQE_s	BamHI/HindIII	
		CqsS_RNQV_C1_EFE_as			
	hACII C1	CqsS_RNQV_C1_EFE_s hAC2_C1b_neu_as	hAC2_C1b_neu_as		
CqsS-hACII C2 (Q ₁₇₅ -I ₈₄₅)	CqsS-Rv1625c	U_pQE_s	U_pQE_s	BamHI/HindIII bzw. BamHI/XhoI (für pACYCDuet-2)	
		CqsS_RNQ_C2_IET_as			
	hACII C2	CqsS_RNQ_C2_IET_s hAC2_C2_neu_as	hAC2_C1b_neu_as		

In Fusionskonstrukten sollte die Dimerisierung erzwungen werden und CqsS-hACII C1ab wurde direkt mit CqsS-hACII C2 verbunden. War CqsS-hACII C1ab kloniert, wurde das Konstrukt in pQE80-L mit BglII/HindIII verdaut und mit BamHI/HindIII geschnittenem CqsS-hACII C2 ligiert, wobei Y₆₀₃ von C1ab über RS mit M₁ von CqsS verknüpft wurde. In CqsS-hACII C1ab wurde der C1b-Anteil mittels PCR (U_pQE_s, hAC2_C1a_as) entfernt und das übrige CqsS-C1a über BamHI/HindIII wieder in den entsprechenden Vektor eingefügt.

Als Kontrolle wurde die hACII löslich ohne CqsS-Rezeptor exprimiert. Es wurden die Varianten hACII C1a (Q₂₂₁-P₄₇₉) und C1ab (Q₂₂₁-Y₆₀₃) kloniert, sowie deren Linkerkonstrukte (TRAAGGPPAAGGLE) mit hACII C2 (Tab. 10).

Tab. 10: Klonierungstabelle für lösliche hACII C1a/1ab und C2 einzeln und als Linkerkonstrukte (L = TRAAGGPPAAGGLE). Mittels BamHI/HindIII wurden die Konstrukte mit pQE80-L verknüpft. Die Klonierung wurde von U. Kurz durchgeführt.

Konstrukt	Template	Primer für PCR	Primer für Fusions-PCR
hACII C1a	hACII C1	C1a_löslich_s	
		hAC2_C1a_as	
hACII C1ab	hACII C1	C1a_löslich_s	
		hAC2_C1b_neu_as	
hACII C2	hACII C2	C2_löslich_s	
		hAC2_C2_neu_as	
hACII C1a/C1ab-L- hACII C2	hACII C1	C1a_löslich_s	C1a_löslich_s
		A_Linkers_as bzw. AB_Linkers_as	
	hACII C2	AB_Linkers_s	hAC2_C2_neu_as
		hAC2_C2_neu_as	

Rv1625c-Konstrukte

Die Klonierung der löslichen Rv1625c-Konstrukte diene einem Angleich an *Mammalia*-ACn und sollte eine Stimulierung durch G_{sa}* ermöglichen. Die Klonierung wurde von A. Schultz durchgeführt und kann in ihrem Laborbuch nachvollzogen werden. Eine Übersicht aller getesteten Mutationen in Rv1625c findet sich in Tab. 20.

2.10 Oligonukleotide

Sequenzierprimer

In Tabelle 11 finden sich die allgemeinen *sense* (s) und *antisense* (as) Sequenzierprimer, meist wie vom Hersteller der Vektoren vorgeschlagen. Für die Sequenzierung ist jedoch auch jeder Primer mit passenden Bindestellen möglich.

Tab. 11: Sequenzierprimer

Primer	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
U_pQE_s	gaa ttc att aaa gag gag aaa	Für pQE Vektoren
R_pQE_as	cat tac tgg atc tat caa cag g	Für pQE Vektoren
T3	aat taa ccc tca cta aag gg	Für pET Vektoren
T7	taa tac gac tca cta tag gg	Für pET Vektoren
pETDuet-3_MCS1_s	atg cgt ccg gcg tag a	Für pETDuet Vektoren MCS 1
Duet Down1_as	gat tat gcg gcc gtg tac aa	Für pETDuet/pACYCDuet Vektoren MCS 1
Duet Up2_s	ttg tac acg gcc gca taa tc	Für pETDuet/pACYCDuet Vektoren MCS 2
RpET_MCS_pQE30_as	acc cct caa gac ccg ttt aga	Für pETDuet/pACYCDuet Vektoren MCS 2
pACYCDuet Up1	gga tct cga cgc tct ccc t	Für pACYCDuet Vektoren MCS 1
pIVEX2.3w_as	unbekannt	Für pIVEX2.3w Vektor

Klonierungsprimer

In Tab. 12 werden die Klonierungsprimer je nach Verwendung für die unterschiedlichen Konstrukte geordnet. Die bereits erwähnten Sequenzierprimer wurden zum Teil ebenfalls für die Klonierung verwendet, werden jedoch nicht erneut aufgeführt. Enthaltene Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, Mutationen durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Mit Wobble-Primern ist es möglich, unterschiedliche Mutationen an derselben Stelle zu erhalten. Dies wird durch den Einsatz von zwei bis drei verschiedenen Primern erreicht, die je eine unterschiedliche Base enthalten. Dies wird in der Tabelle durch Schrägstriche zwischen den Basen angezeigt. Die entsprechenden Klone müssen durch Sequenzierung identifiziert werden.

Tab. 12: Klonierungsprimer für Mutationen in TM1 und TM2 des Tsr Rezeptors

Primer	Sequenz 5' → 3'	Schnittstellen	Bemerkung
Tsr_Xcml_V17E(w)_G19K_s	ttg tga <u>cca gct tac tgc tgg</u> ttt tgg ccg [T/A]At ttA AGc ttt tac aac	Xcml	Mutageneseprimer mit wobble in TM1 von Tsr
Tsr_Stul_s	tcg gta tta <u>aGg cct</u> cgc tgg tag	Stul	Mutageneseprimer
Tsr_V203E_s	atg atc gtc gAa ctg gcg gtc atc		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Tsr_V203E_as	gat gac cgc cag tTc gac gat cat c		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Tsr_W194R_s	agg cga tgC gga ttc tgg tgg gcg tga tg		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Tsr_W194R_as	atc acg ccc acc aga atc cGc atc gcc tg		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Tsr_A192S_L196Q_s	tac agc cag Tcg atg tgg att cAg gtg ggc gtg		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Tsr_A192S_L196Q_as	cac gcc cac cTg aat cca cat cgA ctg gct gta g		Mutageneseprimer für Fusions-PCR

Primer	Sequenz 5' → 3'	Schnittstellen	Bemerkung
Tsr_Stul_F208S_as	cag cga <u>ggc Ctt</u> aat acc gaa cca gac ggc gGa gat gac cgc	Stul	Mutageneseprimer
Tsr-Stul-a-sense	gg cgc tac cag cga <u>ggc Ctt</u> aat acc gaa c	Stul	Mutageneseprimer von L. Mondéjar
I226Swobl229A (s)	aat cgc ctg a[g/t]t gac agc GCt cgt cat att gc		Mutageneseprimer mit wobble von L. Mondéjar
I226S (as)	acg aat gct gtc aCt cag gcg att c		Mutageneseprimer von L. Mondéjar
Tsr_V202E_s	gtg atg atc gAG gta ctg gcg gtc		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Tsr_V202E_as	gac cgc cag tac CTc gat cat cac		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Tsr_L204E_s	g atc gtc gta Gag gcg gtc atc ttc		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Tsr_L204E_as	gaa gat gac cgc cTC tac gac gat c		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Tsr_Xcml_A16K_s	att gtg acc agc tta ctg ctg gtt ttg AAA gtt ttt ggc	Xcml	Mutageneseprimer
Tsr_W194R_M200K_s	cag tcg atg Cgg att cag gtg ggc gtg aAg <u>atc gtc gta c</u>	DpnI, RsaI	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Tsr_W194R_M200K_as	<u>g tac</u> gac gat cTt cac gcc cac ctg aat ccG cat cga ctg	DpnI, RsaI	Mutageneseprimer für Fusions-PCR

Tab. 13: Klonierungsprimer zum Einfügen von T4L* in den Tsr Rezeptor

Primer	Sequenz 5' → 3'	Schnittstellen	Bemerkung
T4LE11N_BamHI_s	cat cac <u>gga tcc</u> atg aat ata ttt gaa atg	BamHI	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
T4LE11N_Tsr_as	gat acg ttt taa ata cgc gtc cca agt gcc		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
T4LE11N_Tsr_s	tgg gac gcg tat tta aaa cgt atc aaa att g		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Switch oligo XmnI sense	gct cat cat tgg <u>aaa acg ttc</u> ttc ggg	XmnI	von A. Schultz
TM1_T4LE11N_as	ttc aaa tat att gaa cag acc gcc tga tgt c		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
T4LE11N_TM1_s	ggc ggt ctg ttc aat ata ttt gaa atg tta c		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
T4LE11N_TM1_as	taa ggc att aaa ata cgc gtc cca agt gcc		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
Tsr_T4LE11N_s	tgg gac gcg tat ttt aat gcc tta aag aat g		Mutageneseprimer für Fusions-PCR

Tab. 14: Klonierungsprimer für Konstrukte mit Fusionsproteinen YaiN und YbeL

Primer	Sequenz 5' → 3'	Schnittstellen	Bemerkung
Rv3645_SnaB1_as	aaa <u>tac gta</u> gcc gcg tac ttc gct gga	SnaBI	Mutageneseprimer, entfernt Stoppcodon in Rv3645-AC, von K. Kanchar

Die Klonierung wurde hauptsächlich von A. Schultz durchgeführt. Die verwendeten Primer und Templates sind ihrem Laborbuch zu entnehmen.

Tab. 15: Klonierungsprimer für Konstrukte des zellfreien Systems (QC-PCR = QuikChange-PCR)

Primer	Sequenz 5' → 3'	Schnittstellen	Bemerkung
Tsr_Spel_s	g gac <u>act agt</u> tta aaa cgt atc aaa att g	SpeI	Mutageneseprimer, entfernt Startmethionin und BamHI von Tsr
Rv3645_XhoI_as	g tct <u>ctc gag</u> gcc gcg tac ttc gct gga	XhoI	Mutageneseprimer, ersetzt Stopp durch XhoI in Rv3645-AC
Rv3645_ΔXhoI_s	ctg gcc aaa ctG gag gat ggc cac		Mutageneseprimer, entfernt XhoI in Rv3645-AC
Rv3645_ΔXhoI_as	gtg gcc atc ctc Cag ttt ggc cag		Mutageneseprimer, entfernt XhoI in Rv3645-AC
GFPΔATG_s	gat ttg aag caa aag gtt aac cac atg agt aaa gga g		Mutageneseprimer für QC-PCR, entfernt Startmethionin von GFP
GFPΔATG_as	ctc ctt tac tca tgt ggt taa cct ttt gct tca aat c		Mutageneseprimer für QC-PCR, entfernt Startmethionin von GFP
ΔGFP_XhoI_s	caa aat cga agg ccg <u>cct cga gca</u> cca cca cc	XhoI	Mutageneseprimer für QC-PCR, entfernt GFP
ΔGFP_XhoI_as	ggt ggt ggt <u>gct cga ggc</u> ggc ctt cga ttt tg	XhoI	Mutageneseprimer für QC-PCR, entfernt GFP
ΔTsr_Spel_s	ggt att aaa <u>act agt</u> atc gcc gac ccg tta cgc	SpeI	Mutageneseprimer, entfernt Tsr

Tab. 16: Klonierungsprimer für Konstrukte aus CqsS und *Mammalia*-ACn

Primer	Sequenz 5' → 3'	Schnittstellen	Bemerkung
CqsS_ACV_as	cag cag gag ccg ctc ctg ttg tgc gat tga gac ttt tgc		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_ACV_s	gca caa cag gag cgg ctc ctg ctg tcc gtc ctt ccc cgc		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
ACV_HindIII_as	cag cta att <u>aag ctt</u> cta ggt gca gcg cag gat gag gaa	HindIII	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_ACII_as	ctc cag cag cac tcg att tag tgc gat tga gac ttt tgc		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_ACII_s	gca cta aat cga gtg ctg ctg gag aac gtg ctt cct gca		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
ACII_XhoI_as	cag <u>act cga gga</u> tgc caa gtt gct ctg aga aag gga cct tga cat ctc tgt	XhoI	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
ACII_XhoI_HindIII_as	gct gcc <u>aag ctt</u> cta <u>ctc gag</u> gga tgc caa gtt gct ctg	XhoI, HindIII	Mutageneseprimer
ACV_C1_Sall_as	aga <u>gtc gac</u> ctt ctc ttc ttt ccg ctt ctg ggt gca gcg cag gat gag	Sall	Mutageneseprimer
C1b_KYY_as	<u>aag ctt</u> cta <u>ctc gag gtc gac</u> <u>aga tct</u> ata ata ttt aaa cgc cgg	HindIII, XhoI, Sall, BglII	Mutageneseprimer
C2_VAS_as	<u>aag ctt</u> cta <u>ctc gag</u> gct cgc cac gtt gct ctg gct c	HindIII, XhoI	Mutageneseprimer
CqsS_C1_SIA_Q_s	cat gaa gca aaa gtc tca atc gca cag gat acc tgc aac tgc		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_C1_SIA_deltaQ_as	ctt tta atg cag ttg cag gta tct cgc att gag act ttt gct tca tg		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_C2_SIA_K_s	cat gaa gca aaa gtc tca atc gca aaG aac aaa ttt aag aaa gaa c		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_C2_SIA_deltaK_as	gcg ttc ttt ctt aaa ttt gtt tgc gat tga gac ttt tgc ttc atg		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_C1_QQER_s	cat gaa gca aaa gtc tca atc gca cag cag gaa cgc ctg ctt ctg		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_C1_QQER_as	cag aag cag gcg ttc ctg ctg tgc gat tga gac ttt tgc ttc atg		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_C2_LNRV_s	cat gaa gca aaa gtc tca atc gca ctg aac cgc gtg ctg ctg g		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_C2_LNRV_as	cca gca gca cgc ggt tca gtg cga ttg aga ctt ttg ctt cat g		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_RNQV_C1_EFE_as	gtt ttt caa att cta cct ggt ttc gga agt ag		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_RNQV_C1_EFE_s	cga aac cag gta gaa ttt gaa aaa cgc cag		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_RNQ_C2_IET_as	cat cgt ttc aat ctg gtt tcg gaa gta gca c		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
CqsS_RNQ_C2_IET_s	ctt ccg aaa cca gat tga aac gat gga aaa c		Mutageneseprimer für Fusions-PCR

Primer	Sequenz 5' → 3'	Schnittstellen	Bemerkung
hAC2_C2_neu_as	cta att <u>aag ctt</u> Tta <u>ctc gag</u> gct cgc cac gtt gct ctg gct cag gc	HindIII, XhoI	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
hAC2_C1b_neu_as	cta att <u>aag ctt</u> Tta <u>ctc gag gtc gac aga tct</u> ata ata ttt aaa cgc cgg	HindIII, XhoI, Sall, BglII	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
C1a_löslich_s	cat cac <u>gga tcc</u> cag gat acc tgc aac tgc att aaa ag	BamHI	Mutageneseprimer
C2_löslich_s	cat cac <u>gga tcc</u> aag aac aaa ttt aag aaa gaa cgc g	BamHI	Mutageneseprimer
hAC2_C1a_as	GCG <u>aag ctt</u> Tta <u>ctc gag gtc gac aga tct</u> cgg gcg aaa cag atg ctg	HindIII, XhoI, Sall, BglII	Mutageneseprimer
AB_Linker_as	cTc ctg cCg cAg gcg gGc cac cGg ctg cac gcg tat aat att taa acg ccg gca gcg c		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
AB_Linker_s	gcC ggt ggC ccg ccT gcG gca ggA ggt ctc gaa aaa aac aaa ttt aag aaa gaa cgc		Mutageneseprimer für Fusions-PCR
A_Linker_as	cTc ctg cCg cAg gcg gGc cac cGg ctg cac gcg tgc ggc gaa aca gat gct gcg ggc		Mutageneseprimer für Fusions-PCR

Alle Klonierungen für die Rv1625c-Konstrukte für G_{sc}*-Stimulierung wurden von A. Schultz durchgeführt. Alle Sequenzierungs- und Klonierungsprimer sind ihrem Laborbuch zu entnehmen.

3 Ergebnisse

3.1 Solubilisierung von Membranproteinen

Dieser Teil der Dissertation beschäftigt sich mit Möglichkeiten zur Solubilisierung von membrangebundenen ACn. Ziel war der Erhalt löslicher Proteine unter Beibehaltung von Aktivität und Regulation. Konkret wurde versucht sich diesem Ziel in vier verschiedenen Versuchsaufbauten zu nähern. Diese werden im Folgenden vorgestellt.

3.1.1 Insertion geladener Aminosäuren in Membranhelices von Tsr

Zum Verständnis der hier im Fokus stehenden Proteine sollten Mutanten von regulierten und nicht regulierten Varianten solubilisiert werden. Anhand von Kristallisation beider Zustände sollten Rückschlüsse von der Struktur auf den Mechanismus der Signalweiterleitung gezogen werden können. Die hier verwendeten Konstrukte wurden in Anlehnung an Mutationen im Aspartatrezeptor (Tar) geplant (Oosawa and Simon, 1986; Umemura et al., 1998). Die Mutation A19K in TM1 von Tar unterband die Fähigkeit zur Chemotaxis von Aspartat, was aber durch verschiedene Punktmutationen in beiden TMs (V17E, W192R, A198E, V201E, V202L) aufgehoben werden konnte (Oosawa and Simon, 1986; Umemura et al., 1998). Es wurde beobachtet, dass die Mutationen die Effekte von A19K unterschiedlich gut supprimieren konnten, was auf die Möglichkeit zur Ausbildung von Salzbrücken zwischen den Untereinheiten zurückgeführt wurde (Umemura et al., 1998).

Die Mutationen des Tar-Rezeptors wurden auf die Tsr-HAMP_{Tsr}Rv3645 Chimäre übertragen, um eine nicht regulierte Mutante des Proteins zu erhalten. Weitere Mutationen an anderer Stelle innerhalb der beiden TMs sollten diesen Effekt wieder aufheben. Ein Vorteil der Tsr-HAMP_{Tsr}Rv3645 Chimäre ist, dass die beiden TMs des Tsr-Rezeptors möglicherweise einfacher zu solubilisieren sind als etwa das Rv3645-Holoenzym mit sechs TMs. Aktivität und Regulation von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 durch Serin sind publiziert (Kanchan et al., 2010). Anhand des Alignments des Tsr-Rezeptors mit dem Tar-Rezeptor (Fig. 8) wurden Mutationen ausgewählt.

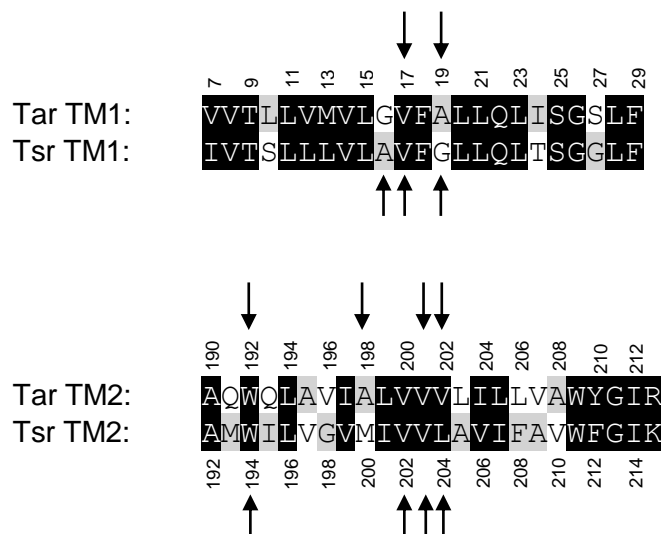
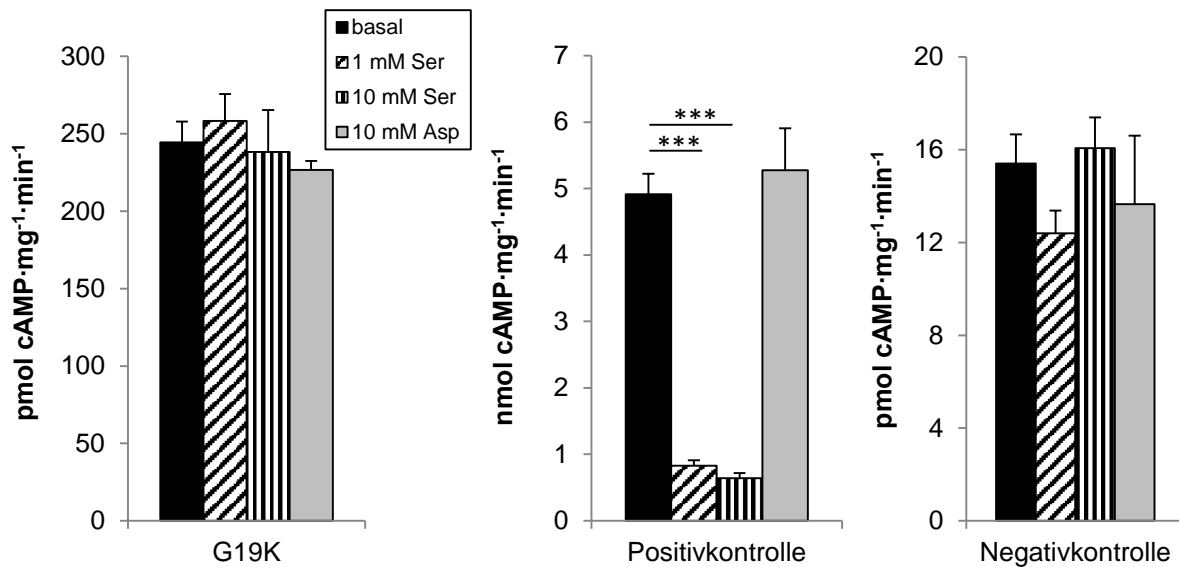


Fig. 8: Alignment der beiden Transmembranhelices (TMs) des Tar- und Tsr-Rezeptors. Die Positionen der ASn in Tar, die zur Ausbildung von Salzbrücken mutiert wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet (Oosawa and Simon, 1986; Umemura et al., 1998). In Anlehnung daran wurden die zu mutierenden ASn in Tsr gewählt (ebenfalls mit Pfeilen gekennzeichnet).

3.1.1.1 Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 [G19K]

Laut des Alignments von TM1 und TM2 aus Tar und Tsr (Fig. 8) ist die AS an Position 19 in Tsr nicht konserviert. Es wurde ermittelt, wie die Chimäre Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 auf die Mutation G19K reagierte. Im AC-Test wurde die Membranpräparation mit Serin und Aspartat getestet. Aspartat dient der Kontrolle der Spezifität des Tsr-Rezeptors. Als Positivkontrolle wurde Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und als Negativkontrolle der Leervektor pQE30 eingesetzt.

A



B

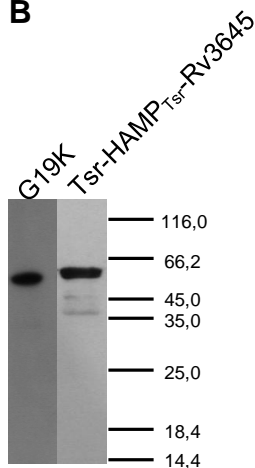


Fig. 9: A) AC-Aktivität der [G19K]-Mutante (n=4), der Positivkontrolle Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (n=6) und Negativkontrolle (pQE30 Leervektor, n=6). Je 20 µg Membranpräparation.

B) Western Blots mit Anti-RGS-His₄ Antikörper der [G19K]-Mutante (links, 2 µg Protein, 5 min Belichtung) und Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (rechts, 2 µg Protein, 30 sec Belichtung), erwartete Bandenhöhe 54 kDa.

Die Positivkontrolle Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 zeigte Basalaktivität von $4,9 \pm 0,3$ nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ und reagierte signifikant (***) auf 1 mM Serin mit einer Hemmung um 84%. Aspartat hatte keine Wirkung. Die Negativkontrolle ergab $15,4 \pm 1,3$ pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. Die [G19K]-Mutante war mit $244,4 \pm 13,4$ pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ aktiver als der Leervektor, hatte aber gegenüber Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 95% Aktivität verloren. Die Mutante war nicht durch Serin reguliert. Offensichtlich führte G19K zu einer dominant gehemmten AC. Das Ausmaß dieser Hemmung war vergleichbar mit der Aktivität der Positivkontrolle mit 10 mM Serin. Das bedeutet unter Umständen, dass G19K in Tsr zu einer Konformation führte, die den ligandengebundenen Zustand imitierte.

3.1.1.2 Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 [V17E/G19K]

Laut Oosawa und Simon (1986) (Oosawa and Simon, 1986) konnte die Mutation V17E in der ersten Transmembrandomäne von Tar die Auswirkungen der [A19K]-Mutation supprimieren. Da diese Position im Alignment von Tar und Tsr (Fig. 8) konserviert ist, wurde ihre Wirkung auf die [G19K]-Mutante untersucht. Da die Positiv- und die Negativkontrolle für alle Konstrukte identisch waren, werden sie nicht mehr separat aufgeführt (Fig. 9).

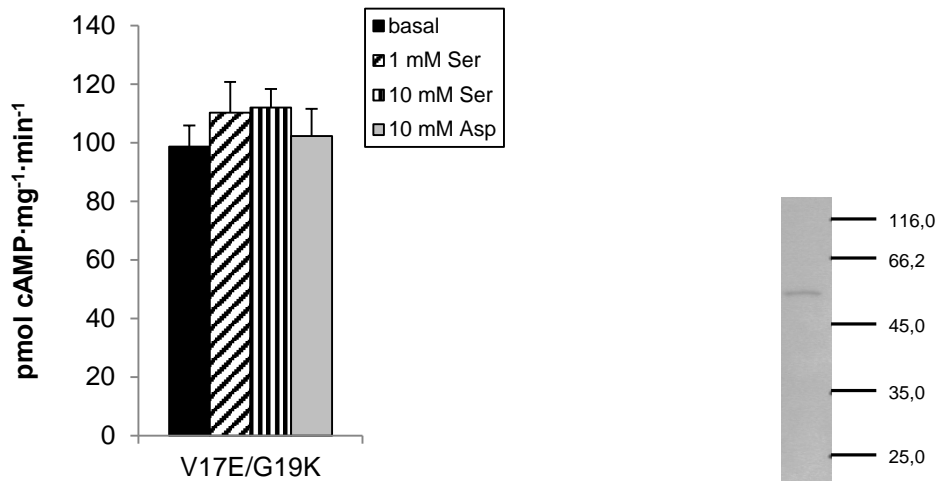


Fig. 10: AC-Aktivität der [V17E/G19K]-Mutante von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (20 µg Membranpräparation, n=4). Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper (2 µg Protein, 5 min Belichtung), erwartete Bandenhöhe 54 kDa.

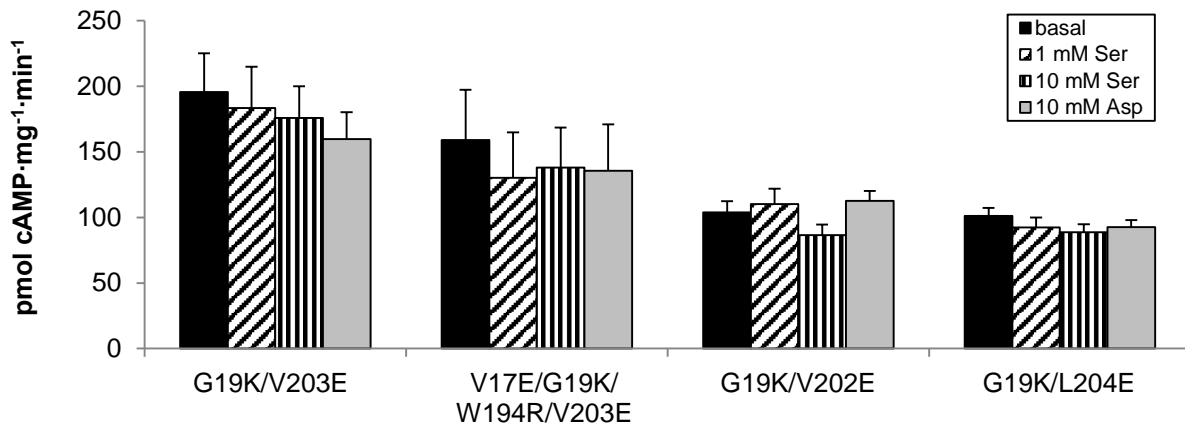
Die Basalaktivität der [V17E/G19K]-Mutante war nochmals um 60% geringer als bei der G19K Mutation. Durch die V17E Mutation ließ sich weder die Aktivität noch die Regulation des Ausgangskonstrukts Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 wieder herstellen. Laut Western Blot wurde die Mutante schwach exprimiert.

3.1.1.3 Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 [G19K/V203E], Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 [V17E/G19K/W194R/V203E], Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 [G19K/V202E], Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 [G19K/L204E]

Da die [V17E/G19K]-Mutante nicht reguliert war, wurden weitere Mutationen in der TM2 entsprechend den Ergebnissen an Tar (Oosawa and Simon, 1986; Umemura et al., 1998) durchgeführt. A198E konnte dort den negativen Effekt von A19K in Tar vollständig aufheben (Umemura et al., 1998). Da diese AS in Tsr nicht konserviert ist (Fig. 8), wurde sie nicht in diese Versuche einbezogen. Alle weiteren in Tar-A19K untersuchten Mutationen in der TM2, W192R, V201E und V202L, konnten die Ausgangsbedingungen aus Tar unterschiedlich erfolgreich wieder herstellen (Umemura et al., 1998). Diese drei Positionen sind in Tsr konserviert und resultierten

in den [G19K/V203E]-, [V17E/G19K/W194R/V203E]- und [G19K/L204E]-Mutanten. Zusätzlich wurde die ebenfalls konservierte Position V202 zu Glu mutiert. Die [V17E/G19K/W194R/V203E]-Mutante ist die einzige Variante, die mittels mehrerer Mutationen versucht die Regulationsfähigkeit zurückzuerlangen.

A



B

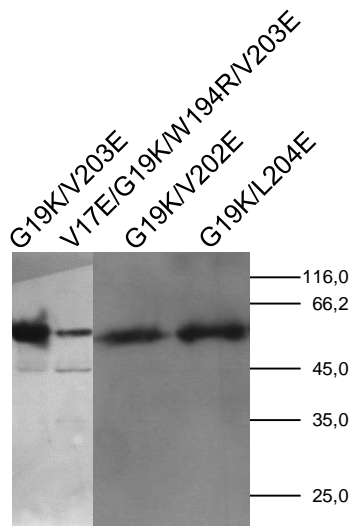


Fig. 11: A) AC-Aktivität der [G19K/V203E]-, [V17E/G19K/W194R/V203E]-, [G19K/V202E]- und [G19K/L204E]-Mutante von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (je 20 µg Membranpräparation, n=4).

B) Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper. Von li nach re: [G19K/V203E]-Mutante, [V17E/G19K/W194R/V203E]-Mutante (je 2 µg Protein, 5 min Belichtung), [G19K/V202E]-Mutante, [G19K/L204E]-Mutante (je 4 µg Protein, 30 sec Belichtung). Erwartete Bandenhöhe 54 kDa.

Alle Mutanten zeigten eine geringere Basalaktivität als die [G19K]-Mutante und waren nicht durch Serin reguliert. Die [G19K/V203E]-Mutante hatte eine Aktivität von $195,7 \pm 29,6$ pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, die [G19K/V202E]-Mutante $103,8 \pm 8,6$ pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ und die [G19K/L204E]-Mutante $101,1 \pm 6,3$ pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. Selbst die Kombination der Mutationen V17E/G19K/W194R/V203E konnte keine Regulation der AC herstellen ($159,0 \pm 38,3$ pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹).

3.1.1.4 Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 [A16K]

Entsprechend dem Alignment der TMs von Tar und Tsr (Fig. 8) ist die Position 19 nicht konserviert. Die Position 16 in Tsr und Tar ist ähnlich zu Position 19, hier ist Ala in Tsr und Gly in Tar. Der Effekt einer [A16K]-Mutante auf das Ausgangskonstrukt Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 wurde daher untersucht.

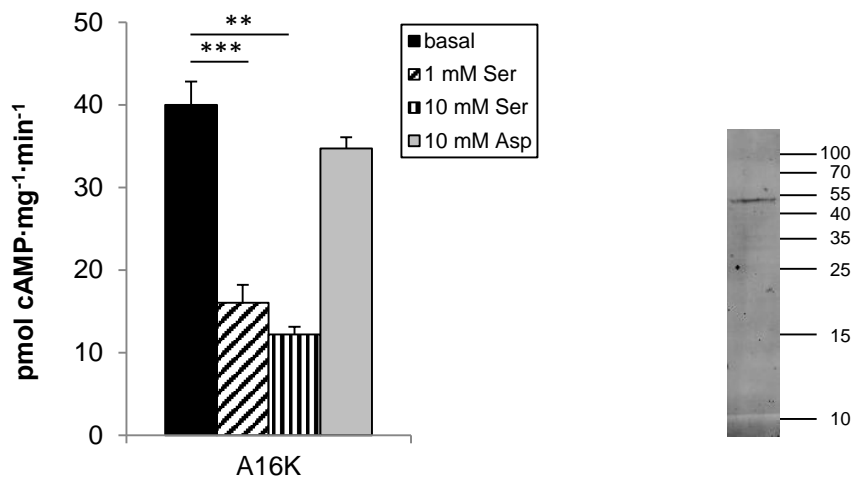


Fig. 12: AC-Aktivität der [A16K]-Mutante von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (20 µg Membranpräparation, n=4). Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper (5 µg Protein), erwartete Bandenhöhe 54 kDa.

Die Basalaktivität der [A16K]-Mutante war mit $40,0 \pm 2,9$ pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ ungefähr doppelt so hoch wie der Wert des Leervektors und um 84% geringer als die der G19K Mutation. Im Gegensatz zu dieser konnte bei A16K eine signifikante Hemmung (***) von 60% durch 1 mM Serin festgestellt werden. Die A16K-Mutation hat somit nur Einfluss auf die Aktivität des Konstrukts, während die Regulation fast wie bei Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 erhalten bleibt (84%-ige Hemmung bei 1 mM Serin, Fig. 9A). 10 mM Aspartat wirkte sich nicht auf die Aktivität aus. A16K in Tsr wirkt sich also nicht wesentlich auf die Serinregulation aus, es werden offensichtlich andere Proteineigenschaften erheblich beeinträchtigt.

3.1.1.5 Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 [A16K/V203E]

Zur Kompensation des A16K Effekts wurde einzig die Mutation V203E aus dem konservierten Bereich des Tar-Tsr-Alignments herangezogen (Fig. 8).

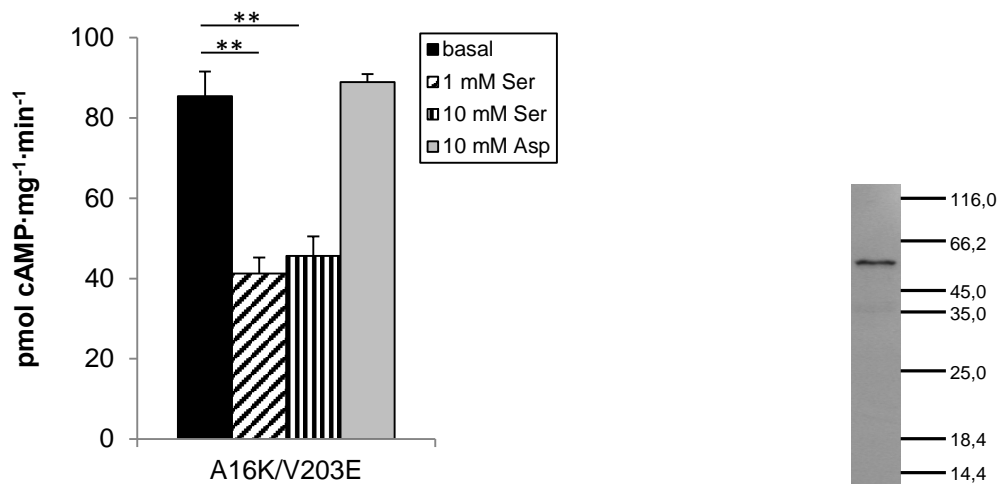


Fig. 13: AC-Aktivität der [A16K/V203E]-Mutante von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (20 µg Membranpräparation, n=4). Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper (2 µg Protein, 30 sec Belichtung), erwartete Bandenhöhe 54 kDa.

Für die [A16K/V203E]-Mutante wurde mit $85,4 \pm 6,1$ pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ eine doppelt so hohe Basalaktivität im Vergleich zur [A16K]-Mutante erreicht. Die Hemmung durch 1 mM Serin war signifikant (** = p<0,01) und betrug 52%. Die Aktivitäten reichten jedoch in keiner Weise an die Werte des Ausgangskonstrukts Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 heran.

Mit A16K und G19K wurden zwei Mutationen in der TM1 von Tsr mit erheblichem negativem Effekt auf die AC-Aktivität gefunden. Hier sind die Ergebnisse mit den Erkenntnissen am Tar-Rezeptor vergleichbar. Bei der G19K-Mutante war die Regulation gestört, während bei der A16K-Mutante nur die Aktivität betroffen war und die Regulation erhalten blieb. Trotz Mutationen an verschiedenen Stellen in TM1 und TM2 konnte keine Variante die Regulation in der G19K-Mutante wiederherstellen und die Aktivität wurde weiter gemindert. Bei der A16K-Mutante blieb die Regulation mit der zusätzlichen Mutation in TM2 fast unverändert. Auch wenn v.a. die Ergebnisse der A16K/V203E-Mutante Hoffnung auf eine Steigerungsmöglichkeit der Aktivität gegeben haben, wurde hier nicht weiter gearbeitet.

3.1.2 Insertion hydrophiler Aminosäuren in die zweite Transmembranhelix von Tsr

Im nächsten Ansatz wurde getestet, welche und wie viele ASn in TM2 von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 ohne Funktions- und Regulationsverlust gegen hydrophile Reste ausgetauscht werden können. Dies sollte die anschließende Solubilisierung des Transmembranbereichs erleichtern. Mutationsstudien an den Transmembranhelices von Tsr lagen vor (J. S. Parkinson, persönliche Mitteilung, Anhang 1). Dort wurden in fortlaufender Reihenfolge einzelne ASn in den TMs mutiert und die Mutationen entsprechend ihrem Einfluss auf die Tsr-Rezeptorfunktion geordnet. K. Kanchar untersuchte in ihrer Dissertation eine Chimäre mit insgesamt 15 AS-Substitutionen in

beiden Transmembranhelices (Kanchan, 2011), die laut den Mutationsstudien von J. S. Parkinson einzeln kaum zur Beeinträchtigung der Rezeptorfunktion führten. In der Summe ergaben diese 15 Austausche in der erwähnten Chimäre aber ein nicht reguliertes Konstrukt. In Fig. 14 sind die 15 mutierten ASn dieser Chimäre Tsr-(mut)-Rv3645 dargestellt (Kanchan, 2011).



Fig. 14: Darstellung der Mutationen in TM1 und TM2 in Tsr-(mut)-Rv3645 von K. Kanchan entsprechend den Mutationsstudien von J. S. Parkinson.

3.1.2.1 Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 [A192S/L196Q/F208S]

Die vorhergehenden Experimente zeigten, dass bereits einzelne AS-Austausche in der TM1 erheblichen Einfluss auf Aktivität und Regulation der AC haben können. Deshalb wurden keine Mutationen in der TM1 geplant. Die TM2 ist möglicherweise verträglicher gegenüber Mutationen, da selbst ein Austausch der ganzen TM2 von Tar durch die von Tsr und umgekehrt die jeweilige Rezeptorfunktion unbeeinträchtigt lässt (Tatsuno et al., 1994). In Anlehnung an Tsr-(mut)-Rv3645 (Fig. 14) wurden als erste Mutationen A192S, L196Q und F208S anhand der folgenden Kriterien ausgewählt. A192 ist die erste AS der TM2 und möglicherweise einfacher in eine hydrophile AS zu mutieren als eine Position inmitten des Transmembranbereichs. Die A192S- bzw. L196Q-Mutante besitzen laut den Mutationsstudien (von J. S. Parkinson) immer noch eine fast unbeeinträchtigte Rezeptorfunktion. Außerdem wurde die Mutation F208 zu Tyr, Ser und Cys getestet (J. S. Parkinson). Obwohl F208Y die Rezeptorfunktion am wenigsten beeinträchtigte, wurde die Mutation F208S ausgewählt, da es sich um eine kleinere AS im Vergleich zu Tyr handelt. Zusätzlich zeigt Ser im Vergleich mit Tyr deutlich weniger Ähnlichkeit zu Phe. Die Ergebnisse der Positivkontrolle Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und der Leervektor pQE30 als Negativkontrolle sind Fig. 9 zu entnehmen.

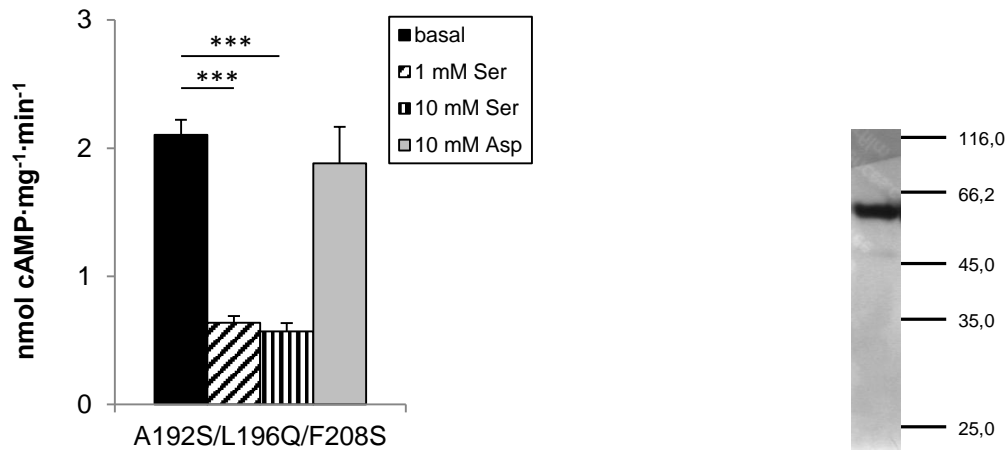


Fig. 15: AC-Aktivität der [A192S/L196Q/F208S]-Mutante von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (20 µg Membranpräparation, n=4). Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper (2 µg Protein, 5 min Belichtung), erwartete Bandenhöhe 54 kDa.

Die [A192S/L196Q/F208S]-Mutante zeigte mit $2,1 \pm 0,1$ nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ ungefähr 40% der Aktivität des Ausgangskonstrukts. Die Hemmung durch 1 mM Serin war signifikant (***) = $p < 0,001$) bei 70%. Die erhaltene Bande im Western Blot erschien wie bei fast allen vorherigen Konstrukten zu hoch. Wahrscheinlich liegt die Ursache darin, dass für diese Proteingröße eine zu hohe Dichte des SDS-Gels gewählt wurde und der Standard in diesem Bereich nicht mehr linear verläuft. Da jedoch keine Abbaubanden detektiert wurden und das Protein sowohl aktiv als auch reguliert war, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der Bande um das gewünschte Protein handelte. Eine zusätzliche Fehlerquelle war die Übertragung der Markerlinien per Hand durch Übereinanderlegen der Coomassie-gefärbten Membran und der Röntgenfilme.

3.1.2.2 Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 [A192S/W194R/L196Q/M200K/F208S]

Da die [A192S/L196Q/F208S]-Mutante Aktivität und Regulation zeigte, wurden die zusätzlichen Mutationen W194R und M200K eingefügt. Beide Mutationen hatten einzeln keinen negativen Einfluss auf die Rezeptorfunktion (J. S. Parkinson). Vier der fünf eingebrachten Mutationen befinden sich in der ersten Hälfte der TM2.

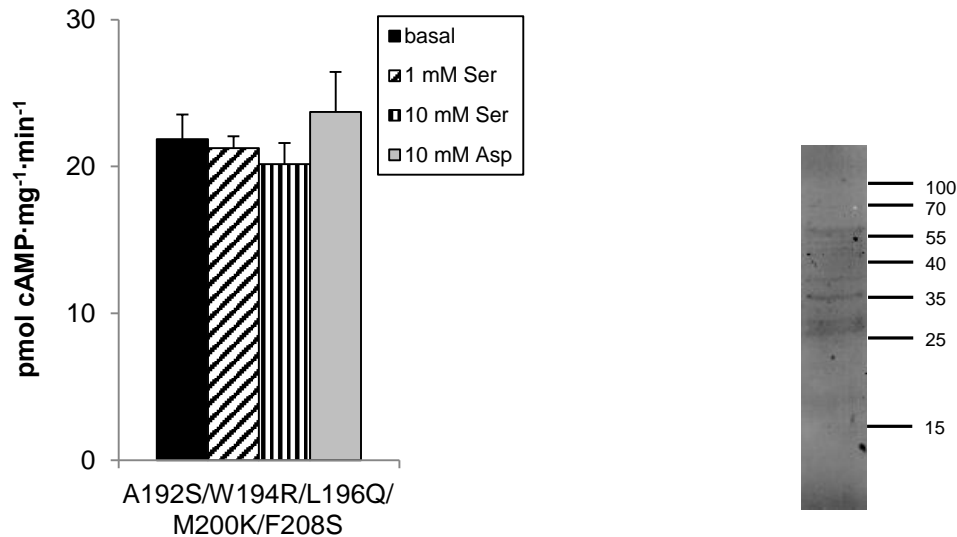


Fig. 16: AC-Aktivität der [A192S/W194R/L196Q/M200K/F208S]-Mutante von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (20 µg Membranpräparation, n=4). Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper (5 µg Protein), erwartete Bandenhöhe 54 kDa

Die [A192S/W194R/L196Q/M200K/F208S]-Mutante zeigte mit ca. 22 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ kaum AC-Aktivität verglichen mit der [A192S/L196Q/F208S]-Mutante (Negativkontrolle ca. 15 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹). Das Konstrukt war nicht durch Serin reguliert. Höchstwahrscheinlich wurde das Protein nur schwach exprimiert, da keine eindeutige Bande im Western Blot nachweisbar war.

Die getestete Kombination dieser fünf Mutationen war weder mit einer vernünftigen Expression noch mit der Regulation der AC verträglich. Weitere mögliche AS-Austausche mit hydrophilen Resten, welche die Tsr-Rezeptorfunktion nicht beeinträchtigten, wären entsprechend den Mutationsstudien F208Y und G213C/S (J. S. Parkinson). Alle anderen Mutationen störten den Rezeptor in unterschiedlich starkem Ausmaß (J. S. Parkinson). Auf die Suche nach weiteren Mutationskombinationen in der TM2 wurde verzichtet, da der Einsatz von Fusionsproteinen gutes Gelingen bei der Solubilisation von Membranproteinen versprach.

3.1.3 Fusionsproteine zur Unterstützung der Solubilisation

Der Einsatz von Fusionsproteinen ist vielfältig und aus der Biotechnologie nicht mehr wegzudenken. Durch genetische Fusion entstehen rekombinante Proteine mit den kombinierten Eigenschaften der jeweiligen Ausgangsmoleküle (Uhlen et al., 1992). Anwendungsmöglichkeiten sind beispielsweise die Reinigung von Proteinen mittels His-Tag über Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen (IMAC) (Uhlen et al., 1992), Detektion von Proteinen mit Hilfe von GFP (Muller-Lucks et al., 2012), Erhöhung der Proteinmenge in Überexpressionssystemen mit Mistic („*m*embrane-*i*ntegrating *s*equences for *t*ranslation of *i*ntegral membrane protein

constructs“) (Blain et al., 2010), Schutz der rekombinanten Proteine vor proteolytischem Abbau oder gezielte Pharmakotherapie (Uhlen et al., 1992). Bei diesen Anwendungen wird das Fusionsprotein meist N- oder C-terminal mit dem zu untersuchenden Protein verknüpft und kann bei Bedarf durch das Einfügen bestimmter Schnittstellen (z.B. für Thrombin oder *factor Xa*) entfernt werden (Uhlen et al., 1992). Das Fusionsprotein kann auch mitten in ein anderes Protein eingefügt werden, was im Fall des T4 Lysozyms die Kristallisation des β_2 -adrenergen Rezeptors erleichterte (Rosenbaum et al., 2007). Ein weiterer Vorteil ist, dass hydrophile und gut lösliche Fusionsproteine die Solubilisierung ihrer Partnerproteine begünstigen und die Bildung von Aggregaten oder *inclusion bodies* bei der Überexpression reduzieren können. Bekannte Vertreter dieser Fusionsproteine sind Thioredoxin, Glutathion-S-Transferase oder das Maltose-Bindeprotein (Kapust and Waugh, 1999). Für die Solubilisierung von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 wurden T4L* und eine Kombination aus YaiN und YbeL als Fusionsproteine eingesetzt, welche in anderen Arbeiten bereits gute Ergebnisse beim Einsatz mit Membranproteinen gezeigt hatten (Leviatan et al., 2010; Rosenbaum et al., 2007).

3.1.3.1 T4* Lysozym

Das Lysozym des Bakteriophagen T4 (T4L) ist ein lösliches Enzym mit bekannter Struktur (Baase et al., 2010). T4L wurde z.B. für die Kristallisation des β_2 -adrenergen Rezeptors verwendet, da es in Fusion mit dem Protein die hydrophile Oberfläche vergrößerte, die interne Flexibilität im Partnerprotein reduzierte und somit die Kristallisationseigenschaften entscheidend verbesserte (Cherezov et al., 2007). Durch die hier verwendete Mutation E11N ist T4L enzymatisch inaktiv (T4L*) und unfähig bakterielle Zellwände aufzuspalten (Shoichet et al., 1995). Diese Eigenschaft ist von Bedeutung, wenn T4L mit Peptidoglycan der Bakterienwand in Kontakt treten kann und seine Endoacetylmuramidase-Aktivität (Matthews et al., 1981) unerwünscht ist. Dies war bei einem der beiden folgenden Konstrukte der Fall.

Um den idealen Verknüpfungspunkt von T4L* mit Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 zu ermitteln, erfolgte die Fusion an zwei verschiedenen Stellen. Das Lysozym wurde auf beiden Seiten der Membran eingefügt, da sich die Positionierung möglicherweise unterschiedlich auf die Solubilisierung auswirkt. T4L* wurde im ersten Konstrukt N-terminal an Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 fusioniert (T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645). Dies hatte zur Folge, dass T4L* im rekombinanten Protein im Cytoplasma lokalisiert war. Im zweiten Konstrukt wurde T4L* im Periplasma zwischen dem Ende der TM1 (F₂₉) und der periplasmatischen Schleife (F₃₀) des Tsr-Rezeptors positioniert (TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645) (Fig. 17).

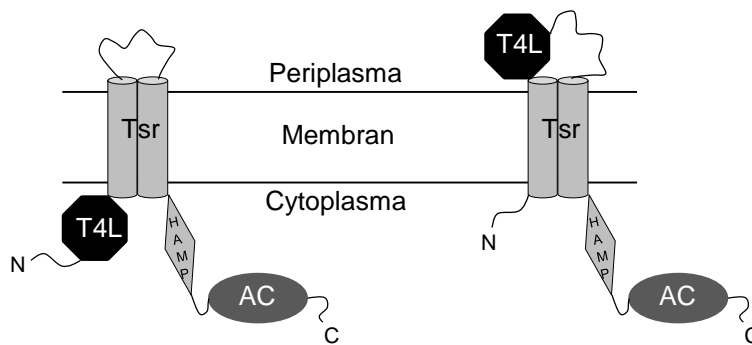


Fig. 17: Schematische Darstellung von T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (links) und TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (rechts). Die Konstrukte sind Dimere und unterscheiden sich durch die Position von T4L* im Cytoplasma oder im Periplasma.

Bevor mit den Solubilisationsversuchen begonnen wurde, musste zunächst die Funktionalität des Fusionsproteins in der Membran untersucht werden. Das Konstrukt Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 diente als Positivkontrolle und der Leervektor pQE30 als Negativkontrolle (Fig. 9).

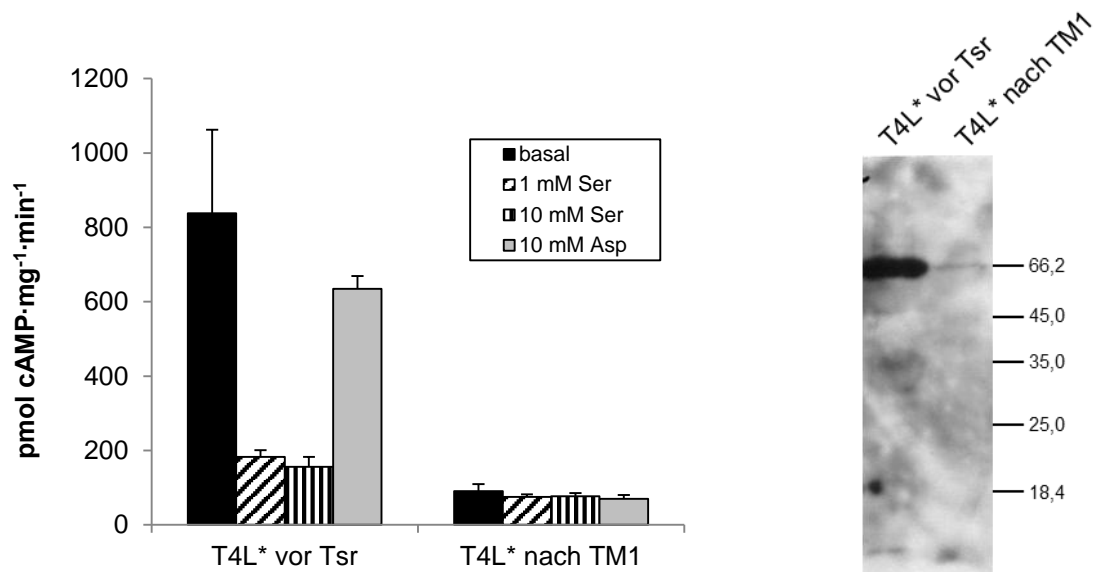


Fig. 18: AC-Aktivität von T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (links) und TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (rechts) (20 µg Membranpräparation, n=4). Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper von T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (links) und TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (rechts), je 8 µg Protein, 5 min Belichtung. Erwartete Bandenhöhe 72 kDa.

Bei T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 mit T4L* als cytosolischem Anteil lag die Basalaktivität bei ca. 840 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ mit einer Hemmung von 78% bei 1 mM Serin (p=0,06). War T4L* bei TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 im Periplasma lokalisiert, sank die Basalaktivität auf ca. 90 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ und Serin regulierte nicht

mehr. Im Western Blot ist zu sehen, dass letzteres Konstrukt nur sehr gering exprimiert wurde. Die Banden scheinen tiefer als erwartet zu laufen, jedoch kann angemerkt werden, dass die Überexpressionsbanden in Coomassiegefärbten SDS-Gelen erkennbar über der 66,2 kDa Markerbande detektiert wurden (Fig. 19). Bei diesem Western Blot handelt es sich vermutlich um Ungenauigkeiten bei der Übertragung des Markers von der gefärbten Membran auf den Röntgenfilm.

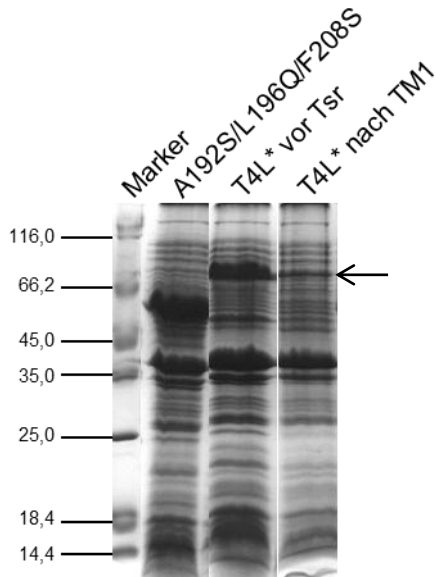


Fig. 19: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel mit Protein-Marker I, Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 [A192S/L196Q/F208S], T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (von li nach re). 5 µl Marker, je 20 µg Membranpräparation, erwartete Bandenhöhe 54 kDa [A192S/L196Q/F208S] bzw. 72 kDa T4L*-Konstrukte (Pfeil). [A192S/L196Q/F208S] dient zum Vergleich der Überexpressionsbanden der T4L*-Konstrukte.

Auf Grund der niedrigen Aktivität von T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und dem Verlust der Regulation von TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 wurden keine weiteren Experimente mit T4L* als Fusionsprotein durchgeführt. Da allem Anschein nach eine Fusion an einem der Termini von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 toleriert wurde, konzentrierten sich die Versuche auf die Fusionsproteine YaiN und YbeL. Nur bei Erhalt von Regulation und Aktivität im gelösten Protein kann angenommen werden, dass eine daraus resultierende Kristallstruktur einem realen Zustand entspricht.

3.1.3.2 YaiN und YbeL

Bei YaiN und YbeL handelt es sich um zwei stark hydrophile bakterielle Proteine mit einer Länge von ungefähr 100 ASn. Eine globuläre Struktur wird nicht vorhergesagt. YaiN (91 ASn) stammt aus dem *E. coli* Operon *frm* und ist vermutlich am Abbau von Formaldehyd beteiligt. YbeL (120 ASn) ist Teil des *E. coli* *YbeL* Gens mit unbekannter Funktion (Leviatan et al., 2010). In der Arbeit von Leviatan et al. (2010) (Leviatan et al., 2010) wurden acht verschiedene Expressionskassetten mit diesen zwei Fusionsproteinen konstruiert. Die beiden Proteine befanden sich jeweils N- oder C-terminal oder an beiden Termini des zu untersuchenden Membranproteins (Fig. 20). Dies beeinflusste sowohl die Expression der Fusionsproteine als auch das

Herauslösen aus der Membran. Deshalb müssen alle acht möglichen Fusionsstellen durchgetestet werden.

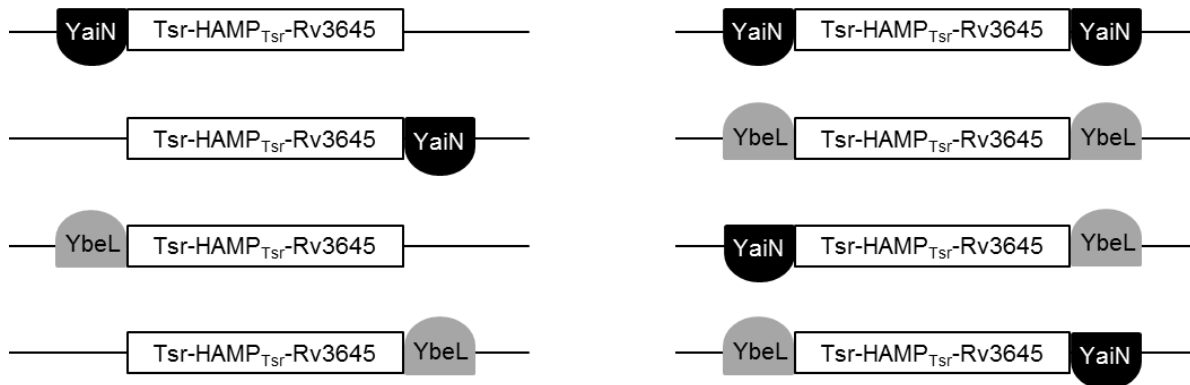


Fig. 20: Acht mögliche Expressionskassetten mit den Fusionsproteinen YaiN und YbeL und der zu solubilisierenden Chimäre Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645.

3.1.3.2.1 Expressionskassetten

Die acht verschiedenen Fusionsproteine von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 mit YaiN und YbeL (Fig. 20) und Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 als Kontrolle wurden in pET28a(+) angelegt, da dieser Vektor zur Reinigung und Detektion des Proteins mit einem N- und C-terminalen His₆-Tag versehen ist. Die Konstrukte wurden in *E. coli* C43(DE3) exprimiert, da dieser Stamm generell eine höhere Verträglichkeit gegenüber toxischen rekombinanten Proteinen besitzt als *E. coli* BL21(DE3) (Dumon-Seignovert et al., 2004). Fig. 21 zeigt den Vergleich der Aktivitäten von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 in *E. coli* BL21(DE3) pREP4 pQE30 und *E. coli* C43(DE3) pET28a(+), die Negativkontrolle *E. coli* C43(DE3) pET28a(+) Leervektor und deren Western Blots.

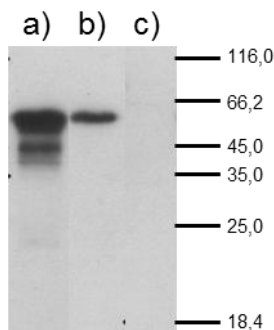
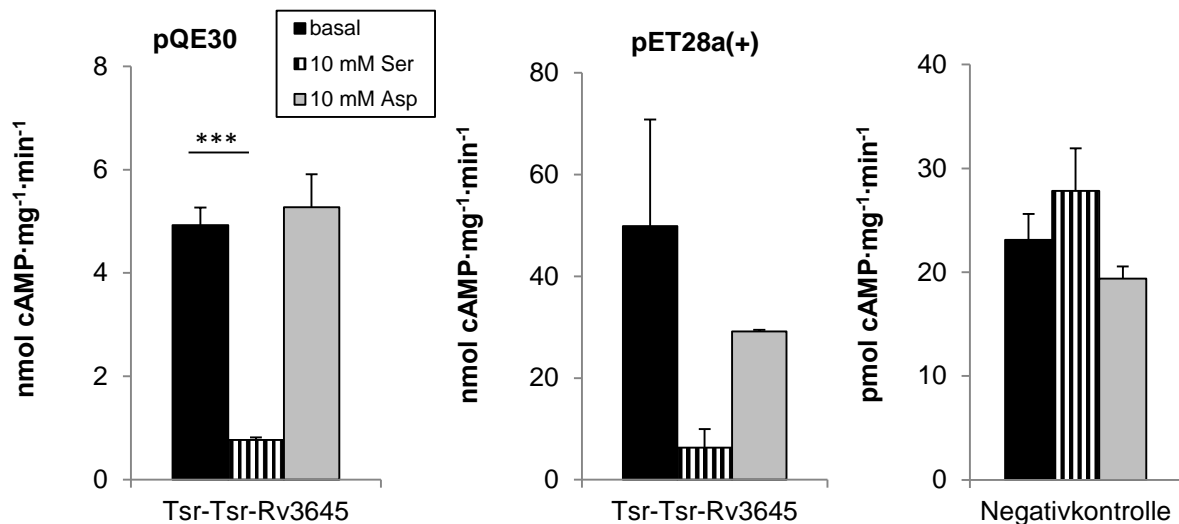


Fig. 21: AC-Aktivität von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 in *E. coli* BL21(DE3) pREP4 pQE30 (n=6-18) und *E. coli* C43(DE3) pET28a(+) (n=2-3) und Negativkontrolle *E. coli* C43(DE3) pET28a(+) Leervektor (n=2), je 20 µg Membranpräparation. Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper für a) Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 in pQE30, b) Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 in pET28a(+), c) Negativkontrolle pET28a(+) (je 5 µg Protein, 2 sec Belichtung), erwartete Bandenhöhe 54 kDa.

Die Basalaktivität des Leervektors pET28a(+) lag bei ca. 23 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. Die Basalaktivität der Chimäre Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 betrug in pQE30 nur ein zehntel der Aktivität in pET28a(+) (signifikant, *** = p<0,001). In pQE30 betrug sie 4,9 ± 0,3 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, während sie in pET28a(+) 49,9 ± 21,0 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ erreichte. Die Hemmung durch 10 mM Serin betrug 83% (pQE30) bzw. 87% (pET28a(+)).

Anschließend wurden die Auswirkungen der Fusionsproteine YaiN und YbeL auf die Aktivität von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 in den acht Expressionskassetten von pET28a(+) untersucht (Fig. 22).

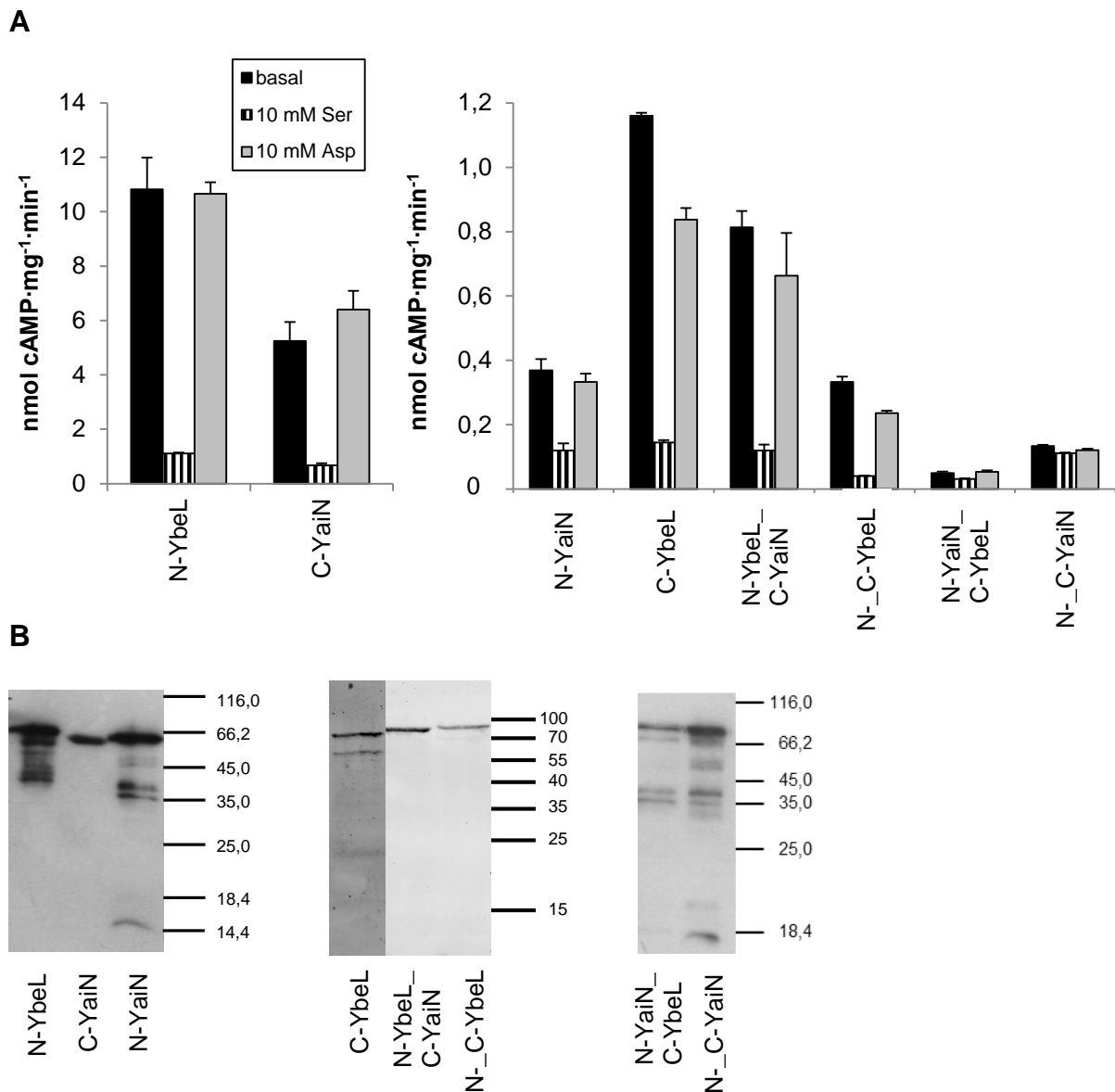


Fig. 22: A) AC-Aktivität der acht Fusionskonstrukte von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 mit YaiN und YbeL. Die Konstrukte sind nach der Position des Fusionsproteins benannt (z.B. N-YbeL = YbeL N-terminal von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645). Je 20 µg Membranpräparation, n=2.

B) Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper. Von li nach re: N-YbeL (70 kDa), C-YaiN (66 kDa), N-YaiN (66 kDa) (je 5 µg Protein, 10 sec Belichtung), C-YbeL (70 kDa, 5 µg Protein), N-YbeL_C-YaiN (80 kDa), N_C-YbeL (84 kDa) (je 10 µg Protein), N-YaiN_C-YbeL (80 kDa), N_C-YaiN (76 kDa) (je 5 µg Protein, 2 sec Belichtung).

Verglichen mit Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 in pET28a(+) verlieren die Fusionskonstrukte mit YaiN und/oder YbeL an Aktivität. Mit Ausnahme von N-YaiN_C-YbeL und N-YaiN_C-YaiN wurden alle Fusionskonstrukte durch 10 mM Serin zwischen 67-92% gehemmt.

3.1.3.2.2 N-YbeL

Für Solubilisierungsversuche wurde nur mit dem aktivsten regulierten Konstrukt N-YbeL weitergearbeitet. In Vorversuchen (n=2) in kleinem Maßstab (200 µl Membranpräparation mit 50 µl Detergenzlösung) wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Detergenzien und deren Konzentration auf die Aktivität und Regulation untersucht. Als Kontrolle diente Membranpräparation mit Zugabe von Puffer anstatt Detergenzlösung. Nach Inkubation der Membranpräparation für 1 h mit 0,5, 1 und 2% DDM bzw. C₁₂E₈ wurde zentrifugiert (20.800 x g, 30 min, 4°C) und in Überstand und Pellet getrennt. Nach Auflösen des Pellets in Solubilisierungspuffer wurden beide Fraktionen getestet (Tab. 16).

Tab. 16: AC-Aktivitäten der Membranpräparation von N-YbeL mit und ohne Detergens (Inkubation 1 h, auf Eis, leicht schütteln, n=2). Mit Detergens behandelte Präparationen wurden auf AC-Aktivität in Überstand (ÜS) und Pellet (P) getestet.

	ohne Detergens	Konzentration DDM [%]						Konzentration C ₁₂ E ₈ [%]					
		0,5		1		2		0,5		1		2	
		ÜS	P	ÜS	P	ÜS	P	ÜS	P	ÜS	P	ÜS	P
basal [pmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	9571	233	78	223	63	193	54	178	44	127	24	124	26
10 mM Ser [pmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	861	159	65	186	61	147	52	143	27	105	22	110	25
Hemmung [%]	91	32	17	17	3	24	4	20	39	17	10	11	5

Mit Detergens wurden nur maximal 2% der Aktivität der Kontrolle erreicht. Mit höherer Detergenkonzentration nahm die Aktivität tendenziell weiter ab, die Regulation bzw. Hemmung durch 10 mM Serin lag bei maximal 32%. C₁₂E₈ hemmte noch stärker als DDM. Die Restaktivität im Pellet war gering und teilweise nur auf Höhe der Negativkontrolle (Fig. 21). Auf Grund der Ergebnisse für DDM und C₁₂E₈ wurde entschieden das Detergens zu wechseln. Die Solubilisierung im großen Ansatz (Membranpräparation aus 800 ml LB-Expressionsansatz) wurde mit 1% Brij58 für ca. 4 h auf Eis bei 4°C durchgeführt. Der mit Ni-NTA gereinigte Proteinüberstand wurde zur Gelfiltration (GF) auf eine Superdex-200 10/30 Säule aufgetragen. Der verwendete GF-Puffer enthielt nur noch 0,05% Brij58. Das Ergebnis der Auftrennung bei der Gelfiltration ist in Fig. 23 zu sehen.

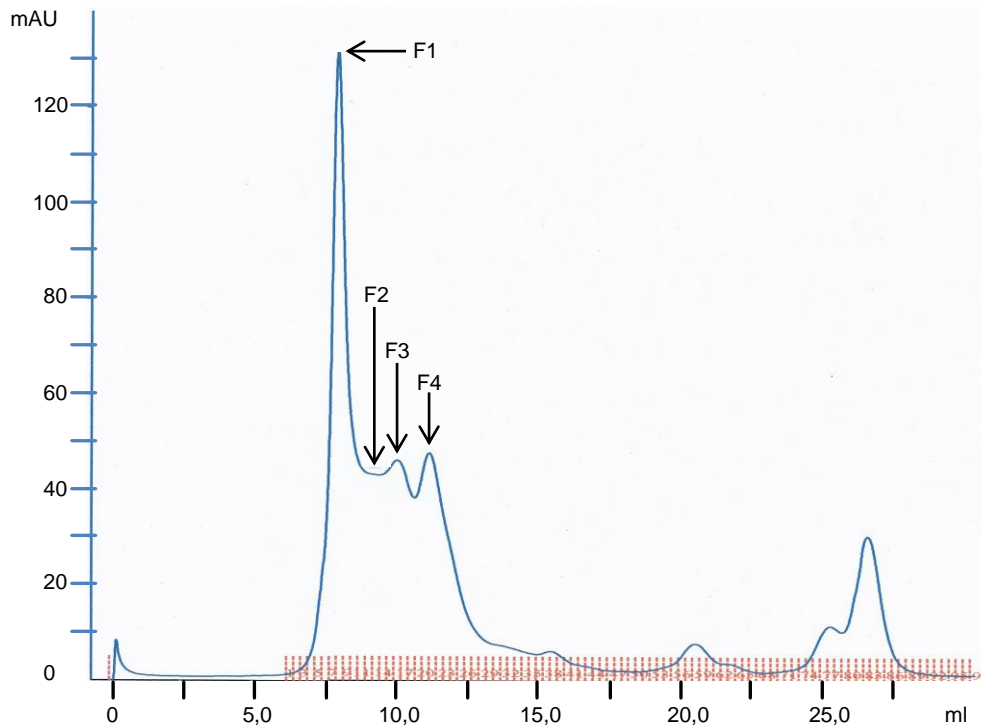


Fig. 23: Auftrennung des solubilisierten N-YbeL (nach Ni-NTA Reinigung) durch Gelfiltration auf einer Superdex-200 10/30 Säule. Laufbedingungen: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 0,05% Brij58, Absorption bei 280 nm. Ab 6 ml wurde fraktioniert (0,5 ml Fraktionen). Für den AC-Test wurden mehrere Fraktionen gepoolt (F1-4) und getestet.

Zur Größenbestimmung der eluierten Proteine wurde eine Kalibriergerade für die Superdex-200 10/30 Säule in GF-Puffer erstellt. Die verwendeten Markerproteine (Konzentration je Protein 2 mg·ml⁻¹, je 200 µl aufgetragen) und die erhaltene Kalibriergerade zeigt Fig. 24.

Marker	MW [kDa]	V _{Elution} [ml]
Cytochrom C	12,5	18,25
Ovalbumin	43	15,19
Phosphorylase b	96	13,28
Thyroglobulin	669	9,57

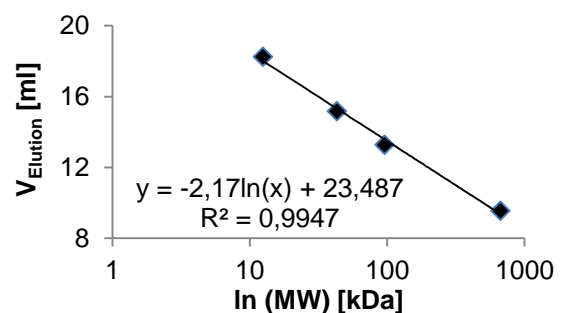
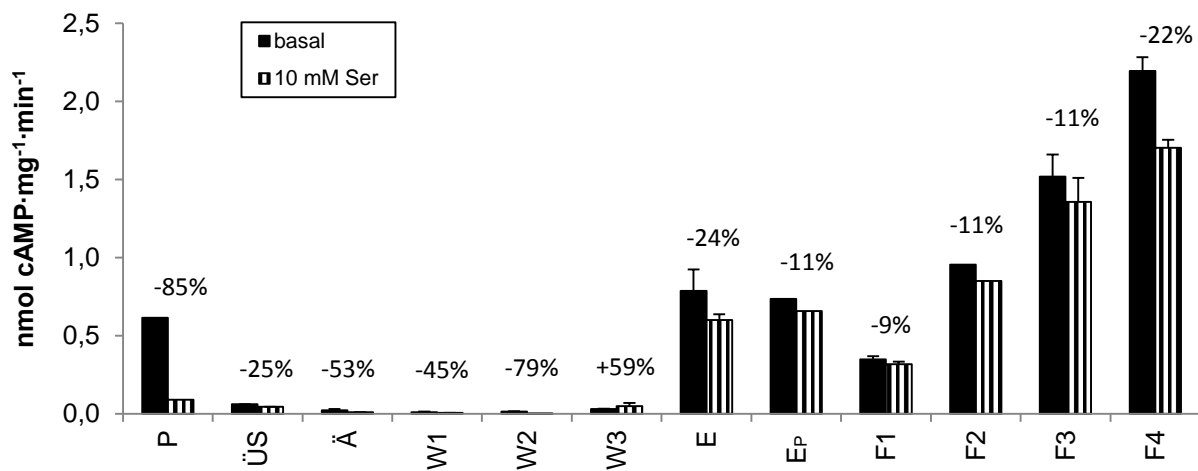


Fig. 24: Links Tabelle mit Markerproteinen für eine Superdex-200 10/30 Säule in GF-Puffer. Rechts daraus resultierende Kalibriergerade mit Gleichung.

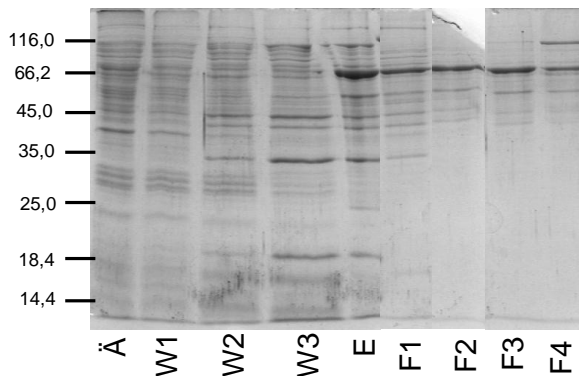
Laut der Kalibriergerade wäre die Elution des 70 kDa großen N-YbeL (Monomer) bei ungefähr 14,3 ml zu erwarten. Die prominenten Peaks (F1-4) wurden jedoch bereits früher eluiert. Bei F3 und F4 könnte es sich um das Tetramer (erwartet bei ca. 11,3 ml) bzw. das Dimer (erwartet bei ca. 12,8 ml) handeln. Da F1-4 ineinander

übergehen, war mit keiner guten Auftrennung zu rechnen. Möglicherweise bildeten sich Agglomerate auf Grund der hohen Ausgangskonzentration der aufgetragenen Proteinprobe. Die Aktivität der gepoolten Fraktionen von F1-4 wurde im AC-Test untersucht. Die Peaks mit einem Elutionsvolumen von 27 ml wurden nicht untersucht, da es sich hierbei normalerweise um sehr kleine Moleküle handelt, die kurz vor dem totalen Säulenvolumen eluiert werden. Falls Moleküle unspezifisch an das Gelfiltrationsmedium binden, kann dies mit vermehrten Waschschritten oder Änderungen in der Pufferzusammensetzung unterbunden werden.

A



B SDS-PAGE



C Western Blot

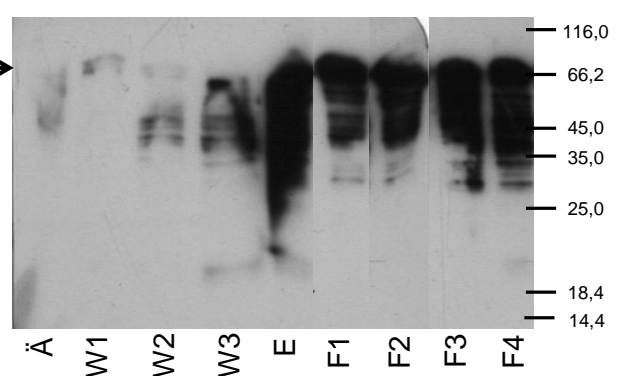


Fig. 25: A) AC-Aktivität von N-YbeL (n=2) nach Solubilisation in 1% Brij58 (P = Pellet, ÜS = Überstand), bei Reinigung mit Ni-NTA (Ä = Äquilibrium, W1-3 = Waschschritte 1-3, E = Elution, EP = Pellet des Eluats) und nach Gelfiltration mit 0,05% Brij58 (F1-4 = Fraktionen 1-4). 1-3 µg Protein für F1-4, sonst je 20 µg Protein. Prozentuale Hemmung (-) bzw. Aktivierung (+) durch 10 mM Serin im Diagramm angegeben. Nähere Erläuterung im Text.

Fig. 25 (vorige Seite): B) 15% SDS-Gel mit Proben nach Reinigung mit Ni-NTA (Ä, W1-3, E = 5 µg Protein) und nach Gelfiltration (F1-4 = 1-1,7 µg Protein), erwartete Bandenhöhe 70 kDa mit Pfeil markiert.

C) Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper mit denselben Proben (10 sec Belichtung).

Das Ergebnis des AC-Tests (Fig. 25, n=2) machte deutlich, dass nach Zugabe von 1% Brij58 die Basalaktivität gegenüber der Membranpräparation zurückging. Nach der Solubilisierung wurde die Proteinlösung zentrifugiert, um die Restaktivität im Pellet (P) bestimmen zu können. Sie betrug nur noch ein sechzehntel im Vergleich mit der Membranpräparation und zeigte Regulation durch 10 mM Serin (85% Hemmung). Der Überstand (ÜS) hatte eine zehnfach geringere Basalaktivität als das Pellet und noch 25% Hemmung durch 10 mM Serin. Die einzelnen Waschschrte bei der Ni-NTA-Reinigung (Ä = Äquilibrierung mit dem Überstand, Waschschrte W1-3) wiesen kaum Aktivität auf, d.h. das Protein wurde nicht frühzeitig eluiert. Das eluierte N-YbeL (E) zeigte mit ca. 800 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ eine höhere Basalaktivität als der Überstand vor der Ni-NTA-Reinigung, aber die gleiche Regulation durch Serin. Wie im SDS-Gel sichtbar, ist das Eluat noch aus vielen Proteinbanden zusammengesetzt. Zur weiteren Reinigung und Umpufferung wurde das Eluat auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Um ein Verstopfen der Säule durch Präzipitate zu vermeiden, ist eine Zentrifugation notwendig und nur der hierbei erhaltene Überstand wird auf die Säule geladen. Die „verlorene“ Restaktivität in dem zurückbleibenden Pellet (E_P) wurde ebenfalls getestet. Sie war vergleichbar mit der Basalaktivität des Eluats der Ni-NTA-Reinigung mit geringerer Regulation durch Serin (11% Hemmung). Zur Minimierung dieses Verlusts wäre es sinnvoll, das Eluat in mehreren Runden auf die Gelfiltrationssäule aufzutragen und entsprechende Fraktionen zu vereinigen. Nach der Gelfiltration wurden vier Fraktionen (F1-4) gesammelt und getestet. Die Basalaktivität und Regulation durch Serin ist in F4 am höchsten (ca. 2,2 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, 22% Hemmung), erreicht aber nicht dieselben Werte wie die Membranpräparation (ca. 10 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, 90% Hemmung). Die Aktivität für F4 ist plausibel, da diese Fraktion dem errechneten Wert zur Elution des Dimers (12,8 ml) am nächsten lag. Das mutmaßliche Tetramer in F3 ist weniger aktiv und reguliert als das Dimer in F4. Das SDS-Gel zeigt eine Verbesserung der Reinigung nach Gelfiltration (F1-4) verglichen mit dem Eluat (E) nach der Ni-NTA-Reinigung. Im Western Blot kann N-YbeL im Eluat (E) und allen vier Fraktionen (F1-4) nachgewiesen werden. Vermutlich bildet N-YbeL Agglomerate und die einzelnen Oligomere wurden in der Gelfiltration kaum voneinander getrennt.

Der Aktivitätsverlust nach Detergenzugabe ließ sich durch die Ni-NTA-Reinigung und Gelfiltration zwar teilweise aufheben, jedoch konnte die Regulation durch Serin nicht die Ausgangswerte der Membranpräparation erreichen. Da die Zugabe von Detergen zu einem Aktivitätsrückgang führte, wurden weitere Versuche mit den weniger aktiven Fusionskonstrukten nicht durchgeführt. Um den tatsächlichen Effekt von N-YbeL auf die Solubilisierung einschätzen zu können, wurde Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 ohne Fusionsproteine solubilisiert.

3.1.3.2.3 *Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645*

Anhand der Ergebnisse mit N-YbeL ließ sich vermuten, dass das Fusionsprotein aus der Membran gelöst werden konnte, allerdings mit eingeschränkt funktionsfähiger Rezeptordomäne. Um auszuschließen, dass YbeL die Faltung des Rezeptors behinderte, wurden Solubilisierungsversuche mit *Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645* ohne Fusionsproteine entsprechend der etablierten Protokolle durchgeführt.

In Vorversuchen in kleinem Maßstab (200 µl Membranpräparation mit 50 µl Detergenzlösung) wurden die Auswirkungen von 0,5% DDM bzw. Brij58 untersucht. 0,5% DDM reduzierte die Basalaktivität auf ca. 12 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ (79% Hemmung bei 10 mM Serin), während mit 0,5% Brij58 eine Basalaktivität von ca. 50 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ (88% Hemmung bei 10 mM Serin) erhalten wurde (n=2). Wie bei N-YbeL schien sich Brij58 besser für die Solubilisierung zu eignen, da höhere Aktivitäten erzielt wurden. Im Gegensatz zu N-YbeL blieb in diesen Vorversuchen die Regulation des Rezeptors erhalten. Da die Versuchsdurchführung über zwei Tage angesetzt war, wurden unterschiedliche Lagerungsbedingungen für das Protein getestet. Nach Zugabe von 1% Brij58 zur Membranpräparation (aus 800 ml Expressionsansatz) und Inkubation für ca. 3 h auf Eis bei 4°C wurde die Suspension zentrifugiert (100.000 x g, 1 h, 4°C). Der Überstand wurde ÜN auf Eis bei 4°C oder bei -20°C oder nach Einfrieren in flüssigem N₂ bei -80°C gelagert. Die Basalaktivität aller drei Lagerungsbedingungen betrug 16,7 bis 20,5 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ bei einer fast 90%igen Hemmung durch 10 mM Serin (n=2). Nicht die Art der Lagerung sondern die Lagerungsdauer schien von Bedeutung zu sein, da ÜN ein Aktivitätsverlust von 60 bis 67% auftrat. Auf Grund des Versuchsablaufs wurde das Eluat nach der Ni-NTA Reinigung trotzdem ÜN auf Eis bei 4°C gelagert. Wie bei N-YbeL wurde das Eluat konzentriert und zur Gelfiltration auf eine Superdex-200 10/30 Säule aufgetragen (Fig. 26).

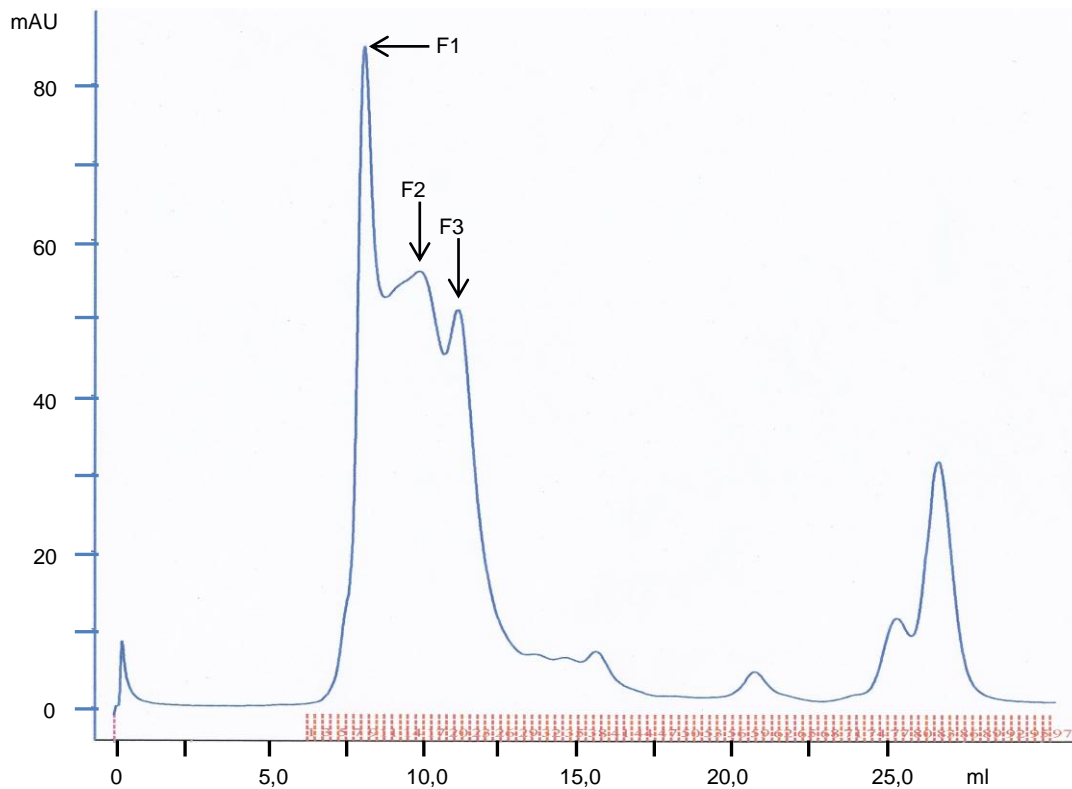


Fig. 26: Auftrennung des solubilisierten Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (nach Ni-NTA-Reinigung) auf einer Superdex-200 10/30 Säule. Laufbedingungen: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 0,05% Brij58, Absorption bei 280 nm. Ab 6 ml wurde fraktioniert (0,5 ml Fraktionen). Für den AC-Test wurden drei Fraktionen gesammelt (F1-3).

Laut der Kalibriergerade (Fig. 24) wäre die Elution des 54 kDa großen Monomers bei ungefähr 14,8 ml erwartet worden, das Dimer bei ca. 13,3 ml und das Tetramer bei ca. 11,8 ml. Die prominenten Peaks, die ineinander übergehen, erschienen zwischen 8 bis 12 ml. Da wie bei N-YbeL keine gute Auftrennung der Peaks erfolgte, war auch bei Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 mit der Bildung von Agglomeraten durch die hohe Proteinkonzentration in der aufgetragenen Probe zu rechnen. Es wurden drei Fraktionen (F1-3) gesammelt, wobei es sich bei F2 möglicherweise um das Tetramer und bei F3 um das Dimer handelte. Aus den bereits erwähnten Gründen wurde der Peak bei 27 ml Elutionsvolumen nicht weiter untersucht. Die Aktivitäten von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 nach Solubilisation, Ni-NTA-Reinigung und Gelfiltration, sowie das SDS-Gel und den Western Blot der Reinigungsschritte zeigt Fig. 27.

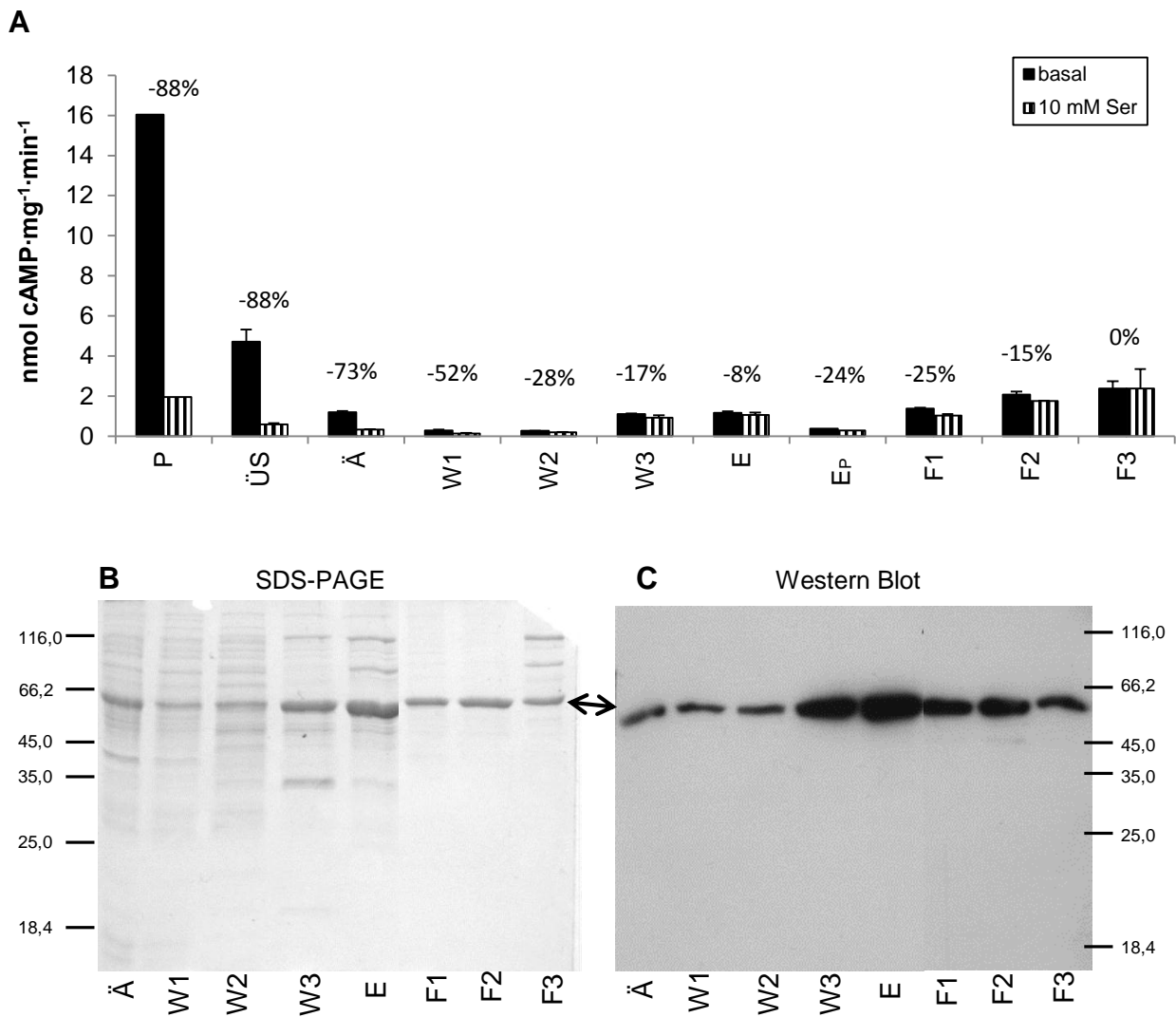


Fig. 27: A) AC-Aktivität von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (n=2) nach Solubilisierung in 1% Brij58 (P = Pellet, ÜS = Überstand), bei Reinigung mit Ni-NTA (Ä = Äquilibration, W1-3 = Waschschrirte 1-3, E = Elution, EP = Pellet des Eluats) und nach Gelfiltration mit 0,05% Brij58 (F1-3 = Fraktionen 1-3). 3-4 µg Protein für EP und F1-3, sonst je 20 µg Protein. Prozentuale Hemmung durch 10 mM Serin im Diagramm angegeben. Nähere Erläuterung im Text.

B) 15% SDS-Gel der Proben nach Reinigung mit Ni-NTA (Ä, W1-3, E = 5 µg Protein) und nach Gelfiltration (F1-3 = 2 µg Protein), erwartete Bandenhöhe 54 kDa mit Pfeil markiert.

C) Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper mit denselben Proben (20 sec Belichtung).

Die Ergebnisse des AC-Tests (n=2) zeigen, dass auch die Aktivität von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 durch das Detergens beeinflusst wurde (Fig. 27). Nach der Solubilisierung mit 1% Brij58 wurde die Proteinlösung zentrifugiert, um die Restaktivität in den Membranbestandteilen (P) zu bestimmen. Diese Basalaktivität betrug ein Drittel verglichen mit der Aktivität der Membranpräparation vor Detergenzugabe. Die Basalaktivität des Überstandes (ÜS) erreichte ein Drittel der Aktivität von P, jedoch zeigten ÜS und P dieselbe Regulation durch 10 mM Serin (88% Hemmung). Die Imidazolkonzentrationen während der Ni-NTA-Reinigung bedürfen weiterer Anpassung, da bei der Äquilibration mit dem Überstand (Ä) und v.a. im dritten

Waschschrift (W3) ein großer Anteil des Proteins zu früh eluiert wurde und somit verloren ging. Dies wurde auch im SDS-Gel und im Western Blot nachgewiesen. Im Eluat nach der Ni-NTA-Reinigung konnte eine Basalaktivität von ca. 1 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ bei 8%iger Hemmung durch Serin gemessen werden. Die Restaktivität im Pellet des Eluats (E_P), welches durch den Zentrifugationsschritt vor der Gelfiltration entstand, betrug ein Drittel von E. Der Verlust an aktivem Protein schien somit geringer als bei N-YbeL zu sein, bei welchem E und E_P gleich aktiv waren. Bei den gesammelten Fraktionen nach der Gelfiltration steigert sich die Aktivität bis zu F3 (ca. 2 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹), jedoch mit völligem Verlust der Regulation durch Serin. Es handelt sich bei F3 vermutlich um das Dimer, da es die höchste Aktivität der Fraktionen besitzt. Der Western Blot zeigt wie bei N-YbeL, dass in allen drei Fraktionen (F1-3) Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 enthalten ist, da sich die Agglomerate nicht gut trennen ließen. Trotz Proteinverlust während der Ni-NTA-Reinigung (SDS-Gel, Western Blot), wurde nach der Gelfiltration (F1-3) eine gute Reinigung erzielt. Um auszuschließen, dass Imidazol die Aktivität und Regulation von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 beeinträchtigte, wurde derselbe Versuch mit einer Dialyse ÜN im Anschluss an die Ni-NTA-Reinigung durchgeführt. Wie zuvor wurde die Probe am nächsten Morgen konzentriert und die Gelfiltration (Superdex-200 10/30 Säule) durchgeführt. Die Dialyse änderte jedoch am Ergebnis des AC-Tests nichts. Die Aktivität der Fraktionen nach der Gelfiltration war unverändert (Basalaktivität 2,5-2,8 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹) und es war keine Regulation des Konstrukts feststellbar (n=2).

Im Endeffekt wurde bei Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 der Solubilisierungsprozess mit einer höheren Ausgangsaktivität begonnen, aber die Basalaktivität in der vermeintlichen Dimerfraktion nach der Gelfiltration war genauso hoch wie bei N-YbeL und die Regulation durch Serin ging verloren. So kann festgestellt werden, dass YbeL vermutlich einen positiven Einfluss auf die Solubilisierung von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 besitzt und es vielleicht durch Optimierung möglich ist, eine stärkere Regulation durch Serin zu erreichen. Für weitere Solubilisierungsversuche wurde jedoch auf die Methode des zellfreien Systems umgestellt.

3.1.4 Solubilisierung via zellfreier Proteinbiosynthese

Da im Rahmen der bisherigen Solubilisierungsversuche mit und ohne YbeL zwar ein aktives, aber kaum reguliertes Konstrukt aus der Membran gelöst werden konnte, wurde mit der Etablierung des zellfreien Systems (ZS) ein anderer Ansatz zur Lösung des Problems verfolgt. Wird im ZS ohne Detergens exprimiert, entstehen Präzipitate, welche nach der Expression durch Zugabe von Detergens unter Umständen noch solubilisiert werden können. Dieses Verfahren ähnelt der Solubilisierung von *inclusion bodies*, wobei die korrekte Faltung des Proteins möglicherweise nicht immer erreicht werden kann. Deshalb scheinen im ZS die Chancen auf ein richtig gefaltetes Protein beim Einsatz von Detergenzien höher zu sein. Hierbei sollen sich die entstandenen Proteine korrekt in Micellen falten und anschließend für Aktivitäts- oder Kristallisationsversuche verwendbar werden. Die Schwierigkeiten bei der

Überexpression in Bakterien, das Herauslösen der Konstrukte aus der Membran und die Rekonstitution der richtigen Faltung, entfallen.

Das Erlernen des ZSs und erste Vorversuche für die vorliegende Arbeit fanden am Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie der Universität Kiel statt. Für die weiteren Experimente wurde das ZS in unserem Labor aufgebaut. Zur Kontrolle von Aktivität und Regulation der zellfrei exprimierten Proteine wurde anschließend der AC-Test durchgeführt. Da große Hoffnung auf dieses System gesetzt wurde, sollte die zellfreie Expression mit den beiden chimären Konstrukten Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 durchgeführt werden. Im Falle des Erfolges und bei möglicher Kristallisation könnten die Auswirkungen unterschiedlicher HAMP-Domänen auf die Struktur desselben Proteins untersucht werden. Erste Expressionsversuche mit Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 im ZS schlugen fehl und es konnte kein Protein mit passender Bandenhöhe im Western Blot nachgewiesen werden. Deshalb wurde GFP zur Stabilisierung und erleichterten Detektion C-terminal an Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 fusioniert. Erst dann konnten Proteine mit richtiger Bandenhöhe im SDS-Gel und im Western Blot nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle für das ZS diente die Expression von GFP (Fig. 28). Zusätzlich fungierte GFP in den Fusionskonstrukten als Indikator für die richtige Faltung der Proteine. Bei sichtbarer Fluoreszenz in den Reaktionsgefäßen war davon auszugehen, dass nicht nur GFP, sondern auch die damit fusionierten Konstrukte korrekt gefaltet waren.



Fig. 28: Auswirkung unterschiedlicher Mg^{2+} -Konzentrationen (von li nach re: 8 mM, 10 mM, 12 mM, 14 mM, 16 mM Mg^{2+}) in der zellfreien Expression auf die richtige Faltung, d.h. die Fluoreszenz, von GFP.

3.1.4.1 Chimäre mit GFP

Nachdem die Etablierung des ZSs durch die Expression von GFP bestätigt werden konnte, wurden die Expressionsbedingungen für die beiden chimären Fusionsproteine Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-GFP und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645-GFP optimiert. Vor dem Einsatz von Detergenzien wurde die benötigte Mg^{2+} -Konzentration ermittelt. Hierfür wurden beide Konstrukte als Präzipitate zellfrei exprimiert, der RM aus den analytischen Ansätzen abgenommen, zentrifugiert und in Überstand und Pellet getrennt. Das Pellet wurde in 55 μ l S30-C-Puffer suspendiert. Die Ausbeute betrug je nach Ansatz zwischen 0,07 bis 0,17 mg. Das gelöste Pellet und der Überstand wurden mit 19 μ l Probenpuffer versehen und davon wurden je 20 μ l pro

Tasche auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Unterschiede in der Expressionsrate wurden im Western Blot abgeschätzt (Fig. 29).

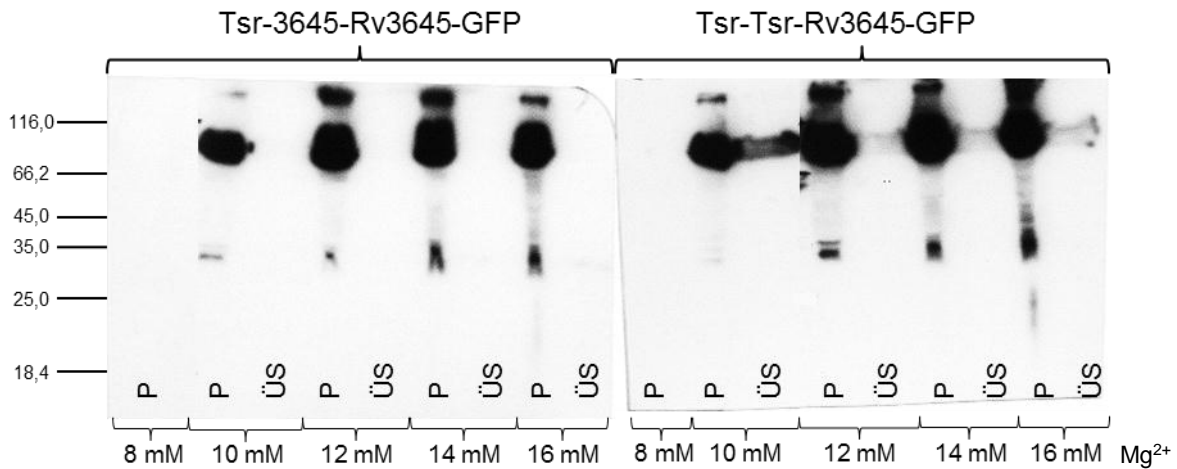


Fig. 29: Western Blot von Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645-GFP (li, 86 kDa) und Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-GFP (re, 85 kDa) mit Anti-His₄ Antikörper, Proben aus zellfreier Expression mit unterschiedlichen Mg²⁺-Konzentrationen (ohne Detergens). P = Pellet, ÜS = Überstand

Ohne die Zugabe von Detergens lag alles exprimierte Protein in der Pelletfraktion vor. Nur bei einer Mg²⁺-Konzentration von 8 mM wurde kein Protein gebildet. Da das Protein ohne Detergens ausfällt, wurde keine Fluoreszenz durch das fusionierte GFP erwartet. In allen Pelletproben war eine zusätzliche Bande knapp unter 35 kDa sichtbar. Diese konnte nicht genau zugeordnet werden, denn würde es sich um lösliches GFP handeln, müsste es im Überstand zu finden sein. GFP wurde mit seinem Startmethionin (M₁NHMS..., 29 kDa) an Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 fusioniert, was möglicherweise einen zusätzlichen Expressionsstartpunkt darstellt.

Für die weitere zellfreie Expression wurden 14 mM Mg²⁺ und unterschiedliche nichtionische Detergenzien eingesetzt. Es handelte sich um die Polyoxyethylen Alkyl-Ether Brij35 (Polyoxyethylen-(23)-lauryl-ether), Brij58 (Polyoxyethylen-(20)-cetyl-ether), Brij78 (Polyoxyethylen-(20)-stearyl-ether), Brij98 (Polyoxyethylen-(20)-oleyl-ether) und das Steroidderivat Digitonin, welche in der Vergangenheit im ZS generell gute Erfolge lieferten (Klammt et al., 2005). Außerdem wurden die Alkyl Glucoside DDM (n-Dodecyl-β-D-maltosid) und MNG-3 (Lauryl-maltose-neopentyl glycol) getestet, da sie bereits mit großer Erfahrung im Labor verwendet wurden. Der Polyoxyethylen Alkyl-Ether C₁₂E₈ (Octaethylen-glycol-monododecyl-ether) wurde ausgewählt, da er gute Solubilisationserfolge beim Tsr-Rezeptor lieferte (J. S. Parkinson, persönliche Mitteilung). Wie bereits beim Mg²⁺-Screen beschrieben, wurden die Ansätze nach der zellfreien Expression in Pellet und Überstand getrennt. Je 2 µl des resuspendierten Pellets bzw. des Überstandes wurden mit 5 µl Probenpuffer und 10 µl Wasser gemischt und auf das SDS-Gel aufgetragen. Dadurch wurde das Gel nicht so stark überladen. Im Western Blot konnte

abgeschätzt werden, wie viel Protein sich nun im Überstand des Reaktionsansatzes befand (Fig. 30).

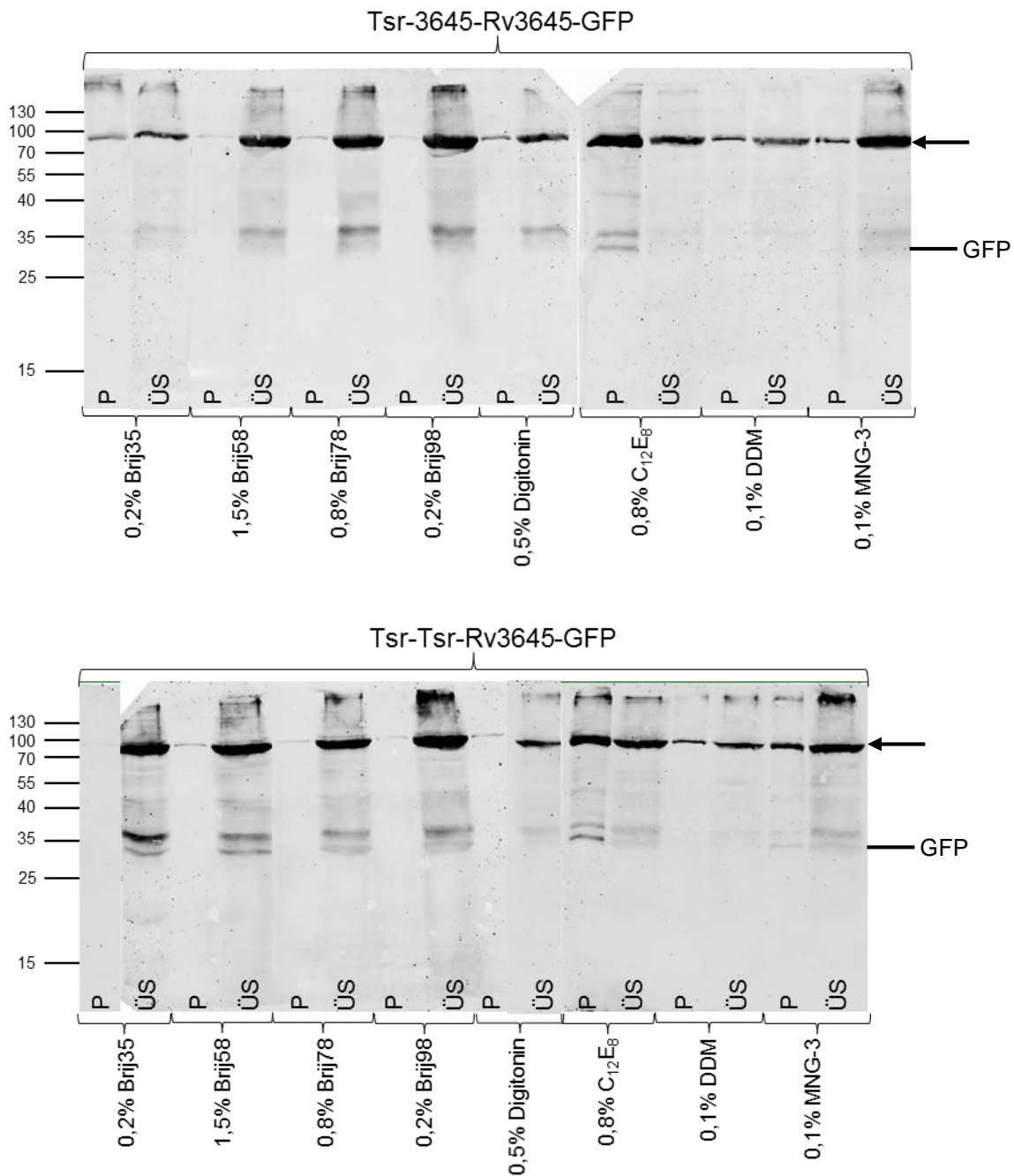


Fig. 30: Western Blots der chimären Fusionsproteine (Pfeil) Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645-GFP (oben, 86 kDa) und Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-GFP (unten, 85 kDa) mit Anti-His₄ Antikörper, Proben aus zellfreier Expression mit 14 mM Mg²⁺ und verschiedenen Detergenzien. P = Pellet, ÜS = Überstand, GFP = grün fluoreszierendes Protein (29 kDa)

Mit der Zugabe von Detergens war der Hauptanteil an gebildetem Protein im Überstand bei der erwarteten Bandenhöhe zu finden. Bei den verwendeten Brij-Derivaten und Digitonin konnte fast alles Protein im Überstand nachgewiesen werden, während bei C₁₂E₈, DDM und MNG-3 ein Großteil des Proteins immer noch

im Pellet zu finden war. In den Reaktionsgefäßen war keine Fluoreszenz sichtbar, was gegen korrekt gefaltete Proteine sprach. Durch das bereits erwähnte Startmethionin (M_1 NHMS...) von GFP wurde vermutlich auch ein gewisser Anteil an GFP parallel exprimiert. Dies konnte zwar als Bande in den Überstandsfractionen in der Nähe der 35 kDa-Markerbande detektiert werden, aber es reichte nicht zur sichtbaren Fluoreszenz im Reaktionsgefäß aus. Um eine mögliche parallele Expression von GFP zu unterbinden und damit eine effizientere zellfreie Expression zu gewährleisten, wurde das Startmethionin von GFP in den Fusionskonstrukten ($Tsr-HAMP_{Tsr-Rv3645-GFP}$, $Tsr-HAMP_{3645-Rv3645-GFP}$) deletiert (...-GFP ΔM). Da bislang mit bloßem Auge keine Detektion der Fluoreszenz möglich war, sollte die Auswirkung der Deletion mit dem ETTAN DIGE Imager als Alternative zum Western Blot untersucht werden. Für den Cy2-Kanal des ETTAN DIGE Imagers wird ein Anregungsfilter bei 480/30 nm verwendet (ETTAN DIGE Imager Handbuch), was für die Fluoreszenz von GFP ausreicht (Tsien, 1998). Um die verbleibende GFP-Expression zu überprüfen, wurde für $Tsr-HAMP_{3645-Rv3645-GFP\Delta M}$ ein Mg^{2+} -Screen ohne Detergens durchgeführt. Der RM wurde nach der Expression wie erwähnt in Pellet und Überstand getrennt. 5 μ l des gelösten Pellets bzw. 3 μ l des Überstandes wurden mit je 5 μ l Probenpuffer und 10 μ l Wasser gemischt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Anschließend wurde die Fluoreszenz im SDS-Gel im ETTAN DIGE Imager untersucht, was den Western Blot ersetzte (Fig. 31).

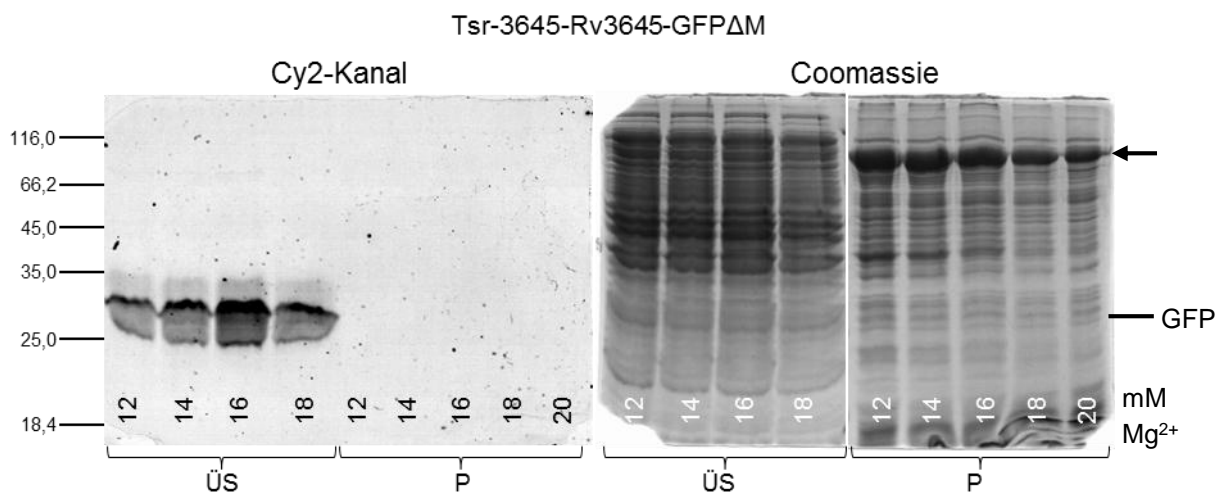


Fig. 31: SDS-Gel des Mg^{2+} -Screens mit $Tsr-HAMP_{3645-Rv3645-GFP\Delta M}$ (Deletion des Startmethionins M_1 von GFP, 86 kDa). Dasselbe Gel li im ETTAN DIGE Imager im Cy2-Kanal betrachtet (Fluoreszenz von löslichem GFP) und re nach Coomassie-Färbung. Chimäres Fusionsprotein (Pfeil), GFP = grün fluoreszierendes Protein (29 kDa), P = Pellet, ÜS = Überstand

In Fig. 31 ist zu sehen, dass trotz der Deletion des Startmethionins von GFP in $Tsr-HAMP_{3645-Rv3645-GFP\Delta M}$ weiterhin eine Expression von GFP stattfand. Das Anregungsspektrum im Cy2-Kanal des ETTAN DIGE Imagers bringt das gebildete GFP im Überstand zum Leuchten. Im Gegensatz dazu kann sich $Tsr-HAMP_{3645-Rv3645}$

GFP Δ M ohne Detergens nicht korrekt falten und befindet sich deshalb als Präzipitat in der Pelletfraktion, was nur im Coomassie-gefärbten Gel sichtbar ist.

Da die Deletion des Startmethionins von GFP dessen parallele Expression nur vermindern, aber nicht verhindern konnte, wurde durch eine Erhöhung der K⁺-Konzentration versucht, die Expressionseffizienz zu steigern. Die Expression mit verschiedenen K⁺-Konzentrationen zwischen 290 – 400 mM zeigte im Gegensatz zum Mg²⁺-Screen jedoch keine Unterschiede. Für die folgenden zellfreien Expressionen wurde deshalb eine K⁺-Konzentration von 370 mM eingesetzt.

Die Vorversuche waren hiermit abgeschlossen und größere Ansätze wurden für den AC-Test vorbereitet, da nur damit eindeutig nachgewiesen werden konnte, ob es sich bei den detektierten Banden im Western Blot auch um funktionsfähiges Protein handelt. Zur ersten Bestimmung der Aktivität und Regulation von Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645-GFP Δ M wurden fünf Ansätze zu je 55 μ l RM mit 14 mM Mg²⁺, 370 mM K⁺ und 0,2% oder 0,6% Brij78 exprimiert und anschließend vereinigt. Brij78 wurde aus den verfügbaren Detergenzien ausgewählt, da es laut den Erfahrungen des Kieler Labors zu den Erfolgversprechendsten zählte und in den Vorversuchen auch zu ausreichend Protein im Überstand geführt hatte. Nach der Expression war wiederholt keine Fluoreszenz in den Reaktionsgefäßen sichtbar. Im AC-Test wurde nur auf vorhandene AC-Aktivität untersucht, nicht auf spezifische Aktivität, d.h. es wurden keine Proteinkonzentrationen gemessen. Die Werte des Überstandes im AC-Test waren zwar ca. 10-fach höher als der Leerwert, aber die Basalaktivitäten waren für beide Detergenzkonzentrationen zwischen 0,8–1 pmol cAMP·min⁻¹ äußerst gering (n=2). Es war keine Regulation durch 10 mM Serin feststellbar. Da Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-GFP Δ M bereits in den Vorversuchen generell niedrigere Aktivitäten als Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645-GFP Δ M aufwies, wurde dieser Test nicht mit Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-GFP Δ M wiederholt. Um auszuschließen, dass GFP die Faltung der AC behinderte, wurden die Chimären Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 ohne GFP in den pIVEX2.3w kloniert.

3.1.4.2 Chimäre ohne GFP

Zur Überprüfung der Einflussnahme von GFP auf die Aktivität der AC wurden die beiden Chimären Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 und Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 ohne GFP zellfrei exprimiert. Die zellfreie Expression fand mit 14 mM Mg²⁺, 370 mM K⁺ und 0,6% Brij78 als präparativer Ansatz (500 μ l RM) im *Slide-A-Lyzer* statt. Der Überstand von Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 erreichte die 9-fache Basalaktivität (ca. 9 pmol cAMP·min⁻¹, n=2) im Vergleich zu dem Fusionsprotein mit GFP. Es war aber ebenfalls nicht durch Serin reguliert. Im Gegensatz dazu waren die Aktivitäten für Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 mit 0,6% Brij78 bzw. 0,6% C₁₂E₈ kaum höher als der Leerwert und damit inaktiv (n=2). Im Western Blot (Fig. 32) ließ sich jedoch Protein nachweisen.

Um die Auswirkung von Detergens auf die Aktivität der AC aller bisher im ZS getesteten Chimären zu untersuchen, wurde das lösliche Konstrukt HAMP₃₆₄₅-Rv3645 mit und ohne Detergenz im ZS exprimiert. HAMP₃₆₄₅-Rv3645 wurde mit 14 mM Mg²⁺, 370 mM K⁺ und 0,6% Brij78 bzw. ohne Detergens als präparativer Ansatz

(500 μ l RM) im *Slide-A-Lyzer* exprimiert. Mit 0,6% Brij78 erzielte der Überstand des löslichen HAMP₃₆₄₅-Rv3645 $2,7 \pm 0,1$ pmol cAMP \cdot min⁻¹ (n=2). Ohne Detergens wurde für den Überstand (nach Zentrifugation und Separation von Überstand und Pellet) eine Basalaktivität von $5,6 \pm 0,6$ pmol cAMP \cdot min⁻¹ gemessen (n=2). Wurde auf die Zentrifugation verzichtet und nur der RM getestet, ergab sich eine Basalaktivität von $10,8 \pm 0,2$ pmol cAMP \cdot min⁻¹ (n=2). Es zeigte sich ein Unterschied in der Aktivität durch die Behandlung der Proben einmal mit und ohne Detergens und mit oder ohne Zentrifugationsschritt. Im Western Blot war zu sehen, dass für jedes Konstrukt ein Großteil des Proteins nicht löslich und im Pellet zu finden war (Fig. 32, je 2 μ l Probe mit 5 μ l Probenpuffer und 10 μ l Wasser vermischt aufgetragen).

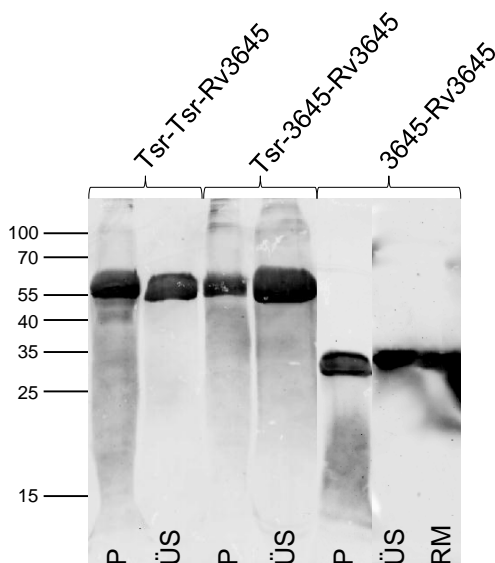


Fig. 32: Western Blot der zellfreien Expression von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (li, 56 kDa), Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 (Mitte, 56 kDa) und HAMP₃₆₄₅-Rv3645 (re, 32 kDa) mit Anti-His₄ Antikörper. P = Pellet, ÜS = Überstand, RM = reaction mixture.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Plasmide kodierend für die Konstrukte Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 und HAMP₃₆₄₅-Rv3645 nach Kiel geschickt und mit den dortigen Puffern von S. Bock zellfrei exprimiert. Die Expression fand bei 14 mM Mg²⁺ und 290 mM K⁺ statt, da der dort eingesetzte S30-Extrakt mit dieser K⁺-Konzentration am besten funktionierte. Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 wurde mit 0,6 und 0,8% Brij78 exprimiert, das lösliche HAMP₃₆₄₅-Rv3645 ohne Detergens (n=2). Nach der Expression wurde der jeweilige RM nach dem in Kiel etablierten Protokoll gereinigt (Muller-Lucks et al., 2012). Zu den 55 μ l RM wurden je 15 μ l Ni-NTA Suspension (QIAGEN) und 400 μ l Reinigungspuffer (300 mM NaCl, 0,05% DDM, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0) zugegeben und für 3 h bei RT geschüttelt. Die Proteinsuspension wurde zweimal mit 75 μ l Reinigungspuffer (+20 mM Imidazol) gewaschen. Das Protein wurde mit 80 μ l Reinigungspuffer (+300 mM Imidazol) eluiert und davon je 10 μ l auf ein SDS-Gel aufgetragen (Fig. 33). In jedem Ansatz konnte die erwartete Proteinbande nachgewiesen werden. Prinzipiell konnte dadurch nachgewiesen werden, dass die Expression der Konstrukte funktioniert. Die Proben konnten in Kiel weder auf AC-Aktivität noch auf die richtige Faltung untersucht werden, da der AC-Test dort nicht etabliert war und die Konstrukte nicht mit GFP fusioniert waren.

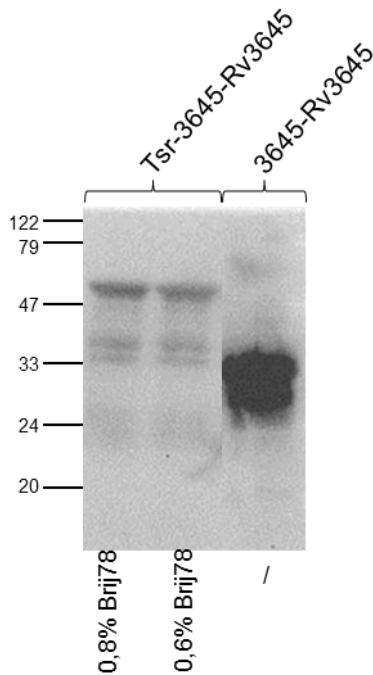


Fig. 33: Western Blot von Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 (li, 56 kDa) und HAMP₃₆₄₅-Rv3645 (re, 32 kDa) mit Anti-His₄ Antikörper. Zellfreie Expression, Reinigung und Western Blot wurden in Kiel durchgeführt (Beschreibung im Text).

3.1.4.3 Bakterielle Expression

Zwar konnten bei der zellfreien Expression immer Proteinbanden auf der erwarteten Höhe im Western Blot nachgewiesen werden, aber es konnte weder eine Fluoreszenz als Hinweis auf die richtige Faltung in den Fusionsproteinen beobachtet werden, noch eine Regulation durch Serin bei den getesteten Konstrukten. Auf Grund der geringen Aktivitäten sollte überprüft werden, ob der pIVEX2.3w hierfür die Ursache war. Diese Kontrolle wurde durch Expression der chimären Tsr-Rezeptorkonstrukte in Bakterien durchgeführt. pIVEX2.3w wurde mit dem jeweiligen Konstrukt Tsr-HAMP_{Tsr/3645}-Rv3645-GFP, Tsr-HAMP_{Tsr/3645}-Rv3645-GFP Δ M und Tsr-HAMP_{Tsr/3645}-Rv3645 in *E. coli* C43(DE3) pREP4 transformiert, da pIVEX2.3w keinen *lacI*-Repressor besitzt. Die ÜN-Kultur wurde bei 28°C gezogen, da die Zellen bei 37°C den pIVEX2.3w verloren. Die Expression startete bei 28°C, wurde vor der Induktion mit 100 μ M IPTG auf 22°C gekühlt und 5 h nach Induktion geerntet.

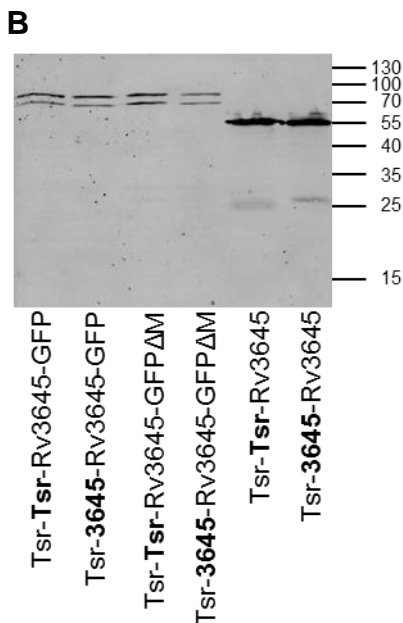
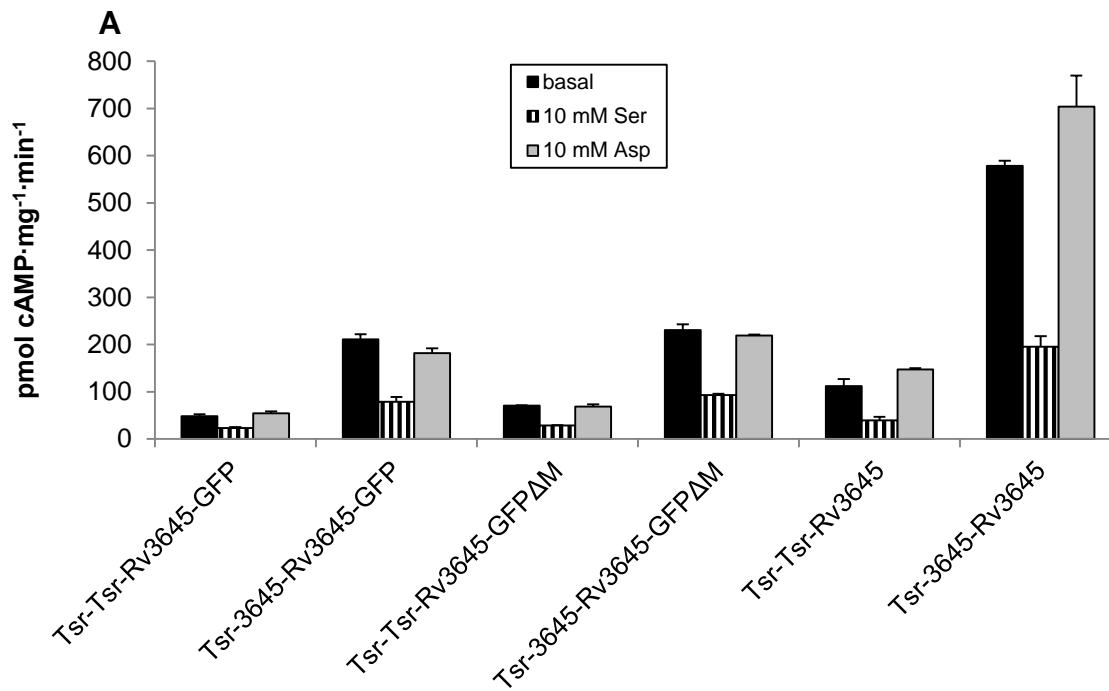


Fig. 34: A) AC-Aktivität der chimären Konstrukte Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 mit und ohne GFP nach Expression in *E. coli* C43(DE3) pREP4 (je 20 µg Membranpräparation, n=2). GFPΔM = Deletion des Startmethionins von GFP

B) Western Blot der chimären Konstrukte mit Anti-His₄ Antikörper (je 5 µg Protein). Erwartete Bandenhöhe für Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645-GFP/-GFPΔM 85 kDa, Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645-GFP/-GFPΔM 86 kDa, Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 56 kDa, Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 57 kDa.

Nach der bakteriellen Expression wurden Basalaktivitäten zwischen ca. 50–580 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ gemessen. Die Regulation durch 10 mM Serin war erkennbar und lag je nach Konstrukt zwischen 52–66% Hemmung. Konstrukte mit HAMP₃₆₄₅ waren in pIVEX2.3w generell aktiver als mit HAMP_{Tsr} und GFP hatte generell einen aktivitätsmindernden Einfluss. Entsprechend diesen Ergebnissen müsste es also theoretisch möglich sein, auch höhere Aktivitäten im ZS zu erzielen, da der pIVEX2.3w aktive und regulierte Konstrukte hervorbringt. Der Einfluss des Vektors auf die Aktivität eines Konstruktes wird in diesem Experiment bestätigt. Beispielsweise zeigt Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 in pET28a(+) eine Aktivität von $49,9 \pm 21,0$ nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, in pQE30 $4,9 \pm 0,3$ nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ (Fig. 21) und

in pIVEX2.3w $112,3 \pm 14,5$ pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ (Fig. 34). Die Hemmung durch 10 mM Serin betrug 87% (pET28a(+)), 83% (pQE30) und 65% (pIVEX2.3w). Im ZS schien ein spezieller Faktor zu fehlen, da bei bakterieller Expression beispielsweise auch HAMP₃₆₄₅-Rv3645 eine Basalaktivität von ca. 3-4 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ (200 µM ATP) erzielte (Expression in *E. coli* BL21(DE3) pREP4 pQE30 von A. Hammer (Hammer, 2004)). Auf Grund der vielfältigen Variationsmöglichkeiten im ZS gestaltete sich die Suche nach dem fehlenden Faktor als sehr umfassend. Da die bisherigen Solubilisationsversuche nur in begrenztem Umfang erfolgreich waren, wurde der Themenschwerpunkt verlagert und auf die Regulation in *Mammalia*-ACn umgeschwenkt.

3.2 Untersuchungen zur Regulation von *Mammalia*- und mykobakteriellen ACn

Dieser Teil der Dissertation beschäftigt sich mit Versuchen an membrangebundenen *Mammalia*-ACn und einer löslichen mykobakteriellen AC. Ziel bei den chimären Konstrukten mit *Mammalia*-ACn war eine Regulation durch den *quorum sensing* Liganden CAI-1. Die mykobakterielle AC Rv1625c sollte durch Mutation so umgestaltet werden, dass G_{sa}* als Regulator dient.

3.2.1 Kontrolle der G_{sa}*- und Forskolin-Regulation in *Mammalia*-ACn

Es ist hinreichend bekannt, dass alle neun membranständigen *Mammalia*-ACn (I-IX) durch G_{sa} stimuliert werden. Zusätzlich aktiviert FSK die ACn I-VIII (Linder and Schultz, 2003). Werden beide Stimulanzen zusammen zugegeben, lässt sich ein Synergieeffekt bei der Aktivierung beobachten (Tang and Gilman, 1995). Die Dauerkultur zur Überexpression der konstitutiv aktiven G_{sa}* (erhalten von C. Kleuss) wurde bereits über zehn Jahre im Labor aufbewahrt. Daher wurde die Aktivierungsfähigkeit des daraus gewonnenen G_{sa}* in Gewebepreparationen von Mäusegehirnen (Wildtyp C57BL/6N, 1 Männchen, 1 Weibchen, Alter ca. 1 Jahr) kontrolliert. Zusätzlich wurde an diesen Gewebepreparationen der Synergieeffekt durch gleichzeitige Zugabe von G_{sa}* und FSK bestätigt (Tab. 17).

Tab. 17: AC-Aktivität (n=4) in Membranpräparationen des Gesamthirns der Maus unter Zugabe der Stimulanzen G_{sa}^* und Forskolin (FSK). In Klammer Angabe der Signifikanz bezüglich der jeweiligen Basalaktivität (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Prozentuale Angabe der Stimulation bezüglich der jeweiligen Basalaktivität wurde grau unterlegt.

Gesamthirn [μ g]	Aktivität [$\text{nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]						
	basal	2 μ M G_{sa}^*		100 μ M FSK		2 μ M G_{sa}^* + 100 μ M FSK	
20	0,18 \pm 0,01	1,34 \pm 0,01 (***)	731%	1,43 \pm 0,06 (***)	783%	4,29 \pm 0,21 (***)	2345%
50	0,19 \pm 0,00	1,34 \pm 0,08 (***)	695%	1,48 \pm 0,19 (**)	772%	3,67 \pm 0,38 (**)	1911%
100	0,20 \pm 0,00	1,22 \pm 0,03 (***)	599%	1,48 \pm 0,15 (**)	728%	3,38 \pm 0,24 (***)	1666%

Wie in Tab. 17 zu sehen ist, konnte die AC-Aktivität in Membranpräparationen des Gesamthirns der Maus bei Zugabe von 2 μ M G_{sa}^* oder 100 μ M FSK um das 6-8-fache stimuliert werden. Die Zugabe von 4 μ M G_{sa}^* erzielte keine höhere Aktivierung (Daten nicht gezeigt). Wurden beide Stimulanzen zugegeben, zeigte sich der erwartete Synergieeffekt mit 17-23-fach höherer Aktivität. Die Zugabe des Phosphodiesterase-Inhibitors 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) hatte bei einer Konzentration von 1 mM keinen Effekt auf die Aktivität (Daten nicht gezeigt). Da diese IBMX-Konzentration bei Versuchen zur AC-Aktivität in Rattengehirnen angegeben wurde, wurden keine höheren IBMX-Konzentrationen getestet (Schultz and Schmidt, 1987).

3.2.2 Quorum sensing Rezeptor Chimären

Da Versuche zur Solubilisation des Transmembranbereiches des Tsr-Rezeptors hintangestellt wurden, ergab sich bislang keine Möglichkeit, durch Strukturanalyse Information zur Signalübertragung zu erhalten. Einen anderen Ansatzpunkt zur Aufklärung möglicher Rezeptorfunktion des Transmembranbereiches von ACn lieferte die erfolgreiche Verknüpfung des QS Rezeptors CqsS mit der AC Rv1625c von Mykobakterium (durchgeführt von S. Beltz). Der CqsS-Rezeptor von *Vibrio cholerae* besitzt genau wie Rv1625c sechs α -Helices als Membrandomäne. Somit ist die Chimäre CqsS-Rv1625c dem mykobakteriellen Holoenzym ähnlicher als die Chimäre mit Tsr-Rezeptor, welcher nur über zwei α -Helices in der Membran verfügt. Durch den spezifischen Liganden CAI-1 ließen sich chimäre CqsS-Rv1625c-Konstrukte in ihrer Aktivität regulieren. Da Rv1625c aus struktureller Sicht der Hälfte einer *Mammalia*-AC entspricht (Guo et al., 2001), war die funktionsfähige Verknüpfung von CqsS mit *Mammalia*-ACn das nächste Ziel. Da es sich bei *Mammalia*-ACn um Pseudoheterodimere, bestehend aus zwei katalytischen Domänen C1 und C2, handelt, mussten für die chimären Konstrukte jeweils CqsS-C1 und CqsS-C2 konstruiert werden. Entweder wurden für die Klonierung Vektoren mit zwei MCSs (pETDuet-3, pACYCDuet-2) zur parallelen Expression verwendet oder es

wurden Fusionsproteine hergestellt. Untersucht wurden eine mögliche Regulation durch CAI-1 und Stimulierung der katalytischen Domänen durch G_{sa}^* und FSK.

3.2.2.1 Kaninchen ACV C1 – Ratte ACII C2

Die Expression funktionsfähiger Konstrukte aus *Mammalia*-ACn erwies sich seit Beginn der Untersuchungen als knifflig (Tang and Gilman, 1995). So bestand zum Beispiel die erste publizierte Struktur einer katalytisch aktiven löslichen *Mammalia*-AC aus der C1a Domäne von ACV vom Hund und der C2 Domäne von ACII der Ratte (Tesmer et al., 1997). C1a ist einer der beiden katalytischen Bereiche der *Mammalia*-ACn, während es sich bei C1b um einen Linker handelt, der den cytosolischen Teil mit dem zweiten Transmembrananker verknüpft. Des Weiteren dient der C1b Linker als Bindestelle für Ca^{2+} und die regulatorische β -Untereinheit des G-Proteins (Diel et al., 2006; Scholich et al., 1997).

Wie wurden die Verknüpfungsstellen zwischen CqsS und den *Mammalia*-ACn ausgewählt? Ausgangspunkt hierfür waren die Ergebnisse zur Signalumkehr in chimären Konstrukten mit der CyaG AC aus *Arthrospira maxima* (Winkler et al., 2012). CyaG ist eine Klasse IIIa AC mit zwei TMs und einer HAMP Domäne vor der katalytischen Domäne (Kanchan, 2011). Zwischen der HAMP- und der katalytischen Domäne befindet sich eine ca. 25 ASn lange S-Helix (*signaling helix*, A₄₃₁LEN...QEKE₄₅₅), die durch Verlängern oder Verkürzen eines bestimmten AS-Musters ($n \times 7 + 4$) eine Signalumkehr in chimären Konstrukten mit Tsr-Rezeptor bewirken konnte (Winkler et al., 2012). Der Beginn der katalytischen Domäne von CyaG wurde mit R₄₅₆SEEL... angegeben. Die erste katalytische AS D493 befindet sich 37 ASn dahinter. Im Alignment von CyaG mit anderen membrangebundenen IIIa ACn, wie beispielsweise Rv1625c und *Mammalia*-ACn, zeigt sich noch vor der ersten katalytischen AS ein hoch konservierter Bereich von ca. 25 ASn (Fig. 35). Dieser konservierte Bereich verbindet in Rv1625c und *Mammalia*-ACn die letzte TM mit der katalytischen Domäne. Ihm scheint besondere Bedeutung für die Aktivität zuzukommen, da lösliche Rv1625c-Konstrukte ohne den vollständigen Bereich (R₂₁₈SEAL...KEPE₂₃₉) erheblich weniger aktiv waren (Guo et al., 2001). Dieser konservierte Bereich wird von uns C-Helix (*cyclase activity modulating helix*) genannt, wird aber laut EMBL SMART als Teil der katalytischen Domäne geführt. Aus evolutionärer Sicht deutet dieser konservierte Bereich auf einen gemeinsamen Mechanismus bei der TM-Signalübertragung in *Mammalia*-ACn hin, vergleichbar mit HAMP-Domänen in Klasse IIIb ACn. Die exakte Länge der C-Helix ist unbekannt. In *Mammalia*-ACn findet sich vor C1 und C2 eine C-Helix. Der Verknüpfungspunkt auf Seiten der *Mammalia*-ACn war also auf den Beginn der C-Helix festgelegt. Da in unserem Labor bereits mit der DNA von ACV C1a von Kaninchen und mit ACII C2 der Ratte gearbeitet wurde, sollte daraus eine funktionale AC entstehen - analog mit der ACV C1/ACII C2 von Tesmer et al. (Tesmer et al., 1997). Die verwendete Sequenz für ACV C1a war Q₄₃₀QER...RCT₆₄₉ und für ACII C2 L₈₅₀NRV...LAS₁₀₉₀. Der Verknüpfungspunkt für CqsS ergab sich aus den Ergebnissen der CqsS-Rv1625c Konstrukte (von S. Beltz). Das am besten von CAI-1 regulierte Konstrukt

war CqsS(...SIA₁₈₁)-Rv1625c(R₂₁₈SEAL...). Deshalb wurden die erwähnten *Mammalia*-AC Sequenzen auch mit CqsS(...SIA₁₈₁) verknüpft.

A

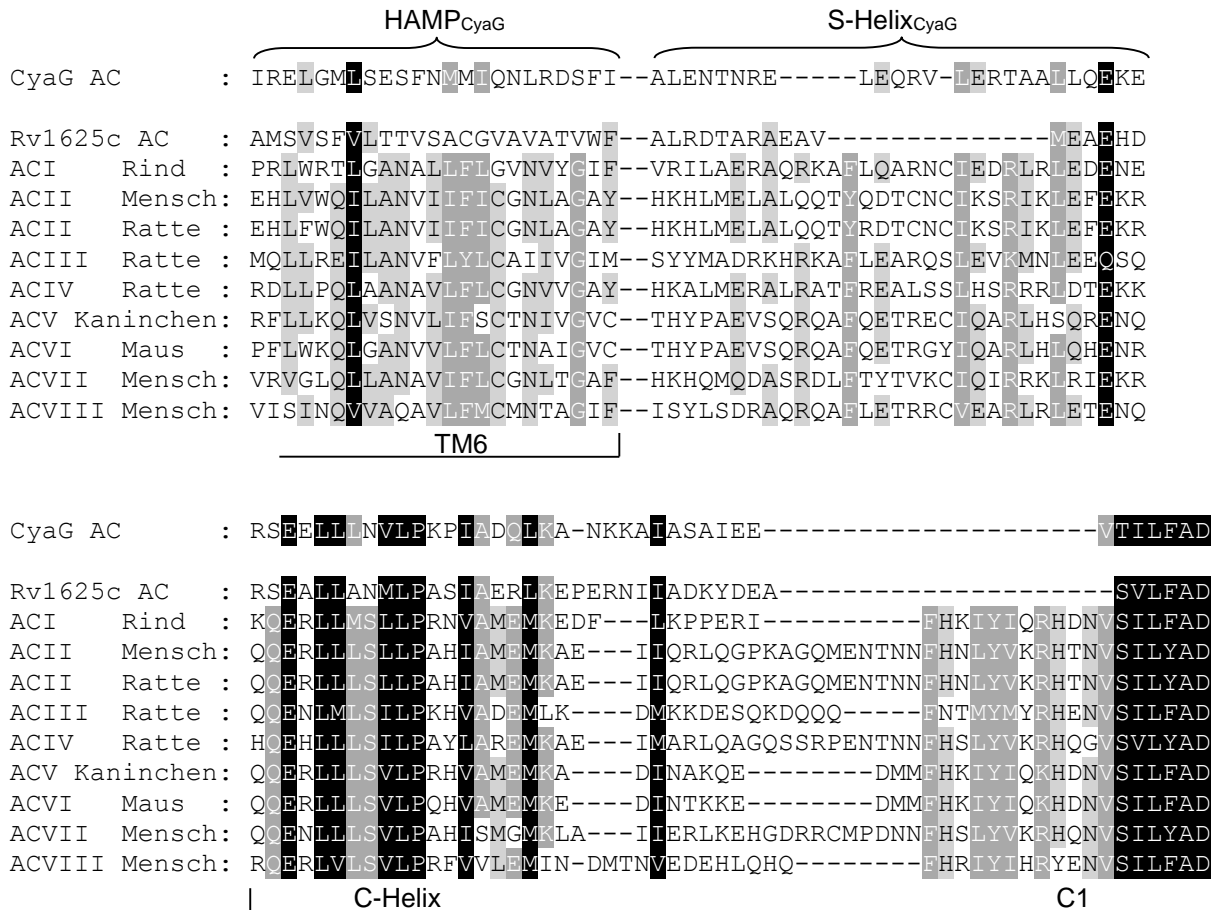


Fig. 35A: Alignment der CyaG AC, Rv1625c AC und *Mammalia*-ACn der Isoformen I-VIII. Gezeigt ist ein Teil der letzten TM (TM6 bei *Mammalia*-ACn) mit dem Übergang zur postulierten C-Helix und dem Beginn der katalytischen Domäne (C1 bei *Mammalia*-ACn). Die exakte Länge der C-Helix ist noch unbekannt. Über Rv1625c ist die Sequenz der CyaG AC aus *A. maxima* (Gen Bank Zugangsnr. ZP_03272770) mit einem Teil der HAMP-Domäne, der S-Helix und dem Übergang zur katalytischen Domäne dargestellt. Die Grautöne veranschaulichen den Grad der Konservierung (weiß = nicht konserviert, schwarz = hoch konserviert).

B

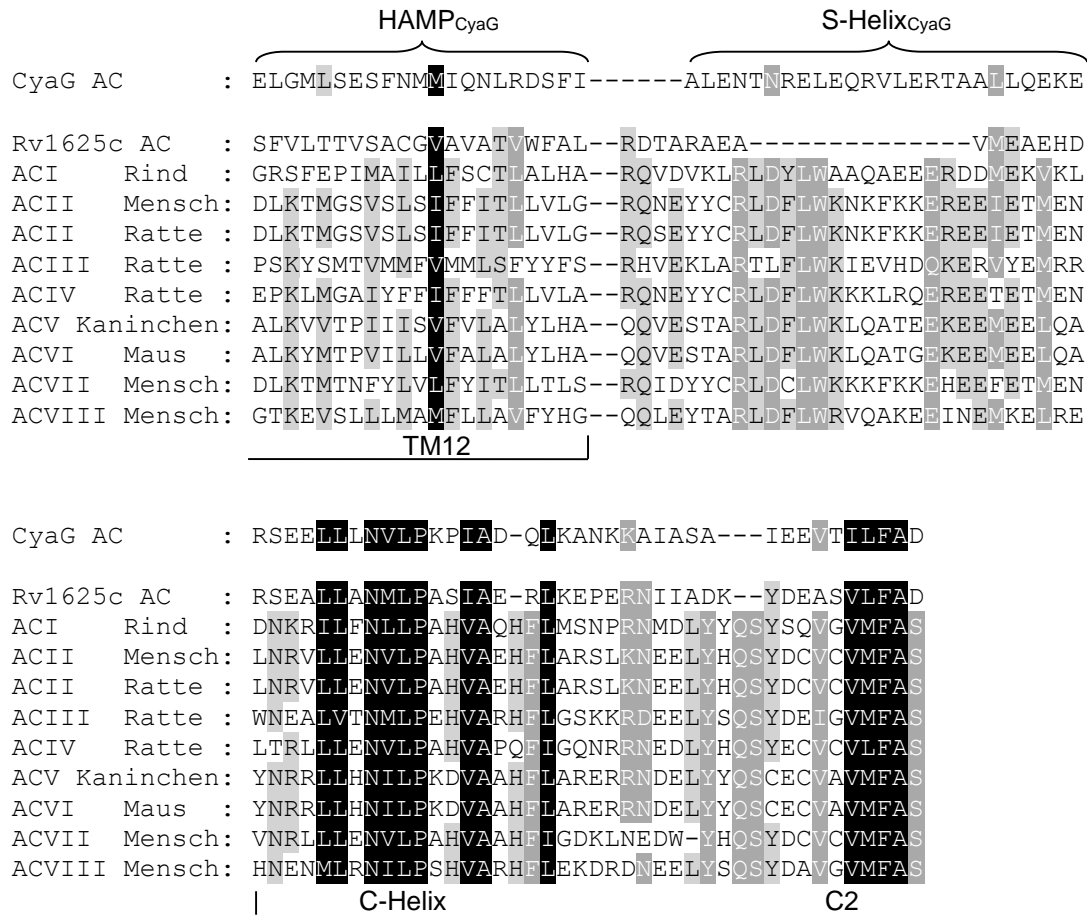


Fig. 35B: Alignment der CyaG AC, Rv1625c AC und *Mammalia*-ACn der Isoformen I-VIII. Gezeigt ist jeweils ein Teil der letzten TM (TM12 bei *Mammalia*-ACn) mit dem Übergang zur postulierten C-Helix und dem Beginn der katalytischen Domäne (C2 bei *Mammalia*-ACn). Nähere Erläuterungen gemäß Fig. 35A.

Sämtliche getesteten *CqsS-Mammalia*-AC Konstrukte wurden mit einem Buchstaben-Nummern-Code versehen (Tab. 18, Konstrukte mit *Mammalia*-ACn aus Kaninchen bzw. Ratte). Die vollständigen Sequenzen sind im Anhang dargestellt (Anhang 2).

Tab. 18: Auflistung der getesteten *CqsS-Mammalia*-AC Konstrukte (*Mammalia*-ACn aus Kaninchen bzw. Ratte) mit jeweiligem Beginn und Ende der verwendeten Sequenz. Die Buchstaben CM stehen für *CqsS* bzw. *Mammalia*-AC, die Konstrukte sind durchgehend nummeriert. CM-1 und CM-2 wurden in pETDuet-3 exprimiert. Je nach MCS enthalten die Untereinheiten einen His₆- bzw. S-Tag.

Code	pETDuet-3			
	MCS1 (N-terminal His ₆ -Tag)		MCS2 (C-terminal S-Tag)	
CM-1	CqsS	ACV C1	CqsS	ACII C2
	M ₁ ...SIA ₁₈₁	Q ₄₃₀ QER...RCT ₆₄₉	M ₁ ...SIA ₁₈₁	L ₈₅₀ NRV...LAS ₁₀₉₀
CM-2	CqsS	ACII C2	CqsS	ACV C1
	M ₁ ...SIA ₁₈₁	L ₈₅₀ NRV...LAS ₁₀₉₀	M ₁ ...SIA ₁₈₁	Q ₄₃₀ QER...QKRKEEK ₆₅₆

Das Konstrukt CM-1 wurde in pETDuet-3 in *E. coli* C43(DE3) oder *E. coli* Rosetta pLysS exprimiert. *E. coli* C43(DE3) ist besonders für die Expression toxischer Proteine geeignet (Dumon-Seignovert et al., 2004), während *E. coli* Rosetta pLysS sieben tRNAs für seltene *codons* enthält und durch Expression des T7 Lysozyms die Basalexpression der rekombinanten, möglicherweise toxischen Proteine reduziert (Angaben des Herstellers). Für CM-2 wurde C1a um sieben ASn (Q₆₅₀KRKEEK) C-terminal verlängert und dieses CqsS-C1a in die MCS2 von pETDuet-3 kloniert. Die längere Sequenz und der S-Tag sollten die Untereinheit vor einem möglichen Proteaseabbau schützen. CqsS-C2 blieb wie in CM-1 unverändert und wurde in die MCS1 von pETDuet-3 kloniert. CM-2 wurde in *E. coli* C43(DE3) exprimiert. Im AC-Test (40-46 µg Membranpräparation, n=2) lagen CM-1 und CM-2 mit einer Basalaktivität von 11-17 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ im Bereich des Leervektors und wurden deshalb als inaktiv eingestuft.

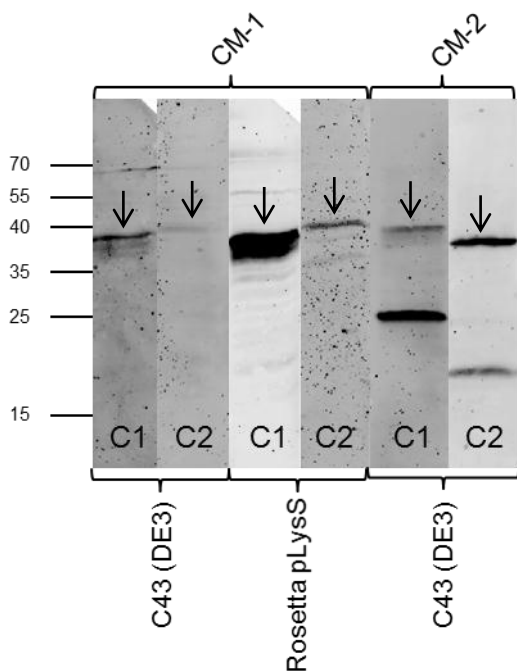


Fig. 36: Western Blot der CqsS-*Mammalia*-AC Konstrukte CM-1 und CM-2 mit Anti-RGS-His₄ oder Anti-S-tag Antikörper (mit Pfeil markiert). Die Konstrukte wurden in *E. coli* C43(DE3) oder Rosetta pLysS exprimiert. C1 bzw. C2 stehen für die beiden CqsS-AC Untereinheiten.

CM-1 C1 = Anti-RGS-His₄, je 3 µg Protein, 48 kDa. CM-1 C2 = Anti-S-tag, je 3 µg Protein, 51 kDa.

CM-2 C1 = Anti-S-tag, 5 µg Protein, 50 kDa. CM-2 C2 = Anti-RGS-His₄, 5 µg Protein, 50 kDa.

Im Western Blot (Fig. 36) waren die Banden z.T. nur schwach nachweisbar oder es waren zusätzliche Banden sichtbar. Die längere AS-Sequenz und der S-Tag in der CM-2 Untereinheit CqsS-C1 schienen keinen Schutz vor möglichem Proteaseabbau zu bieten. Die meisten Banden liefen niedriger als erwartet. Von Membranproteinen ist bekannt, dass sie in der SDS-PAGE nicht immer auf der erwarteten Höhe laufen (Drew et al., 2006). Dies liegt oftmals an unvollständiger Denaturierung, weshalb SDS in unterschiedlicher Menge an die für es zugänglichen Stellen am Protein bindet und geänderte Laufeigenschaften hervorruft (sog. „gel shifting“) (Rath et al., 2009). Um auszuschließen, dass es sich in einigen Fällen um unbemerkten Abbau der exprimierten Proteine handelte, wurde das Konstrukt CM-3, bestehend aus CqsS-ACII C2 (Anhang 2), mit N-terminalem RGS-His₆-tag und C-terminalem S-tag

versehen. Im Western Blot erscheinen beide Banden tiefer als erwartet, aber auf derselben Höhe (Fig. 37). Es ist anzunehmen, dass die Konstrukte mit CqsS-Rezeptor generell tiefer im SDS-Gel laufen, da ein Abbau in der Mitte des Proteins unwahrscheinlich erscheint, v.a. da keinerlei Abbaubanden entdeckt werden konnten.

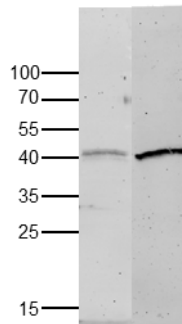


Fig. 37: Western Blot mit Anti-RGS-His₄ (li) und Anti-S-tag Antikörper (re) von CM-3. Erwartete Bandenhöhe 52 kDa, je 2 µg Protein.

3.2.2.2 hACII C1 – hACII C2

Da die chimären Proteine aus CqsS und ACV C1a bzw. ACII C2 keine Aktivität zeigten und Schwierigkeiten bei der Expression aufwiesen, wurden Teile des Gens der hACII synthetisiert (GenScript USA Inc.). Hierbei handelte es sich um die kompletten C1ab und C2 Domänen. Die Proteinsequenz der hACII aus der NCBI Datenbank (Zugangsnr. NP_065433) wurde mit Hilfe des Programms EMBOSS Backtranseq (Website von EMBL-EBI http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/) in „*Escherichia coli* K12“ codon usage übersetzt, um mögliche Probleme bei der bakteriellen Translation zu minimieren. Zusätzlich wurden in der Sequenz einige Restriktionsschnittstellen, wie z.B. BplI, durch stille Mutation entfernt, um die Klonierung zu erleichtern. Beide Domänen wurden N-terminal mit BamHI versehen. Die C1ab Domäne erhielt einen C-Terminus aus BglII, Sall, XhoI und HindIII, die C2 Domäne XhoI und HindIII. Somit war eine Klonierung in Duet-Vektoren über BamHI/HindIII bzw. BglII/XhoI gewährleistet. Das Aufeinanderfolgen von mehr als vier Adeninen in der Sequenz wurde durch stille Mutation verhindert, um potentiellen Leserahmenverschiebungen durch „*transcriptional slippage*“ vorzubeugen (Linton et al., 1997). Da nicht bestätigt werden konnte, dass die bisher verwendeten Verknüpfungspunkte eine funktionsfähige Chimäre bildeten, wurden zusätzlich weitere Kombinationsmöglichkeiten zwischen CqsS und hACII ausgetestet. Sämtliche CqsS-hACII Konstrukte, fusioniert oder mit geteilten Untereinheiten, sind in Tabelle 19 dargestellt. Der Buchstaben-Nummern-Code aus Tabelle 18 wird fortgeführt, die vollständigen Sequenzen finden sich im Anhang 2.

Tab. 19: Auflistung der getesteten CqsS-hACII Konstrukte, fusioniert oder mit geteilten Untereinheiten C1 und C2. Der Buchstaben-Nummern-Code wird aus Tab. 18 fortgeführt. Der Beginn und das Ende der verwendeten Sequenzen und vorhandene Verknüpfungspunkte sind angegeben. Der Beginn der C-Helix wurde unterstrichen. CM-8 wurde sowohl in pETDuet-3/pACYCDuet-2 als auch in pACYCDuet-2 exprimiert. CM-12 und CM-13 besitzen im Gegensatz zu den anderen Konstrukten der Tabelle nicht die C1b-Sequenz.

Code	Fusionskonstrukte				
	pQE80-L				
	CqsS	hACII C1ab	Verknüpfung	CqsS	hACII C2
CM-4	M ₁ ...SIA ₁₈₁	Q ₂₂₁ DTC...KYY ₆₀₃	RS	M ₁ ...SIA ₁₈₁	N ₈₃₆ KF...VAS ₁₀₉₁
CM-5	M ₁ ...SIA ₁₈₁	D ₂₂₂ TC...KYY ₆₀₃	RS	M ₁ ...SIA ₁₈₁	N ₈₃₆ KF...VAS ₁₀₉₁
CM-6	M ₁ ...SIA ₁₈₁	<u>Q₂₃₉QER</u> ...KYY ₆₀₃	RS	M ₁ ...SIA ₁₈₁	<u>L₈₅₁NRV</u> ...VAS ₁₀₉₁
CM-7	M ₁ ...SIA ₁₈₁	Q ₂₂₁ DTC...KYY ₆₀₃	RS	M ₁ ...SIA ₁₈₁	K ₈₃₅ NKF...VAS ₁₀₉₁
Geteilte Konstrukte					
	pETDuet-3 MCS1, N-terminal His ₆			pACYCDuet-2 MCS2, C-terminal S-Tag	
	CqsS	hACII C1ab		CqsS	hACII C2
CM-8	M ₁ ...SIA ₁₈₁	Q ₂₂₁ DTC...KYY ₆₀₃		M ₁ ...SIA ₁₈₁	K ₈₃₅ NKF...VAS ₁₀₉₁
CM-9	M ₁ ...SIA ₁₈₁	D ₂₂₂ TC...KYY ₆₀₃		M ₁ ...SIA ₁₈₁	N ₈₃₆ KF...VAS ₁₀₉₁
CM-10	M ₁ ...SIA ₁₈₁	<u>Q₂₃₉QER</u> ...KYY ₆₀₃		M ₁ ...SIA ₁₈₁	<u>L₈₅₁NRV</u> ...VAS ₁₀₉₁
pACYCDuet-2					
	MCS1, N-terminal His ₆			MCS2, C-terminal S-Tag	
	CqsS	hACII C1ab		CqsS	hACII C2
CM-8	M ₁ ...SIA ₁₈₁	Q ₂₂₁ DTC...KYY ₆₀₃		M ₁ ...SIA ₁₈₁	K ₈₃₅ NKF...VAS ₁₀₉₁
CM-11	M ₁ ...RNQV ₁₇₂	E ₂₃₄ FE... KYY ₆₀₃		M ₁ ...RNQ ₁₇₁	I ₈₄₅ ET... VAS ₁₀₉₁
pACYCDuet-2					
	MCS1, N-terminal His ₆			MCS2, C-terminal S-Tag	
	CqsS	hACII C1a		CqsS	hACII C2
CM-12	M ₁ ...SIA ₁₈₁	Q ₂₂₁ DTC...FRP ₄₈₉		M ₁ ...SIA ₁₈₁	K ₈₃₅ NKF...VAS ₁₀₉₁
CM-13	M ₁ ...RNQV ₁₇₂	E ₂₃₄ FE... FRP ₄₈₉		M ₁ ...RNQ ₁₇₁	I ₈₄₅ ET... VAS ₁₀₉₁

Die Verknüpfungsstelle zwischen CqsS(...SIA₁₈₁) und dem Beginn der C-Helix (C1 = Q₂₃₉QER..., C2 = L₈₅₁NRV...) wurde auch in den Konstrukten CM-6 und CM-10 mit der hACII getestet. CM-7, CM-8 und CM-12 entstanden durch das Abmessen des Abstandes vom Ende der TM6 (...C₁₆₆YF₁₆₈) bis zu SIA₁₈₁ (=13 ASn) in CqsS. Diese Länge wurde auf die entsprechende Stelle in der Sequenz von hACII übertragen. Somit ergab sich 13 ASn vom Ende der TM6 der Verknüpfungspunkt Q₂₂₁DTC... in C1 und 13 ASn vom Ende der TM12 K₈₃₅NKF... in C2. Da das Ende der TMs nicht mit völliger Sicherheit vorhergesagt werden kann, wurden die Verknüpfungspunkte in CM-4, CM-5 und CM-9 zusätzlich um eine AS verschoben (C1 = D₂₂₂TC..., C2 = N₈₃₆KF...). Außerdem wurde für CM-11 und CM-13 anhand von Alignments versucht, eine Übereinstimmung bzw. einen stimmigen Übergang zwischen CqsS und hACII zu finden (Fig. 38). Daraus entstanden an einem hoch konservierten Glu die Verknüpfungspunkte CqsS(...RNQV₁₇₂) und C1(E₂₃₄FE...) bzw. CqsS(...RNQ₁₇₁) und C2(I₈₄₅ET...).

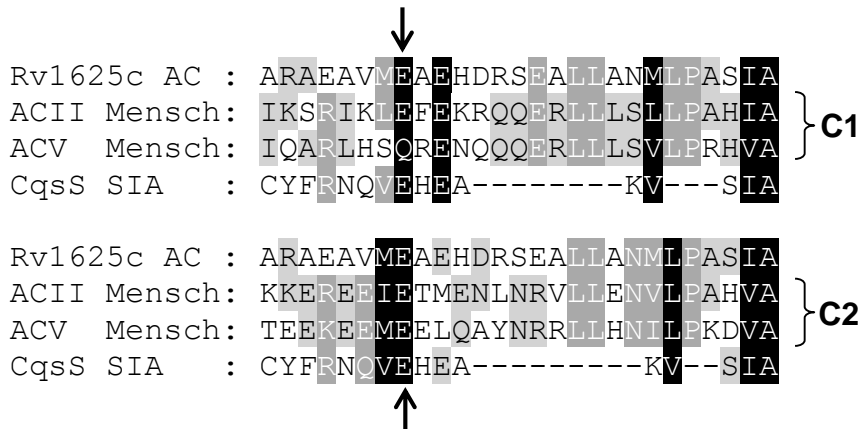


Fig. 38: Alignment eines Teils des CqsS Rezeptors mit Rv1625c AC und zwei *Mammalia*-ACn (jeweilige Darstellung des Übergangs zur katalytischen Domäne C1 bzw. C2). Das Alignment wurde verwendet, um Verknüpfungspunkte zwischen CqsS und hACII zu ermitteln. Als Verknüpfungspunkt wurde das hoch konservierte Glu (Pfeil) gewählt.

Das Programm Quick2d (http://toolkit.tuebingen.mpg.de/quick2_d) ermittelt anhand mehrerer Vorhersagealgorithmen das mögliche Auftreten von Sekundärstrukturen, wie beispielsweise α -Helices, β -Faltblätter, *coiled coils*, in der eingegebenen Sequenz. Nach Eingabe der Sequenz von CqsS-hACII C2 wurde für den Beginn der C2 Untereinheit ein *coiled coil* vorausgesagt (Anhang 5). Hierbei handelt es sich um Bündel aus meistens 2-4 α -Helices, die in einer superhelikalen Struktur umeinander gewunden sind (Lupas and Gruber, 2005). Um das *coiled coil* zu vervollständigen, müsste ein entsprechender Gegenpart in CqsS-hACII C1ab vorhergesagt werden, was jedoch nicht der Fall war (Anhang 3). Allerdings wurde am Ende des C1b Linkers ein *coiled coil* vorausgesagt, wenn die Sequenz „rückwärts“ (mit der letzten AS beginnend) in das Programm eingegeben wurde (Anhang 4). Da ein möglicher Einfluss des C1b Linkers für die Faltung der katalytischen Domänen nicht ausgeschlossen ist, wurden die Konstrukte CM-4 bis CM-11 um die entsprechende Sequenz verlängert.

Zu Beginn wurden die Konstrukte CM-4 bis CM-7 als Fusionsproteine in pQE80-L kloniert. Dadurch ergab sich eine Verknüpfung von C1ab Y₆₀₃-RS mit M₁ von CqsS-C2. Auffällig war, dass die Konstrukte schwierig zu klonieren waren und mehrere Anläufe und Zwischenschritte über pBluescript II SK(-) benötigt wurden, bis die Transformation funktionierte. Die Fusionskonstrukte CM-4, CM-5 und CM-6 zeigten Basalaktivität zwischen 7–46 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. CM-4 und CM-5 wiesen im Gegensatz zu CM-6 eine Aktivitätszunahme bei Zugabe des Liganden CAI-1 auf (Fig. 39A). Da CAI-1 in DMSO verdünnt wurde, diente der Zusatz von DMSO als Kontrolle. Da das Temperaturoptimum für die Enzymaktivität in den Fusionskonstrukten unbekannt war, wurden CM-4 bis CM-7 zusätzlich bei 30°C getestet (Fig. 39B). Bis auf CM-5 waren die Basalaktivitäten bei 30°C geringer als bei 37°C. Bei Zugabe von G_{sa}* konnte eine Stimulation der Aktivität bei CM-4 und CM-6 beobachtet werden (Fig. 39B). Die Werte von CM-7 sind nur unter Vorbehalt zu analysieren, da dieses Fusionskonstrukt im Western Blot nicht nachweisbar war (Fig. 39C).

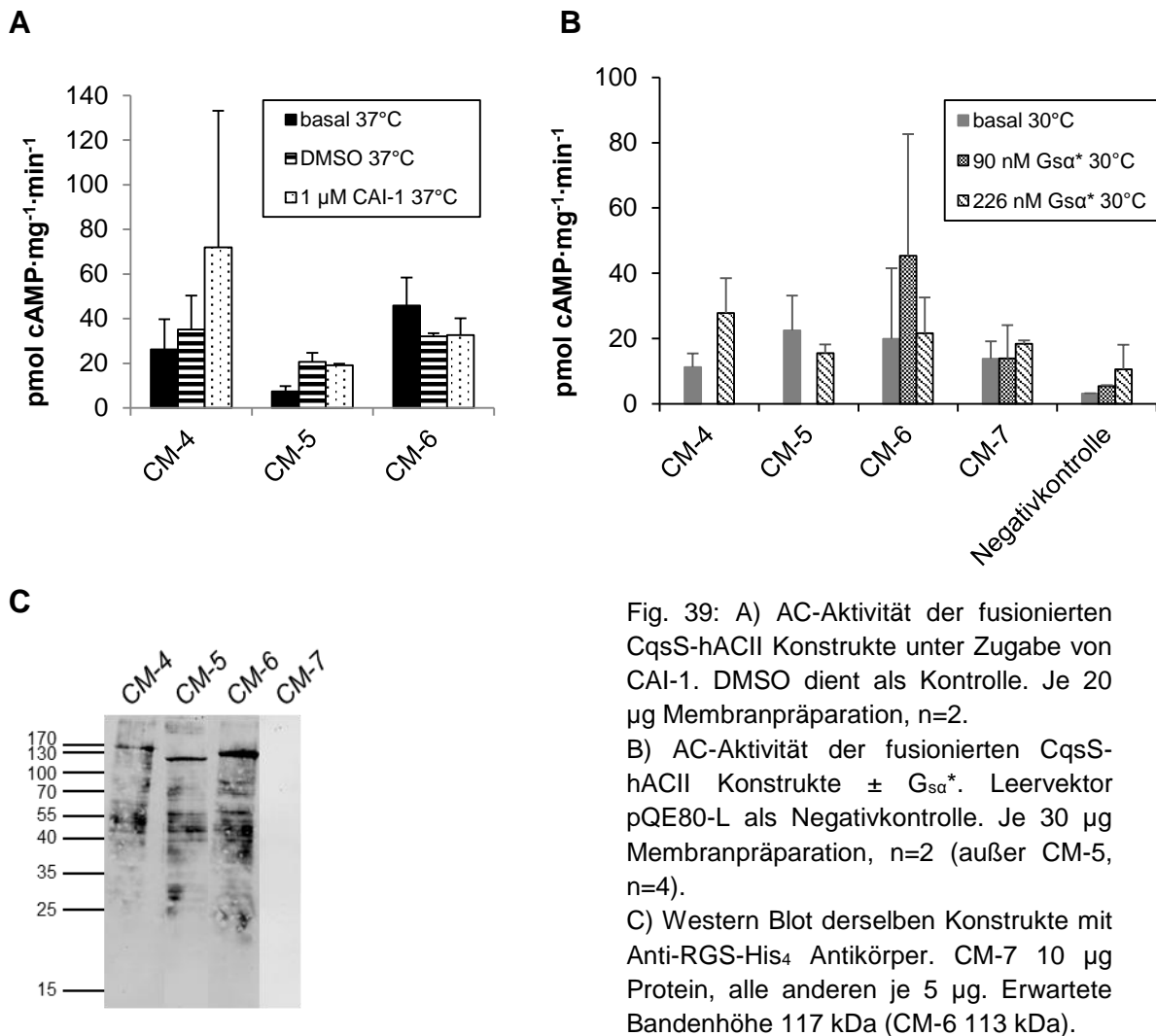


Fig. 39: A) AC-Aktivität der fusionierten CqsS-hACII Konstrukte unter Zugabe von CAI-1. DMSO dient als Kontrolle. Je 20 μg Membranpräparation, $n=2$.

B) AC-Aktivität der fusionierten CqsS-hACII Konstrukte \pm $G_{s\alpha^*}$. Leervektor pQE80-L als Negativkontrolle. Je 30 μg Membranpräparation, $n=2$ (außer CM-5, $n=4$).

C) Western Blot derselben Konstrukte mit Anti-RGS-His₄ Antikörper. CM-7 10 μg Protein, alle anderen je 5 μg . Erwartete Bandenhöhe 117 kDa (CM-6 113 kDa).

Als Vergleich zu den Fusionskonstrukten wurden die Konstrukte in C1- und C2-Bereiche geteilt. Diese wurden dann jeweils in zwei kompatible Vektoren (pETDuet-3, pACYCDuet-2) kloniert und anschließend eine Doppeltransformation durchgeführt (CM-8 bis CM-10). Als weitere Möglichkeit wurden CqsS-hACII C1 und CqsS-hACII C2 in pACYCDuet-2 mit zwei ribosomalen Bindestellen kloniert und exprimiert (CM-8, CM-11 bis CM-13). Dies sollte eine flexible Faltung der Konstrukte ermöglichen und zeigen, ob die vorherigen Konstrukte durch die Fusion womöglich zu starr für die richtige Aneinanderlagerung waren. Bei den Konstrukten wurde mittels Zugabe von $G_{s\alpha^*}$ versucht, die Aktivität zu erhöhen. Eine Regulation durch CAI-1 wurde vorerst nicht getestet. Die geteilten Konstrukte CM-8, CM-9 und CM-10 wurden in pETDuet-3 (CqsS-hACII C1ab) und pACYCDuet-2 (CqsS-hACII C2) parallel exprimiert. Nur CM-8 zeigte im Vergleich mit dem entsprechenden Fusionskonstrukt CM-7 eine höhere Basalaktivität bei 30°C (Fig. 40A bzw. Fig. 39B). Wie es bei dem Fusionskonstrukt CM-6 bereits erkennbar war (Fig. 39B), zeigte auch das entsprechende geteilte Konstrukt CM-10 eine Stimulation durch $G_{s\alpha^*}$, hier mit mehr als 400% (Fig. 40A). Allerdings konnte die Signifikanz anhand der Datenmenge ($n=2$) nicht bestimmt werden. Bei CM-6 und CM-10 handelt es sich um die Verknüpfung von CqsS mit der

C-Helix der hACII. Im Western Blot konnten die geteilten Konstrukte mit dem jeweiligen Antikörper nachgewiesen werden (Fig. 40B). CqsS-hACII C1ab wies vermehrt unspezifische Bindungen des Antikörpers oder Abbaubanden auf. CqsS-hACII C2 zeigte in zwei Fällen eine weitere Bande bei ca. 25 kDa. Wie bereits bei anderen CqsS-AC-Konstrukten beobachtet, liefen auch diese Banden niedriger als erwartet.

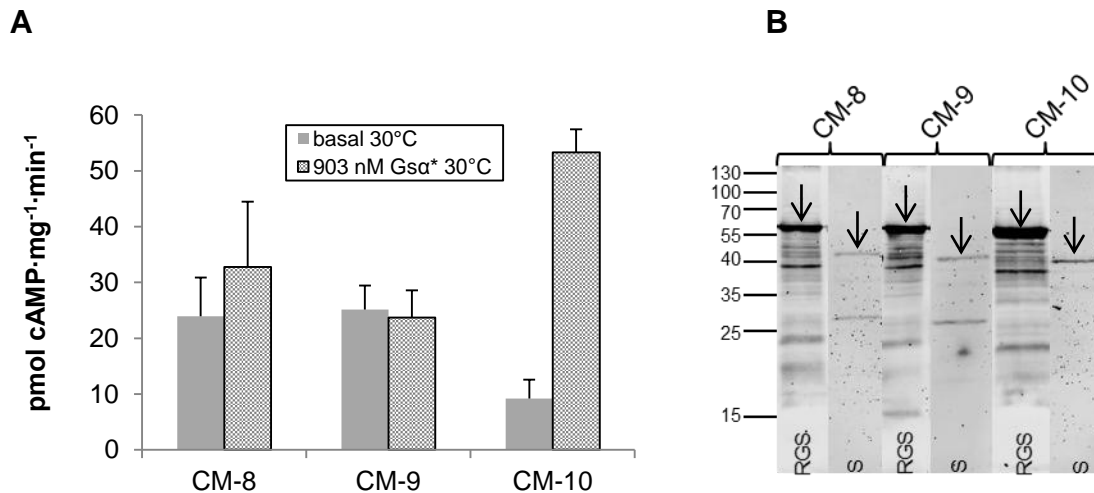


Fig. 40: A) AC-Aktivität der geteilten CqsS-hACII Konstrukte nach paralleler Expression (in pETDuet-3 und pACYCDuet-2) \pm G_{sa}*. 20 μ g Membranpräparation, n=4 (außer CM-10 + 903 nM G_{sa}*: n=2). B) Western Blot der getesteten Konstrukte, je 5 μ g Protein. CqsS-hACII C1ab mit Anti-RGS-His₄ Antikörper (RGS), CqsS-hACII C2 mit Anti-S-tag Antikörper (S). Erwartete Bandenhöhe: 68 kDa CM-8 „RGS“, 67 kDa CM-9 „RGS“, 65 kDa CM-10 „RGS“, 53 kDa CM-8 und CM-9 „S“, 51 kDa CM-10 „S“ (jeweils mit Pfeil markiert).

Um den Einfluss des C1b Linkers auf die Aktivität festzustellen, wurden die Konstrukte CM-12 und CM-13 nur mit der C1a-Sequenz kloniert, während die entsprechenden Konstrukte CM-8 bzw. CM-11 um C1b verlängert wurden. Diese vier Konstrukte wurden in pACYCDuet-2 exprimiert und bei 37°C getestet. Die Aktivitäten waren auch nach Zugabe von G_{sa}* und FSK nur geringfügig höher als die Aktivität der Negativkontrolle (Leervektor pACYCDuet-2) (Fig. 41 A). Die Signifikanz konnte nicht bestimmt werden (n=2). Eine Zunahme in der Aktivität bei gleichzeitiger Zugabe von 0,6 μ M G_{sa}* und 50 μ M FSK ließ sich nur bei CM-8 (mit C1b) feststellen. Dieser Effekt trat bei doppelter Konzentration von G_{sa}* und FSK nicht mehr auf. Eine generelle positive Wirkung von C1b auf die Aktivität der Konstrukte trat nicht auf. Im Western Blot waren die geteilten Konstrukte nachweisbar (Fig. 41 B). Die Banden liefen erneut niedriger als erwartet. Das Verhältnis der Banden zueinander war jedoch stimmig: Konstrukte mit derselben erwarteten Höhe liefen tatsächlich gemeinsam und größere Konstrukte liefen immer höher als kleinere Konstrukte. Dies ist ein weiterer Punkt, der gegen willkürlichen Abbau der Proteine spricht.

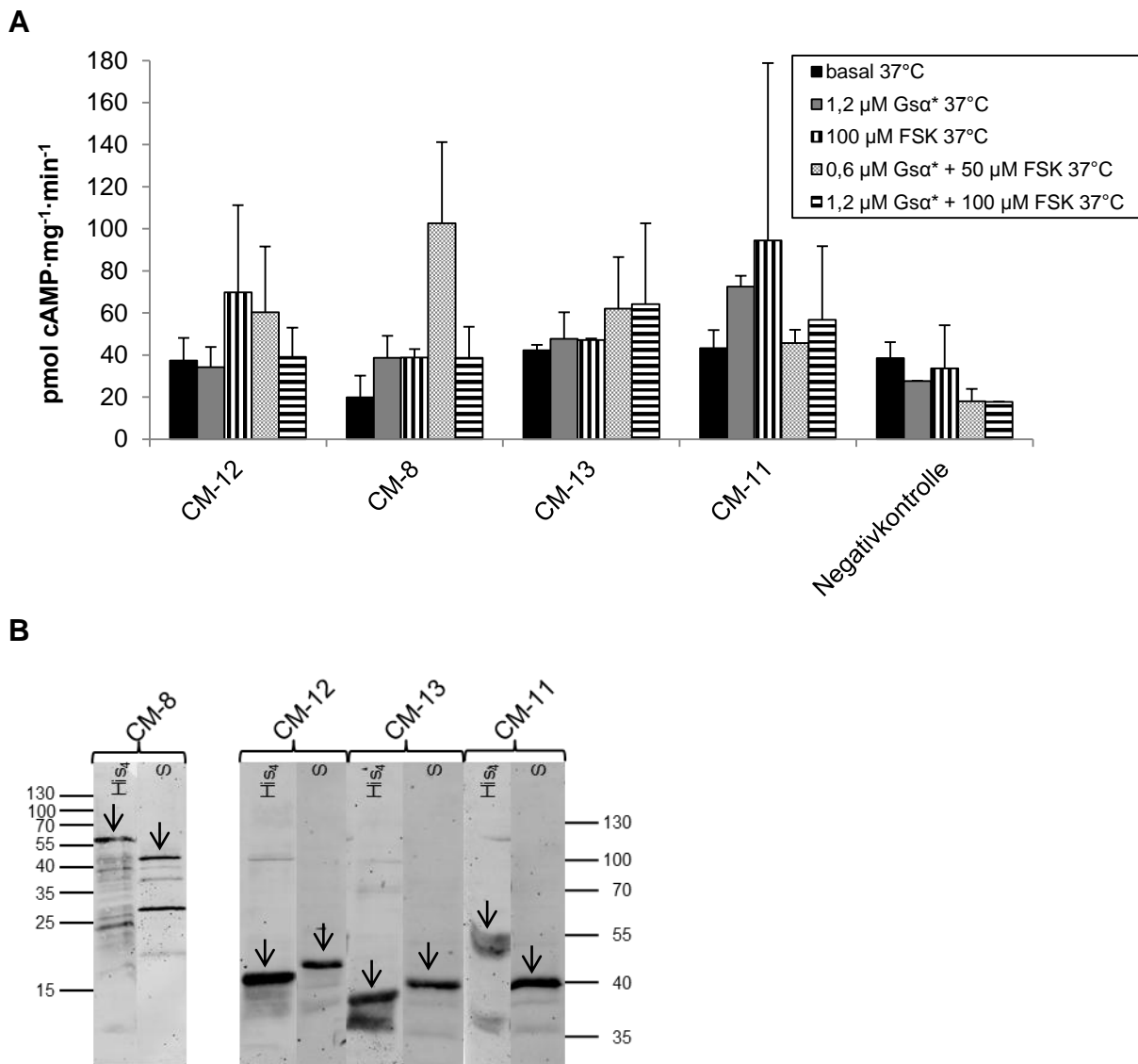


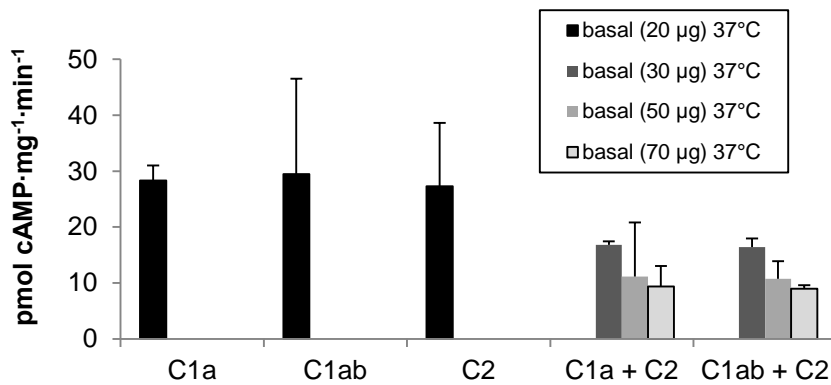
Fig. 41: A) AC-Aktivität der getrennten CqsS-hACII Konstrukte nach paralleler Expression (in pACYCDuet-2) \pm Gs α^* und FSK. 20 μ g Membranpräparation, n=2.

B) Western Blot der getesteten Konstrukte, je 5 μ g Protein. CqsS-hACII C1a(b) mit Anti-His₄ Antikörper (His₄), CqsS-hACII C2 mit Anti-S-tag Antikörper (S). Erwartete Bandenhöhe: 68 kDa CM-8 „His₄“, 52 kDa CM-12 „His₄“, 50 kDa CM-13 „His₄“, 65 kDa CM-11 „His₄“, 53 kDa CM-8 und CM-12 „S“, 51 kDa CM-11 und CM-13 „S“ (jeweils mit Pfeil markiert). Li: 15%iges SDS-Gel, re: 10%iges SDS-Gel.

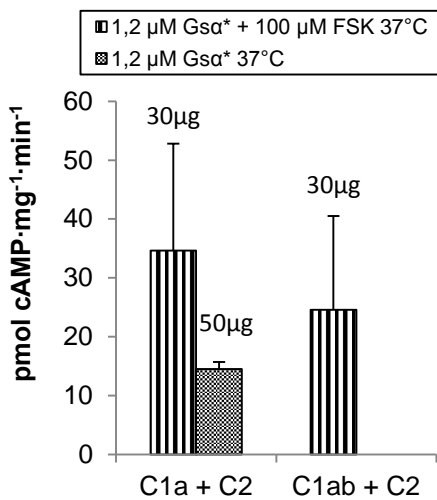
Da die CqsS-hACII Konstrukte gering aktiv waren und nur in begrenztem Umfang stimuliert werden konnten (Fig. 39B, 40A, 41A), wurden lösliche Konstrukte aus den beiden Untereinheiten hACII C1a(b) und hACII C2 ohne CqsS-Rezeptor hergestellt. Damit sollte getestet werden, ob als Ursache für die geringen Aktivitäten evtl. Inkompatibilität bei der bakteriellen Expression oder ein störender Einfluss von CqsS in Frage kommen. Die beiden hACII-Untereinheiten wurden entweder getrennt oder gelinkert (Linker: TRAAGGPPAAGGLE) exprimiert (vollständige Sequenz Anhang 2). Die einzelnen Untereinheiten hACII C1a, C1ab und C2 sind inaktiv. Bei 37°C lagen ihre Basalaktivitäten mit ungefähr 30 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ im selben Bereich wie die der CqsS-Rezeptorkonstrukte (Fig. 42A bzw. Fig. 39A, 41A). Entgegen der

Erwartung zeigte das Mischen (C1a/b + C2) bzw. Linkern (C1a/b-L-C2) beider katalytischer Domänen keine höhere Aktivität im Vergleich zu den Einzeldomänen, selbst als die eingesetzte Proteinmenge erhöht wurde (Fig. 42A). Die Zugabe von 1,2 μM G_{sa}^* und 100 μM FSK konnte die Aktivität von hACII C1a(b) + hACII C2 steigern (Fig. 42B). Allerdings lagen diese Aktivitäten ungefähr auf demselben Niveau wie die der Einzeldomänen (vgl. Fig. 42A und B). Bei den Linkerkonstrukten zeigte nur hACII C1ab-Linker-hACII C2 eine Aktivitätssteigerung bei Zugabe von 1,2 μM G_{sa}^* (Fig. 42C). Die gleichzeitige Zugabe von G_{sa}^* und FSK hatte hier keine aktivitätssteigernde Wirkung (Fig. 42C). Der Western Blot (Fig. 42D) zeigte eine geringe Expression von hACII C1a(b), während hACII C2 stark exprimiert wurde. Sowohl hACII C1a als auch C1ab wiesen eine Abbaubande auf. hACII C2 dimerisierte womöglich, da eine zusätzliche Bande bei ca. 60 kDa zu sehen war. Die beiden Linkerkonstrukte hACII C1a(b)-Linker-hACII C2 konnten kaum nachgewiesen werden. hACII C1ab-Linker-hACII C2 wies in einem Western Blot eine starke Abbaubande bei ca. 30 kDa auf und ist möglicherweise nicht stabil. Auffällig ist, dass ohne CqsS die Banden auf der erwarteten Höhe detektiert wurden. Da auch ohne den Rezeptor keine höheren Aktivitäten oder Regulation zu erzielen war, konnte CqsS als Ursache ausgeschlossen werden.

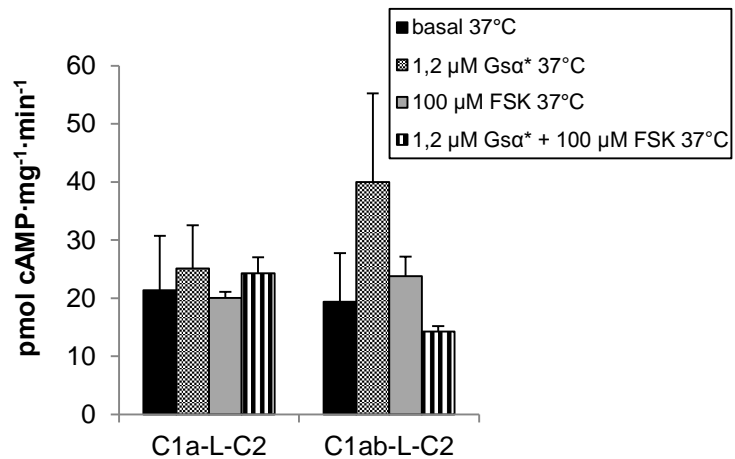
A



B



C



D

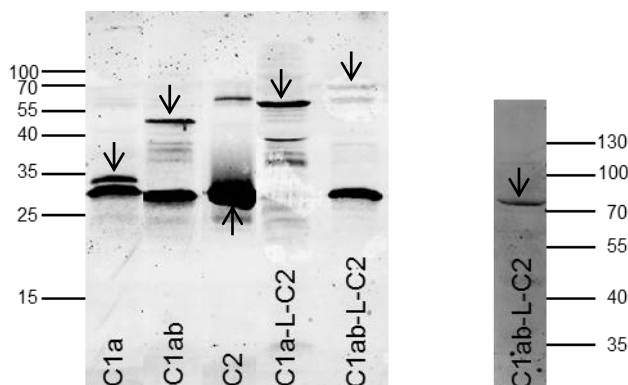


Fig. 42: A) AC-Aktivität der hACII-Domänen C1a(b) und C2 einzeln oder in Kombination, n=2. Jeweils eingesetzte Gesamtproteinmenge in der Legende angegeben (bei C1a(b)+C2: 10 µg feste Proteinmenge für C2, C1a(b) variable Proteinmenge).

B) AC-Aktivität der titrierten hACII-Domänen + G_{sα}* bzw. FSK, n=2. Jeweils eingesetzte Gesamtproteinmenge über dem Balken angegeben (bei C1a/b+C2: 10 µg feste Proteinmenge für C2, C1a(b) variable Proteinmenge).

C) AC-Aktivität der Linkerkonstrukte C1a(b)-L-C2 der hACII-Domänen ± G_{sα}* und FSK. Je 20 µg Protein, n=2.

D) Western Blot der hACII-Domänen mit Anti-RGS-His₄ Antikörper. Erwartete Bandenhöhe (jeweils mit Pfeil markiert): 31 kDa C1a (8 µg), 46 kDa C1ab (15 µg), 30 kDa C2 (2 µg), 61 kDa C1a-L-C2 (33 µg), 76 kDa C1ab-L-C2 (7 µg linkes Gel bzw. 5 µg rechtes Gel). Der starke Abbau von C1ab-L-C2 ist nicht in jedem Western Blot zu sehen. Li: 15%iges SDS-Gel, re: 10%iges SDS-Gel.

3.2.3 Regulierung von Rv1625c-Konstrukten durch G_{sa}^*

Die vorangegangenen Versuche mit *Mammalia*-ACn ergaben nur geringe Aktivitäten, eine Regulation wurde nicht gesichert. Auf Grund der teilweise schwachen Banden im Western Blot lag die Vermutung nahe, dass es sich um ein grundlegendes Problem bei der Expression der chimären *Mammalia*-Konstrukte in Bakterien handelte. Zur Klärung dieses Verdachts wurde mit der mykobakteriellen AC Rv1625c als *Mammalia*-Modellsystem weiter gearbeitet. Die lösliche Domäne von Rv1625c zeigte keine Probleme bei der Expression in verschiedenen *E. coli* Stämmen, Aktivitäten von $685 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ eines gelinkerten Homodimers sind publiziert (Guo et al., 2001). Bei Rv1625c handelt es sich um die Hälfte einer *Mammalia*-AC bestehend aus einem 6-TM Membrananker und einer katalytischen Domäne. Mittels der Programme HHpred und Modeller (erhalten von H. Zhu, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) wurde die räumliche Struktur des löslichen Teils von Rv1625c mit der vorhandenen Struktur von *Mammalia* ACV C1 und ACII C2 (Tesmer et al., 1997) als Basis modelliert (Fig. 43). Rv1625c (blau) weicht nur an wenigen Stellen von ACV C1 (rot) und ACII C2 (grün) ab (vgl. auch Alignment Fig. 46). Durch Mutationen sollte Rv1625c weiter an *Mammalia*-ACn angeglichen werden. Zunächst wurde die lösliche Domäne von Rv1625c durch passende Mutationen in eine Rv1625c-C1 und Rv1625c-C2 umgewandelt, welche nur bei Dimerisierung Aktivität zeigen (Guo et al., 2001). Danach sollte die allmähliche Umwandlung zu einem G_{sa}^* -aktivierten Rv1625c-C1/C2-Heterodimer erfolgen. Mit diesem Modell und Alignments sollten die Schwierigkeiten bei der Expression von *Mammalia*-ACn erkannt werden. Mit diesen Erkenntnissen könnten wiederum die *Mammalia*-ACn angepasst werden, damit eine bakterielle Expression erfolgreich ist.

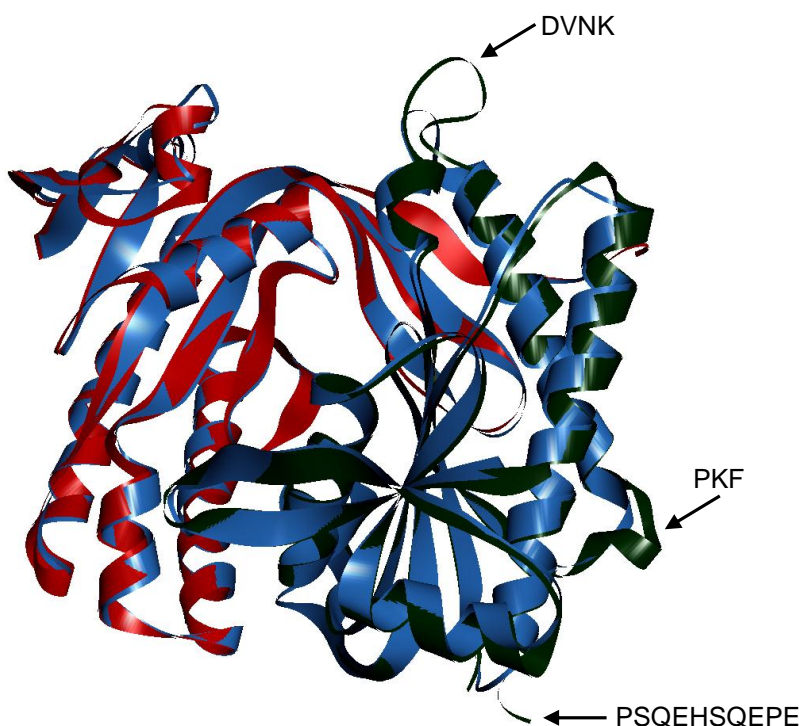


Fig. 43: Darstellung der Überlagerung der bekannten Struktur von ACV C1 (rot) und ACII C2 (grün) (Tesmer et al., 1997) mit der unbekannt Struktur von Rv1625c (blau). Markante Abweichungen in den Strukturen sind mit Pfeilen und der entsprechenden AS-Sequenz markiert. In ACII C2 konnte ein kurzer Abschnitt (PSQEHSQEPE) der Struktur nicht aufgeklärt werden. Die zugehörigen Sequenzen sind im Alignment von Fig. 46 zu finden.

3.2.3.1 Mutationen zur Bildung von Rv1625c-C1 und Rv1625c-C2

Rv1625c bildet normalerweise ein Homodimer mit zwei aktiven katalytischen Zentren (Fig. 3B) (Guo et al., 2001). Jedes Monomer besitzt alle sechs ASn, die für die Katalyse von ATP zu cAMP von Bedeutung sind. Eine *Mammalia*-AC hingegen bildet ein katalytisches Zentrum aus beiden Untereinheiten (Fig. 1B), da die katalytischen Reste auf C1 und C2 verteilt sind (Guo et al., 2001). Anhand von Sequenzvergleichen mit einer *Mammalia*-ACII (Fig. 44) und auf Grundlage der Ergebnisse von Guo et al. 2001 (Guo et al., 2001) wurden die Mutationen zur Bildung einer Rv1625c-C1 und von zwei Varianten einer Rv1625c-C2 gewählt. Als Startpunkt von Rv1625c diente D₂₀₄ (Guo et al., 2001).

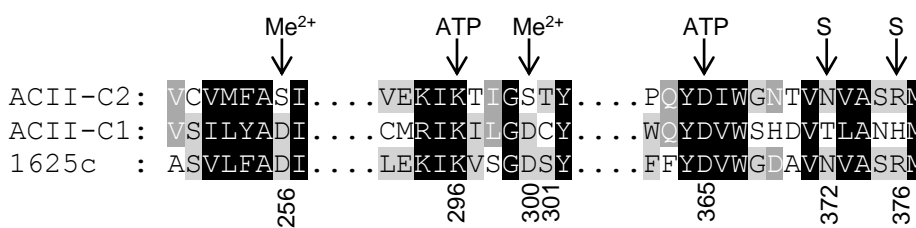
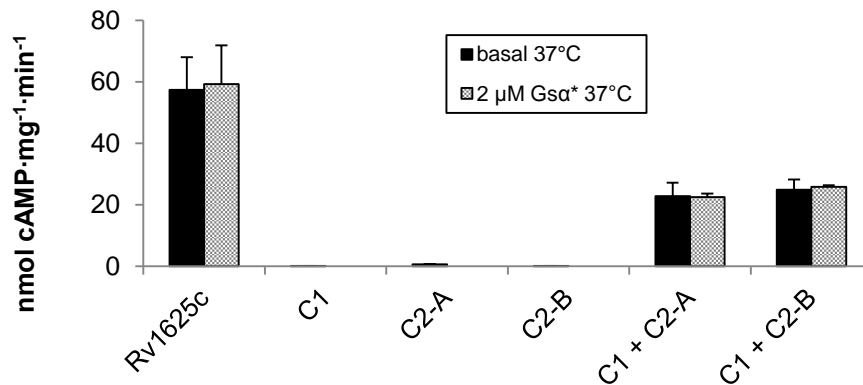


Fig. 44: Ausschnitte des Alignments der katalytischen Domänen C1 und C2 einer *Mammalia*-ACII und von Rv1625c. Über dem Alignment sind die katalytischen ASn markiert (Me²⁺ = Bindestelle für Metallionen, ATP = Substraterkennung, S = Stabilisierung des Übergangszustandes von ATP zu cAMP). Diese ASn sind mit der Nummerierung von Rv1625c versehen.

Wie in Fig. 44 zu sehen ist, sind die katalytischen ASn zur Substraterkennung in *Mammalia*-ACII und Rv1625c (K₂₉₆, D₃₆₅) identisch. Rv1625c-C1 sollte wie in *Mammalia*-ACn Metallionen binden und Rv1625c-C2 sollte zur Stabilisierung des Übergangszustandes dienen. Anhand des Alignments (Fig. 44) wurden die ASn in Rv1625c entsprechend der ACII mutiert. Rv1625c-C1 erhielt demnach die jeweiligen ASn aus ACII C1 (N₃₇₂T/R₃₇₆H). Für Rv1625c-C2 wurden zwei Varianten laut der ACII C2 gebildet (Variante A: D₂₅₆S/D₃₀₀S/S₃₀₁T; Variante B: D₂₅₆S/D₃₀₀S). Bei Variante A wurden nicht nur die entsprechenden katalytischen ASn D₂₅₆ und D₃₀₀ wie in Variante B mutiert, sondern zusätzlich auch die AS S₃₀₁ verändert, da bei vielen *Mammalia* C2 an dieser Position Thr steht (vollständige Sequenz Anhang 6). Die Konstrukte Rv1625c-C1 und -C2-A/B wurden getrennt in pQE80 kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Im AC-Test (Fig. 45A) waren C1 und C2-A/B alleine inaktiv, bei gemeinsamer Zugabe aktiv. Rv1625c-C1/-C2-A/B waren in diesem Test ungefähr halb so aktiv wie der Wildtyp Rv1625c. Das könnte daran liegen, dass die mutierten Untereinheiten nicht titriert wurden, um die maximale Aktivität zu bestimmen. Die Aktivitäten von Rv1625c-C1 mit -C2-A oder -B waren nahezu identisch und wurden nicht durch G_{sa}* beeinflusst. Um ein Titrieren der Untereinheiten zu umgehen, wurde ein Linkerkonstrukt (Linker: TRAAGGPPAAGGLE (Guo et al., 2001)) aus Rv1625c-C1 und Rv1625c-C2-A erstellt, welches unter gleichen Bedingungen exprimiert und gereinigt wurde (vollständige Sequenz Anhang 6). Dieses Konstrukt wird im Folgenden als „RV-1“ (für Rv1625c) bezeichnet und

zeigte eine Aktivität von $944,7 \pm 125,9$ nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ und eine 10%ige Stimulation durch 1,2 µM G_{sα}* (n=6). Unter den gleichen Bedingungen wurde auch der gereinigte Überstand des Leervektors pQE80-L getestet (157 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹). Im Western Blot (Fig. 45B) waren trotz Erhitzen der Proben (10 min, 80°C) sowohl im Wildtyp als auch in den mutierten Untereinheiten von Rv1625c Dimere bei ca. 55 kDa sichtbar. Obwohl keine Cysteine in der Sequenz vorhanden sind, treten anscheinend sehr stabile Dimere auf.

A



B

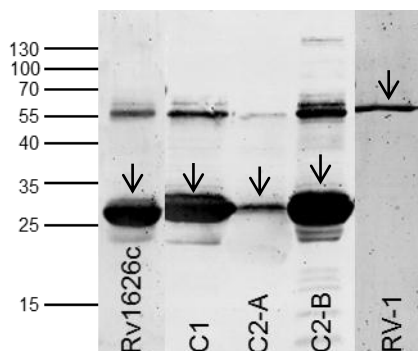


Fig. 45: A) AC-Aktivität der löslichen Rv1625c-Konstrukte ± G_{sα}* (n=2). Rv1625c = D₂₀₄-V₄₄₃ (ungelinkert), C1 = Rv1625C₂₀₄₋₄₄₃ [N₃₇₂T/R₃₇₆H], C2-A = Rv1625C₂₀₄₋₄₄₃ [D₂₅₆S/D₃₀₀S/S₃₀₁T], C2-B = Rv1625C₂₀₄₋₄₄₃ [D₂₅₆S/D₃₀₀S], je Untereinheit 2 µg Protein.

B) Western Blot mit Anti-RGS-His₄ Antikörper. Erwartete Bandenhöhe (Pfeile): Rv1625c, C1, C2-A/B 28 kDa, Linkerkonstrukt RV-1 55 kDa, je 0,5 µg Protein.

3.2.3.2 Mutationen für ein G_{sα}*-stimuliertes Rv1625c-C1/-C2-Heterodimer

Nachdem mit Rv1625c-C1 und Rv1625c-C2 ein funktionsfähiges Modell einer *Mammalia*-AC erstellt wurde, wurden weitere Mutationen eingeführt, die eine G_{sα}*-Stimulation ermöglichen sollten. Grundlage für die Überlegungen waren mehrere Publikationen (Hatley et al., 2000; Tesmer et al., 1997; Yan et al., 1997; Zimmermann et al., 1998). Darin wurden einige mutmaßliche G_{sα}-Bindestellen an *Mammalia*-ACn diskutiert. Mit Hilfe eines Alignments von Rv1625c und *Mammalia*-ACII und -ACV wurden zunächst generelle Unterschiede in den Sequenzen analysiert, die für eine erfolgreiche G_{sα}*-Bindung angepasst werden sollten (Fig. 46). Da sowohl Sequenzunterschiede als auch strukturelle Anforderungen eine Rolle spielen könnten, wurde die bekannte Sekundärstruktur des ACV C1/ACII C2 Heterodimers (Fig. 43) schematisch in das Alignment mit einbezogen (Tesmer et al., 1997).

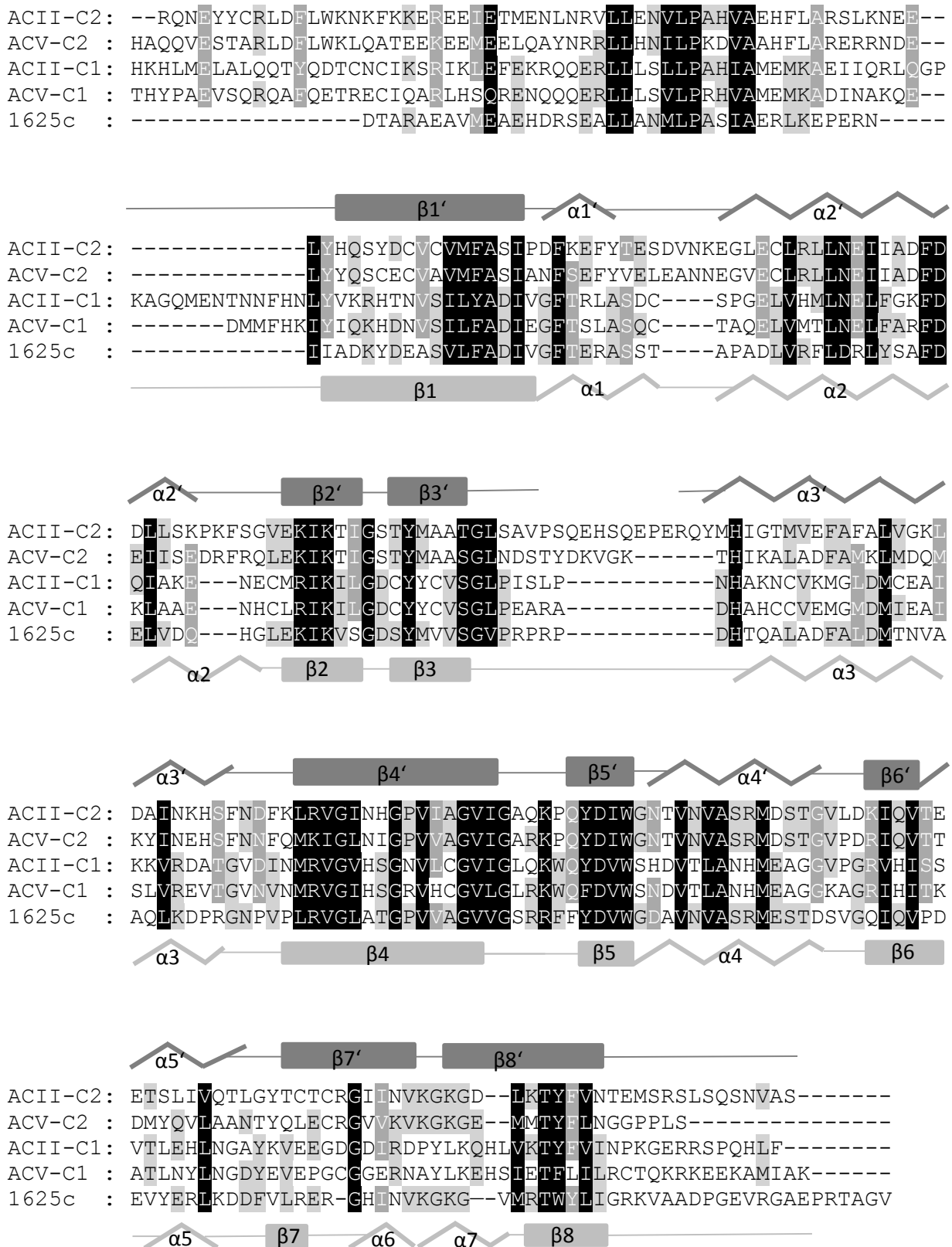


Fig. 46: Alignment von Rv1625c (D₂₀₄-V₄₄₃) und *Mammalia*-ACII und -ACV. Der Grad der Konservierung ist in verschiedenen Grautönen angegeben (weiß = nicht konserviert, schwarz = hoch konserviert). Die Sekundärstruktur des ACV C1/ACII C2-Heterodimers ist schematisch dargestellt und nummeriert (Tesmer et al., 1997). Oberhalb des Alignments ist die Struktur der C2-Untereinheit (α' , β') gezeichnet, unterhalb die der C1-Untereinheit (α , β).

In Tab. 20 sind alle getesteten Mutationen aufgeführt. Es handelt sich dabei um Varianten von RV-1. In Anlehnung an RV-1 werden die Konstrukte in fortlaufender Reihe nummeriert. Die vollständigen Sequenzen sind in Anhang 6 zusammengestellt. In der Tabelle wird die AS-Bezifferung von Rv1625c angegeben, die mutiert wurden oder nach denen ein Einschub erfolgte. Da zu Beginn unbekannt war, wie viele Mutationen nötig sein würden, um eine G_{sa}^* -Stimulation in den Mutanten zu bewirken, wurden Mutationen sowohl einzeln als auch in Kombination in die Konstrukte eingefügt.

Tab. 20 (folgende Seite): Auflistung der mutierten Rv1625c₍₂₀₄₋₄₄₃₎-Konstrukte. Ausgangskonstrukt war RV-1 mit den Mutationen Rv1625c-C1[N₃₇₂T/R₃₇₆H] und Rv1625c-C2-A[D₂₅₆S/D₃₀₀S/S₃₀₁T], die auch in allen folgenden Konstrukten beibehalten wurden. Die C1- und C2-A-Untereinheiten sind jeweils mit einem Linker (L = TRAAGGPPAAGGLE, grauer Balken) verknüpft. Zur Orientierung wurden die Mutationen entsprechend ihrer Lage wie in Fig. 46 angegeben. Bereits erwähnte Mutationen werden nicht erneut mit der Stelle ihrer Insertion genannt.

Linker-konstrukt	Rv1625c-C1 [N ₃₇₂ T/R ₃₇₆ H]			L	Rv1625c-C2-A [D ₂₅₆ S/D ₃₀₀ S/S ₃₀₁ T]					
	C-Helix	vor β 1	β 7 α 6 α 7		C-Helix	+4 ASn	α 2'	+3 ASn	+11 ASn	α 3'
RV-2		R ₂₄₀ +NFH		“						
RV-3	N ₂₂₅ S	NFH		“						
RV-4		R ₂₄₀ +IFH		“						
RV-5		R ₂₄₀ +IFHNIAER LKEPERNFH		“						
RV-6			F ₄₀₀ +EVEPGCGGE RNAYLKEHSM ₄₁₆	“						
RV-7	L ₂₂₇ P			“						
RV-8				“	L ₂₂₇ P					
RV-9	L ₂₂₇ P			“	L ₂₂₇ P					
RV-10				“		T ₂₆₇ + DVNK				
RV-11				“			D ₂₇₇ N, R ₂₇₈ E, A ₂₈₂ D			
RV-12				“		DVNK	NED			
RV-13				“		DVNK	D ₂₇₁ E, L ₂₇₂ C, NED			
RV-14				“				V ₂₈₇ +S, H ₂₉₀ +FS		
RV-15				“		DVNK		S, FS		
RV-16				“		DVNK	NED	S, FS		
RV-17				“				Q ₂₈₉ +PKF		
RV-18				“				H ₂₉₀ + KFS		
RV-19				“		DVNK		KFS		
RV-20				“		DVNK	NED	KFS		
RV-21				“						R ₃₃₇ S, G ₃₃₈ F
RV-22				“						P ₃₃₆ H, SF
RV-23				“						K ₃₃₄ N, HSF
RV-24				“		DVNK	NED	KFS		HSF
RV-25				“					V ₃₀₈ +NDSTYDKVKGKTH ₃₁₅	
RV-26		NFH		“		DVNK	NED	PKF		SF
RV-27		IFH		“		DVNK	NED	KFS		HSF
RV-28		IFHNIAER LKEPERNFH	EVEPGCGGERNA YLKEHS	“		DVNK	EC, NED	PKF	NDSTYDKVGKT	N, HSF

RV-2 wurde konstruiert, da N378 und F379 (ACII) vor dem β 1-Faltblatt direkt mit $G_{S\alpha}$ interagieren könnten (Tesmer et al., 1997). Hier wurde zusätzlich eingefügt, da es in der C1-Domäne von *Mammalia*-ACn konserviert ist und Rv1625c vor dem β 1-Faltblatt generell eine kürzere AS-Sequenz verglichen mit den *Mammalia*-ACn aufwies.

In RV-3 wird die zusätzliche Mutation N₂₂₅S eingeführt, da es sich hier in der C1-Domäne von *Mammalia*-ACn um eine stark konservierte Position handelt.

RV-4 entspricht RV-2, nur dass die ASn IFH aus *Mammalia*-ACI stammen und NFH aus *Mammalia*-ACII.

Der Einschub von 18 ASn (IFHNIIAERLKEPERNFH) in RV-5 ist auf eine spontane Sequenzverlängerung während der Klonierung des Konstrukts RV-4 zurückzuführen. Dieses Konstrukt wurde getestet, da es die beiden gewünschten Motive IFH und NFH beinhaltet.

Bei RV-6 handelt es sich um eine strukturelle Anpassung. Die C1-Domäne weist an ihrem C-Terminus die Folge β 7 α 6 α 7 β 8 mit zwei helicalen Strukturen auf, während die C2-Domäne in diesem Bereich nur die beiden β -Faltblätter β 7' β 8' enthält (Fig. 46) (Tesmer et al., 1997). Da die Sequenz von Rv1625c-C1 in diesem Bereich mit der *Mammalia* C2-Domäne nahezu identisch ist, wurde die entsprechende AS-Sequenz mit der der *Mammalia* C1-Domäne (EVEPGCGGERNAYLKEHS) getauscht.

Bei den Konstrukten RV-7, RV-8 und RV-9 handelt es sich in den jeweiligen Untereinheiten immer um die Mutation L₂₂₇P. Ursprung dieser Mutation waren Studien an Hefezellen ohne funktionsfähige AC, in denen mutierte ACV Varianten exprimiert wurden (Zimmermann et al., 1998). Als eine von mehreren Mutationen führte L₉₆₇P in ACV zu einer Cyclase, die nicht mehr auf $G_{S\alpha}$ reagiert (Zimmermann et al., 1998). Es wurde eine verminderte Bindungsfähigkeit dieser Konstrukte an $G_{S\alpha}$ und eine geringere Stimulierbarkeit durch $G_{S\alpha}$ festgestellt (Zimmermann et al., 1998). Diese Mutation befindet sich in einem stark konservierten Bereich innerhalb der vermeintlichen C-Helix und wurde für Rv1625c in allen Untereinheiten getestet.

DVNK in RV-10 diente dazu, die um vier ASn kürzere Rv1625c im Bereich zwischen α 1' und α 2' zu verlängern und die vermeintlichen $G_{S\alpha}$ -bindenden ASn Val und Asn zu erhalten (Tesmer et al., 1997).

Die Mutationen D₂₇₇N/R₂₇₈E/A₂₈₂D in der α 2' von RV-11 sollten ebenfalls $G_{S\alpha}$ binden, genauso wie die zusätzlichen Mutationen D₂₇₁E/L₂₇₂C in RV-13 (Tesmer et al., 1997). Die Varianten RV-14, RV-17 und RV-18 sollten die um drei ASn kürzere Rv1625c zwischen α 2' und β 2' verlängern.

In ACII α 3' befinden sich laut Tesmer *et al.* (Tesmer et al., 1997) die ASn H989 und F991, die ebenfalls mit $G_{S\alpha}$ interagieren sollen. Dies führte zu den Konstrukten RV-21, RV-22 und RV-23. Bei der Mutation K₃₃₄N im letzten Konstrukt handelt es sich um das Einführen eines konservierten Asn.

In der C2-Domäne herrscht zwischen β 3' und α 3' eine deutliche Längenvariation zwischen Rv1625c und den *Mammalia*-ACn. In diesem Bereich konnte die Kristallstruktur nicht vollständig aufgeklärt werden, was mit einer Lücke in der Strukturdarstellung in Fig. 43 bzw. 46 an dieser Stelle angedeutet wird. Die um elf

ASn kürzere Rv1625c wurde mit den entsprechenden elf ASn aus ACV C2 (NDSTYDKVGKT) aufgefüllt (RV-25).

Alle anderen bislang nicht erwähnten Konstrukte setzen sich aus Kombinationen der bereits erläuterten Mutationen zusammen.

Da die Mutationen in die jeweilige Rv1625c-C1- oder -C2-A vor dem Linkern eingefügt wurden, konnten die Aktivitäten der Untereinheiten bereits in Vorversuchen durch Titrieren im AC-Test untersucht werden. In den meisten Fällen konnte eine gemeinsame Zugabe der verschiedenen Rv1625c-Untereinheiten keine Aktivitätssteigerung im Vergleich zu der höchsten Basalaktivität, die für eine einzelne Untereinheit gemessen wurde, erzielen (Tab. 21A+B). Dies könnte an den zusätzlich eingeführten Mutationen liegen, da die Ausgangskonstrukte Rv1625c-C1 und -C2-A zusammen deutlich höhere Aktivität als einzeln aufwiesen (Fig. 45A). Die einzeln getesteten Rv1625c-C2-A Varianten in Tab. 21A zeigten bei Zugabe von G_{sa}^* bereits eine Aktivitätserhöhung. Bei gleichzeitiger Zugabe beider Rv1625c-Untereinheiten und G_{sa}^* war nur eine geringe Aktivitätssteigerung messbar (Tab. 21A). Die Ergebnisse in Tab. 21B weisen keine Aktivitätserhöhung bei Zugabe von G_{sa}^* bei den getesteten Rv1625c-Untereinheiten auf. In den Western Blots (Fig. 47) wurden für alle C1- und C2-A-Untereinheiten mehr oder weniger starke Dimerisierungsbanden nachgewiesen.

Generell wiesen die bislang getesteten, titrierten Konstrukte niedrigere Aktivitäten als die entsprechenden Linkerkonstrukte auf (Tab. 21A+B, Tab. 22). Um das Titrieren für jedes neue Konstrukt zu umgehen, wurden in den fortlaufenden Versuchen nur noch Linkerkonstrukte, wie in Tab. 20 aufgeführt, getestet. So wurde gewährleistet, dass die Untereinheiten in jedem Fall zusammenfanden und die Auswirkungen der Mutationen auf die Aktivität sofort zu beurteilen waren.

Tab. 21A: AC-Aktivität von Rv1625c-C1 und unterschiedlichen Rv1625c-C2-A Untereinheiten einzeln oder bei gemeinsamer Zugabe $\pm G_{sa}^*$ (n=2). Je Untereinheit wurden 2 μ g Protein eingesetzt. Die Bezeichnung der Konstrukte beruht auf Tab. 20, allerdings handelt es sich hier nicht um Linkerkonstrukte, sondern nur um die jeweilige angezeigte Untereinheit (z.B. C2 RV-15 = Rv1625c-C2-A[+DVNK, +S, FS]).

Unter- einheit		basal 37°C [pmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]		1,8 μ M G_{sa}^* 37°C [pmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	
		-	+ Rv1625c-C1	-	+ Rv1625c-C1
C1	Rv1625c-C1	170 \pm 32	-	153 \pm 6	-
C2	RV-15	115 \pm 15	145 \pm 8	172 \pm 4	150 \pm 7
C2	RV-16	154 \pm 11	162 \pm 15	253 \pm 18	184 \pm 11
C2	RV-19	29 \pm 17	268 \pm 18	68 \pm 0	252 \pm 17

Tab. 21B: AC-Aktivität einer Rv1625c-C2-A Untereinheit und unterschiedlichen Rv1625c-C1 Varianten einzeln oder bei gemeinsamer Zugabe $\pm G_{sa}^*$ ($n=2$). Für die Rv1625c-C1 Varianten wurden unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt, für die Rv1625c-C2-A Untereinheit wurden konstant 0,5 μg Protein verwendet. Die Bezeichnung der Konstrukte erfolgte wie in Tab. 21A. (n.t. = nicht getestet)

Unter-einheit		Protein [μg]	basal 37°C [pmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	1,7 μM G_{sa}^* 37°C [pmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]
C1	RV-2	10	78 \pm 9	n.t.
C1	RV-4	10	61 \pm 11	n.t.
C1	RV-5	10	66 \pm 3	n.t.
C2	RV-26	0,5	286 \pm 74	n.t.
C1+C2	RV-2 + RV-26	5 + 0,5	246 \pm 3	n.t.
		10 + 0,5	280 \pm 22	172 \pm 5
C1+C2	RV-4 + RV-26	5 + 0,5	164 \pm 2	n.t.
		10 + 0,5	188 \pm 1	122 \pm 17
C1+C2	RV-5 + RV-26	5 + 0,5	97 \pm 10	n.t.
		10 + 0,5	91 \pm 4	82 \pm 6

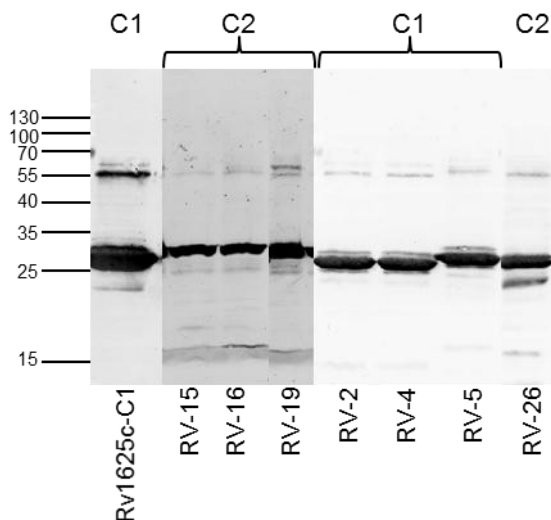


Fig: 47: Western Blot der getesteten Rv1625c-Untereinheiten aus Tab. 21A+B mit Anti-RGS-His₄ Antikörper. Die Bezeichnung der Konstrukte erfolgt nach Tab. 20, allerdings handelt es sich nur um die jeweils im Western Blot angegebenen Untereinheiten, nicht um Linkerkonstrukte. Erwartete Bandenhöhe: 28-30 kDa, bis auf Rv-1625c-C1 (0,5 μg) alle Proben mit 2 μg Protein aufgetragen.

Die Linkerkonstrukte wurden von A. Schultz in pQE80-L kloniert und von U. Kurz in *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* BLR(DE3) (nach Bedarf mit pREP4) exprimiert und gereinigt. Tab. 22 zeigt die Aktivitäten der Konstrukte und die Wirkung von G_{sa}^* . Die Bezeichnung der Linkerkonstrukte erfolgt laut Tab. 20. Die Konstrukte sind in absteigender Aktivität angeordnet. Es wurden nur diejenigen Konstrukte mehrmals getestet, die eine Tendenz zur G_{sa}^* -Stimulierung aufwiesen. Alle Konstrukte konnten im Western Blot nachgewiesen werden (Fig. 48).

Tab. 22 (folgende Seite): AC-Aktivität der mutierten Varianten von RV-1 $\pm G_{sa}^*$ bei 37°C. Die Linkerkonstrukte sind laut Tab. 20 bezeichnet. Jedes dieser Konstrukte enthält die Mutationen N₃₇₂T/R₃₇₆H in C1 und D₂₅₆S/D₃₀₀S/S₃₀₁T in C2-A. Zusätzliche Mutationen sind mit einem Hinweis zu ihrer ungefähren Lage in der Struktur angegeben. Fett gedruckte Mutationen stehen laut Tesmer *et al.* (Tesmer et al., 1997) möglicherweise in direktem G_{sa}^* -Kontakt. Die Konstrukte sind in absteigender Aktivität angeordnet. Bei einer Stimulation durch G_{sa}^* sind die Konstrukte grau hinterlegt. Die Basalaktivitäten ergaben sich aus dem Mittelwert \pm SD ($n=2$) bzw. \pm SEM ($n=4$). Die Stimulation durch G_{sa}^* war nicht signifikant.

Linker-konstrukt	Mutation C1[N ₃₇₂ T/R ₃₇₆ H]	Mutation C2-A[D ₂₅₆ S/D ₃₀₀ S/S ₃₀₁ T]	Protein [µg]	n	Basalaktivität [nmol cAMP ·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	G _{sa} *- Zugabe [µM]	+ G _{sa} * [nmol cAMP ·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	Stimulierung (+)/ Hemmung (-) [%]
	C-Helix.....β1.....α6α7	+4AS.....α2'.....+3AS.....+11AS.....α3'						
RV-11	NED.....	0,01	4	2780,5 ± 427,9	1,2	2726,3 ± 596,4	- 2
RV-13		.DVNK...EC.NED.....	0,05	4	907,9 ± 103,8	1,2	1100,0 ± 94,2	+ 21
RV-12		.DVNK.....NED.....	0,05	4	774,0 ± 113,7	1,2	867,9 ± 129,6	+ 12
RV-21	SF	0,1	4	629,7 ± 76,0	1,2	762,4 ± 79,1	+ 21
RV-2NFH.....		0,1	2	494,7 ± 26,3	1,2	354,7 ± 148,8	- 28
RV-22	HSF	0,1	4	448,0 ± 55,3	1,2	596,2 ± 30,8	+ 33
RV-17	PKF.....	0,1	2	444,5 ± 30,6	1,2	497,2 ± 75,0	+ 12
RV-23	N...HSF	0,1	4	418,3 ± 61,8	1,2	531,6 ± 72,2	+ 27
RV-10		.DVNK.....	0,1	2	368,3 ± 7,8	1,2	338,2 ± 44,3	- 8
RV-25	NDSTYDKVGKT.....	0,5	2	268,8 ± 5,8	3,8	246,3 ± 0,3	- 8
RV-3	S.....NFH.....		0,5	2	178,1 ± 11,2	3,8	196,6 ± 4,8	+ 10
RV-5	...IFHNIIAERLKEPERNFH.....		0,5	2	161,4 ± 2,4	1,6 3,1	140,2 ± 8,8 128,9 ± 4,9	- 13 - 20
RV-8		P.....	0,5	4	148,9 ± 7,5	1,2	171,4 ± 19,2	+ 15
RV-4IFH.....		0,1	4	132,5 ± 12,7	1,2	168,1 ± 20,2	+ 27
RV-6EVEPGCGGERNAYLKEHS		0,5	4	60,1 ± 9,8	1,2	63,1 ± 1,6	+ 5
RV-18	KFS.....	0,5	4	56,3 ± 2,9	1,2	56,5 ± 6,5	0
RV-9	P.....	P.....	0,5	4	54,6 ± 1,9	1,2	54,2 ± 11,1	- 1
RV-7	P		0,5	2	40,8 ± 0,3	1,2	41,6 ± 0,5	+ 2
RV-26NFH.....	.DVNK.....NED...PKF.....SF	0,5	2	37,7 ± 10,4	1,2	21,0 ± 8,1	- 44
RV-20		.DVNK.....NED....KFS.....	0,5	2	23,9 ± 1,7	0,8 1,7	20,3 ± 0,1 20,1 ± 0,9	- 15 - 16
RV-19		.DVNK.....KFS.....	2	2	16,5 ± 2,3	1,8	18,7 ± 1,8	+ 13
RV-14	S.FS.....	0,5	2	10,3 ± 0,7	1,6 3,1	9,9 ± 1,3 8,3 ± 0,0	- 3 - 19
RV-24		.DVNK.....NED....KFS.....HSF	0,5	2	8,1 ± 0,2	0,8 1,7	5,8 ± 0,0 5,4 ± 0,2	- 29 - 34
RV-16		.DVNK.....NED....S.FS.....	2	2	5,5 ± 0,5	1,8	5,7 ± 0,3	+ 4
RV-15		.DVNK.....S.FS.....	2	2	2,0 ± 0,1	1,8	2,1 ± 0,0	+ 8
RV-27IFH.....	.DVNK.....NED....KFS.....HSF	2	2	1,5 ± 0,1	0,8 1,7	1,5 ± 0,0 1,1 ± 0,0	- 3 - 29
RV-28	...IFHNIIAERLKEPERNFH.....EVEPGCGGERNAYLKEHS	.DVNK...EC.NED...PKF...NDSTYDKVGKT...N...HSF	0,5	2	0,8 ± 0,2	1,6 3,1	0,7 ± 0,1 0,5 ± 0,1	- 14 - 34

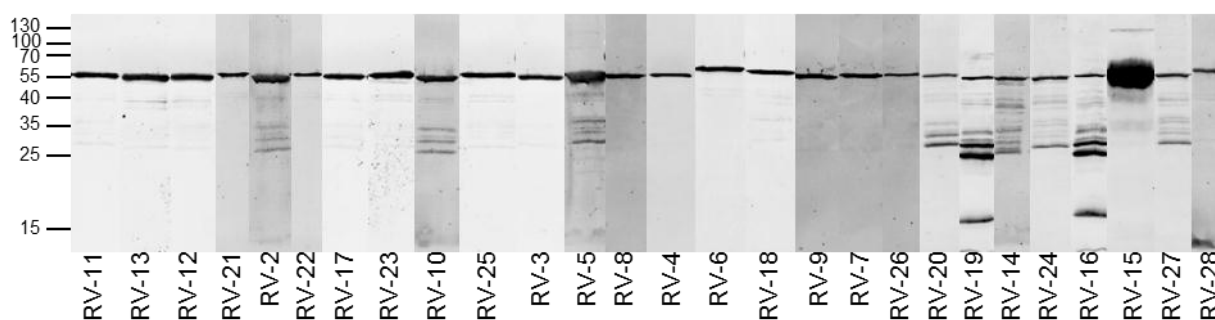


Fig. 48: Western Blots der mutierten Rv1625c-Linkerkonstrukte mit Anti-RGS-His₄ Antikörper. Die Reihenfolge der Konstrukte erfolgt laut Tab. 22 (Benennung entsprechend Tab. 20). Erwartete Bandenhöhe 55-59 kDa. Je 0,5 µg Protein aufgetragen (außer: RV-16, RV-19 2 µg, RV-15 10 µg).

Die Ergebnisse der mutierten Rv1625c-Linkerkonstrukte zeigten (Tab. 22), dass das Einführen von weiteren Mutationen tendenziell eine geringere Basalaktivität im Vergleich zum Ausgangskonstrukt RV-1 (ca. 945 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹) bewirkte. Einzige Ausnahme hiervon war RV-11 mit ca. 2781 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ (Tab. 22). Das Konstrukt mit der meisten Anzahl an Mutationen hatte die geringste Basalaktivität (RV-28 ca. 1 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, Tab. 22). Bemerkenswert war die Wirkung einiger Mutationen auf die Basalaktivität von Konstrukten, die sich nur in einzelnen ASn voneinander unterschieden (fett gedruckt, bzw. identische ASn unterstrichen):

Aktivität [nmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]											
RV-21	[SF]	630	RV-17	[PKF]	445	RV-2	[NFH]	495	RV-8	C2[P]	149
RV-22	[HSF]	448	RV-18	[KFS]	56	RV-4	[IFH]	133	RV-9	C1[P]-C2[P]	55
RV-23	[N,HSF]	418	RV-14	[S,FS]	10	RV-3	[S,NFH]	178	RV-7	C1[P]	41

Die Kombination verschiedener Mutationen hatte ebenfalls unterschiedliche Basalaktivitäten zur Folge (Unterschiede fett gedruckt):

Aktivität [nmol cAMP·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]					
RV-20	[DVNK,NED, KFS]	24	RV-26	C1[NFH]-C2[DVNK, NED, PKF, SF]	38
RV-16	[DVNK,NED, S, FS]	6	RV-27	C1[IFH]-C2[DVNK, NED, KFS, HSF]	2
RV-19	[DVNK, KFS]	17			
RV-14	[DVNK, S, FS]	2			

In einigen mutierten Konstrukten wurde bei Zugabe von G_{sα}* statt einer Aktivierung eine Hemmung festgestellt (Tab. 22). Beispielsweise zeigte RV-2 entgegen der Erwartung eine Hemmung von 28%. Ein Phe in *Mammalia*-C1 ist nachweislich an der Bindung von G_{sα} beteiligt (Zimmermann et al., 1998) und an einer vergleichbaren Position in Rv1625c nicht enthalten.

Die vermeintlichen G_{sα}-bindenden ASn Val und Asn (Tesmer et al., 1997) in RV-10 reichten offensichtlich für eine Stimulation nicht aus. Es kam zu einer Hemmung von 8%.

Mehrere Konstrukte, deren Mutationen die Sequenz von Rv1625c verlängern sollten und strukturellen Zwecken dienten, wurden auch gehemmt bzw. zeigten keine Reaktion (RV-25 -8%, RV-18 0%, RV-14 -3 bzw. -19%, Tab. 22).

Die Zufallsmutante RV-5 mit den beiden G_{sa}^* -bindenden Motiven (IFH...NFH) wies ebenfalls eine Hemmung auf (-13 bzw. -20%, Tab. 22).

Selbst Mutanten mit mehreren vermeintlichen G_{sa}^* -Bindungsstellen und strukturellen Anpassungen wurden gehemmt (Tab. 22):

	Hemmung [%]			
RV-20	[DVNK,	NED, KFS]		-15 bzw. -16
RV-24	[DVNK,	NED, KFS,	HSF]	-29 bzw. -34
RV-26	C1[NFH]-C2[DVNK,	NED,PKF,	SF]	-44
RV-27	C1[IFH]-C2[DVNK,	NED, KFS,	HSF]	-3 bzw. -29
RV-28	C1[+18AS, +α6α7]-C2[DVNK,	EC, NED,PKF, +11AS, N,	HSF]	-14 bzw. -34

Die Mutante RV-9 mit L₂₂₇P in beiden Rv1625c-Untereinheiten wurde kaum von G_{sa}^* beeinflusst (1% Hemmung, Tab. 22).

Die in einigen Konstrukten gemessene Stimulation war nicht signifikant. Das Konstrukt mit der höchsten G_{sa}^* -Stimulation war RV-22 mit 33%. Auch die beiden ähnlichen Konstrukte RV-21 und RV-23 wurden durch G_{sa}^* aktiviert (21% bzw. 27%, Tab. 22). Das Ausgangskonstrukt RV-1 wies bereits eine 10%ige Stimulation durch 1,2 μ M G_{sa}^* auf. Vergleichbare Werte mit der 7-fachen G_{sa}^* -Stimulation im Gesamthirn der Maus (Tab. 17) wurden mit den Rv1625c-Linkerkonstrukten nicht erreicht. Im Fall von RV-10 und RV-11 wurde keine Stimulation gemessen, aber in den kombinierten Konstrukten RV-12 und RV-13 schon (12% bzw. 21%, Tab. 22). RV-17 wurde als einziges Konstrukt mit einer Mutation zur Verlängerung der Rv1625c-Sequenz um 12% stimuliert (Tab. 22). Wie bereits erwähnt, konnte das Phe in RV-2 nicht zu einer G_{sa}^* -Stimulation beitragen, wohl aber in den Konstrukten RV-3 und RV-4 (10% bzw. 27%, Tab. 22). Drei Kombinationen aus möglichen G_{sa}^* -bindenden ASn und strukturellen Anpassungen erzielten eine G_{sa}^* -Aktivierung (RV-15 8%, RV-16 4%, RV-19 13%, Tab. 22). Die Mutation L₂₂₇P in den jeweiligen Rv1625c-Untereinheiten bewirkte nicht nur einen Unterschied in der Basalaktivität, sondern auch in der Stimulierbarkeit durch G_{sa}^* (RV-7 2%, RV-8 15%, Tab. 22). Wie bereits erwähnt, blieb das Konstrukt RV-9 mit L₂₂₇P in beiden Untereinheiten von G_{sa}^* unbeeinflusst.

Die Stimulierbarkeit einiger Rv1625c-Linkerkonstrukte durch G_{sa}^* um 20-30% kann durchaus als Anfangserfolg gewertet werden, obwohl die Werte noch nicht vergleichbar mit *Mammalia*-ACn sind. Die Ergebnisse zeigen, wie komplex das Zusammenspiel der beiden Rv1625c-Untereinheiten miteinander und im Bezug auf eine G_{sa}^* -Stimulierung ist. Es konnte bislang noch keine Vorhersage getroffen werden, welche Mutationen für eine G_{sa}^* -Bindung unbedingt erforderlich sind. Es besteht jedoch Hoffnung, dass weitere Experimente in diese Richtung ein passables, gut exprimierbares Modell zur Erforschung von *Mammalia*-ACn liefern könnten.

4 Diskussion

4.1 Solubilisierung von Membranproteinen

4.1.1 Insertion geladener Aminosäuren in Membranhelices von Tsr

In Chemotaxisproteinen spielen die Transmembranbereiche eine große Rolle bei der Signalübertragung nach Bindung eines Liganden in der periplasmatischen Domäne. Die Auswirkung unterschiedlicher Mutationen in den TMs wurde hauptsächlich am Aspartatrezeptor Tar und am Galactose-/Riboserezeptor Trg untersucht (Baumgartner and Hazelbauer, 1996; Oosawa and Simon, 1986; Tatsuno et al., 1994; Umemura et al., 1998). Die Mutation A19K in der TM1 von Tar verhindert die Übertragung des Aspartat-Signals, die Zellen bilden auf aspartathaltigen Agarplatten keine Schwarmringe mehr (Oosawa and Simon, 1986; Umemura et al., 1998). Das Protein war zwar trotz der Mutation immer noch in die Membran integriert und konnte Aspartat an der periplasmatischen Domäne binden, jedoch fand keine Methylierung der cytoplasmatischen Domäne mehr statt. Daraus lässt sich schließen, dass in der A19K-Mutante der C-Terminus des Proteins strukturell so verändert wurde, dass die modifizierenden Enzyme CheB und CheR nicht mehr binden konnten (Oosawa and Simon, 1986). Mehrere Mutationen in beiden TMs konnten den negativen Effekt von A19K aufheben (TM1: V17E, TM2: W192R, A198E, V201D/E, V202L, L205D/E) (Oosawa and Simon, 1986; Umemura et al., 1998). Es stellte sich jedoch heraus, dass die Mutationen nicht gleichwertig waren: A19K/W192R- und A19K/V202L-Mutanten zeigten im Gegensatz zu den anderen Mutationen aus der TM2 nur schwaches Schwärmen auf maltosehaltigen Agarplatten, die Adaptation an Maltose war beeinträchtigt und W192R bzw. V202L supprimierten A19K nur, wenn sie auf derselben Untereinheit vorlagen (Umemura et al., 1998). Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass sich A19K auf TM1 und A198E, V201D/E, L205D/E auf TM2' gegenüber lagen und stabilisierende Salzbrücken ausbilden konnten (Umemura et al., 1998). Anders als A19K behinderten W192R, A198E, V201E und V202L alleine nicht die Rezeptorfunktion (Umemura et al., 1998).

Dasselbe Prinzip, nämlich der Erhalt einer unregulierten Mutante und einer regulierten Doppelmutante, sollte auch für das chimäre Protein Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 angewendet werden. Unterschiede in der Struktur eines solchen Mutantenpaars sollten Aufschluss über die Signalweiterleitung liefern. Die Arbeiten wurden an der erwähnten Tsr-AC Chimäre vorgenommen, da sie verglichen mit den Chemotaxisproteinen für die geplanten Versuche besser geeignet war. Durch die ähnliche modulare Bauweise der hier verwendeten AC und des Serinrezeptors (Membrananker/Rezeptor-HAMP-Domäne-katalytische Domäne) konnten beide Proteine miteinander kombiniert und die dimere Chimäre spezifisch durch Serin reguliert werden (Kanchan et al., 2010). Diese Regulation konnte mittels des sensiblen AC-Tests genauer analysiert werden als es die Auswertung von Schwarmringen auf Agarplatten ermöglicht. Mit Hilfe der bereits vorhandenen Strukturen einer HAMP-Domäne (Hulko et al., 2006) und einer AC (Tews et al., 2005) ließe sich möglicherweise auch eine Struktur der Chimäre Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645

erleichtert entschlüsseln. Nach Etablierung eines Solubilisationsprotokolls für die Chimäre wäre der nächste Schritt die Solubilisierung des Rv3645-Holoenzym, um mehr Informationen über dessen 6-TM Membrananker zu erhalten.

Das Einbringen einer positiven Ladung in die Mitte der hydrophoben TM1 verhinderte bei der G19K-Mutante nicht nur die Regulation durch Serin, sondern führte auch zu einer deutlichen Verminderung der Aktivität im Vergleich zu Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645. Die Position 19 des Serinrezeptors scheint ebenso wie im Aspartatrezeptor bei Mutation entscheidenden Einfluss auf das übrige Molekül zu nehmen. Die G19K-Mutante war immer noch in die Membran integriert, was im Western Blot nachgewiesen wurde. Die G19K-Mutante lief im SDS-Gel etwas schneller als die Chimäre Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645, was auch bei der A19K-Mutante verglichen mit dem Tar-Wildtyp beobachtet wurde (Oosawa and Simon, 1986). Es wird angenommen, dass nach Bindung eines Liganden an die periplasmatische Domäne durch eine Bewegung der beiden TMs zueinander das Signal an die folgende Domäne weitergegeben wird (Baumgartner and Hazelbauer, 1996; Umemura et al., 1998). In diesem Fall trifft das Signal der TM2 auf die HAMP-Domäne, bei welcher der vermutete Mechanismus der Signalweiterleitung auf einer Rotation ähnlich wie bei einem Zahnrad beruht (Hulko et al., 2006; Schultz and Natarajan, 2013). Laut einer aktuellen Hypothese bestimmt sich die Aktivität einer AC dadurch, dass sich die beiden Monomere mit ihren katalytischen Zentren zusammenfinden, was durch eine aufgelöste α -helicale Struktur ermöglicht wird (*regulated unfolding*) (Schultz and Natarajan, 2013). Wird in der Chimäre Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 das Signal nach Ligandenbindung von der HAMP-Domäne auf die AC übertragen, bildet sich eine starre α -Helix, welche die aktiven Zentren voneinander trennt und somit zu einer Hemmung der Aktivität der AC führt (Schultz and Natarajan, 2013). Ähnlich wie bei A19K in Tar wird bei der G19K-Mutante durch die Mutation das Gefüge der beiden Transmembranhelices zueinander wahrscheinlich so gestört, dass letztendlich auch der C-Terminus des Proteins negativ beeinflusst wird und sich die beiden katalytischen Zentren der AC kaum zusammenfinden. Die Doppelmutante V17E/G19K wies noch geringere Aktivität als die G19K-Mutante auf und wurde nicht reguliert. Falls sich zwischen den beiden geladenen Resten in der TM1 eine Salzbrücke ausbilden konnte, führte diese nicht zu einer Wiederherstellung der aktiven Struktur. Möglicherweise benötigt eine Salzbrücke innerhalb der TM1 zu viel Platz und behindert die Signalweiterleitung im zweiten Transmembranteil. Auffällig ist, dass die V17E-Mutation in der Publikation von Umemura *et al.* (Umemura et al., 1998) nicht mehr erwähnt wurde, obwohl alle anderen TM-Mutationen aus der Publikation von Oosawa und Simon (Oosawa and Simon, 1986) genauer untersucht wurden. Anders als bei den Mutanten in Tar, bei welchen vermutlich stabilisierende Salzbrücken zwischen TM1 und TM2 Ergebnisse vergleichbar mit dem Wildtyp hervorbrachten (Umemura et al., 1998), führten die ausgewählten Mutationen in Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 (G19K/V202E, G19K/V203E, G19K/L204E, V17E/G19K/W194R/V203E) nicht zu einer Steigerung der Aktivität oder zu einer Regulation durch Serin. Möglicherweise konnten sich bei diesen Mutanten ebenfalls keine Salzbrücken bilden oder im Fall von V17E/G19K/W194R/V203E stören zu viele Mutationen das

komplexe TM-Gefüge. Für eine abschließende Beurteilung müssten die Auswirkungen aller vorgenommenen Mutationen in TM1 und TM2 ohne G19K getestet werden, wobei Aktivität und Regulation durch Serin nicht beeinflusst werden sollten.

Im Vergleich mit G19K war die Aktivität der A16K-Mutante um 84% geringer, jedoch wies diese eine signifikante Hemmung durch Serin auf. Eine Verschiebung der Mutation um drei ASn ermöglicht also eine Signalweiterleitung, aber die katalytischen Zentren der AC können noch nicht optimal zueinander finden. Die Doppelmutante A16K/V203E zeigte bei signifikanter Hemmung durch Serin eine Verdopplung der Aktivität verglichen mit A16K, was eventuell auf die Ausbildung einer stabilisierenden Salzbrücke hindeuten könnte. Alle Mutanten konnten im Western Blot in der Membran nachgewiesen werden. So wird auch beim Tsr-Rezeptor deutlich, wie sensibel die Signalweiterleitung auf Eingriffe reagiert und was für Auswirkungen die Position einer Mutation haben kann. Obwohl die TMs von Tsr und Tar eine hohe Konservierung aufweisen, konnten die Mutationen nicht eins zu eins übertragen werden. Die getesteten Mutationen in der TM2 zusätzlich zu der G19K- bzw. A16K-Mutation konnten die Ausgangsbedingungen der Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 Chimäre in Bezug auf Aktivität und Regulation durch Serin nicht wiederherstellen. Die Ergebnisse von A16K bzw. A16K/V203E wären jedoch ein geeigneter Startpunkt für weitere Mutationen, um mögliche Partner zur Bildung von Salzbrücken auszutesten. Da Disulfid-Crosslinking Studien zum TM-Bereich von Tsr noch ausstehen, kann nicht mit Sicherheit vorhergesagt werden, wie die α -Helices der TMs zueinander ausgerichtet sind. Möglichweise liegen sich die bisher getesteten Mutationen nicht passend gegenüber und die Bildung einer stabilisierenden Salzbrücke bleibt aus.

Eine weitere Möglichkeit zur Fortführung der Experimente wäre die Verwendung einer Tar-Chimäre. Diese Konstrukte sind ebenfalls bereits etabliert (Kanchan et al., 2010). Allerdings müsste für diese Versuche auf das Konstrukt Tar-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 oder Tar-HAMP_{Tsr}-Rv3645 zurückgegriffen werden, da Tar-HAMP_{Tar}-Rv3645 nicht durch Aspartat reguliert wurde (Kanchan et al., 2010). In Tar-HAMP_{3645/Tsr}-Rv3645 könnten die bekannten Mutationen A19K bzw. A19K/A198E, A19K/V201D/E, A19K/L205D/E eingeführt werden (Umemura et al., 1998). In den Doppelmutanten sollten die stabilisierenden Salzbrücken zwischen TM1 und TM2 die Aktivität der AC unbeeinflusst lassen und somit könnten Unterschiede im TM-Bereich des jeweiligen Konstrukts analysiert werden. Da A19K vermutlich den C-Terminus mit der AC verändern würde, könnte in dieser Konstellation auch das *regulated unfolding* am aktiven und inaktiven Zustand der AC untermauert werden.

4.1.2 Insertion hydrophiler Aminosäuren in die zweite Transmembranhelix von Tsr

Wird ein Membranprotein aus der Membran gelöst, werden Detergenzien oder eine Mischung aus Detergenzien und Phospholipiden eingesetzt, um die fehlende Stütze der Lipiddoppelschicht partiell zu ersetzen (Bogonez and Koshland, 1985). Zur Erleichterung der Solubilisierung der Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 Chimäre wurden bei diesen Experimenten einige hydrophobe ASn gegen hydrophile ausgetauscht. Die

eingefügten Mutationen beschränkten sich auf TM2. Dabei sollte die Aktivität der Chimäre und Regulation durch Serin erhalten bleiben. Anhaltspunkte lieferten bereits getestete Einzelmutanten am Tsr-Rezeptor, deren Restfunktionalität bekannt war und die nun miteinander kombiniert werden sollten (J. S. Parkinson, persönliche Mitteilung, Anhang 1). Untersuchungen zeigten, dass die Sequenz der TM2 nicht unbedingt entscheidend für die Signalweiterleitung ist. Chimären aus dem N-Terminus von Tsr (TM1 und periplasmatische Domäne) und dem C-Terminus von Tar (TM2, HAMP-Domäne und cytoplasmatische Domäne) und umgekehrt reagierten trotzdem spezifisch auf den Liganden der eingesetzten periplasmatischen Domäne (Tatsuno et al., 1994).

Die Ergebnisse der Dreifach-Mutante A192S/L196Q/F208S zeigten Aktivität und Regulation durch Serin. Unterschiedliche Faktoren können dafür verantwortlich sein, dass die Mutationen toleriert wurden. Die Volumina der Seitenketten der ausgetauschten ASn sind vergleichbar, weshalb sich vermutlich die Struktur innerhalb der TM nicht verändert hat. Bei Ala und Ser sowie Leu und Gln sind sich die Volumen der Seitenketten sehr ähnlich, verglichen mit Phe hat Ser ein kleineres Volumen der Seitenkette (Klapper, 1971). Möglicherweise hat auch die Position der Mutation Einfluss, denn AS 192 ist der Start der TM2 und AS 196 sitzt eher am peripheren Ende der TM2 in Richtung Periplasma. Mutationen an diesen beiden Positionen stören somit vielleicht in geringerem Maße die Lage der beiden TMs zueinander als es eine Mutation in der Mitte des Transmembranbereichs täte. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die ASn an den ausgewählten Positionen in der α -Helix eher in die Lipiddoppelschicht ragen anstatt in direktem Kontakt zu den anderen TMs stehen. Eine derartige Ausrichtung in die Membran zeigte bei Mutationsstudien an Trg kaum Einfluss auf die Aktivität des Rezeptors, obwohl geladene ASn eingefügt wurden (Baumgartner and Hazelbauer, 1996). Im Western Blot schien die Bande für die Dreifach-Mutante höher als erwartet zu laufen. Es muss angemerkt werden, dass auch methodische Ursachen als Gründe dafür anzusehen sind. Bei Entwicklung des Western Blots auf Röntgenfilmen werden nur die mit Antikörper gekoppelten Banden sichtbar, nicht aber der Marker. Dieser muss von der Coomassie gefärbten Membran extra per Hand auf die Röntgenfilme übertragen werden. Dies könnte zu Schwierigkeiten führen, wenn die Linien des Markers nur schwach angefärbt waren. Auch bei der computergestützten Auswertung der Western Blots im Ettan DIGE Imager wurde der Marker nicht automatisch erkannt, sondern der Benutzer musste jede einzelne Bande festlegen. Bereits bei der G19K-Mutante der Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 Chimäre und der A19K-Mutante in Tar (Oosawa and Simon, 1986) wurde die Beobachtung gemacht, dass Mutationen Auswirkungen auf das Laufverhalten der Proteine im SDS-Gel haben könnten. Da es sich bei der A192S/L196Q/F208S-Mutante um ein aktives, reguliertes Protein ohne Abbauprodukte handelt, kann der Western Blot als verlässlicher Nachweis für das erwartete Protein angesehen werden. Die im Folgenden zusätzlich eingebrachten Mutationen W194R und M200K hatten geladenen Charakter. Letzteres war vermutlich der Grund, dass die A192S/W194R/L196Q/M200K/F208S-Mutante nahezu inaktiv und nicht durch Serin reguliert war. W194R und M200K als Einzelmutationen hatten in den an Tsr

durchgeführten Mutationsstudien keinen funktionsmindernden Einfluss (J. S. Parkinson, Anhang 1). Für die konservierte Position W192 in Tsr ist bekannt, dass die entsprechende Mutation W192R den Chemotaxisrezeptor nicht beeinträchtigt (Umemura et al., 1998). Da die Mutationen nicht einzeln getestet wurden, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob W194R, M200K oder beide Mutationen zusammen den Ausschlag zur Funktionslosigkeit in der A192S/W194R/L196Q/M200K/F208S-Mutante gaben. In der Summe scheinen die Mutationen jedenfalls das Gefüge der α -Helices in der Membran empfindlich zu stören. Ohne die Möglichkeit zur Ausbildung einer stabilisierenden Salzbrücke inaktivierte auch der geladene Rest der A19K-Mutante in Tsr den kompletten Chemotaxisrezeptor (Oosawa and Simon, 1986; Umemura et al., 1998). Es könnte darauf hindeuten, dass die Positionen 194 und 200 in Tsr in Kontakt mit den anderen Teilen des TM-Bereichs stehen und nicht in die Lipiddoppelschicht ragen. Der äußerst schwache Nachweis der A192S/W194R/L196Q/M200K/F208S-Mutante im Western Blot zeugt von geringer Expression des Proteins und ist weiterer Hinweis für die problematische Kombination der ausgewählten Mutationen.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei wohlüberlegter Auswahl einige ASn in TM2 unter Erhalt von Aktivität und Regulation der Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 Chimäre ausgetauscht werden konnten. Allerdings muss darauf geachtet werden, dass es sich vornehmlich um hydrophile Austausch handelt und falls bekannt, Positionen gewählt werden, die nicht die anderen Bereiche des TM-Bereichs kontaktieren. Gestützt auf die Mutationsstudien (J. S. Parkinson) könnten noch die hydrophilen Mutationen F208Y und G213C/S ausprobiert werden. Ähnliche Austausch könnten auch in der TM1 von Tsr durchgeführt werden, allerdings wird mit der Summe der Mutationen der Erhalt der Funktionalität der Chimäre immer unberechenbarer. Solubilisierungsversuche an derartig modifizierten Chimären würden zeigen, ob der Aufwand solcher Mutationsstudien die Herstellung löslicher Proteine rechtfertigt.

4.1.3 Fusionsproteine zur Unterstützung der Solubilisierung

4.1.3.1 T4* Lysozym

Mit Hilfe des T4 Lysozyms als Fusionsprotein konnten die Strukturen zweier GPCRs erfolgreich aufgeklärt werden (Cherezov et al., 2007; Jaakola et al., 2008; Rosenbaum et al., 2007). In diesen Versuchen ersetzte T4L jeweils die dritte cytoplasmatische Schleife. Dadurch konnte diesen Rezeptoren eine flexible Struktur entzogen werden, welche ansonsten die Kristallisation beeinträchtigt hätte (Jaakola et al., 2008; Rosenbaum et al., 2007). Weitere Vorteile des T4L-Fusionsproteins sind die Vergrößerung der polaren Oberfläche und damit verbesserte Protein-Protein-Interaktionen während der Kristallisation und erleichterte Kristallaufklärung durch die bereits bekannte Struktur von T4L (Baase et al., 2010; Engel et al., 2002).

Bei den beiden Konstrukten T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 wurde T4L* in die Chimäre eingesetzt ohne bestimmte Strukturen zu ersetzen. Die N-terminale Verknüpfung mit T4L* (T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645) zeigte

im Vergleich zur Chimäre ohne Fusionsprotein eine geringere Aktivität, aber die Regulation durch Serin blieb erhalten. Ein Grund für die Aktivitätsabnahme könnte sein, dass T4L* und die katalytische Domäne der AC auf der cytoplasmatischen Seite zu geringen Abstand voneinander haben und die AC behindert wird. Bei den bislang solubilierten GPCRs und Löslichkeitsversuchen an der *E. coli* Laktose Permease in Kombination mit T4L handelte es sich im Gegensatz zu der Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 Chimäre immer um reine Transmembranproteine, deren cytosolischer C-Terminus zu Kristallisationszwecken verkürzt wurde (Cherezov et al., 2007; Jaakola et al., 2008; Rosenbaum et al., 2007) oder bei dem keine cytoplasmatische Domäne vorhanden war (Engel et al., 2002).

Wurde T4L* zwischen das Ende der TM1 und die periplasmatische Schleife eingesetzt (TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645), war das Konstrukt kaum noch aktiv und nicht mehr durch Serin reguliert. Der Einschub der 160 ASn an dieser Position führte vermutlich zu drastischen Änderungen in der gesamten Struktur der Chimäre. Wenn sich die periplasmatische Schleife auf Grund von T4L* nicht mehr korrekt falten kann, wird wahrscheinlich auch die Bindungsstelle von Serin betroffen sein, was zu einem Verlust der Regulation führt. Falls Serin doch bindet, ist es außerdem möglich, dass das Gefüge von TM1 und TM2 durch die zusätzlichen ASn verändert wurde, was wiederum Auswirkungen auf die Signaltransduktion mit sich bringt. Ähnlich wie bei der A19K-Mutante in Tar und der G19K-Mutante in Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 könnte durch eine Veränderung des Zusammenspiels der TMs auch der C-Terminus von TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 in seiner Funktion gestört werden. Eine weitere Ursache für den Aktivitäts- und Regulationsverlust könnten Probleme beim Einbau des Fusionsproteins in die Membran sein, was sich in der niedrigen Expressionsrate im Western Blot andeutet.

Eine Alternative zu einem Einschub wäre wie im Fall der G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Ersatz der gesamten periplasmatischen Schleife durch T4L*. Vorteil bei der Solubilisierung und Kristallisation wäre möglicherweise die zuvor genannte Verminderung der Flexibilität der periplasmatischen Schleife. Die Anzahl an ASn für T4L* und der periplasmatischen Schleife sind nahezu identisch. Die Struktur der periplasmatischen Schleife von Tsr wurde bereits ermittelt (Tajima et al., 2011). Würde in einem Tsr-Rv3645 Konstrukt die periplasmatische Schleife durch T4L* ersetzt, könnte bei erfolgreicher Kristallisation zwar der TM-Bereich analysiert werden, jedoch könnten keine Unterschiede in der Signalweiterleitung bei Bindung eines Liganden untersucht werden. Ohne die Funktionalitätsprüfung der Signaltransduktion kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob ein Ersatz der periplasmatischen Schleife durch T4L* tatsächlich die Ausrichtung der TMs im Originalprotein widerspiegelt. Von den vorhandenen Konstrukten wäre höchstens T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 für Solubilisierungsversuche geeignet. Es wäre aber damit zu rechnen, dass während derartiger Experimente weiter Aktivität verloren gehen kann, was bei einem schwach aktiven Konstrukt problematisch ist. Bei hier durchgeführten Versuchen mit den Fusionsproteinen YaiN und YbeL wurde ein solcher Aktivitätsverlust bei der Solubilisierung beobachtet.

4.1.3.2 YaiN und YbeL

Bei den Fusionsproteinen YaiN und YbeL handelt es sich um ein vielversprechendes Überexpressionssystem bestehend aus mehreren Expressionskassetten (Leviatan et al., 2010). Hierbei kann das zu exprimierende Protein in acht verschiedenen Kombinationen am N-, C-Terminus oder an beiden Termini mit YaiN und YbeL verknüpft werden. Dadurch soll sich die Chance erhöhen, eine gute Expression löslicher Proteine zu erreichen. Zusätzlich wurde mit *E. coli* C43(DE3) ein Bakterienstamm eingesetzt, der sich besonders verträglich gegenüber der Expression toxischer (Membran-)Proteine zeigte (Dumon-Seignovert et al., 2004). Die der Toleranz gegenüber toxischen Proteinen zugrundeliegende Mutation auf dem Genom konnte zwar bislang nicht lokalisiert werden, jedoch wird vermutet, dass entweder die Aktivität der T7 RNA Polymerase beeinflusst wird oder weniger von dieser Polymerase produziert wird (Miroux and Walker, 1996). Möglicherweise hat *E. coli* C43(DE3) auch positiven Einfluss auf die Faltung und den Einbau von Proteinen in die bakterielle Membran (Miroux and Walker, 1996).

Tatsächlich wurde nach der Expression der Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 Chimäre ein deutlicher Aktivitätsunterschied beobachtet. Bei ähnlicher Regulation durch Serin war das Protein aus *E. coli* BL21(DE3) pREP4 pQE30 weniger aktiv als in *E. coli* C43(DE3) pET28a(+). Inwiefern sich der Wechsel von pQE30 zu pET28a(+) auswirkte, wurde nicht untersucht. pET28a(+) wurde in den Experimenten verwendet, um bei der Reinigung von dem N- und C-terminalen His₆-Tag zu profitieren. Für jedes zu untersuchende Protein müssen alle acht Expressionskassetten getestet werden, da nicht in jedem Fall vorhergesagt werden kann, welches die optimale Kombination mit YaiN und YbeL ist (Leviatan et al., 2010). Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 wurde zwar laut Western Blot in allen acht Expressionskassetten nachgewiesen, jedoch zeigte sich bei der Verträglichkeit des Konstrukts mit den beiden Fusionsproteinen ein deutlicher Unterschied bei der Aktivität und Regulation. Bis auf N-YaiN_C-YbeL und N_C-YaiN wurden die übrigen Kombinationen durch Serin reguliert, d.h. die periplasmatische Schleife wurde durch die Fusion nicht beeinflusst. Eine Fusion mit YaiN und/oder YbeL an beiden Termini schnitt im Vergleich meist schlechter ab, vermutlich weil sich die Fusionsproteine und die AC auf der cytoplasmatischen Seite gegenseitig behindern. N-YbeL und C-YaiN wiesen Aktivitäten deutlich über 1 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ auf, während alle anderen sechs Kombinationen Aktivitäten unter 1,2 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ zeigten. Es war auffällig, dass die Position des Fusionspartners entscheidend für die Aktivität war, da sowohl C-YbeL als auch N-YaiN weniger aktiv waren als N-YbeL bzw. C-YaiN. Obwohl YbeL im Vergleich mit YaiN länger ist und es dadurch möglicherweise zu Platzproblemen mit der AC kommen könnte, war der N-YbeL Konstrukt viel aktiver als N-YaiN. Auch bei den chimären Konstrukten mit T4L* zeigte sich bereits die bessere Toleranz gegenüber einer N-terminalen Modifikation. Dabei ist T4L* ungefähr 40 ASn länger als YbeL.

Die Solubilisierung von N-YbeL mit 1% Brij58 verlief in gewisser Weise erfolgreich, jedoch besteht noch Optimierungsbedarf. Das Konstrukt konnte in aktivem Zustand aus der Membran gelöst werden, jedoch unter Einbußen in der Regulation durch

Serin. Außerdem verlor das Protein im Solubilisations- und Reinigungsprozess ein Vielfaches seiner Aktivität im Vergleich zum Membranprotein. Dieser Umstand erfordert eine hohe Ausgangsaktivität vor der Solubilisation.

Nach Wiederholung der Protokolle mit Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 ohne N-YbeL entstand ein gelöstes aktives, aber nicht reguliertes Konstrukt. Imidazol konnte als Ursache für den Regulationsverlust ausgeschlossen werden, da die zusätzlich durchgeführte Dialyse nach der Gelfiltration dieselben Aktivitäten in Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645, ebenfalls ohne Regulation durch Serin, ergab. Vermutlich verliert der Tsr-Rezeptor bei der Solubilisation seine optimale Konformation, da das Detergens die Zellmembran nicht ersetzen kann. Möglicherweise kann YbeL am N-Terminus den Verlust der Zellmembran bis zu einem gewissen Grad kompensieren.

Eine Möglichkeit zur Optimierung besteht in der Austestung weiterer Detergenzien. Bei den Solubilisationsversuchen mit N-YbeL und Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 in kleinem Maßstab und im zellfreien System wurde der Einfluss des Detergens auf die Aktivität deutlich. DDM, C₁₂E₈ und Brij58 brachten bei den Fusionsproteinen unterschiedlich aktive Konstrukte zum Vorschein. Beispielsweise könnten noch andere Brij-Derivate verwendet werden, welche auch im ZS gute Erfolge lieferten (Klammt et al., 2005). Ob die eingesetzten Detergenzien für den Aktivitätsverlust verantwortlich waren, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da Tests zur Verträglichkeit der Detergenzien mit dem löslichen HAMP_{Tsr}-Rv3645 bzw. der AC nicht durchgeführt wurden. Falls ein Detergens alleine nicht ausreicht, um die TMs in einer ähnlichen Konformation wie in der Membran zu stabilisieren, könnten auch angepasste Mischungen aus Detergens, Phospholipiden und Glycerin zum Einsatz kommen (Bogonez and Koshland, 1985). Verbesserung, beispielsweise in der Pufferzusammensetzung, bedarf auch die Ni-NTA-Reinigung und die Gelfiltration, um eine Auftrennung in einzelne Peaks zu gewährleisten. Es wäre wahrscheinlich vorteilhafter, die Proteine in geringerer Konzentration in mehreren Gelfiltrationsläufen aufzutragen und später zu vereinigen. Die spät eluierenden Peaks weisen auf hydrophobe bzw. ionische Wechselwirkungen zwischen der Säulenmatrix und dem Protein hin. Durch Anpassung des Puffers und ausgeprägte Waschschrte könnten solche Bindungen vielleicht vermieden werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expressionskassetten mit YaiN und YbeL möglicherweise zu einer erfolgreichen Solubilisation eines Konstrukts mit cytoplasmatischer, katalytischer Domäne führen können. Leviatan *et al.* (Leviatan et al., 2010) testeten im Gegensatz zu der hier eingesetzten Chimäre vornehmlich Membranproteine mit mehreren TMs, aber ohne cytoplasmatischen Anteil.

Eine Alternative zu N-YbeL bietet das 110 ASn große Mistic Protein aus *Bacillus subtilis* (Akronym: „*m*embrane-*i*ntegrating *s*equences for *t*ranslation of *i*ntegral membrane protein *c*onstructs“) (Roosild et al., 2005). Mistic besitzt wie YaiN und YbeL eine vermutete Struktur aus vier α -Helices, kann sich autonom in die Zellmembran falten und ist trotzdem stark hydrophil (Roosild et al., 2005). Diese Eigenschaften unterstützten die Solubilisation von EnvZ, einem Histidin Kinase Rezeptor aus *E. coli* (Blain et al., 2010). Bei EnvZ handelt es sich wie bei der Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 Chimäre um ein dimeres Protein bestehend aus zwei TMs, einer

HAMP-Domäne und einer cytoplasmatischen Domäne. EnvZ wurde N-terminal mit Mistic verknüpft und behielt seine Fähigkeit zur Signaltransduktion im gelösten Zustand (Blain et al., 2010; Yaku and Mizuno, 1997). Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen EnvZ und Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 scheinen die Aussichten auf ein gelöstes aktives und reguliertes Konstrukt durch eine Fusion mit Mistic vielversprechend. Da Mistic mit der bakteriellen Membran assoziiert ist, wären die katalytischen Domänen der AC vermutlich nicht in ihrer Faltung eingeschränkt. Bei entsprechend positiven Ergebnissen könnte Mistic beispielsweise mit einer eingeführten Thrombin-Schnittstelle aus dem Konstrukt entfernt werden (Blain et al., 2010).

4.1.4 Solubilisation via zellfreier Proteinbiosynthese

Eine erfolgversprechende Alternative zu bakterieller Überexpression und Solubilisation der erhaltenen Proteine aus der Zellmembran schien die Expression der gewünschten Chimären in einem zellfreien System zu bieten. Das System weist im Vergleich mit bakterieller Expression viele Vorteile auf. Ein Überladen der Zellmembran durch überexprimiertes Protein und dadurch auftretende Toxizität entfällt. Es handelt sich um ein offenes System, das auf die Bedürfnisse des jeweiligen Proteins angepasst werden kann, sollte es zu Expressionsproblemen kommen. Die zeitsparende Versuchsdurchführung resultiert in gereinigtem Protein innerhalb von zwei Tagen (Klammt et al., 2005; Schwarz et al., 2007a). Das Hauptargument im vorliegenden Fall war, dass das ZS drei verschiedene Expressionsformen zulässt, nämlich die Expression der Proteine als Präzipitate, eingebettet in Micellen oder in Liposomen (Schwarz et al., 2007a).

In den Solubilisationsversuchen von N-YbeL zeigte sich, dass zwar aktives Protein erhalten wurde, jedoch nur mit eingeschränkter Rezeptorfunktion. Um dieses Problem zu umgehen, sollten die Chimären Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 direkt in einer detergenshaltigen Umgebung exprimiert werden. Bei Erhalt von funktionsfähigen, aktiven Konstrukten wäre es möglich, die in Detergenzien gelösten Proteine umgehend weiter in Kristallisationsversuchen einzusetzen. Bei der Etablierung des Systems in unserem Labor wurde auf die eigenständige Vorbereitung der meisten benötigten Komponenten gesetzt. Zwar sind kommerzielle Kits verfügbar (z.B. RTS *rapid translation system* von Roche (Martin et al., 2001)), jedoch lassen sich aus Kosten- und Optimierungsgründen alle Puffer, der S30-Extrakt und die T7 RNA Polymerase mit einfachen Techniken und in ausreichender Menge problemlos im Labor herstellen (Schwarz et al., 2007a). Anhand der Expression eines Kontrollproteins wie GFP wurde der gelungene Aufbau der zellfreien Methode gezeigt. Der Einsatz von GFP, dessen Fluoreszenz bereits mit bloßem Auge sichtbar wird, ist wichtig, um die für jeden S30-Extrakt variierende Menge an Mg²⁺ auszutesten (Schwarz et al., 2007b). Die Fluoreszenz ist sowohl in den Reaktionsgefäßen als auch im SDS-Gel sichtbar, was eine schnelle und einfache qualitative Auswertung der Experimente erlaubt (Drew et al., 2006; Muller-Lucks et al., 2012).

Zur vergleichenden Kontrolle wurden alle im ZS eingesetzten Konstrukte auch in *E. coli* C43(DE3) pREP4 exprimiert und getestet. Somit wurde sichergestellt, dass die geringen Aktivitätswerte im ZS nicht grundsätzlich an einer Inkompatibilität des pIVEX2.3w mit den eingesetzten Chimären lagen oder die beigefügten Tags (HA-Tag und His₁₀-Tag) störend waren. Wie in vorhergehenden Versuchen festgestellt, kann sich die Expression der Chimären in verschiedenen *E. coli* Stämmen je nach verwendetem Vektor in erheblichen Aktivitätsunterschieden äußern. Beispielsweise zeigte Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 nach Expression in *E. coli* C43(DE3) pET28a(+) eine höhere Basalaktivität als nach Expression in *E. coli* BL21(DE3) pREP4 pQE30 oder in *E. coli* C43(DE3) pREP4 pIVEX2.3w. Ob hinsichtlich der Aktivitätsschwankungen die Unterschiede in den Bakterienstämmen oder in den Vektoren hauptsächlich den Ausschlag dazu gaben, wurde nicht untersucht. Sicher ist zu berücksichtigen, dass pIVEX2.3 auf eine Expression *in vitro* konzipiert ist (Roche Benutzerhandbuch). Allerdings wurde von vergleichbaren Ergebnissen bei der Expression von *E. coli* MscL in pIVEX2.3 *in vitro* und *in vivo* berichtet (Berrier et al., 2004). Eine weitere Auffälligkeit war, dass die in pIVEX2.3w bakteriell exprimierte Chimäre Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 ± GFP generell aktiver war als Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645. Bei Expression beider Chimären (ohne GFP) in *E. coli* BL21(DE3) pREP4 pQE30 war dies umgekehrt (Kanchan et al., 2010). Nur bei den chimären Fusionskonstrukten mit GFP wurden im Western Blot nach bakterieller Expression zwei nahe beieinander liegende Doppelbanden in der Membranpräparation detektiert. Bei Expression unterschiedlicher GFP-Fusionsproteine im ZS mit Einsatz von Detergenzien wurden ähnliche Doppelbanden beschrieben. In diesem Fall handelte es sich um aktives, korrekt gefaltetes Protein und inaktives, nicht fluoreszierendes Protein, die anhand ihrer Größe im SDS-Gel unterschieden werden (Muller-Lucks et al., 2012). Ob die hier beobachteten Doppelbanden ebenfalls einer aktiven und einer inaktiven Struktur zuzuordnen wären, wurde nicht untersucht. Derartige Doppelbanden wurden bei Expression der Chimären im ZS mit Detergens nicht entdeckt.

Nach Expression von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 im ZS konnte Protein im Western Blot sowohl als Präzipitat als auch bei Detergenzugabe im Überstand nachgewiesen werden. Die Bildung der Proteine als Präzipitat ermöglicht meist eine anschließende Solubilisierung mit Detergenzien und würde eine Alternative zur detergenbasierten zellfreien Expression darstellen. Hierbei wird vermutet, dass die Proteine in einer anderen Form als derjenigen von *inclusion bodies* präzipitieren, da bereits milde Detergenzien eine Solubilisierung und Faltung gestatten (Schwarz et al., 2007b). Jedoch wurden auch Unterschiede in der Struktur von Proteinen beobachtet, die entweder durch Solubilisierung von Präzipitaten entstanden waren oder direkt in Micellen exprimiert wurden. Somit ist nicht in jedem Fall gewährleistet, dass die zellfreie Expression von Präzipitaten und mit Detergens immer aktive Proteine bildet (Klammt et al., 2005).

Die zellfreie Expression wurde mit Detergenzien durchgeführt, deren gute Verträglichkeit mit dem ZS bekannt waren (Klammt et al., 2005). Nach der Expression wurde der RM zentrifugiert und das enthaltene Protein jeweils im Pellet und Überstand mittels Western Blot verglichen. Bei Verwendung von Brij58, Brij78

und Brij98 wurde kaum Protein im Pellet nachgewiesen, bei Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 traf dies auch für Brij35 und Digitonin zu. Bei C₁₂E₈, DDM und MNG-3 war hingegen ein bedeutender Anteil im Pellet. Die Wahl des passenden Detergens, bei dem sowohl ein hoher Ertrag als auch ein höchstmöglicher Anteil an aktivem Protein erhalten werden, gestaltet sich als kniffligste Aufgabe im ZS. Es gibt zwar Anhaltspunkte von erfolgreich solubilisierten Proteinen, jedoch sind die Ergebnisse schwer direkt übertragbar (Klammt et al., 2005). Beispielsweise solubilisierten die Polyoxyethylen Alkyl-Ether, welche zu Beginn jeder Versuchsreihe im ZS empfohlen werden, fünf verschiedene Membranproteine unterschiedlich gut, wobei das gelöste Protein nicht immer auch eine aktive Konformation hatte (Muller-Lucks et al., 2012). So zeigte sich an dem Aquaglyceroporin PfAQP, dass nur bei Verwendung von Brij78 aktives Protein entstand, während Brij35 es zwar lösen konnte, das Protein aber in einer inaktiven Form vorlag (Muller-Lucks et al., 2012). Da es sich bei dem ZS um ein offenes System handelt, können auch andere als die bislang getesteten Detergenzien eingesetzt werden, solange sie mit dem Translationsprozess kompatibel sind und die Ribosomen nicht beeinträchtigen (Muller-Lucks et al., 2012). Die erhaltenen Ergebnisse legten außerdem nahe, dass auch die AC Rv3645 nicht unbeeinflusst durch Brij78 blieb, da im löslichen Konstrukt HAMP₃₆₄₅-Rv3645 doppelt so hohe Basalaktivität ohne Detergens als mit Detergens besaß. Bereits bei den Solubilisierungsversuchen von N-YbeL und Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 mit Brij58 ergab sich ein starker Aktivitätsverlust im Vergleich zum Protein in der intakten Membran. Bei weiteren Experimenten sollten im Vorfeld die Auswirkungen des Detergens auf die bloße katalytische Domäne der AC abgeklärt werden. Eine weitere Variante wäre die zellfreie Expression in Liposomen oder eine zusätzliche Gabe von *E. coli* Lipiden bzw. eine Mischung aus Detergens, Phospholipiden und Glycerin, was sich positiv auf die Stabilität der Proteine auswirken könnte (Bogonez and Koshland, 1985; Hovijitra et al., 2009; Schwarz et al., 2007a).

Da die Austestung eines geeigneten Detergens ausufernde Versuchsreihen nach sich ziehen kann, sollte durch die Fusion der Chimären mit GFP dessen Fluoreszenz als schneller Faltungsindikator für aktive Proteine dienen (Muller-Lucks et al., 2012). Allerdings wurde durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande knapp unterhalb von 35 kDa im Western Blot vermutet, dass auch ein gewisser Anteil dieses Proteins durch das eigene Startmethionin von GFP gebildet wurde. Die Deletion des Startmethionins von GFP trug wie schon bekannt war, nicht zu einer vollständigen Unterdrückung der Translation von GFP bei (Muller-Lucks et al., 2012). Vermutlich müsste zu diesem Zweck das nächste in der Sequenz folgende Methionin (Position 4) ebenfalls deletiert werden bzw. GFP mit einer Deletion seiner ersten vier AAs (GFP Δ M₁NHM) verwendet werden. Obwohl sich in den durchgeführten Versuchen immer Protein im Überstand im Western Blot nachweisen ließ, konnte nie eine Fluoreszenz nach der zellfreien Expression beobachtet werden und die gemessenen Aktivitäten im AC-Test waren verschwindend gering. Eine Ursache könnte sein, dass sich die Monomeren auf Grund geringer Affinität im ZS nicht finden oder dass falsch und richtig gefaltete Proteine aneinander binden und so die Bildung aktiver Dimere drastisch vermindert wird. Um dem abzuhelpen, könnten zwei Monomere mit einem

Linker verknüpft werden. Allerdings ist zu bedenken, dass möglicherweise auch im ZS ein ähnlicher Aktivitätsrückgang bei Zugabe von Detergenzien auftreten könnte, wie es bei N-YbeL und Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 nach Solubilisation mit Brij58 der Fall war. Demnach wären geringe Basalaktivitäten im ZS nicht unwahrscheinlich, da bereits die „Ausgangsaktivitäten“ der pIVEX2.3w-Konstrukte bei bakterieller Expression geringer als $1 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ausfielen. Die Bedingungen im ZS schienen noch nicht ideal zu sein, da in Bakterien exprimiertes und gereinigtes HAMP_{Tsr}-Rv3645 mit Basalaktivitäten im nmol-Bereich um ein Vielfaches aktiver war (Hammer, 2004), als es im ZS erreicht wurde.

Alles in allem handelt es sich bei dem ZS um eine Methode, in der großes Potential bei der Solubilisation von Membranproteinen liegt. Wie gezeigt wurde, konnten die chimären Proteine sowohl zellfrei exprimiert, als auch in gelöster Form gebracht werden. Der letzte entscheidende Schritt, die Chimären auch in einen aktiven, regulierten Zustand zu bringen, fehlte.

Die hier aufgezählten Experimente, die entweder mit dem Ziel der Solubilisation chimärer Membranproteine begonnen wurden, jedoch nicht weitergeführt wurden oder die Versuche, die tatsächlich gelöstes Protein zustande brachten, zeigen vielfältige Methoden, die bei diesem komplexen Thema zur Anwendung kommen können. Nur ein Bruchteil der bekannten Membranproteine konnte bislang in seiner Struktur entschlüsselt werden, was auf die Schwierigkeiten hindeutet, aktives Protein aus der Membran zu lösen. Die ausgewählten Methoden zeigen größtenteils ein gutes Potential, um bei entsprechender Fortführung auch einen Durchbruch zu erzielen. Das vielversprechendste Thema ist wohl die Solubilisation mit N-YbeL, wobei bereits aktives Protein mit geringer Rezeptorfunktionalität erhalten wurde. Auf diesen Ergebnissen aufbauend, scheint eine vollständige Regulation von Tsr in der solubilierten Chimäre nicht unmöglich.

4.2 Untersuchungen zur Regulation in *Mammalia*- und mykobakteriellen ACn

4.2.1 *Quorum sensing* Rezeptor Chimären

Da eine weitere Funktion, wie beispielsweise die eines Rezeptors, bei den Membranankern der ACn vermutet, aber nicht bewiesen werden konnte, wurden im Labor funktionsfähige Chimären aus Rezeptoren anderer Proteine und den katalytischen Einheiten von ACn erstellt. Dies gelang von Tsr oder Tar mit unterschiedlichen HAMP-Domänen und der AC Rv3645 (Kanchan et al., 2010). Tsr und Tar verfügen im Gegensatz zu vielen ACs nur über je zwei TMs, während Rv3645 und Rv1625c jeweils sechs TMs haben (Falke and Hazelbauer, 2001; Guo et al., 2005; Schultz and Natarajan, 2013). Um eine höhere Ähnlichkeit der Chimären mit dem Rv1625c-Holoenzym zu erreichen, wurde dessen 6-TM-Anker gegen die 6-TM-Rezeptoren CqsS bzw. LqsS ausgetauscht. Die Konstrukte wurden durch die

Liganden CAI-1 bzw. LAI-1 (*Legionella autoinducer 1*) reguliert (S. Beltz, unveröffentlicht).

Hier wurde versucht, das QS-System mit *Mammalia*-ACn zu koppeln. Dazu diente zunächst Rv1625c, eine IIIa AC, die in ihrer Struktur der Hälfte einer membrangebundenen *Mammalia*-AC entspricht (Guo et al., 2005). In *Mammalia*-ACn wurde gefunden, dass die löslichen katalytischen Domänen C1 und C2 alleine durch G_{sa} und FSK reguliert werden (Scholich et al., 1997; Tang and Gilman, 1995; Tesmer et al., 1997; Whisnant et al., 1996). Es scheint, dass C1 und C2 nur geringe Affinität zueinander besitzen, was durch Zugabe von G_{sa} und FSK verändert wird und die Aktivität stark erhöht (Yan et al., 1996). Vermutlich dienen die Membrananker der *Mammalia*-ACn deshalb dazu, C1 und C2 in räumliche Nähe zueinander zu bringen und dadurch die lokale Konzentration der Untereinheiten zu erhöhen (Seebacher et al., 2001; Yan et al., 1996). Es könnte sein, dass in der geringen Affinität der Untereinheiten eine Ursache der niedrigen Basalaktivitäten der CqsS-*Mammalia*-AC-Konstrukte begründet ist. Beim CqsS-Rezeptor handelt es sich um ein Homodimer, der möglicherweise nicht unterscheidet, ob sich die Chimären als Homodimere (CqsS-C1 + CqsS-C1 bzw. CqsS-C2 + CqsS-C2) oder als Heterodimere (CqsS-C1 + CqsS-C2) zusammenlagern. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Fusionskonstrukte gebildet, die jedoch keine höheren Aktivitäten im Vergleich mit geteilten Konstrukten verursachten. Zwei der Fusionskonstrukte wiesen geringe G_{sa}^* -Stimulation auf. Im Vorläuferkonstrukt CqsS-Rv1625c konnten ebenfalls mehrere unterschiedliche Verknüpfungspunkte erfolgreich auf Aktivität und auch auf Regulation durch CAI-1 getestet werden (S. Beltz, unveröffentlicht). Bei Verknüpfung von CqsS mit der C-Helix der *Mammalia*-AC zeigten sowohl das Fusions- als auch das geteilte Konstrukt G_{sa}^* -Stimulation. Im Vergleich mit den eigenen Stimulationsversuchen am Mäusegehirn und mit vorangegangenen Publikationen (Hoffmann, 1999; Tang and Gilman, 1995) könnte diese Stimulation noch gesteigert werden. Es ist zu berücksichtigen, dass die Konstrukte möglicherweise einer Temperaturabhängigkeit unterliegen, da die G_{sa}^* -Stimulation teilweise nur im Test bei 30°C und nicht mehr bei 37°C nachweisbar war.

Dem C1b Linker konnte eine positive Wirkung weder eindeutig zu- noch abgesprochen werden. Im direkten Vergleich zeigte das Konstrukt CM-8 mit C1b Linker eine G_{sa}^* -Stimulation im Vergleich mit seinem Gegenpart CM-12 ohne C1b, während bei einem anderen Konstrukt (CM-11) kein Effekt auftrat. Zumindest scheint C1b nicht die Basalaktivität zu beeinflussen, da Konstrukte mit und ohne C1b ähnliche Werte aufweisen.

Problematisch war im Fall der CqsS-*Mammalia*-AC-Konstrukte die teilweise geringe Expression, wodurch manchmal kaum Protein im Western Blot nachgewiesen werden konnte. Um mögliche Kompatibilitätsprobleme zwischen dem *E. coli* Expressionssystem und dem *Mammalia codon usage* auszuschließen, wurden Konstrukte mit der hACII in einem für *E. coli* angepassten *codon usage* geplant. Untersuchungen von Hu et al. zeigten, dass der jeweils verwendete *codon usage* die Löslichkeit und die Funktionalität eines getesteten Proteins beeinflussen kann (Hu et al., 2013). Allerdings konnte im hier vorliegenden Fall keine Verbesserung erzielt

werden. Ähnliche Schwierigkeiten bei der Klonierung und Expression synthetisch produzierter Gene mit angepasstem *codon usage* wurden berichtet (K. Hantke, persönliche Kommunikation). Zwar stehen die niedrigen Basalaktivitäten für die CqsS-Mammalia-AC-Konstrukte und die löslichen hACII-Konstrukte im Einklang mit bereits publizierten Daten, jedoch fehlt den meisten Konstrukten die üblicherweise feststellbare Stimulierbarkeit durch G_{sa} (Hoffmann, 1999; Tang and Gilman, 1995). Auffällig ist, dass ohne CqsS das Mischen der löslichen hACII C1a(b) und C2 oder deren Linkerkonstrukte $\pm G_{sa}^*$ keine höheren Aktivitäten als die einzelnen Untereinheiten erbrachte, was eigentlich zu erwarten war. Möglicherweise ist problematisch, dass es sich um Untereinheiten derselben AC-Isoform handelt. Aus bislang nicht bekannten Gründen war das Mischen nichtchimärer AC-Untereinheiten *in vitro* nur selten erfolgreich (z.B. ACV und ACIX (Scholich et al., 1997; Yan et al., 1998)), während es sich sonst immer um Chimäre, z.B. ACI/ACII, ACV/ACII, handelte (Tang and Gilman, 1995; Tesmer et al., 1997). Ein weiterer kritischer Punkt ist das Auftreten von Dimeren der hACII C2, die im Western Blot sichtbar waren. Vermutlich behindert dies ebenfalls die Dimerenbildung von C1/C2. Um die Experimente nicht zu komplex zu gestalten, wäre es sinnvoll, keine Verknüpfungsmöglichkeiten mit dem CqsS-Rezeptor in Betracht zu ziehen, bevor eine Aktivitätssteigerung durch G_{sa}^* bei den löslichen Untereinheiten erreicht wird. Es wäre denkbar für weitere Versuche auf ein anderes Expressionssystem, z.B. Insektenzellen, umzuschwenken oder LqsS anstelle von CqsS zu verwenden. LqsS-Rv1625c-Homodimere konnten z.T. höhere Basalaktivitäten als CqsS-Rv1625c erzielen (M. Ziegler, unveröffentlicht), was im Fall der niedrigen Mammalia-AC Basalaktivitäten von Vorteil wäre.

Auch wenn bei den hier beschriebenen chimären Konstrukten kaum Regulation durch CAI-1 erhalten wurde, lässt sich die Theorie über eine mögliche Rezeptorfunktion der AC-Membrananker nicht von der Hand weisen. Beispielsweise scheinen spezielle Domänen oft an derselben Position in unterschiedlichen Proteinen lokalisiert. Hiervon zeugt das Auftreten von Rezeptoren oder Sensoren N-terminal von Effektor-domänen, während C-terminal davon eher Domänen für die Lokalisation des Proteins angesiedelt sind (Schultz and Natarajan, 2013). Die Membrandomänen der hier getesteten ACn befinden sich alle N-terminal vor der katalytischen Effektor-domäne.

Darüber hinaus deuten auch sog. „horizontale“ und „vertikale“ Alignments auf eine spezifische Funktion der Transmembranbereiche von ACn hin. Ein horizontales Alignment beinhaltet beispielsweise alle Mammalia-ACn der Isoformen I-VIII (> 250 ACn). Hierbei wird die starke Konservierung der katalytischen Domänen C1 und C2 sichtbar. Diese Konservierung ist selbst dann noch vorhanden, wenn bakterielle ACn der Klasse IIIa in das Alignment mit einbezogen werden. Im Gegensatz dazu lassen sich in den Transmembranbereichen kaum konservierte Sequenzen feststellen. Einen Ausschnitt eines horizontalen Alignments von Mammalia-ACn der Isoformen I und II zeigt Anhang 7 (Daten J. E. Schultz 2014). Im Fall eines vertikalen Alignments wird nur eine bestimmte AC-Isoform betrachtet, jedoch aus allen zur Verfügung stehenden sequenzierten Spezies. Dann wandelt sich das Bild und auch die Transmembranbereiche zeigen eine Konservierung selbst über die Speziesgrenzen

hinaus. Zum Vergleich ist das entsprechende vertikale Alignment der *Mammalia*-AC Isoformen I und II im Anhang 7 dargestellt. Solch eine spezifische Konservierung erscheint nur logisch, wenn die Transmembranbereiche eine Funktion erfüllen, die über eine bloße Membranverankerung hinausgehen. Die bioinformatischen Daten unterstützen auch die Tatsache, dass sich die Transmembranbereiche unterschiedlicher ACn nicht beliebig in Chimären kombinieren lassen (Seebacher et al., 2001).

4.2.2 Regulierung von Rv1625c-Konstrukten durch $G_{s\alpha}^*$

Auf Grund der Schwierigkeiten mit den *Mammalia*-AC-Konstrukten, sollte ein Lösungsansatz mit Hilfe des löslichen Teils der mykobakteriellen Rv1625c gefunden werden. Die bakterielle AC sollte so mutiert werden, dass sie sowohl als heterodimeres Modell einer *Mammalia*-AC dienen, als auch durch $G_{s\alpha}^*$ stimuliert werden kann. Eine Regulation durch G-Proteine ist in Bakterien unbekannt. Da sich Rv1625c und *Mammalia*-ACn sehr ähnlich sind, könnten mit Rv1625c als Modell Probleme bei der Expression von *Mammalia*-ACn in Bakterien behoben werden. Beispielsweise ließen sich Schlüsselstellen in der Sequenz durch diejenigen der bakteriellen AC austauschen und die Expression so erleichtern.

Das Ziel, die löslichen Teile von Rv1625c in ein Heterodimer umzuwandeln, konnte mit zwei verschiedenen Mutantenkombinationen erreicht werden (Rv1625c-C1 und Rv1625c-C2-A bzw. -C2-B). Wie beim Vorbild der löslichen katalytischen *Mammalia*-AC Domänen waren die Untereinheiten allein inaktiv, während Rv1625c-C1/-C2-A bzw. Rv1625c-C1/-C2-B Aktivität zeigten (Tesmer et al., 1997; Whisnant et al., 1996; Yan et al., 1996). Die hier verwendeten Rv1625c-C1/-C2-Varianten sind mit den entsprechenden ASn aus *Mammalia*-ACn ausgestattet worden, während in früheren Versuchen Rv1625c-C1- und -C2-Untereinheiten durch Mutation der katalytischen ASn (D256, D300, N372, R376) zu Ala entstanden (Linder et al., 2004a). Das Auftreten von Dimeren im Western Blot bei allen Rv1625c-Varianten inklusive des unveränderten, löslichen „Wildtyps“, zeugt von einer großen Affinität der Untereinheiten, sodass sich funktionsfähige Einheiten zusammenfanden. Dies ist ein Vorteil im Vergleich mit den zuvor getesteten löslichen *Mammalia*-AC-Untereinheiten. Es konnte bislang keine Ursache für die Dimerbildung im Western Blot gefunden werden, da sich in der Sequenz keine Cysteine befinden und die Proben vor dem Auftragen erhitzt wurden.

Da Heterodimere bestehend aus verschiedenen Rv1625c-C1 Varianten und *Mammalia*-AC C2-Untereinheiten und umgekehrt bislang keine AC-Aktivität aufwiesen (Linder et al., 2004a), wurden weitere Mutationen in Rv1625c-C1 und -C2-A eingeführt, um eine höhere Übereinstimmung mit *Mammalia*-ACn zu erzielen. Mit dem Versuch der Umwandlung der Rv1625c-Untereinheiten in $G_{s\alpha}^*$ regulierte Konstrukte wurde Neuland betreten. Auf Grund der starken Ähnlichkeit in Sequenz und vorhergesagter Struktur zwischen Rv1625c und *Mammalia*-ACn scheint dieses Ziel möglicherweise erreichbar. Es muss beachtet werden, dass $G_{s\alpha}$ die schwach aktiven *Mammalia*-AC-Untereinheiten in einer optimalen Position stabilisiert und

dadurch aktiviert (Tesmer et al., 1997). Im Gegensatz dazu ist Rv1625c hoch aktiv und es ist ungewiss, ob eine Stimulation durch $G_{s\alpha}$ erreicht werden kann, da die Ausrichtung der Untereinheiten zueinander schlicht nicht verbessert werden kann. Vor allem mit Hilfe der Struktur des ACV C1/ACII C2 Heterodimers waren Bindestellen zwischen *Mammalia*-ACn und $G_{s\alpha}$ sichtbar und wurden auf entsprechende Stellen im Rv1625c-Heterodimer übertragen (Tesmer et al., 1997). Zur Vermeidung aufwendigen Titrierens der beiden Untereinheiten im AC-Test wurden alle Rv1625c-C1 und -C2-A Konstrukte gelinkert, um die lokale Konzentration im Test zu erhöhen. Obwohl einige der mutierten Rv1625c-Konstrukte eine bislang nicht signifikante Stimulation durch $G_{s\alpha}^*$ aufwiesen, waren die Werte immer noch gering im Vergleich mit der getesteten Stimulation im Gesamthirn der Maus. Es zeigte sich jedoch entgegen der Befürchtung, dass selbst hoch aktive Konstrukte eine $G_{s\alpha}^*$ -Stimulation aufwiesen. Möglicherweise ist der Effekt ähnlich wie in *Mammalia*-ACn und der aktive Zustand wird durch $G_{s\alpha}^*$ weiter stabilisiert (Tesmer et al., 1997). Besonders bei Konstrukten mit mehreren Mutationen war nur eine Hemmung feststellbar, die bei höherer $G_{s\alpha}^*$ -Konzentration sogar verstärkt wurde. Vermutlich wirken sich die unterschiedlichen Mutationen zu stark auf die Struktur aus, sodass $G_{s\alpha}^*$ nicht mehr binden kann. Außerdem wäre es möglich, dass bei einem Überangebot an $G_{s\alpha}^*$ auch die Bindestelle für die inhibierende α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins ($G_{i\alpha}$) besetzt wird, was in der Hemmung resultiert. $G_{s\alpha}$ und $G_{i\alpha}$ sind sich in der Sequenz sehr ähnlich (Anhang 8) und besetzen wahrscheinlich gegenüberliegende Bindestellen im C1/C2-Heterodimer von *Mammalia*-ACn (Dessauer et al., 1998).

Die Versuche gestalteten sich als schwierig, da keine Mindestanzahl an benötigten $G_{s\alpha}$ -bindenden ASn bekannt ist. Aus den Versuchen ergab sich bislang noch kein Muster, das auf zwingend nötige Mutationen schließen ließ. Manche Mutationen zeigten eine Hemmung durch $G_{s\alpha}^*$, was jedoch in Kombination mit anderen Mutationen in Stimulation geändert wurde. Selbst das Einfügen möglichst vieler Mutationen für eine gute Anpassung an *Mammalia*-ACn führte entgegen der Erwartung eher zu einer Hemmung durch $G_{s\alpha}^*$. Mit den hier getesteten Mutanten konnte noch nicht geklärt werden, wie die Struktur des Rv1625c-Heterodimers verändert werden muss, um den Unterschieden in *Mammalia*-C1 und -C2 gerecht zu werden. Somit muss jede mögliche Mutation in den Rv1625c-Konstrukten einzeln und in Kombination mit anderen getestet werden. Erschwerend kommt hinzu, dass jede neu eingefügte Mutation die Struktur des jeweiligen Konstrukts unvorhergesehen beeinflussen kann und sich Aktivität und Stimulierbarkeit verändern. Dadurch erhöht sich der Versuchsaufwand enorm. Daher ist es für weitere Experimente sinnvoll, auf computergestützte Rechenmodelle auszuweichen, welche die geplanten Konstrukte mit Datenbanken abgleichen und die zu erwartende Struktur mit realen Proteinen abschätzen. Nach der Auswertung mit verschiedenen Programmen erhält man eine Art Verwandtschaftsbeziehung der eingespeisten Konstrukte zu bekannten ACn aus der Datenbank (*Cluster-Analyse*). Verschieben sich durch die eingefügten Mutationen diese „Verwandtschaftsgrade“ weg von den mykobakteriellen ACn hin zu *Mammalia*-ACn, ist zwar noch keine Garantie für

Aktivität und Stimulierbarkeit durch $G_{s\alpha}^*$ gegeben, aber zumindest lässt sich die Anzahl der zu testenden Konstrukte etwas beschränken. Bioinformatik ist daher als Schlüssel anzusehen, um die ungeheure Menge an gesammelten Daten optimal zu verwerten und für eine zielgerichtete Forschung anzuwenden.

Bei einer Kristallstruktur handelt es sich um eine Momentaufnahme eines fixen Zustandes. Werden weitere Kristalle analysiert, kann sich ein anderes Bild ergeben und es ist möglich, dass manchen $G_{s\alpha}$ bindenden ASn keine so hohe Bedeutung zukommt, wie ursprünglich angenommen. Deshalb ist es unverzichtbar, für folgende Konstrukte mehr Strukturdaten einfließen zu lassen. An diesem Projekt wurde deutlich, wie komplex die Untereinheiten miteinander interagieren und welche Auswirkungen unterschiedliche Mutationen haben können. Sind nur wenige ASn von Mutationen betroffen, wird dies gelegentlich vom Protein toleriert. So konnte eine lösliche ACIX so mutiert werden, dass eine Forskolinstimulation erfolgte (Yan et al., 1998). Ähnliche Versuche, Rv1625c durch Mutation mit FSK zu stimulieren, schlugen bislang fehl (Linder et al., 2004a). Es zeigte sich prinzipiell, dass eine (bislang noch mäßige) Stimulation durch $G_{s\alpha}^*$ von Rv1625c-Konstrukten möglich ist und eine Optimierung der Versuche nicht ohne bioinformatische Analysen am Computer zu bewältigen ist. Trotz der starken Ähnlichkeit zwischen Rv1625c und *Mammalia*-ACn bestehen viele Unterschiede, die das Protein an den jeweiligen Organismus anpassen und nicht übertragen werden können.

Die bisher gesammelte Datenlage reicht noch nicht aus, um Verbesserungen für die CqsS-*Mammalia*-AC-Konstrukte vorschlagen zu können. Die Rv1625c-Konstrukte können erst als zuverlässiges *Mammalia*-AC-Modell dienen, wenn die $G_{s\alpha}^*$ -Stimulation besser ist. Die Vermutung liegt nahe, dass auch die C-Helix möglicherweise in der $G_{s\alpha}$ -Bindung eine Rolle spielt, da $G_{s\alpha}$ auch an den N-terminalen Bereich der C1 bindet (Tesmer et al., 1997). Einen Hinweis darauf lieferte die L₂₂₇P Mutation, da sich diese AS in der C-Helix befindet. Studien hatten gefunden, dass diese Mutation in ACV C2 zu einer reduzierten Stimulierbarkeit durch $G_{s\alpha}$ führte (Zimmermann et al., 1998). Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigten das umgekehrte Bild, nämlich dass die L₂₂₇P Mutation in C2 zu einer Stimulation durch $G_{s\alpha}^*$ führte, während eine Stimulation mit der Mutation in C1 oder in beiden Untereinheiten nicht nachweisbar war. Wahrscheinlich gibt die L₂₂₇P Mutation in C1 den Ausschlag, denn C1[P]-C2 und C1[P]-C2[P] sind sowohl ähnlich aktiv als auch nicht stimuliert. Warum diese Position nur in C1 eine Rolle spielt, wurde nicht geklärt. Im Gegensatz zu *Mammalia*-ACn ist die C-Helix der Rv1625c-Untereinheiten identisch. Um Auswirkungen der C-Helix näher zu untersuchen, könnte beispielsweise in späteren, optimierten Rv1625c-Konstrukten deren C-Helix gegen diejenige von verschiedenen *Mammalia*-ACn ausgetauscht werden.

5 Zusammenfassung

Membranproteine sind als Rezeptoren oder Ionenkanäle entscheidende Bestandteile der Zelle. Bislang konnte nur bei einem Bruchteil der Membranproteine die Struktur entschlüsselt werden. Das Hauptproblem bei der Strukturaufklärung von Membranproteinen ist nach der Überexpression der Proteine deren Solubilisation in einem aktiven und regulierbaren Zustand. Es gibt verschiedene Methoden der Solubilisation, von denen einige an den chimären Konstrukten Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 ausprobiert wurden. Die Chimären wurden gegenüber dem Holoenzym der AC bevorzugt, da diese Konstrukte nur zwei TMs als Membrananker enthielten und die Funktion des Rezeptors durch Regulation mit Serin überprüfbar war.

In Vorversuchen sollte der Tsr-Rezeptor durch Bildung möglicher Salzbrücken zwischen gezielten Mutationen stabilisiert werden. Die Versuche erfolgten in Anlehnung an Tar. Die Mutationen A16K und G19K hatten Auswirkungen auf die Gesamtstruktur der Chimäre. Bei A16K sank die Aktivität auf ca. 40 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ unter Erhalt der Serinregulation. Bei G19K war bei einer Aktivität von ca. 250 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ keine Regulation mehr messbar. Bis auf die regulierte A16K/V203E-Mutante zeigten alle weiteren Mutationen, die zur Ausbildung einer Salzbrücke zwischen TM1 und TM2 gedacht waren (V17E/G19K, G19K/V202E, G19K/V203E, V17E/G19K/W194R/V203E, G19K/L204E), nur geringe Aktivität ohne Serinregulation.

Eine weitere Möglichkeit, die Solubilisation zu erleichtern, war das Einfügen hydrophiler Reste in den TM2-Bereich von Tsr. Die Mutationen A192S/L196Q/F208S wurden vom Protein toleriert (ca. 2 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, 70% Hemmung 1 mM Serin). Mit dem weiteren Einfügen geladener ASn bei der [A192S/W194R/L196Q/M200K/F208S]-Mutante wurde das Konstrukt nicht reguliert und die Aktivität nahm stark ab (ca. 22 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹).

Das Einfügen des T4L* als Fusionsdomäne in Tsr sollte die Solubilisation erleichtern. T4L* sollte die hydrophile Oberfläche im Konstrukt vergrößern und interne Flexibilität vermindern. Als Membranpräparation hatte das Konstrukt T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 verminderte Aktivität, die Regulation blieb erhalten (ca. 840 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, 78% Hemmung 1 mM Serin). Das zweite Konstrukt TM1_{Tsr}-T4L-Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 war hingegen kaum aktiv und unreguliert.

Mit den Fusionsproteinen YaiN und YbeL wurden acht verschiedene Expressionskassetten konstruiert. YaiN und YbeL sind zwei hydrophile Proteine, die das Herauslösen von Proteinen aus der Membran positiv beeinflussen sollen. Das aktivste Konstrukt N-YbeL (ca. 11 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, 90% Hemmung 10 mM Serin) wurde mit 1% Brij58 solubilisiert, wobei nach der Reinigung des Konstrukts nur noch eine Aktivität von ca. 2 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ bei 22%iger Hemmung durch 10 mM Serin übrig war.

Mit der Etablierung eines zellfreien Expressionssystems sollten Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645 und Tsr-HAMP₃₆₄₅-Rv3645 direkt in einer detergenshaltigen Lösung exprimiert werden. GFP als Fusionsprotein diente der direkten Kontrolle. Mit Verwendung

unterschiedlicher Detergenzien (Brij35, Brij58, Brij78, Brij98, Digitonin, C₁₂E₈, DDM, MNG-3) gelang der Nachweis von Proteinen im Überstand der Reaktion (Western Blot). Die Basalaktivitäten der gelösten Proteine waren allerdings äußerst gering, die Regulation war verloren.

Membrangebundene ACn finden sich sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten. Es gibt Hinweise, dass es sich bei den Membranankern um Rezeptoren handeln könnte. Der *quorum sensing* Rezeptor CqsS und die beiden katalytischen Domänen C1 und C2 der *Mammalia*-ACn sollten zu regulierbaren Chimären verknüpft werden. Die Konstrukte wurden entweder fusioniert oder geteilt exprimiert (CqsS-C1/CqsS-C2), die Verknüpfungspunkte zwischen CqsS und den katalytischen Untereinheiten wurden variiert und der *codon usage* der hACII wurde an den Expressionsstamm *E. coli* angepasst. Trotz aller Bemühungen blieben die Basalaktivitäten sehr gering (zwischen 30-100 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹). Nur in einzelnen Konstrukten konnte eine schwache Regulation durch den Liganden CAI-1 und teilweise Stimulation durch G_{sα}* festgestellt werden. Lösliche Konstrukte bestehend aus den katalytischen Untereinheiten hACII C1 und C2 ohne CqsS-Rezeptor zeigten bislang keine Stimulation durch G_{sα}* oder FSK.

Da sich die Expression der *Mammalia*-ACn als problematisch erwies, sollte die mykobakterielle AC Rv1625c zu einem entsprechenden Modellsystem umfunktioniert werden. Bei Rv1625c handelt es sich um die Hälfte einer *Mammalia*-AC. Durch die Mutationen N₃₇₂T/R₃₇₆H entstand Rv1625c-C1 und durch D₂₅₆S/D₃₀₀S/S₃₀₁T bzw. D₂₅₆S/D₃₀₀S Rv1625c-C2-A bzw. -B nach Vorbild der beiden katalytischen Domänen von *Mammalia*-ACn. Beide Untereinheiten zeigen nur bei gemeinsamer Zugabe im AC-Test Aktivität. Es wurden zusätzliche Mutationen in das Linkerkonstrukt RV-1 eingeführt, um eine G_{sα}*-Stimulation zu bewirken. Die Mutationen befanden sich entsprechend publizierter Strukturdaten sowohl im Bereich von C1 als auch von C2 und wurden je nach Konstrukt verschieden miteinander kombiniert. Die Konstrukte zeigten teils Hemmung, teils eine geringfügige Stimulierung durch verschiedene G_{sα}*-Konzentrationen (maximale Stimulation 33% mit 1,2 μM G_{sα}* bei RV-22). Nach den bisherigen Untersuchungen war noch kein Muster für zwingend nötige ASn für eine G_{sα}*-Stimulierung erkennbar.

6 Anhang

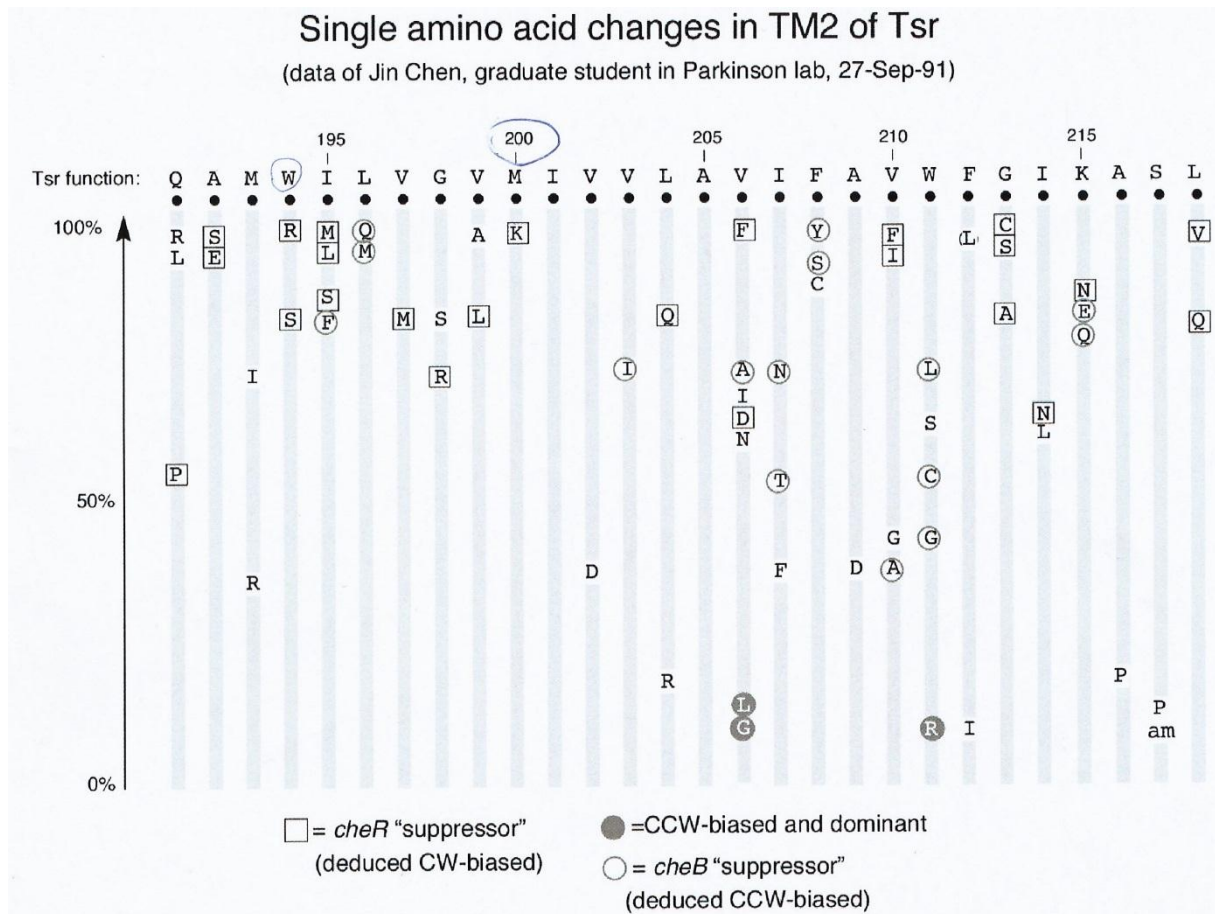
Datenbanken und Bioinformatik:

NCBI	http://ncbi.nlm.nih.gov/
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/
EMBOSS	http://ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/
Quick2d	http://toolkit.tuebingen.mpg.de/
PrimerX	http://bioinformatics.org/primerx/cgi-bin/DNA_1.cgi

Zugangsnummern:

Tsr	gi: 400233
Rv3645	gi: 395140502
Rv1625c	gi: 614134238
ACII (Ratte)	gi: 13591906
ACV (Kaninchen)	gi: 130491813
ACII (Mensch)	gi: 115387102
CqsS	gi: 167009128
CyaG	gi: 209524220
G _{Sα} (Mensch, kurz)	gi: 52000961
G _{Iα} (Mensch)	gi: 33946324

Anhang 1



Datengrundlage zur Bildung von Chimären mit Insertion hydrophiler Reste in die zweite Transmembranhelix von Tsr-HAMP_{Tsr}-Rv3645. Daten wurden von J. S. Parkinson zur Verfügung gestellt.

Anhang 2

CM-1:

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIAQQUER**LLLSVLPRHVAMEMKADINAKQEDMMFHKIYIQKHDNVSILFADIE
GFTSLASQCTAQELVMTLNELFARFDKLAENHCLRIKILGDCYYCVSGLPEARADHAHCCVEMGMDMIEAISLVR
EVTGVNVNMRVGIHSGRVHCGVLGLRQWQFDVWSNDVTLANHMEAGGKAGRIHITKATLNLNGDYEVPEPGCG
GERNAYLKEHSIETFLILRCT;
MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIALNRV**LLENVLP AHVAEHFLARSLKNEELYHQSYDCVCMFASIPDFKEF
YTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAIPSQEHAQEPERQYMHIGTMVEF
AYALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPVIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSILILQTL
GYTCTCRGIINVKGKGLDLYFVNTEMSRSLSQSNLAS

CM-2:

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIAQQUER**LLLSVLPRHVAMEMKADINAKQEDMMFHKIYIQKHDNVSILFADIE
GFTSLASQCTAQELVMTLNELFARFDKLAENHCLRIKILGDCYYCVSGLPEARADHAHCCVEMGMDMIEAISLVR
EVTGVNVNMRVGIHSGRVHCGVLGLRQWQFDVWSNDVTLANHMEAGGKAGRIHITKATLNLNGDYEVPEPGCG
GERNAYLKEHSIETFLILRCT**QKRKEEK**;
MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIALNRV**LLENVLP AHVAEHFLARSLKNEELYHQSYDCVCMFASIPDFKEF
YTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAIPSQEHAQEPERQYMHIGTMVEF
AYALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPVIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSILILQTL
GYTCTCRGIINVKGKGLDLYFVNTEMSRSLSQSNLAS

CM-3:

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIALNRV**LLENVLP AHVAEHFLARSLKNEELYHQSYDCVCMFASIPDFKEF
YTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAIPSQEHAQEPERQYMHIGTMVEF
AYALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPVIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSILILQTL
GYTCTCRGIINVKGKGLDLYFVNTEMSRSLSQSNLAS

CM-4:

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIAQDTC**NCIKSRIKLEFEK**QQER**LLLSLLPAHIAMEMKAEIIRLQGPAG
QMENTNMFHNLVYKRHTNVSILYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENECMRIKILGDCYYCVSG
LPISLPHAKNCVKMGLDMCEAIKKVRDATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVVSHDVTLANHMEAGG
VPGRVHISSVTLEHLNGAYKVEEGDGDIRDYPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQHFRPRHTLDGAKMRASVRMT
RYLESWGAAPFAHLHHRDSMTTENGKISTTDVPMGQHNFNQNRTRLRTKSQKKRFEELNERMIQAIDGINAQKQ
WLKSEDIQRISLLFYNKVLEKEYRATALPAFKYYRSMDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPY
ENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITS
VMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIANK**FKKEREEIETME
N**LNRV**LLENVLP AHVAEHFLARSLKNEELYHQSYDCVCMFASIPDFKEFYTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDDLL
LSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEHSQEPPERQYMHIGTMVEFAFALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGIN
HGPVIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSILVLTGTYTCTCRGIINVKGKGLDLYFVNTE
EMSRSLSQSNVAS

Anhang 2 (Fortsetzung)

CM-5:

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIADTC**NCIKSRIKLEFEKR**QQER**LLLSLLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAGQ
MENTNNFHNLYVKRHTNVSILYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENECMRIKILGDCYYCVSGL
PISLPNHAKNCVKMGLDMCEAIKKVRDATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVWVSHDVTLANHMEAGG
VPGRVHISSVTLEHLNGAYKVEEGDGDIRDYPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQHLFRPRHTLDGAKMRASVRMT
RYLESWGAAKPFALHHRDSMTTENGKISTTDVPMGQHNFNQNRTRLRTKSQKKRFEELNERMIQAIDGINAQKQ
WLKSEDIQRISLLFYNKVLEKEYRATALPAFKYYRSMDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPY
ENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITS
VMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIANK**FKKEREEIETME
N**LNRV**LLENVLP AHVAEHFLARSLKNEEL YHQS YDCVCVMFASIPDFKEFYTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDDL
LSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEHSQEPPERQYMHIGTMVEFALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGIN
HGPVIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSLVLQTLGYTCTCRGIINVKGKGLKTYFVNT
EMSRSLSQSNVAS

CM-6:

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIAQQR**LLLSLLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAGQMENTNNFHNLYVKRHT
NVSILYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENECMRIKILGDCYYCVSGLPISLPNHAKNCVKMGLD
MCEAIKKVRDATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVWVSHDVTLANHMEAGGVPGRVHISSVTLEHLNGA
YKVEEGDGDIRDYPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQHLFRPRHTLDGAKMRASVRMTRYLESWGAAKPFALHH
RDSMTTENGKISTTDVPMGQHNFNQNRTRLRTKSQKKRFEELNERMIQAIDGINAQKQWLKSEDIQRISLLFYNKV
EKEYRATALPAFKYYRSMDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRN
RTPFEWRGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAW
VAQGFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIALNRV**LLENVLP AHVAEHFLARSLKNEEL YHQS
YDCVCVMFASIPDFKEFYTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDDL LSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEH
SQEPPERQYMHIGTMVEFALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPVIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDST
GVLDKIQVTEETSLVLQTLGYTCTCRGIINVKGKGLKTYFVNT EMSRSLSQSNVAS

CM-7:

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIAQDTC**NCIKSRIKLEFEKR**QQER**LLLSLLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAG
QMENTNNFHNLYVKRHTNVSILYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENECMRIKILGDCYYCVSG
LPISLPNHAKNCVKMGLDMCEAIKKVRDATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVWVSHDVTLANHMEAGG
VPGRVHISSVTLEHLNGAYKVEEGDGDIRDYPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQHLFRPRHTLDGAKMRASVRMT
RYLESWGAAKPFALHHRDSMTTENGKISTTDVPMGQHNFNQNRTRLRTKSQKKRFEELNERMIQAIDGINAQKQ
WLKSEDIQRISLLFYNKVLEKEYRATALPAFKYYRSMDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPY
ENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFEWRGFLPAYYQVVTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITS
VMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHVPIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIANK**FKKEREEIETM
EN**LNRV**LLENVLP AHVAEHFLARSLKNEEL YHQS YDCVCVMFASIPDFKEFYTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDD
LLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEHSQEPPERQYMHIGTMVEFALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGIN
HGPVIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSLVLQTLGYTCTCRGIINVKGKGLKTYFVNT
EMSRSLSQSNVAS

Anhang 2 (Fortsetzung)

CM-8:

MDAIRKVVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIAQDTC**NCIKSRIKLEFEKROQERLLLSLLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAG
QMENTNNFHNLYVKRHTNVSILYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENECMRILKILGDCYYCVSG
LPISLPHAKNCVKMGLDMCEAIKKVRDATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVWVSHDVTLANHMEAGG
VPGRVHISSVTLEHLNGAYKVEEGDGDIRDYPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQHFRPRHTLDGAKMRASVRMT
RYLESWGAAKPFALHHRDSMTTENGKISTTDVPMGQHNFQNRTRLRTKSQKKRFEELNERMIQAIDGINAQKQ
WLKSEDIQRISLLFYNKVLEKEYRATALPAFKYY;

MDAIRKVVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIANKFK**KEREEIETMENLNRVLLLENVLP AHVAEHFLARSLKNEELYHQSYD
DCVCMFASIPDFKEFYTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEHS
QEPERQYMHIGTMVEFALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPVIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTG
VLDKIQVTEETSLVLQTLGYTCTCRGIINVKGKGDLDKTYFVNTEMSRSLSQSNVAS

CM-9:

MDAIRKVVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIADTC**NCIKSRIKLEFEKROQERLLLSLLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAGQ
MENTNNFHNLYVKRHTNVSILYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENECMRILKILGDCYYCVSGL
PISLPHAKNCVKMGLDMCEAIKKVRDATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVWVSHDVTLANHMEAGG
VPGRVHISSVTLEHLNGAYKVEEGDGDIRDYPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQHFRPRHTLDGAKMRASVRMT
RYLESWGAAKPFALHHRDSMTTENGKISTTDVPMGQHNFQNRTRLRTKSQKKRFEELNERMIQAIDGINAQKQ
WLKSEDIQRISLLFYNKVLEKEYRATALPAFKYY;

MDAIRKVVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIANKFK**KEREEIETMENLNRVLLLENVLP AHVAEHFLARSLKNEELYHQSYD
CVCVMFASIPDFKEFYTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEHSQ
EPERQYMHIGTMVEFALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPVIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLD
DKIQVTEETSLVLQTLGYTCTCRGIINVKGKGDLDKTYFVNTEMSRSLSQSNVAS

CM-10:

MDAIRKVVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIAQER**LLLSLLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAGQMENTNNFHNLYVKRHT
NVSILYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENECMRILKILGDCYYCVSGLPISLPHAKNCVKMGLD
MCEAIKKVRDATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVWVSHDVTLANHMEAGGVPGRVHISSVTLEHLNGA
YKVEEGDGDIRDYPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQHFRPRHTLDGAKMRASVRMTRYLESWGAAKPFALHHR
RDSMTTENGKISTTDVPMGQHNFQNRTRLRTKSQKKRFEELNERMIQAIDGINAQKQWLKSEDIQRISLLFYNKVL
EKEYRATALPAFKYY;

MDAIRKVVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKV**SIALNRV**LLLENVLP AHVAEHFLARSLKNEELYHQSYDCVCMFASIPDFKEF
YTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEHSQEPERQYMHIGTMVEF
AFALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPVIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSLVLQTL
GYTCTCRGIINVKGKGDLDKTYFVNTEMSRSLSQSNVAS

Anhang 2 (Fortsetzung)

CM-11:

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEFEKRQQRLLLLSLLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAGQMENTNNFHNLVYKRHTNVS
LYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENECMRIKILGDCYYCVSGLPISLPNHAKNCVKMGLDMCE
AIKKVRDATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVVSHDVTLANHMEAGGVPGRVHISSVTLEHLNGAYKV
EEGDGDIRDPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQHFRPRHTLDGAKMRASVRMTRYLESWGAAKPFAHLHHRDS
MTTENGKISTTDVPMGQHNFNQRTLRTKSQKKRFEEELNERMIQAIDGINAQKQWLKSEDIQRISLLFYNKVLEKE
YRATALPAFKYY;

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQIETMENLNRVLEENLPAHVAEHFLARSLKNEELYHQS YDCVCMFASIPDFKEFYTES
DVNKEGLECLRLLNEIADFDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEHSQEPPERQYMHIGTMVEFAFAL
VGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSLVLQTLGYT
CTCRGIINVKGKGD LKTYFVNTEMSRSLSQSNVAS

CM-12:

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKVSI AQDTCNCIKSRIKLEFEKRQQRLLLLSLLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAG
QMENTNNFHNLVYKRHTNVSILYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENECMRIKILGDCYYCVSG
LPISLPNHAKNCVKMGLDMCEAIKKVRDATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVVSHDVTLANHMEAGG
VPGRVHISSVTLEHLNGAYKVEEGDGDIDRDPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQHFRP;

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEHEAKVSI AKNKFKKEREEIETMENLNRVLEENLPAHVAEHFLARSLKNEELYHQS
YDCVCMFASIPDFKEFYTESDVNKEGLECLRLLNEIADFDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEHS
QEPPERQYMHIGTMVEFAFALVGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTG
VLDKIQVTEETSLVLQTLGYTCTCRGIINVKGKGD LKTYFVNTEMSRSLSQSNVAS

CM-13:

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQVEFEKRQQRLLLLSLLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAGQMENTNNFHNLVYKRHTNVS
LYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENECMRIKILGDCYYCVSGLPISLPNHAKNCVKMGLDMCE
AIKKVRDATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVVSHDVTLANHMEAGGVPGRVHISSVTLEHLNGAYKV
EEGDGDIRDPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQHFRP;

MDAIRKVYQYAEPNLSLVGWMGFIGFPIYYIVWEFMFPQPYENLPLRILCSVLFFGIIYRNRTPFWEWRGFLPAYYQV
VTTLCLPCFFFYMLLMNNWSNVWVMSFMSAIFLHILLVHITSVMFVQTFVGIGLATFFAWVAQGFHLELTMDWTHV
PIFLFIYLFGNLCYFRNQIETMENLNRVLEENLPAHVAEHFLARSLKNEELYHQS YDCVCMFASIPDFKEFYTES
DVNKEGLECLRLLNEIADFDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEHSQEPPERQYMHIGTMVEFAFAL
VGKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSLVLQTLGYT
CTCRGIINVKGKGD LKTYFVNTEMSRSLSQSNVAS

Anhang 2 (Fortsetzung)

hACII C1a:

QDTCNCIKSRIKLEFEKRQQERLLL~~S~~LLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAGQMENTN~~N~~FHNLYV~~K~~RHTNVSILYADIV
GFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENE~~C~~MRIKILGDCYYCVSGLPISL~~P~~NHAKNCVKMGLDMCEAIKKVR
DATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVVSHDVTLANHMEAGGVPGRVHISSVTLEHLNGAYKVEEGDG
DIRDPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQH~~L~~FRP

hACII C1ab:

QDTCNCIKSRIKLEFEKRQQERLLL~~S~~LLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAGQMENTN~~N~~FHNLYV~~K~~RHTNVSILYADIV
GFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENE~~C~~MRIKILGDCYYCVSGLPISL~~P~~NHAKNCVKMGLDMCEAIKKVR
DATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVVSHDVTLANHMEAGGVPGRVHISSVTLEHLNGAYKVEEGDG
DIRDPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQH~~L~~FRPRHTLDGAKMRASVRMTRYLESWGAAKPF~~A~~HLHHRDSMTTEN
GKISTTDVPMGQHNFQNR~~T~~LR~~T~~KSQK~~R~~FEEELNERMIQAIDGINAQKQWLKSEDIQRISLLFY~~N~~KVLEKEYRATAL
PAFKYY

hACII C2:

KNK~~F~~KKEREEIETMENLNRVLL~~E~~NVLP~~A~~HVAEHFLARSLKNEELYHQS~~Y~~DCV~~C~~VMFASIPDFKEFYTESDVNKEGL
ECL~~R~~LLNEIADFDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEHSQEPERQYMHIGTMVEFAFALVGKLD~~A~~IN
KHSFNDFKLRVGINHG~~P~~VIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSLVLQTLGYTCTCRGIIN~~V~~
KGGDLKTYFVNTEMSRSL~~S~~QSNVAS

hACII C1a-Linker-hACII C2:

QDTCNCIKSRIKLEFEKRQQERLLL~~S~~LLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAGQMENTN~~N~~FHNLYV~~K~~RHTNVSILYADIV
GFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENE~~C~~MRIKILGDCYYCVSGLPISL~~P~~NHAKNCVKMGLDMCEAIKKVR
DATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVVSHDVTLANHMEAGGVPGRVHISSVTLEHLNGAYKVEEGDG
DIRDPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQH~~L~~FRP *TRAAGGPPAAGGLE***KNK**~~F~~KKEREEIETMENLNRVLL~~E~~NVLP~~A~~H
VAEHFLARSLKNEELYHQS~~Y~~DCV~~C~~VMFASIPDFKEFYTESDVNKEGLECL~~R~~LLNEIADFDLLSKPKFSGVEKIKTI
GSTYMAATGLSAVPSQEHSQEPERQYMHIGTMVEFAFALVGKLD~~A~~INKHSFNDFKLRVGINHG~~P~~VIAGVIGAQP
QYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSLVLQTLGYTCTCRGIIN~~V~~KGGDLKTYFVNTEMSRSL~~S~~QSNVAS

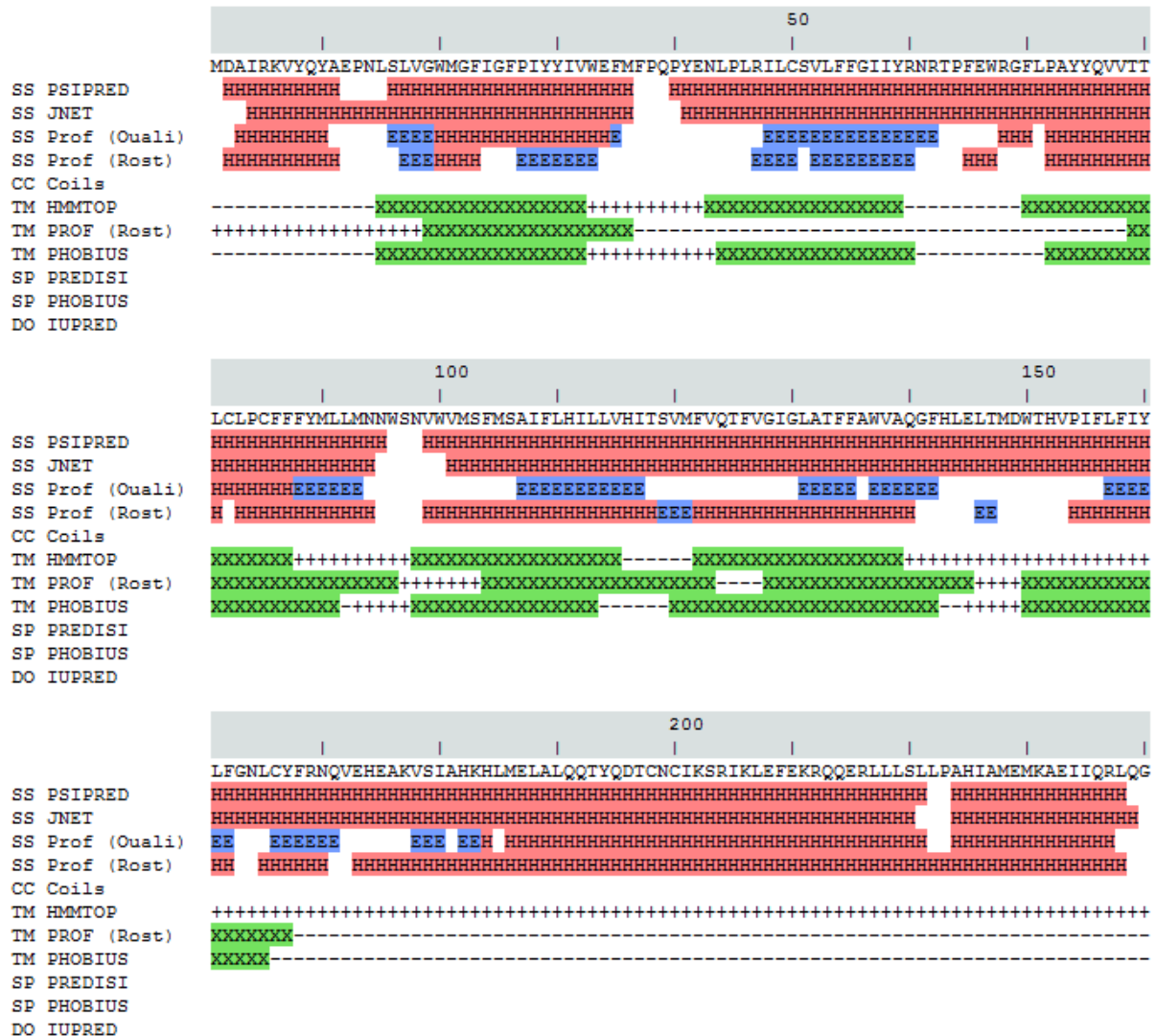
hACII C1ab-Linker-hACII C2:

QDTCNCIKSRIKLEFEKRQQERLLL~~S~~LLPAHIAMEMKAEIIQRLQGPKAGQMENTN~~N~~FHNLYV~~K~~RHTNVSILYADIV
GFTRLASDCSPGELVHMLNELFGKFDQIAKENE~~C~~MRIKILGDCYYCVSGLPISL~~P~~NHAKNCVKMGLDMCEAIKKVR
DATGVDINMRVGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVVSHDVTLANHMEAGGVPGRVHISSVTLEHLNGAYKVEEGDG
DIRDPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQH~~L~~FRPRHTLDGAKMRASVRMTRYLESWGAAKPF~~A~~HLHHRDSMTTEN
GKISTTDVPMGQHNFQNR~~T~~LR~~T~~KSQK~~R~~FEEELNERMIQAIDGINAQKQWLKSEDIQRISLLFY~~N~~KVLEKEYRATAL
PAFKYY *TRAAGGPPAAGGLE***KNK**~~F~~KKEREEIETMENLNRVLL~~E~~NVLP~~A~~HVAEHFLARSLKNEELYHQS~~Y~~DCV~~C~~VM
FASIPDFKEFYTESDVNKEGLECL~~R~~LLNEIADFDLLSKPKFSGVEKIKTIGSTYMAATGLSAVPSQEHSQEPERQY
MHIGTMVEFAFALVGKLD~~A~~INKHSFNDFKLRVGINHG~~P~~VIAGVIGAQPQYDIWGNTVNVASRMDSTGVLDKIQVT
EETSLVLQTLGYTCTCRGIIN~~V~~KGGDLKTYFVNTEMSRSL~~S~~QSNVAS

Vollständige Sequenzen der getesteten CqsS-Mammalia-AC Konstrukte (CM-1 bis CM-13) bzw. der löslichen Mammalia-AC Konstrukte. CM-1 bis CM-3 enthalten ACV C1 aus Kaninchen und ACII C2 der Ratte; CM-4 bis CM-13 enthalten die synthetisierte hACII, ebenso wie die löslichen Einzel- und gelinkerten Domänen. Der Beginn der C-Helix ist in der jeweiligen Untereinheit unterstrichen. Verknüpfungspunkte zwischen CqsS und den Mammalia-ACn bzw. eine Sequenzverlängerung in CM-2 sind fett hervorgehoben. Die Verknüpfung in den Fusionskonstrukten CM-4 bis CM-7 bzw. der Linker in hACII C1a(b)-Linker-hACII C2 sind kursiv dargestellt.

Anhang 3

- CqsS-hACII C1ab



Vorhersage möglicher Sekundärstrukturen (z.B. α -Helices, β -Faltblätter, *coiled coils*) in der Sequenz von CqsS-hACII C1ab in Quick2d mit verschiedenen Algorithmen. Besondere Aufmerksamkeit gilt dem Auftreten von *coiled coils* (cc), mehreren α -Helices, die in superhelicaler Struktur umeinander gewunden sind. Für CqsS-hACII C1ab wurde kein cc ermittelt. Im Gegensatz dazu zeigt sich am Ende von C1b ein cc, wenn die AS-Sequenz für CqsS-hACII C1ab rückwärts, mit der letzten AS beginnend, eingegeben wurde (Anhang 4). Der mögliche Gegenpart für dieses cc wurde für CqsS-hACII C2 am Verknüpfungspunkt von CqsS mit der hACII ermittelt (Anhang 5).

Anhang 3 (Fortsetzung)

250 | | | 300 | | | | |

PKAGQMENTNHNFNHLYVKRHTNVLSILYADIVGFTRLASDCSPGELVHMLNLFCKFDQIAKENECMRIKILGDCYCVSG

SS PSIPRED HHHHHHHH EEEEEEE HHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH EEEEEEE EEEEEEE

SS JNET HHHHH EEEEEEE S HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHH EEEEEEE EEEEEEE

SS Prof (Quali) HHHHHHHH EEEEEEE HH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHH EEEEEEE EEEEEEE

SS Prof (Rost) HHHHDEE EEEEEEE EEE HHHHHHHHHHH HHHHHHHHHH EEEEEEE EEEEEEE

CC Coils

TM HMMTOP ++++++

TM PROF (Rost) -----

TM PHOBIUS -----

SP PREDISI

SP PHOBIUS

DO IUPRED

350 | | | | |

LPISLPNHAKNCVKMGLDMCEAIKKVRDATGVGINMRVGVHSGNVLGCVIGLQKWQYDVVSHDVTLANHMEAGGVPGRVH

SS PSIPRED HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEE HHHHHHHHHH EEE

SS JNET HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH EEEEEEE EEEEEEE EEEEE HHHHHHHHHH EEE

SS Prof (Quali) HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH EEEEEEE EEEEEEE EEEEE HHHHHHHHHH EEE

SS Prof (Rost) HHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHH EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEE HHHHHHHH EEE

CC Coils

TM HMMTOP ++++++

TM PROF (Rost) -----

TM PHOBIUS -----

SP PREDISI

SP PHOBIUS

DO IUPRED

450 | | | | |

ISSVTLEHLNGAYKVEEGDGDIRDYPYLKQHLVKTYFVINPKGERRSPQHLFRPRHTLDGAKMRASVRMTRYLESWGAAKP

SS PSIPRED E HHHHHHHH EEEE HHHH EEEEEEE HHHH HHHH HHHH

SS JNET EEHHHHHHHH HHHH HHHHHHHH EEEEEEE EEEEEEE EEEEE HHHH HHH

SS Prof (Quali) EE HHHHHHHH EEE EEE EEEEEEE H H EEEE

SS Prof (Rost) EEE HHH EEEE HHHHHHHH EEEEEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH H

CC Coils

TM HMMTOP ++++++

TM PROF (Rost) -----

TM PHOBIUS -----

SP PREDISI

SP PHOBIUS

DO IUPRED D DDDDDDDDD

500 | | | | | 550 | | |

FAHLHHRDSMTTENGKISTTDVPMGQHNFNRTLRTKLSQKRFEEELNERMIQAIDGINAQKQWLKSEDIQRISLLFYNK

SS PSIPRED HHHH HH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHH EEEEEEE H

SS JNET HHH HHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHH H

SS Prof (Quali) HHH HHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHH EEEEEEE

SS Prof (Rost) HHH EEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHH

CC Coils

TM HMMTOP ++++++

TM PROF (Rost) -----

TM PHOBIUS -----

SP PREDISI

SP PHOBIUS

DO IUPRED DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD DD

VLEKEYRATALPAFKYYSVDLE

SS PSIPRED HHHHHHHH EE

SS JNET HHHHHHHH EEEE

SS Prof (Quali) HHHHHHHH EEE

SS Prof (Rost) HHHHHHHH HHHHHHHH

CC Coils

TM HMMTOP ++++++

TM PROF (Rost) -----

TM PHOBIUS -----

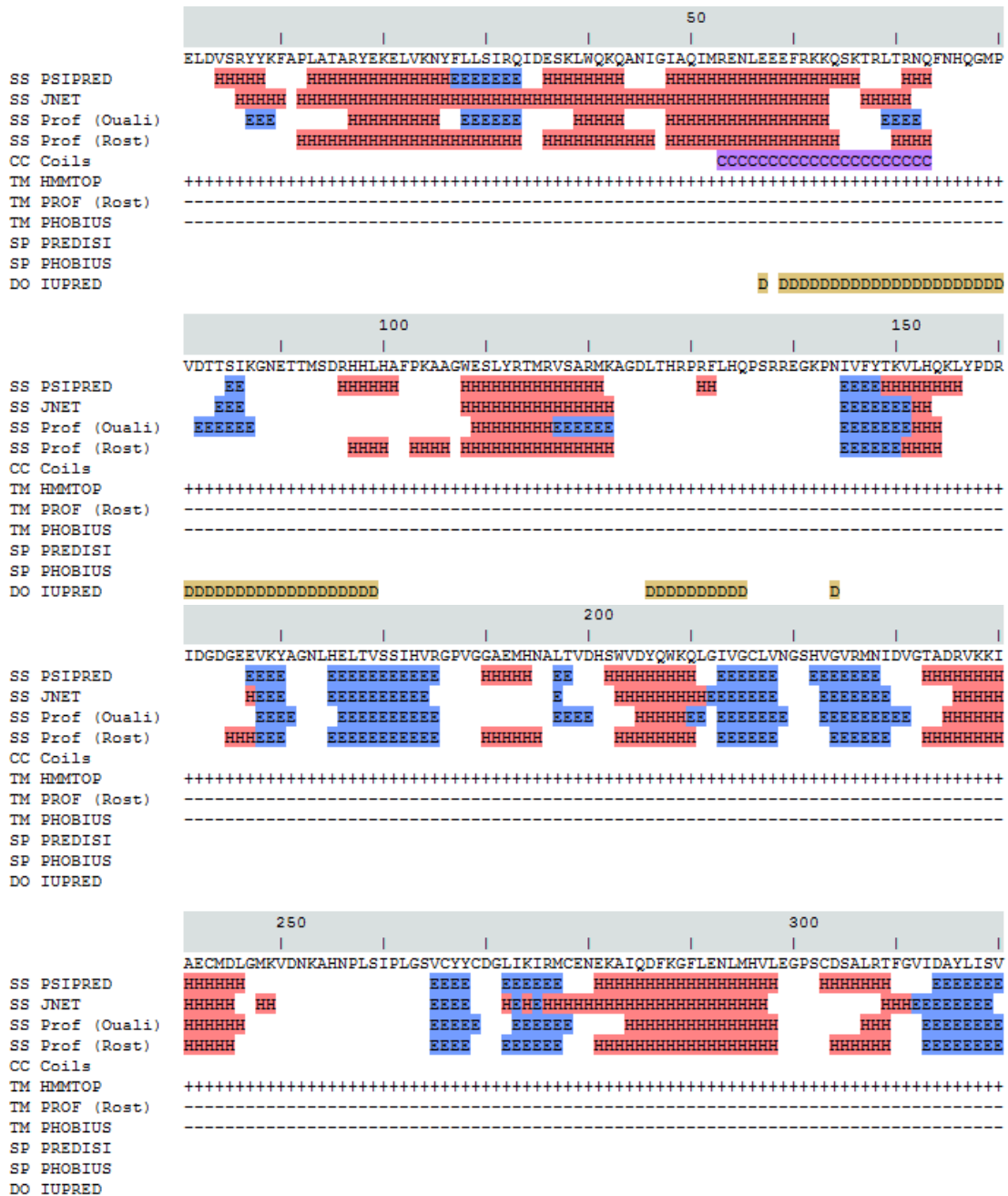
SP PREDISI

SP PHOBIUS

DO IUPRED

Anhang 4

- CqsS-hACII C1ab „rückwärts“



Erläuterungen in Anhang 3

Anhang 4 (Fortsetzung)

```

                                     350
          |           |           |           |           |           |           |           |
SS PSIPRED  NIHRKVYLNHFNNTNEMQAKPGQLRQIIIAKMEMAIIHAPLLSLLLREQQRKEFELKIRSKICNCTDQYTQQLALEMLHK
SS JNET     EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE
SS Prof (Ouali) EE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE
SS Prof (Rost) EEEEEEE EEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE
CC Coils
TM HMMTOP  ++++++
TM PROF (Rost) -----
TM PHOBIUS -----
SP PREDISI
SP PHOBIUS
DO IUPRED
    
```

```

                                     450
          |           |           |           |           |           |           |           |
SS PSIPRED  HAISVKAHEHVQNRFYCLNGFLYIFLFI PVHTQDMTLELHFGQAVQFFLTALGIGVFTGVFMVSTIHVLLIHLFIASMFMSM
SS JNET     H HEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE
SS Prof (Ouali) EEEEEEE EEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE
SS Prof (Rost) H EEEEEEE EEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE
CC Coils
TM HMMTOP  ++++++XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX+++++++
TM PROF (Rost) -----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX+++++
TM PHOBIUS -----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX+++++++XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-----
SP PREDISI
SP PHOBIUS
DO IUPRED
    
```

```

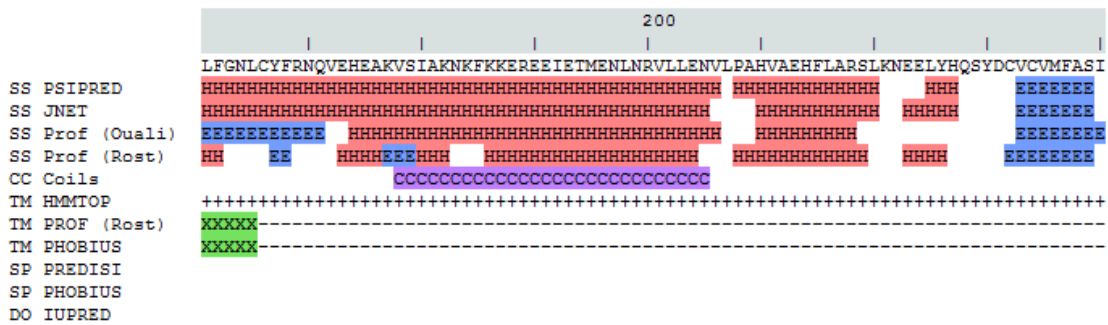
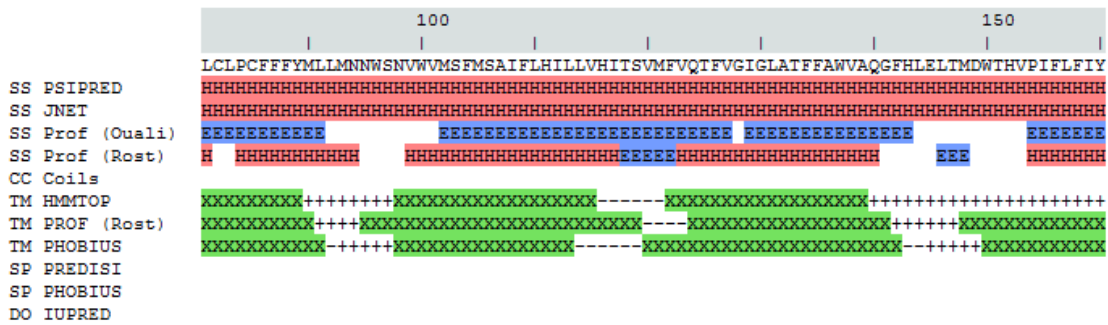
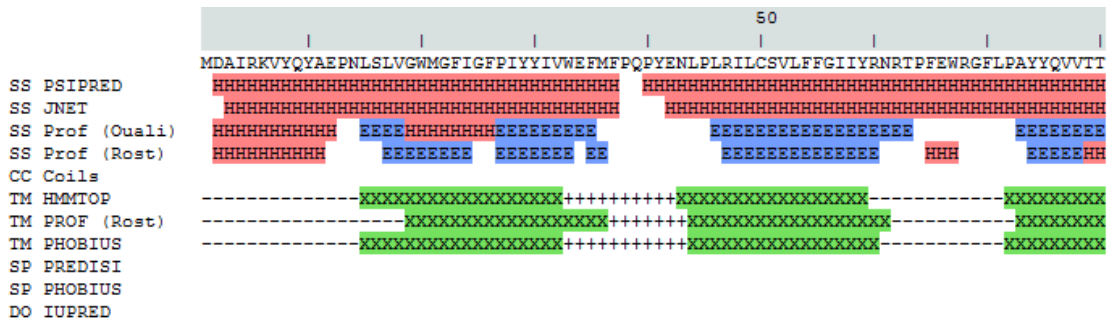
                                     500           550
          |           |           |           |           |           |           |           |
SS PSIPRED  VQVNSQNMLMYFFCPLCLTIVVQYYAPLFGFRQEFPTRRNYIIGFFLVSCILRLPLNEYPQPFMFQVIYIYIPFGIFG
SS JNET     EEE HEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE
SS Prof (Ouali) EEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE
SS Prof (Rost) H HEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE
CC Coils
TM HMMTOP  ++++++XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX+++++++XXXXXXXXXXXXXXXX
TM PROF (Rost) ++++++XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-----XXXXXXXXXXXXXXXX
TM PHOBIUS -----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX+++++++XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-----XXXXXXXXXXXXXXXX
SP PREDISI
SP PHOBIUS
DO IUPRED
    
```

```

          |           |
SS PSIPRED  MQGVLSLNPEAYQYVKRIADM
SS JNET     EEE EEEEEEE
SS Prof (Ouali) EEE EEEEEEE
SS Prof (Rost) EEE EEEEEEE
CC Coils
TM HMMTOP  XXXXXX-----
TM PROF (Rost) -----
TM PHOBIUS XXXXX-----+++++++
SP PREDISI
SP PHOBIUS
DO IUPRED
    
```

Anhang 5

- CqsS-hACII C2



Erläuterungen in Anhang 3

Anhang 5 (Fortsetzung)

```

                                     350
      |         |         |         |         |         |         |         |
VEFAFALVCKLDAINKHSFNDFKLRVGINHGPFVIAGVIGAKPKQYDIWGNITVNVASRMDSTGVLDKIQVTEETSLVLQTL
SS PSIPRED      HHHHHHHHHHHHHHHHHH      EEEEEEE EEEEE EEEEE HHHHHHHHHH      EEEE HHHHHHHH
SS JNET         HHHHHHHHHHHHHHHHHH      EEEEEEE EEEEE EEEEE HHHHHHHHHH      EEEE HHHHHHHH
SS Prof (Quali) HHHHHHHHHHHHHHHHHH      EEEEEEE EEEEEEE EEEEEEE HHHHHHHHHH      EEEE HHHHHHHH
SS Prof (Rost)  HHHHHHHHH HHHHHHHH      EEEEEEE EEEEEEE EEEEE HHHHHHHHHH      EEEEEHHHHHHH
CC Coils
TM HMMTOP      ++++++
TM PROF (Rost) -----
TM PHOBIUS     -----
SP PREDISI
SP PHOBIUS
DO IUPRED

```

```

      |         |         |         |         |
GYTCTCRGIINVKGGDLKTYFVNTEMSRSLSQSNVASLE
SS PSIPRED      EEEEE EEE EEEEE HHHHH HHH
SS JNET         HHHHHHHHHHH      EEEEE H H H
SS Prof (Quali) EEE EEEEE EEEEEEE H H
SS Prof (Rost)  EEEEEEEEEE EEEEEEE
CC Coils
TM HMMTOP      ++++++
TM PROF (Rost) -----
TM PHOBIUS     -----
SP PREDISI
SP PHOBIUS
DO IUPRED

```

SS = Alpha-Helix Beta-Sheet Secondary Structure
 CC = Coiled Coils
 TM = Transmembrane ('+'=outside, '-'=inside)
 DO = Disorder
 SP = Signal Peptide Cleavage Site

- PSIPRED D. T. Jones (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology* **292**, 195-202.
- JNET J. A. Cuff and G. J. Barton (1999) Application of enhanced multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins* **40**, 502-511.
- PROF M. Ouali and R. D. King (2000) Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein Science* **9**, 1162-1176.
- PROF B. Rost (2001) Protein secondary structure prediction continues to rise. *Journal of Structural Biology* **134**, 204-218.
- COILS A. N. Lupas, M. Van Dyke and J. Stock (1991) Predicting Coiled Coils from Protein Sequences. *Science* **252**, 1162-1164.
- HMMTOP G. E. Tusnady and I. Simon (1998) Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Applications to Topology Prediction. *Journal of Molecular Biology* **283**, 489-506.
- MEMSAT-SVM Timothy Nugent, David T. Jones (2009) Transmembrane protein topology prediction using support vector machines *BMC Bioinformatics* 2009
- PHOBIUS Lukas Kall, Anders Krogh and Erik L. L. Sonnhammer. A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *Journal of Molecular Biology* **338(5):1027-1036**, May 2004.
- PREDISI PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. Hiller K, Grote A, Scheer M, Munch R, Jahn D. *Nucleic Acids Res* **1;32, W375-9**, Jul 2004.
- DISOPRED2 J. J. Ward, J. S. Sodhi, L. J. McGuffin, B. F. Buxton and D. T. Jones (2004) Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *Journal of Molecular Biology* **337(3)**, 635-45.
- IUPRED Zsuzsanna Doszta, Veronika Csizmok, Peter Tompa and Istvan Simon (2005) The Pairwise Energy Content Estimated from Amino Acid Composition Discriminates between Folded and Intrinsically Unstructured Proteins *J. Mol. Biol.* **347**, 827-839.

Anhang 6

Rv1625c-C1

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFYDVWGDVAVTVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVA
DPGEVRGAEPRTAGV

Rv1625c-C2-A

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFYDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVA
ADPGEVRGAEPRTAGV

Rv1625c-C2-B

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGSSYMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFYDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVA
ADPGEVRGAEPRTAGV

RV-1

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFYDVWGDVAVTVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMVSGVPRPRPDHTQALADFALD
MTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVAVGVVGSRRFFYDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKD
DFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-2

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNFHNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLD
RLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGP
VVAGVVGSRRFFYDVWGDVAVTVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRK
VAADPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADK
YDEASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMVSGVPRPRPDHTQALADF
ALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVAVGVVGSRRFFYDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYER
LKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-3

DTARAEAVMEAEHDRSEALLASMLPASIAERLKEPERNFHNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLD
RLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGP
VVAGVVGSRRFFYDVWGDVAVTVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRK
VAADPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADK
YDEASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMVSGVPRPRPDHTQALADF
ALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVAVGVVGSRRFFYDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYER
LKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

Anhang 6 (Fortsetzung)

RV-4

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERIFHNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDR
LYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPV
VAGVVGSRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKV
AADPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKY
DEASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMMVSGVPRPRPDHTQALADFA
LDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERL
KDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-5

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERIFHNIIAERLKEPERNFHNIIADKYDEASVLFADIVGFTER
ASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPR
GNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVK
GKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASI
AERLKEPERNIIADKYDEASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMMVSGV
PRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRFFFDVWGDVAVNASRMESTD
SVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-6

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVEPEPGCGGERNAYLKEHSRTWYLIGR
KVAADPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIAD
KYDEASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMMVSGVPRPRPDHTQALAD
FALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYE
RLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-7

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMPPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALD
MTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKD
DFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-8

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMPPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALD
MTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKD
DFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-9

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMPPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMPPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALD
MTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKD
DFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

Anhang 6 (Fortsetzung)

RV-10

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAITVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASST**DVN**KAPADLVRFLDRLYSADFDELVDQHGLEKIKVSG**STY**MVSGVPRPRPDHTQALA
DFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVY
ERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-11

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAITVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFL**NELYS**DFDELVDQHGLEKIKVSG**STY**MVSGVPRPRPDHTQALADFALD
MTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKD
DFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-12

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAITVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASST**DVN**KAPADLVRFL**NELYS**DFDELVDQHGLEKIKVSG**STY**MVSGVPRPRPDHTQALA
DFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVY
ERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-13

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAITVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASST**DVN**KAP**AE**CVRFL**NELYS**DFDELVDQHGLEKIKVSG**STY**MVSGVPRPRPDHTQALA
DFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVY
ERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-14

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAITVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSADFDEL**SDQHFS**GLEKIKVSG**STY**MVSGVPRPRPDHTQALADF
ALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYER
LKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-15

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAITVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASST**DVN**KAPADLVRFLDRLYSADFDEL**SDQHFS**GLEKIKVSG**STY**MVSGVPRPRPDHTQ
ALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPD
EVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

Anhang 6 (Fortsetzung)

RV-16

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTDVNKAPADLVRFLNELYSDFDELVDQHFSGLEKIKVSGSTYMMVSGVPRPRPDHTQ
ALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPD
EVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADDPGEVRGAEPRTAGV

RV-17

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHKFSGLEKIKVSGSTYMMVSGVPRPRPDHTQALADF
ALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYER
LKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADDPGEVRGAEPRTAGV

RV-18

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHKFSGLEKIKVSGSTYMMVSGVPRPRPDHTQALADF
ALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYER
LKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADDPGEVRGAEPRTAGV

RV-19

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTDVNKAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHKFSGLEKIKVSGSTYMMVSGVPRPRPDHTQ
ALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPD
EVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADDPGEVRGAEPRTAGV

RV-20

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTDVNKAPADLVRFLNELYSDFDELVDQHKFSGLEKIKVSGSTYMMVSGVPRPRPDHTQ
ALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVAAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPD
EVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADDPGEVRGAEPRTAGV

RV-21

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALD
MTNVAAQLKDPSFNPVPLRVGLATGPVVAAGVVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKD
DFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADDPGEVRGAEPRTAGV

Anhang 6 (Fortsetzung)

RV-22

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMVSGVPRPRPDHTQALADFALD
MTNVAAQLKDHSFNPVPLRVGLATGPVAVGVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKD
DFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-23

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMVSGVPRPRPDHTQALADFALD
MTNVAAQLNDHSFNPVPLRVGLATGPVAVGVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKD
DFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-24

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTDVNKAPADLVRFLNELYSDFDELVDQHKFSGLEKIKVSGSTYMVSGVPRPRPDHTQ
ALADFALDMTNVAAQLKDHSFNPVPLRVGLATGPVAVGVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPD
EVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-25

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLY
SAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVVA
GVVGSRRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVA
DPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKYDE
ASVLFASIVGFTERASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGSTYMVSGVNDSTYDKVGKHTHTQALA
DFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPVAVGVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQVPDEVY
ERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-26

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNFHIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLD
RLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGP
VVAGVVGSRRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRK
VAADPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADK
YDEASVLFASIVGFTERASSTDVNKAPADLVRFLNELYSDFDELVDQHKFSGLEKIKVSGSTYMVSGVPRPRPD
HTQALADFALDMTNVAAQLKDPSFNPVPLRVGLATGPVAVGVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQ
VPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

RV-27

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERIFHIIADKYDEASVLFADIVGFTERASSTAPADLVRFLDR
LYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPRGNPVPLRVGLATGPV
VAGVVGSRRFFFDVWGDVAVTASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRK
AADPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLED*TARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERNIIADKY
DEASVLFASIVGFTERASSTDVNKAPADLVRFLNELYSDFDELVDQHKFSGLEKIKVSGSTYMVSGVPRPRPDH
TQALADFALDMTNVAAQLKDHSFNPVPLRVGLATGPVAVGVGSRRFFFDVWGDVAVNASRMESTDSVGQIQV
PDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIQRKVAADPGEVRGAEPRTAGV

Anhang 6 (Fortsetzung)

RV-28

DTARAEAVMEAEHDRSEALLANMLPASIAERLKEPERIFHNIAERLKEPERNFHNIIADKYDEASVLFADIVGFTER
ASSTAPADLVRFLDRLYSAFDELVDQHGLEKIKVSGDSYMMVVSGVPRPRPDHTQALADFALDMTNVAAQLKDPR
GNPVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFYDVGDAVTVASHMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDF**VEVEPGCGGER**
NAYLKEHSMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEPRTAGV *TRAAGGPPAAGGLE*DTARAEAVMEAEHDRSEALLANM
LPASIAERLKEPERNIIADKYDEASVLFASIVGFTERASST**DV**NKAPAE**EC**VRFL**NELYSDF**DELVDQ**PK**FHGLEKIKV
SG**ST**YMMVVSGV**NDSTYDKVGK**THHTQALADFALDMTNVAAQL**NDHS**FNPNVPLRVGLATGPVVAGVVGSRRFFYD
VWGDAVNVASRMESTDSVGQIQVPDEVYERLKDDFVLRERGHINVKGKGMRTWYLIGRKVAADPGEVRGAEP
RTAGV

Vollständige Sequenzen der getesteten Rv1625c-Untereinheiten einzeln oder als Linkerkonstrukte (RV-1 bis RV-28). Der Beginn der C-Helix ist in der jeweiligen Untereinheit unterstrichen. Alle enthaltenen Mutationen sind fett hervorgehoben. Der Linker zur Verknüpfung der Rv1625c-C1 und -C2 Untereinheiten ist kursiv dargestellt.

Anhang 7



Alignment von Sequenzen von 16 ACI und 19 ACII Isoformen unterschiedlicher Tierarten (ACI: Affe, Rind, Ente, Frosch, Goldhamster, Häher, Huhn, Mensch, Maus, Mull, Orca, Schimpanse, Schnäpper, tasmanischer Teufel, Walross, Wellensittich; ACII: Alligator, Bartfledermaus, Rind, Hund, Felsentaube, Halsbandschnäpper, Mensch, Krallenaaffe, Maus, Nashorn, Kaninchen, Ratte, Rhesusaffe, Schnabeltier, Spitzmaus, Stockente, Weißkehlammer, Wels, Wüstenmaus). In den Boxen befindet sich das „horizontale“ Alignment von 35 ACI und ACII Sequenzen. Darunter sind die „vertikalen“ Alignments der jeweiligen 16 ACI und 19 ACII Sequenzen dargestellt. Auffallend ist die Konservierung der katalytischen Domänen C1 und C2 in allen ACn, während die Transmembrandomänen nur in der jeweiligen AC-Isoform konserviert sind. Die Grautöne stellen den Grad der Konservierung dar (weiß = nicht konserviert, schwarz = stark konserviert). Darstellung von J. E. Schultz.

Anhang 8

Gsa : MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKTEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVNGFNGEGGEEDPQA: 79
Gia : MGCTLSA-----EDKAAVERSKMIDRNLEDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIEAGYSEEECKQYKAV: 72

Gsa : ARSNSDGEKATKVQDIKNNLKEAIETIVAAMSNLVPPVELANPENQFRVDYILSVMNVPDFDFPPEFYEHAKALWEDEG: 158
Gia : VYSNTI-----QSIIAIIR-----AMGRLKIDFGDSARADDARQLFVLGAAEEGEMTA-ELAGVIKRLWKDSG: 135

Gsa : VRACYERSNEYQLIDCAQYFLDKIDVTKQADYVPSDQDLLRCRVLTSGLFETKFFQVDKVNFEHMFDVGGQDERRKWIQC: 237
Gia : VQACFNRSREYQLNDSAAAYLNDLDRIAQPNYIPTQQDVLRTRVKTTGIVETHFTFKDLHEKMFVGGQRSERKKWIHC: 214

Gsa : FNDVTAIIFVVAASSYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVLGKSKIEDYFPEFA: 316
Gia : FEGVTAIIFCVALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLEDSICNNKWFTDTSIILFLNKDLEFEKIKKSPLTI-CY-PEYA: 291

Gsa : RYTTPE DATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVFNDCRDI IQRMHLRQYELL: 394
Gia : GSNTIYEEAAAYIQCFEDLNKRKDTKEI-----YTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDVVIKNNLKDCGLF: 354

Alignment der stimulierenden (G_{sa}) und der inhibierenden (G_{ia}) α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins des Menschen. Es besteht eine hohe Konservierung zwischen beiden Untereinheiten. Beide binden jedoch an unterschiedlichen Stellen der katalytischen Domänen der *Mammalia*-ACn. Die Graustufen zeigen den Grad der Konservierung an (weiß = nicht konserviert, schwarz = hoch konserviert).

7 Literaturverzeichnis

Adler, J. (1966). Chemotaxis in bacteria. *Science* 153, 708-716.

Adler, J. (1969). Chemoreceptors in bacteria. *Science* 166, 1588-1597.

Amin, D.N., Taylor, B.L., and Johnson, M.S. (2006). Topology and boundaries of the aerotaxis receptor Aer in the membrane of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 188, 894-901.

Aravind, L., and Ponting, C.P. (1999). The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS microbiology letters* 176, 111-116.

Baase, W.A., Liu, L., Tronrud, D.E., and Matthews, B.W. (2010). Lessons from the lysozyme of phage T4. *Protein science : a publication of the Protein Society* 19, 631-641.

Baker, D.A., and Kelly, J.M. (2004). Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Mol Microbiol* 52, 1229-1242.

Baumgartner, J.W., and Hazelbauer, G.L. (1996). Mutational analysis of a transmembrane segment in a bacterial chemoreceptor. *Journal of bacteriology* 178, 4651-4660.

Berrier, C., Park, K.H., Abes, S., Bibonne, A., Betton, J.M., and Ghazi, A. (2004). Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent. *Biochemistry* 43, 12585-12591.

Blain, K.Y., Kwiatkowski, W., and Choe, S. (2010). The functionally active Mistic-fused histidine kinase receptor, EnvZ. *Biochemistry* 49, 9089-9095.

Bogonez, E., and Koshland, D.E., Jr. (1985). Solubilization of a vectorial transmembrane receptor in functional form: aspartate receptor of chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4891-4895.

Bourret, R.B., Borkovich, K.A., and Simon, M.I. (1991). Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annual review of biochemistry* 60, 401-441.

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.

Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., *et al.* (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258-1265.

Coleman, D.E., and Sprang, S.R. (1996). How G proteins work: a continuing story. *Trends Biochem Sci* 21, 41-44.

Dessauer, C.W., and Gilman, A.G. (1996). Purification and characterization of a soluble form of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 271, 16967-16974.

Dessauer, C.W., Tesmer, J.J., Sprang, S.R., and Gilman, A.G. (1998). Identification of a G α binding site on type V adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 273, 25831-25839.

Diel, S., Klass, K., Wittig, B., and Kleuss, C. (2006). Gbetagamma activation site in adenylyl cyclase type II. Adenylyl cyclase type III is inhibited by Gbetagamma. *J Biol Chem* 281, 288-294.

- Drew, D., Lerch, M., Kunji, E., Slotboom, D.J., and de Gier, J.W. (2006). Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nat Methods* 3, 303-313.
- Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., and Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif* 37, 203-206.
- Engel, C.K., Chen, L., and Prive, G.G. (2002). Stability of the lactose permease in detergent solutions. *Biochimica et biophysica acta* 1564, 47-56.
- Falke, J.J., Bass, R.B., Butler, S.L., Chervitz, S.A., and Danielson, M.A. (1997). The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annual review of cell and developmental biology* 13, 457-512.
- Falke, J.J., and Hazelbauer, G.L. (2001). Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem Sci* 26, 257-265.
- Francis, S.H., Turko, I.V., and Corbin, J.D. (2001). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 65, 1-52.
- Guo, Y.L., Kurz, U., Schultz, A., Linder, J.U., Dittrich, D., Keller, C., Ehlers, S., Sander, P., and Schultz, J.E. (2005). Interaction of Rv1625c, a mycobacterial class IIIa adenylyl cyclase, with a mammalian congener. *Mol Microbiol* 57, 667-677.
- Guo, Y.L., Seebacher, T., Kurz, U., Linder, J.U., and Schultz, J.E. (2001). Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases. *EMBO J* 20, 3667-3675.
- Hammer, A. (2004). Klonierung und Charakterisierung von fünf Adenylatcyclasen aus *Stigmatella aurantiaca* und *Mycobakterium tuberculosis* (Eberhard Karls Universität Tübingen)
- Hatley, M.E., Benton, B.K., Xu, J., Manfredi, J.P., Gilman, A.G., and Sunahara, R.K. (2000). Isolation and characterization of constitutively active mutants of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 275, 38626-38632.
- Hazelbauer, G.L., Falke, J.J., and Parkinson, J.S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci* 33, 9-19.
- Henke, J.M., and Bassler, B.L. (2004). Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology* 186, 6902-6914.
- Hoffmann, T.R. (1999). Membranständige Guanylatcyclasen aus *Paramecium* und *Tetrahymena*: Klonierung und bakterielle Expression der katalytischen Bereiche (Tübingen: Eberhard Karls Universität Tübingen)
- Hovijitra, N.T., Wu, J.J., Peaker, B., and Swartz, J.R. (2009). Cell-free synthesis of functional aquaporin Z in synthetic liposomes. *Biotechnology and bioengineering* 104, 40-49.
- Hu, S., Wang, M., Cai, G., and He, M. (2013). Genetic code-guided protein synthesis and folding in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 288, 30855-30861.
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J.U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J.E., Lupas, A.N., and Coles, M. (2006). The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* 126, 929-940.

- Jaakola, V.P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y., Lane, J.R., Ijzerman, A.P., and Stevens, R.C. (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322, 1211-1217.
- Kanchan, K. (2011). Transmembrane Signaling in Chimeras of the *E. coli* Chemotaxis Receptors and Bacterial Class III Adenylyl Cyclases (Eberhard Karls Universität Tübingen)
- Kanchan, K., Linder, J., Winkler, K., Hantke, K., Schultz, A., and Schultz, J.E. (2010). Transmembrane signaling in chimeras of the *Escherichia coli* aspartate and serine chemotaxis receptors and bacterial class III adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 285, 2090-2099.
- Kapust, R.B., and Waugh, D.S. (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein science : a publication of the Protein Society* 8, 1668-1674.
- Klammt, C., Schwarz, D., Fendler, K., Haase, W., Dotsch, V., and Bernhard, F. (2005). Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS J* 272, 6024-6038.
- Klapper, M.H. (1971). On the nature of the protein interior. *Biochimica et biophysica acta* 229, 557-566.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leviatan, S., Sawada, K., Moriyama, Y., and Nelson, N. (2010). Combinatorial method for overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 285, 23548-23556.
- Li, M., and Hazelbauer, G.L. (2004). Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex. *Journal of bacteriology* 186, 3687-3694.
- Linder, J.U. (2005). Substrate selection by class III adenylyl cyclases and guanylyl cyclases. *IUBMB life* 57, 797-803.
- Linder, J.U. (2006). Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell Mol Life Sci* 63, 1736-1751.
- Linder, J.U., Castro, L.I., Guo, Y.L., and Schultz, J.E. (2004a). Functional chimeras between the catalytic domains of the mycobacterial adenylyl cyclase Rv1625c and a *Paramecium* guanylyl cyclase. *FEBS letters* 568, 151-154.
- Linder, J.U., Hammer, A., and Schultz, J.E. (2004b). The effect of HAMP domains on class IIIb adenylyl cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Biochem* 271, 2446-2451.
- Linder, J.U., and Schultz, J.E. (2003). The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cellular signalling* 15, 1081-1089.
- Linder, J.U., and Schultz, J.E. (2008). Versatility of signal transduction encoded in dimeric adenylyl cyclases. *Current opinion in structural biology* 18, 667-672.
- Linton, M.F., Raabe, M., Pierotti, V., and Young, S.G. (1997). Reading-frame restoration by transcriptional slippage at long stretches of adenine residues in mammalian cells. *J Biol Chem* 272, 14127-14132.
- Lowrie, D.B., Jackett, P.S., and Ratcliffe, N.A. (1975). *Mycobacterium microti* may protect itself from intracellular destruction by releasing cyclic AMP into phagosomes. *Nature* 254, 600-602.
- Lupas, A.N., and Gruber, M. (2005). The structure of alpha-helical coiled coils. *Advances in protein chemistry* 70, 37-78.

- Martin, G.A., Kawaguchi, R., Lam, Y., DeGiovanni, A., Fukushima, M., and Mutter, W. (2001). High-yield, in vitro protein expression using a continuous-exchange, coupled transcription/ translation system. *BioTechniques* 31, 948-950, 952-943.
- Matthews, B.W., Remington, S.J., Grutter, M.G., and Anderson, W.F. (1981). Relation between hen egg white lysozyme and bacteriophage T4 lysozyme: evolutionary implications. *Journal of molecular biology* 147, 545-558.
- Miller, M.B., Skorupski, K., Lenz, D.H., Taylor, R.K., and Bassler, B.L. (2002). Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* 110, 303-314.
- Miroux, B., and Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of molecular biology* 260, 289-298.
- Mondejar, L.G., Lupas, A., Schultz, A., and Schultz, J.E. (2012). HAMP domain-mediated signal transduction probed with a mycobacterial adenylyl cyclase as a reporter. *J Biol Chem* 287, 1022-1031.
- Muller-Lucks, A., Bock, S., Wu, B., and Beitz, E. (2012). Fluorescent in situ folding control for rapid optimization of cell-free membrane protein synthesis. *PLoS One* 7, e42186.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, 263-273.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.
- Ng, W.L., Wei, Y., Perez, L.J., Cong, J., Long, T., Koch, M., Semmelhack, M.F., Wingreen, N.S., and Bassler, B.L. (2010). Probing bacterial transmembrane histidine kinase receptor-ligand interactions with natural and synthetic molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5575-5580.
- Oosawa, K., and Simon, M. (1986). Analysis of mutations in the transmembrane region of the aspartate chemoreceptor in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6930-6934.
- Perez, L.J., Ng, W.L., Marano, P., Brook, K., Bassler, B.L., and Semmelhack, M.F. (2012). Role of the CAI-1 fatty acid tail in the *Vibrio cholerae* quorum sensing response. *Journal of medicinal chemistry* 55, 9669-9681.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V.G., Chen, G., and Deber, C.M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1760-1765.
- Roosild, T.P., Greenwald, J., Vega, M., Castronovo, S., Riek, R., and Choe, S. (2005). NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression. *Science* 307, 1317-1321.
- Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Yao, X.J., Weis, W.I., Stevens, R.C., *et al.* (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318, 1266-1273.
- Rutherford, S.T., and Bassler, B.L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2.

- Salomon, Y., Londos, C., and Rodbell, M. (1974). A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal Biochem* 58, 541-548.
- Scholich, K., Barbier, A.J., Mullenix, J.B., and Patel, T.B. (1997). Characterization of soluble forms of nonchimeric type V adenylyl cyclases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2915-2920.
- Schultz, J.E., and Natarajan, J. (2013). Regulated unfolding: a basic principle of intraprotein signaling in modular proteins. *Trends Biochem Sci* 38, 538-545.
- Schultz, J.E., and Schmidt, B.H. (1987). Treatment of rats with thyrotropin (TSH) reduces the adrenoceptor sensitivity of adenylate cyclase from cerebral cortex. *Neurochemistry international* 10, 173-178.
- Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frolich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dotsch, V., and Bernhard, F. (2007a). Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat Protoc* 2, 2945-2957.
- Schwarz, D., Klammt, C., Koglin, A., Lohr, F., Schneider, B., Dotsch, V., and Bernhard, F. (2007b). Preparative scale cell-free expression systems: new tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods* 41, 355-369.
- Seebacher, T., Linder, J.U., and Schultz, J.E. (2001). An isoform-specific interaction of the membrane anchors affects mammalian adenylyl cyclase type V activity. *Eur J Biochem* 268, 105-110.
- Shenoy, A.R., and Visweswariah, S.S. (2006a). Mycobacterial adenylyl cyclases: biochemical diversity and structural plasticity. *FEBS letters* 580, 3344-3352.
- Shenoy, A.R., and Visweswariah, S.S. (2006b). New messages from old messengers: cAMP and mycobacteria. *Trends in microbiology* 14, 543-550.
- Shikuma, N.J., Fong, J.C., Odell, L.S., Perchuk, B.S., Laub, M.T., and Yildiz, F.H. (2009). Overexpression of VpsS, a hybrid sensor kinase, enhances biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology* 191, 5147-5158.
- Shoichet, B.K., Baase, W.A., Kuroki, R., and Matthews, B.W. (1995). A relationship between protein stability and protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 452-456.
- Sinha, S.C., and Sprang, S.R. (2006). Structures, mechanism, regulation and evolution of class III nucleotidyl cyclases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 157, 105-140.
- Tajima, H., Imada, K., Sakuma, M., Hattori, F., Nara, T., Kamo, N., Homma, M., and Kawagishi, I. (2011). Ligand specificity determined by differentially arranged common ligand-binding residues in bacterial amino acid chemoreceptors Tsr and Tar. *J Biol Chem* 286, 42200-42210.
- Tang, W.J., and Gilman, A.G. (1995). Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs alpha and forskolin. *Science* 268, 1769-1772.
- Tatsuno, I., Lee, L., Kawagishi, I., Homma, M., and Imae, Y. (1994). Transmembrane signalling by the chimeric chemosensory receptors of *Escherichia coli* Tsr and Tar with heterologous membrane-spanning regions. *Mol Microbiol* 14, 755-762.
- Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsalpha.GTPgammaS. *Science* 278, 1907-1916.
- Tews, I., Findeisen, F., Sinning, I., Schultz, A., Schultz, J.E., and Linder, J.U. (2005). The structure of a pH-sensing mycobacterial adenylyl cyclase holoenzyme. *Science* 308, 1020-1023.

- Towbin, H., Staehelin, T., and 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.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* 67, 509-544.
- Uhlen, M., Forsberg, G., Moks, T., Hartmanis, M., and Nilsson, B. (1992). Fusion proteins in biotechnology. *Current opinion in biotechnology* 3, 363-369.
- Umemura, T., Tatsuno, I., Shibasaki, M., Homma, M., and Kawagishi, I. (1998). Intersubunit interaction between transmembrane helices of the bacterial aspartate chemoreceptor homodimer. *J Biol Chem* 273, 30110-30115.
- Wei, Y., Ng, W.L., Cong, J., and Bassler, B.L. (2012). Ligand and antagonist driven regulation of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing receptor CqsS. *Mol Microbiol* 83, 1095-1108.
- Weitmann, S., Schultz, G., and Kleuss, C. (2001). Adenylyl cyclase type II domains involved in Gbetagamma stimulation. *Biochemistry* 40, 10853-10858.
- Whisnant, R.E., Gilman, A.G., and Dessauer, C.W. (1996). Interaction of the two cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6621-6625.
- Winkler, K., Schultz, A., and Schultz, J.E. (2012). The S-helix determines the signal in a Tsr receptor/adenylyl cyclase reporter. *J Biol Chem* 287, 15479-15488.
- Yaku, H., and Mizuno, T. (1997). The membrane-located osmosensory kinase, EnvZ, that contains a leucine zipper-like motif functions as a dimer in *Escherichia coli*. *FEBS letters* 417, 409-413.
- Yan, S.Z., Hahn, D., Huang, Z.H., and 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.
- Yan, S.Z., Huang, Z.H., Andrews, R.K., and Tang, W.J. (1998). Conversion of forskolin-insensitive to forskolin-sensitive (mouse-type IX) adenylyl cyclase. *Molecular pharmacology* 53, 182-187.
- Yan, S.Z., Huang, Z.H., Rao, V.D., Hurley, J.H., and Tang, W.J. (1997). Three discrete regions of mammalian adenylyl cyclase form a site for Gsalpha activation. *J Biol Chem* 272, 18849-18854.
- Zimmermann, G., Zhou, D., and Taussig, R. (1998). Genetic selection of mammalian adenylyl cyclases insensitive to stimulation by Gsalpha. *J Biol Chem* 273, 6968-6975.