

Charakterisierung der Hybridsensorkinase LuxN
und des Antwortregulators LuxO des
Quorum sensing-Systems
in *Vibrio harveyi*

Dissertation

der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Tina Odenbach

aus Landau in der Pfalz

München, den 25. September 2008



Promotionsgesuch eingereicht am 25. September 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 17. März 2009

1. Gutachter

Professor Dr. Kirsten Jung

Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie,
Ludwig-Maximilians-Universität
München

2. Gutachter

Professor Dr. Anton Hartmann

Abteilung Mikrogen-Pflanzen-Interaktionen,
Helmholtz Zentrum München

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
NOMENKLATUR.....	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Quorum sensing: Zell-Zell-Kommunikation bei Bakterien.....	1
1.2 Phosphorelay-Systeme	4
1.3 Das Quorum sensing-System in <i>V. harveyi</i>	7
1.3.1 Das Zusammenspiel der drei Hybridsensorkinasen	10
1.3.2 Die HAI-1 abhängige Hybridsensorkinase LuxN.....	10
1.3.3 Die AI-2 abhängige Hybridsensorkinase LuxQ.....	11
1.3.4 Die CAI-1 abhängige Hybridsensorkinase CqsS.....	13
1.3.5 Das Phosphorelay-Protein (HPT) LuxU	13
1.3.6 Der σ^{54} -abhängige Antwortregulator LuxO	14
1.4 Aufgabenstellung.....	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Verwendete Materialien	18
2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	21
2.2.1 Verwendete Stämme	21
2.2.2 Plasmide	22
2.2.3 Verwendete Oligonukleotide.....	25
2.3 Kultivierung.....	28
2.4 Molekularbiologische Methoden	28
2.4.1 Plasmidisolierung	28
2.4.2 Isolierung von genomischer DNA	29
2.4.3 Modifikation von DNA	29
2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	29
2.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	29
2.4.6 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	30
2.4.7 DNA-Sequenzanalyse	30
2.4.8 Markierung von DNA	30
2.4.9 Präparation kompetenter Zellen und Transformation	31
2.4.10 Komplementation von <i>E. coli</i> MM39 und <i>V. harveyi</i> BB170	32
2.4.10.1 Komplementation von <i>E. coli</i> MM39	32
2.4.10.2 Komplementation von <i>V. harveyi</i> BB170 via <i>Triparental Mating</i> mit anschließendem Biolumineszenz-Assay.....	32

2.4.11	Konstruktion der Plasmide	34
2.5	Biochemische und analytische Methoden	36
2.5.1	Proteinbestimmung	36
2.5.2	SDS-Page nach Laemmli (1970)	36
2.5.3	Western-Immunoblot	37
2.5.4	Quantitativer Western-Blot	38
2.5.5	Präparation von Zellfraktionen zur Gewinnung der Lux-Proteine	38
2.5.6	Präparation von Periplasma	39
2.5.7	Präparation von Sphäroplasten und Proteolyse mit Trypsin	40
2.5.8	Reinigung von LuxU mittels Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	41
2.5.9	Solubilisierung, Reinigung und Renaturierung von LuxO	41
2.5.10	Solubilisierung und Reinigung von LuxN mittels Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	43
2.5.11	Rekonstitution von LuxN	43
2.5.12	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung der Lux-Proteine	44
2.5.12.1	Bestimmung der Kinaseaktivität	45
2.5.12.2	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung mit [γ - ³² P]-Acetylphosphat	45
2.5.13	DNA-Bindeexperimente	46
2.5.14	Bestimmung der β -Galaktosidase- und Alkalische Phosphatase Reporter-Gen-Aktivitäten	47
2.5.15	Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie	48
2.5.16	Trübungsmessung der Solubilisierung von <i>V. harveyi</i> BB120-Phospholipiden	49
2.6	Biophysikalische Methoden	50
2.6.1	Circular dichroismus-Analyse von LuxO	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	Untersuchungen zur Topologie von LuxN mittels Reporter-Genfusionen	51
3.2	Untersuchung der Lokalisation des N-Terminus mit dem Maltosebindeprotein	56
3.2.2	<i>malE</i> -Komplementation von <i>E. coli</i> MM39	57
3.2.3	Autokinase- und Phosphotransferaseaktivität der MBP-LuxN-Hybridproteine	58
3.2.4	Zugänglichkeitsstudien an den MBP-LuxN-Hybridproteinen	60
3.3	Versuche zur Identifizierung der HAI-1-Bindestelle in LuxN	62
3.3.2	Untersuchung der potentiellen Bindestelle L166 in LuxN	62
3.3.3	Identifizierung der HAI-1-Bindestelle anhand weiterer Aminosäuren	64
3.3.3.1	Untersuchung der Aminosäuren Y66, D70 und P73 in einem Dreifachaustausch	67
3.3.3.2	Untersuchung weiterer Aminosäuren in LuxN bezüglich HAI-1-Bindung	69
3.3.4	Komplementation von <i>V. harveyi</i> BB170	72
3.4	Reinigung und Rekonstitution von LuxN	72
3.4.1	Reinigung und Rekonstitution von LuxN	73
3.4.2	Lipidanalyse von <i>V. harveyi</i> BB120 und <i>E. coli</i> MG1655	74
3.4.2.1	Rekonstitution von LuxN mit <i>V. harveyi</i> -Phospholipiden	76
3.4.2	Reinigung von LuxN mit Lysophosphatidylethanolamin	78
3.5	Der Antwortregulator LuxO	80
3.5.1	Optimierungsexperimente zur Löslichkeit von LuxO	80
3.5.2	Reinigung und Renaturierung von LuxO aus <i>Inclusion Bodies</i>	82

3.5.2.1	Strukturaufklärung des renaturierten LuxO mittels Circular dichroismus-Analyse	84
3.5.2.2	Renaturierung von LuxO mit verschiedenen Additiven.....	88
3.5.3	Markierung von LuxO mit [γ - 32 P]-Acetylphosphat	89
3.5.4	DNA-Bindungsexperiment mit LuxO <i>in vitro</i>	91
4	DISKUSSION	94
4.1	Die Hybridsensorkinase LuxN	95
4.1.1	Aufklärung der Membrantopologie von LuxN mit Bestimmung der Lokalisation des N-Terminus	95
4.1.2	Identifizierung der HAI-1-Bindestelle in LuxN	100
4.1.3	Reinigung und Rekonstitution von LuxN.....	105
4.2	Der Antwortregulator LuxO	108
4.2.1	Optimierungsexperimente zur Löslichkeit von LuxO	108
4.2.2	Reinigung und Renaturierung von LuxO aus <i>Inclusion Bodies</i>	109
4.2.3	Untersuchung der enzymatischen Aktivität und DNA-Bindefähigkeit des renaturierten LuxO	110
4.3	Ausblick	113
5	ZUSAMMENFASSUNG	115
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	118

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A_x	Absorption der Wellenlänge x nm
AAA ⁺ -ATPase	<i>ATPase associated with diverse cellular activity</i>
Abb.	Abbildung
AB-MM	AB-Minimalmedium
ACP	Acetylphosphat
AHL	Acylhomoserinlacton
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAI-1	<i>cholerae</i> Autoinduktor-1
Ci	Curie
CM	Cytoplasmamembran
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CP	Cytoplasma
C-terminal	carboxylterminal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat

Abkürzung	Bedeutung
DTT	Dithiothreitol
E _x	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
EDTA	Ethylendiamintriacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
ε	Extinktionskoeffizient
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
BG	β-Galaktosidase
h	Stunden
HAI-1	<i>harveyi</i> Autoinduktor-1
HisKA	Histidin-KinaseA-Domäne
HK	Histidinkinase
HPt-Protein/-Domäne	Histidinphosphotransferprotein/-Domäne
HSL	Acylhomoserinlacton
HTH	Helix-turn-Helix
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kDa	Kilodalton
KÜ	zellfreier Kulturüberstand
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LDAO	Lauryldimethylaminoxid
LM	Luria-Marine-Medium
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
LSP	<i>Low Speed Pellet</i> (Pellet der niedertourigen Zentrifugation)
M	Molar (Mol pro Liter)
m	milli- bzw. Meter

Abkürzung	Bedeutung
MBP, MalE	Maltosebindeprotein
MBP _c , MBP _p	MBP im Cytoplasma, MBP im Periplasma
μ	mikro-
min	Minute(n)
MOPS	<i>N</i> -Morpholinopropansulfonat
MV	Membranvesikel
n	nano-
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
NTA	Triazetonitril
N-terminal	aminoterminal
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
oNPG	o-Nitrophenylgalaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG-Maleimid	o-(2-Maleimidoethyl)-o'-methyl-polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PP	Periplasma
REC	Empfängerdomäne eines Antwortregulators
RLU	<i>relative light unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RR	Antwortregulator
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Str ^R	Streptomycin-Resistenz

Abkürzung	Bedeutung
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TG	Tris/HCl-Glycerol
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	<i>Unit</i>
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
Vgl.	Vergleich, vergleiche
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

Nomenklatur

Genprodukte der *lux*-Gene werden so beziffert, dass das erste Methionin im Wildtypprotein in der Aminosäuresequenz mit „1“ bezeichnet wird. Positionen werden als Zahlen hinter der jeweiligen Aminosäure aufgeführt. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben.

LuxN, LuxU und LuxO besitzen C- bzw. N-terminale Histidin-Tags, die durch eine *linker*-Sequenz mit dem Protein verbunden sind. Das Vorhandensein des Histidin-Tags wird nicht explizit in der Proteinbezeichnung aufgeführt.

Substitutionen im Genprodukt werden so bezeichnet, dass die native Aminosäure im Ein-Buchstaben-Code gefolgt von der Position im Protein benannt wird. Die Substitution an der benannten Position folgt dann ebenfalls im Einbuchstabencode.

1 Einleitung

1.1 Quorum sensing: Zell-Zell-Kommunikation bei Bakterien

Was dem einzelnen nicht möglich ist, das vermögen viele.

Friedrich Wilhelm Raiffeisen, (1818 - 1888), deutscher Sozialreformer, Gründer der Raiffeisengenossenschaft

Die Forschung über die Zell-Zell-Kommunikation bei Bakterien begann mit Studien zur Zelldichte-abhängigen Expression der Biolumineszenz des marinen Bakteriums *Vibrio fischeri* und der verwandten Spezies *Vibrio harveyi* (Nealson und Hastings, 1979; Nealson *et al.*, 1970). Beide gehören zu den Gram-negativen γ -Proteobakterien und sind fakultativ anaerobe, gekrümmte Stäbchen mit polar angeordneten Geißeln. *V. fischeri* lebt entweder frei oder symbiotisch in den Leuchtorganen (10^{10} Zellen/ml) von diversen Fischen und Tintenfischen; *V. harveyi* hingegen ist ein frei lebender Organismus. Die Symbiose ermöglicht dem Fisch durch das leuchtende Organ die Beutejagd und Vertreibung von Feinden. Die Bakterien wiederum erhalten in den Leuchtorganen eine schützende Nische mit einer ausreichenden Nährstoff- und Sauerstoffversorgung (Nealson und Hastings, 1979; Ruby, 1996).

Nealson *et al.* fanden im Jahr 1970 heraus, dass *V. fischeri* einen extrazellulären Faktor produziert (Autoinduktor; Signalmolekül), der für die Produktion des Lichtproduzierenden Enzyms Luciferase zuständig ist. Der Autoinduktor wurde später als *N*-3-Oxohexanoyl-Homoserinlacton identifiziert (Eberhard *et al.*, 1981). *N*-Acylhomoserinlactone (HSL oder AHL) (Abb. 1.3A) werden nur von Gram-negativen Proteobakterien als Signalmoleküle verwendet. Sie bestehen aus einem konservierten Homoserinlacton-Ring, der durch eine Peptidbindung mit einer variablen Acylkette verbunden ist. Die Acylkette ist aus 4 - 18 Kohlenstoffatomen aufgebaut, wobei die dritte Position durch eine Carbonyl- oder Hydroxylgruppe modifiziert sein kann. Die unterschiedlichen Acylketten gewährleisten, dass die verschiedenen AHL-Moleküle von

unterschiedlichen LuxR-Proteinen erkannt werden können (Reading und Sperandio, 2006).

Die Leuchtreaktion (Biolumineszenz, *Lux*) wird in den Bakterien durch das LuxI-LuxR-System reguliert. LuxI fungiert als Synthase und synthetisiert den Autoinduktor, der sekretiert und resorbiert wird. Sobald bei einer bestimmten Zelldichte ein Autoinduktor-Schwellenwert erreicht wird, beginnen die Bakterien kollektiv mit der Regulation von Genen Zelldichte-abhängiger Prozesse. Der Transkriptionsaktivator LuxR bindet den Autoinduktor in der Zelle und reguliert die Transkription der Gene *luxCDABE* für den Luciferase-Enzym-Komplex (Engebrecht *et al.*, 1983; Engebrecht und Silverman, 1987; Engebrecht und Silverman, 1984). Dieser „Kommunikationsprozess“ der Zellen untereinander wird als „Quorum sensing“ bezeichnet. Der Begriff leitet sich ab vom lateinischen Wort „quorum“ (Mindestanzahl von Mitgliedern in einem Gremium, die für einen Beschluss benötigt werden) und dem englischen Wort „sensing“ (wahrnehmen) (Fuqua *et al.*, 1994). Die Frage, warum Bakterien miteinander kommunizieren, kann mit den Umweltveränderungen beantwortet werden, auf die sich Bakterien schnell einstellen können müssen. So sind sie z. B. ständig wechselnden Nährstoffangeboten, konkurrierenden Mikroorganismen und Virulenzfaktoren von Pflanzen ausgesetzt. Zu den Prozessen, die durch Quorum sensing reguliert werden, zählen daher u. a. die Biolumineszenz, Sekretion von Virulenzfaktoren, Produktion von Antibiotika, Sporulation und Konjugation. Diese Prozesse sind erst effektiv, wenn sie von mehreren Bakterien als so genannter „multizellulärer Organismus“ ausgeführt werden (de Kievit und Iglewski, 2000; Fuqua *et al.*, 1996; Fuqua *et al.*, 1994; Miller und Bassler, 2001). Acylhomoserinlacton-abhängiges Quorum sensing wurde mittlerweile bei ca. 70 Spezies Gram-negativer Bakterien nachgewiesen (Stabb *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu den Gram-negativen Bakterien synthetisieren die Gram-positiven Bakterien Oligopeptide und Furanosylboratdiester als Signalmoleküle. Die Oligopeptide werden vor ihrem Transport aus der Zelle posttranslational modifiziert, indem sie in kleinere Peptide gespalten werden. Während AHL-Moleküle frei über die Membran diffundieren (Kaplan und Greenberg, 1985), erfolgt der Transport der Peptide über einen ABC-Transporter. Ab einem gewissen Schwellenwert werden die extrazellulären

Moleküle (Pheromone) von membranständigen Histidinkinasen (HK) gebunden, wodurch ein Phosphotransfer zum cytoplasmatischen Antwortregulator (*response regulator*, RR) initiiert wird (Zwei-Komponenten-System) (Bassler, 1999; Kleerebezem *et al.*, 1997; Reading und Sperandio, 2006). Prozesse, die bei Gram-positiven Bakterien durch Quorum sensing reguliert werden, sind u. a. Kompetenz zur DNA-Aufnahme bei *Bacillus subtilis* und *Streptococcus pneumoniae*, Virulenz in *Staphylococcus aureus*, Konjugation in *Enterococcus faecalis*, oder die Bildung antimikrobieller Peptide in Milchsäurebakterien (Bassler, 1999; Kleerebezem *et al.*, 1997). Der Furanosylboratdiester AI-2 wird ebenfalls von Gram-negativen Bakterien synthetisiert und kommt in über 40 Gram-negativen und Gram-positiven Bakterienspezies vor (Mok *et al.*, 2003). AI-2 entsteht aus dem beim Abbau von *S*-Adenosyl-Methionin (SAM) im aktivierten Methylzyklus entstandenen toxischen Zwischenprodukt *S*-Adenosyl-Homocystein (SAH), das in einem von zwei bekannten Abbauwegen durch das Enzym Pfs in *S*-Ribosyl-Homocystein (SRH) umgewandelt wird. Das Enzym LuxS ermöglicht daraus die Synthese der Vorstufe Pro-AI-2, aus der sich spontan durch Anlagerung von Bor das Molekül AI-2 bildet (Chen *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2007; Xavier und Bassler, 2003).

Weitere bekannte Quorum sensing-Signalmoleküle sind die 2-Alkyl-4-Quinolone (AHQ), die u. a. in *Pseudomonas aeruginosa* für die Regulation von Virulenzgenen zuständig sind (Diggle *et al.*, 2007; Dubern und Diggle, 2008), und die kürzlich identifizierten *p*-Coumaroyl-Homoserinlactone (*p*-Coumaroyl-HSL) aus dem photosynthetischen Bakterium *Rhodospseudomonas palustris*, die möglicherweise eine Interaktion zwischen *p*-Coumaroyl-HSL-produzierenden Bakterien und spezifischen *p*-Coumarat-produzierenden Pflanzen ermöglichen (Schaefer *et al.*, 2008).

Bei einigen Bakterien werden die Informationen über die Zelldichte über eine Mischung aus den in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien bekannten Signaltransduktionswegen weitergeleitet. Ein Beispiel hierfür ist *V. harveyi*, bei dem die Autoinduktoren durch membranständige Histidinkinasen wahrgenommen werden und die Information über eine aus mehreren Domänen bestehende Phosphorylierungskaskade zum Antwortregulator geleitet wird. Ein solcher Phosphotransferweg wird als Phosphorelay-System bezeichnet.

1.2 Phosphorelay-Systeme

Phosphorelay-Systeme unterscheiden sich wesentlich vom „klassischen“ Zwei-Komponenten-System der Gram-positiven Bakterien. Bei letzterem findet die Autoinduktorwahrnehmung als auch die Weiterleitung der Phosphorylgruppe über einen einstufigen Phosphotransfer (His \rightarrow Asp) im Cytoplasma statt. Durch die Autokinaseaktivität der Histidinkinase wird ATP hydrolysiert und dessen γ -Phosphorylgruppe auf den konservierten Histidinrest der Histidinkinase übertragen. Dabei entsteht eine energiereiche Phosphoramidat-Bindung (His~P). Anschließend katalysiert der Antwortregulator den Transfer der Phosphorylgruppe vom His~P auf den Aspartatrest der eigenen regulatorischen Domäne, wodurch eine energiereiche Acylphosphat-Verbindung gebildet wird (Asp~P). Für die Reaktionen werden bivalente Metallionen, wie z. B. Mg^{2+} , benötigt. Typische Beispiele für das Zwei-Komponenten-System sind das EnvZ/OmpR-System, das die Osmoregulation in *Escherichia coli* kontrolliert (Perraud *et al.*, 1999; Stock *et al.*, 2000), und das KdpD/KdpE-System in *E. coli*, das die Expression des *kdpFABC*-Operons reguliert, welches für das hochaffine K^+ -Aufnahmesystem KdpFABC codiert (Heermann *et al.*, 2003) (Abb. 1.1A).

Beim Phosphorelay-System dagegen wird die Phosphorylgruppe im Gegensatz zum Zwei-Komponenten-System über mehrere Histidin- und Aspartatreste (His \rightarrow Asp \rightarrow His \rightarrow Asp), sowie über zusätzliche Rezeptor- und HPt-Domänen (Histidin Phosphotransfer) übertragen. Die Signaldomänen sind entweder isolierte Proteine oder unterschiedlich miteinander fusioniert (Perraud *et al.*, 1999; Stock *et al.*, 2000), woraus wiederum unterschiedlich aufgebaute Hybridsensorkinasen resultieren. Die HPt-Domäne hat keine Kinase- und Phosphataseaktivität (Tsuzuki *et al.*, 1995). Ein Beispiel für ein Phosphorelay-System, bei dem alle Signaldomänen auf einzelne voneinander unabhängige Proteine verteilt sind, ist das die Sporulation kontrollierende System in *Bacillus subtilis* (KinA/KinB-Spo0F-Spo0B-Spo0A) (Abb. 1.1B) (Burbulys *et al.*, 1991).

Bei dem osmoregulatorischen System von *S. cerevisiae* (Sln1p-Ypd1p-Ssk1p) ist die Histidinkinase Sln1p mit einer Antwortregulatordomäne fusioniert (Hybridsensorkinase), wodurch ein intramolekularer Phosphotransfer vom His zum Asp stattfindet. Die HPt-

Domäne (Ypd1p) und der nachfolgende Antwortregulator (Ssk1p) sind isolierte Proteine (Abb. 1.1C) (Posas *et al.*, 1996).

Das BvgS/BvgA-Zwei-Komponenten-System von *Bordetella pertussis* ist ebenfalls ein Beispiel für Histidinkinasen mit mehreren Domänen. So besteht die Histidinkinase BvgS aus einer Transmitter- und einer Rezeptordomäne, sowie einer HPt-Domäne. Gleiches findet man in *E. coli* bei den Systemen EvgS/EvgA (Abb. 1.1D) (Perraud *et al.*, 1998; Tsuzuki *et al.*, 1995; Uhl und Miller, 1996).

Beim LuxN/LuxQ/CqsS-LuxU-LuxO-System in *V. harveyi* bestehen die Hybridsensorkinasen LuxN, LuxQ und CqsS aus einer His- und einer Asp-Domäne, wodurch zunächst ein intramolekularer Phosphotransfer stattfindet (Henke und Bassler, 2004). Das HPt-Protein (LuxU) ist, wie der nachfolgende Antwortregulator (LuxO), ein isoliertes Protein (Abb. 1.1E) (Freeman und Bassler, 1999a; Freeman und Bassler, 1999b). Das Lux-System von *V. harveyi* wird in Kapitel 1.3 näher erläutert.

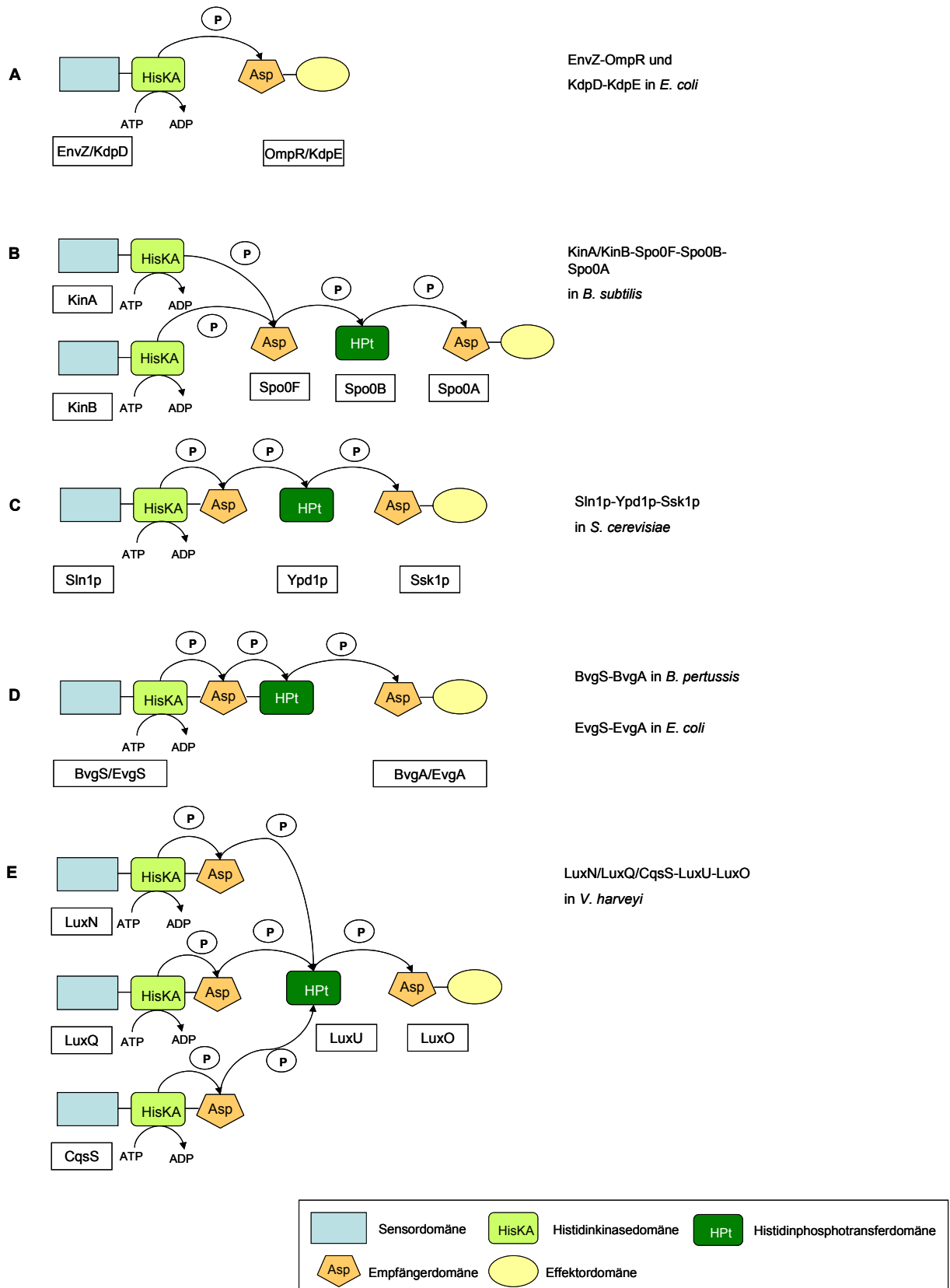


Abb. 1.1: Zwei-Komponenten- und Phosphorelay-Systeme. Dargestellt sind die Domänenstrukturen des „klassischen“ Zwei-Komponenten-Systems (A) und der Phosphorelay-Systeme (B-E) sowie bakterielle Vertreter der einzelnen Phosphorylierungskaskaden. Pfeile markieren den intra- bzw. intermolekularen Phosphotransfer (P).

1.3 Das Quorum sensing-System in *V. harveyi*

Das Quorum sensing-System in *V. harveyi* vereint als komplexes Phosphorelay-System die Eigenschaften der Signaltransduktionswege von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien. Dadurch ist es dem Bakterium möglich, verschiedene und anspruchsvolle Habitate zu besiedeln (Bassler *et al.*, 1993). Die drei vorhandenen parallelen Quorum sensing-Systeme regulieren die Genexpression in Abhängigkeit von der Zelldichte (Abb. 1.2) (Henke und Bassler, 2004).

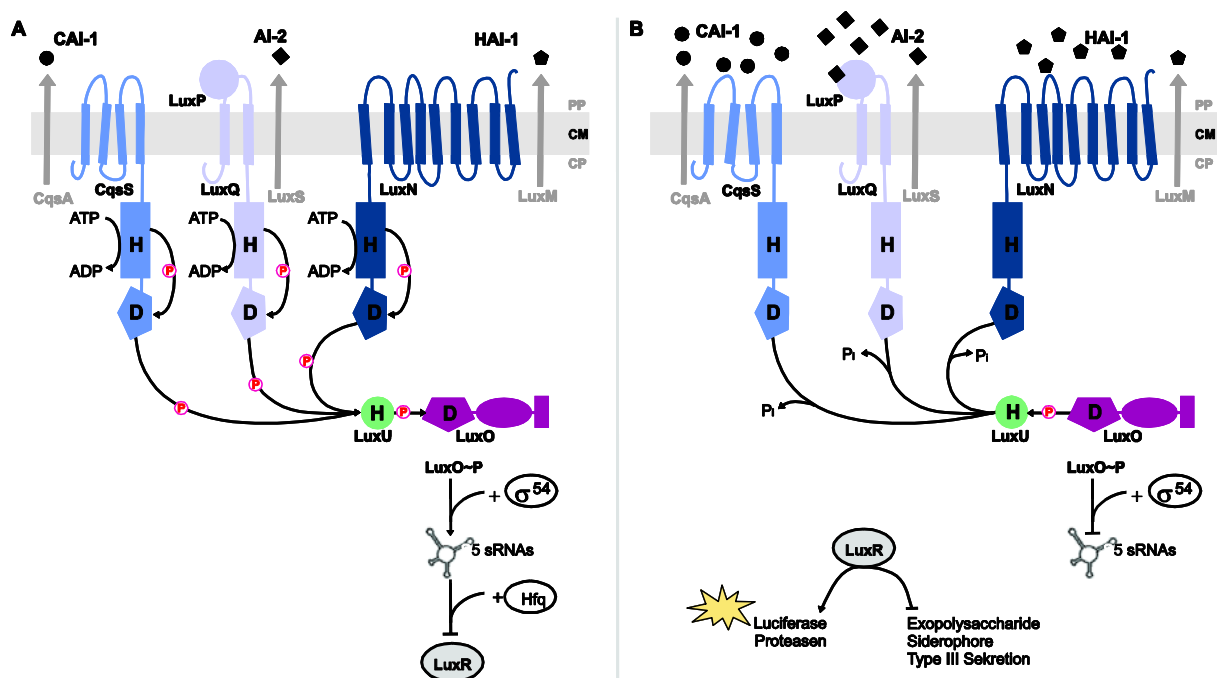


Abb. 1.2: Das Quorum sensing-System in *V. harveyi*. Dargestellt ist die Zelldichte-abhängige Regulation der Biolumineszenz in *V. harveyi* mit der Signaltransduktionskaskade bei niedriger Zelldichte (A) und hoher Zelldichte (B). HAI-1: *Harveyi*-Autoinduktor 1, AI-2: Autoinduktor 2, CAI-1: *Cholerae*-Autoinduktor 1, LuxM: Synthase für HAI-1, LuxS: Synthase für AI-2, CqsA: Synthase für CAI-1, LuxN/LuxQ/CqsS: Hybridsensorkinasen, LuxU: Phosphorelay-Protein, LuxO: Antwortregulator, LuxR: Transkriptionsaktivator, H: Histidinrest, D: Aspartatrest, P: freie Phosphorylgruppe, PP: Periplasma, CM: Cytoplasmamembran, CP: Cytoplasma (aus: Stambrau, 2008).

Die Expression der *luxCDABE*-Gene und anderer Quorum sensing-regulierten Gene erfolgt dabei nur bei hoher Zelldichte (Anwesenheit von Autoinduktoren), wenn der

Antwortregulator LuxO im dephosphorylierten Zustand vorliegt und damit inaktiv ist (Abb. 1.2B). Unter dieser Voraussetzung bindet der Transkriptionsaktivator LuxR an den *lux*-Promotor, wodurch die Genregulation gestartet wird (Miyamoto *et al.*, 1994). Dieser Zustand ändert sich, wenn LuxO bei niedriger Zelldichte (Abwesenheit von Autoinduktoren) durch die Kinaseaktivität der Hybridsensorkinasen vermutlich über das Phosphorelay-Protein LuxU (HPt-Protein) phosphoryliert wird. Zusammen mit dem alternativen Sigma-Faktor σ^{54} bildet LuxO einen Komplex, der die Expression von Genen induziert, die für fünf kleine regulatorische sRNA-Moleküle (Qrr1 - 5) (Tu und Bassler, 2007) codieren. Diese sRNA-Moleküle destabilisieren zusammen mit dem RNA-Chaperon Hfq die mRNA von *luxR*, sodass die Expression der *lux*-abhängigen Gene unterdrückt wird (Abb. 1.2A) (Lenz *et al.*, 2004; Lilley und Bassler, 2000; Tu und Bassler, 2007; Waters und Bassler, 2006). Bei hoher Zelldichte wird die Kinaseaktivität der Hybridsensorkinasen hingegen gehemmt, wodurch sich das Gleichgewicht von LuxU/LuxU~P verschiebt (Timmen *et al.*, 2006).

Durch das Vorhandensein der drei Hybridsensorkinasen wird es *V. harveyi* ermöglicht gleichzeitig drei unterschiedliche Signalmoleküle zu detektieren, die das Bakterium selbst synthetisiert:

- i) Das Acylhomoserinlacton HAI-1 (*Harveyi* Autoinduktor-1) (Abb. 1.3A) wird von der Synthase LuxM synthetisiert und direkt von LuxN detektiert (Abb. 1.2). Es ist ein typisches N-Acylhomoserinlacton: N-3-Hydroxyl-Butanoyl-Homoserinlacton (Cao und Meighen, 1993; Cao und Meighen, 1989; Freeman *et al.*, 2000; Henke und Bassler, 2004).
- ii) Der Furanosylboratdiester AI-2 (3-Methyl-5,6-Dihydrofuro(2,3-D)(1,3,2) Dioxaborol-2,2,6,6-Tetraol) (Abb. 1.3B) wird von der Synthase LuxS synthetisiert. Detektiert wird AI-2 von dem periplasmatischen Protein LuxP, das mit der Hybridsensorkinase LuxQ assoziiert ist (Abb. 1.2) und homolog zum periplasmatischen Ribose-Bindeprotein von *E. coli* ist. Dadurch verändert sich die Aktivität von LuxQ, sodass das Signal des Autoinduktors ins Cytoplasma

weitergeleitet werden kann (Bassler *et al.*, 1994; Henke und Bassler, 2004; Neiditch *et al.*, 2005).

iii) Der Autoinduktor CAI-1 (*Cholerae* Autoinduktor-1) wurde zunächst in *Vibrio cholerae* entdeckt (Abb. 1.3C) (Miller *et al.*, 2002). Durch genetische Analysen wurden auch bei *V. harveyi* die Gene *cqsA*, das für die Autoinduktor-Synthase CqsA codiert (*Cholerae quorum-sensing autoinducer*), und *cqsS*, das für die Hybridsensorkinase CqsS codiert (*Cholerae quorum-sensing sensor*), nachgewiesen (Abb. 1.2) (Henke und Bassler, 2004). Der Autoinduktor CAI-1 wurde erst kürzlich als (*S*)-3-Hydroxytridecan-4-on identifiziert und beschreibt einen neuen Typ bakterieller Autoinduktoren (Higgins *et al.*, 2007).

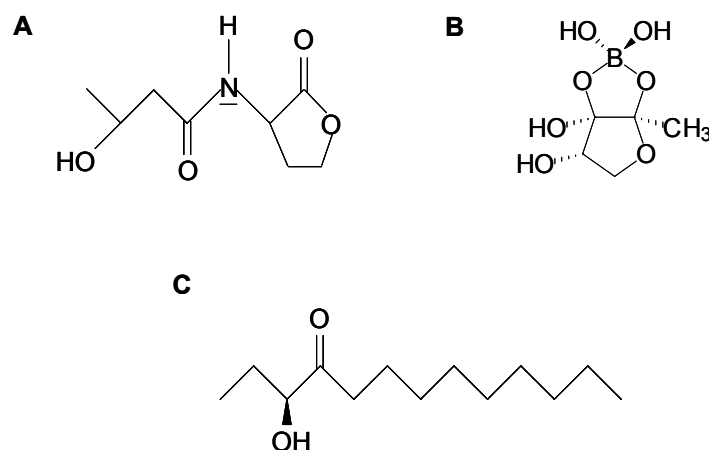


Abb. 1.3: Strukturformeln der Autoinduktoren im Quorum sensing-System von *V. harveyi*. A: HAI-1, *N*-3-Hydroxyl-Butanoyl-Homoserinlacton, B: AI-2, 3-Methyl-5,6-Dihydrofuro(2,3-D)(1,3,2)dioxaborol-2,2,6,6-tetraol, C: CAI-1, (*S*)-3-Hydroxytridecan-4-on.

Da *V. harveyi* sowohl HAI-1 als auch AI-2 synthetisiert, wird postuliert, dass diese Spezies in der Lage ist, sowohl mit der eigenen als auch mit anderen Spezies zu kommunizieren. Dies ermöglicht *V. harveyi* sehr wahrscheinlich neben der Bestimmung der Zelldichte auch die der bakteriellen Zusammensetzung (Bassler, 1999). Nachdem Henke und Bassler (2004) feststellten, dass CAI-1 aus *V. harveyi* die Genexpression von

V. cholerae und umgekehrt kontrolliert, wird angenommen, dass die CAI-1-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation nur innerhalb der Gattung *Vibrio* vorkommt.

1.3.1 Das Zusammenspiel der drei Hybridsensorkinasen

Die drei Hybridsensorkinasen sind unabhängig voneinander in der Lage, die Quorum sensing-abhängigen Prozesse zu regulieren. Studien über die Präferenz der Autoinduktoren zeigten, dass nur bei Vorhandensein aller drei Signalmoleküle (HAI-1, AI-2 und CAI-1) eine maximale Genregulation erreicht wird. Die drei Autoinduktoren haben dabei einen synergistischen Effekt auf das Lux-System, wobei sich die Aktivitäten der Hybridsensorkinasen im Kinase/Phosphatase-Verhältnis unterscheiden (LuxN > LuxQ > CqsS) (Henke und Bassler, 2004). Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass die Signalstärke der drei Moleküle unterschiedlich groß ist. Dies ist u. a. auch abhängig davon, ob die Bakterien auf festen Oberflächen oder in Flüssigkulturen wachsen. In flüssigen Medien wird das Quorum sensing-System in der Reihenfolge LuxN > LuxQ > CqsS (HAI-1 > AI-2 > CAI-1) reguliert; auf Agar-Oberflächen werden die Aktivitäten zu LuxN > CqsS > LuxQ (HAI-1 > CAI-1 > AI-2) umgewandelt (Henke und Bassler, 2004). Timmen *et al.* (2006) zeigten für die Hybridsensorkinase LuxN eine konstitutive Phosphataseaktivität, die unabhängig ist von HAI-1. Ebenso wurde eine von AI-2 unabhängige Phosphataseaktivität für LuxQ nachgewiesen (Stambrau, 2008).

1.3.2 Die HAI-1 abhängige Hybridsensorkinase LuxN

Die Hybridsensorkinase LuxN in *V. harveyi* wurde erstmals 1993 mittels genetischer Analysen von Bassler *et al.* untersucht (Bassler *et al.*, 1993). LuxN hat mit 849 Aminosäuren eine relative Molekülmasse von 96,1 kDa (Abb. 1.4). Das Protein besteht aus einer Histidinkinasedomäne mit einem hoch konservierten Histidinrest an Position 471 (H471), der als Sensorkinase die Phosphorylgruppe an die C-terminale Empfängerdomäne eines Antwortregulators weiterleitet. Letztere enthält einen konservierten Aspartatrest an Position 771 (D771) (Bassler *et al.*, 1994; Freeman *et al.*, 2000). In Hydrophathieanalysen

der Proteinsequenz mit diversen Analyse-Programmen [Kyte-Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982), TopPred (Claros und Heijne, 1994), Tmpred (Hofmann und Stoffel, 1993), SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) und TMHMM (Krogh *et al.*, 2001)] wurden bis zu neun transmembrane Domänen (TM) im Bereich der ersten 300 Aminosäuren vorhergesagt. Zur Bestimmung der Topologie von LuxN wurden Reporterfusionen des *luxN*-Fragments unterschiedlicher Länge in den vorhergesagten transmembranen Domänen bzw. cytoplasmatischen und periplasmatischen Schleifen mit den Reporter-Genen *lacZ* und *phoA* vorgenommen (Timmen, 2005). Mit Hilfe dieser Reporter-Gen-Untersuchungen und der Verteilung positiv und negativ geladener Aminosäuren entsprechend der „*positive inside rule*“ (von Heijne, 1992) konnte ein erstes Modell der Sekundärstruktur von LuxN mit zumindest 8 Transmembrandomänen erstellt werden. Unklar blieb der Bereich der Aminosäuren 1- 40 und damit die Lokalisation des N-Terminus.

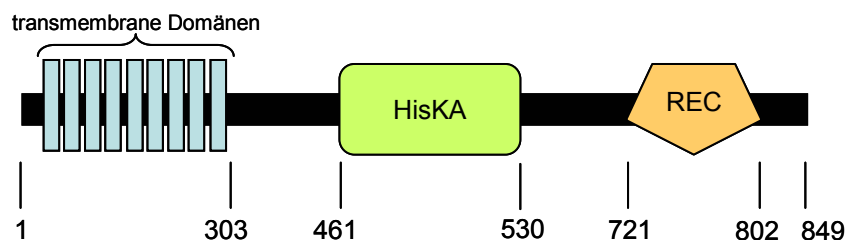


Abb. 1.4: Domänenstruktur von LuxN. Dargestellt sind der transmembrane Bereich aus neun vorhergesagten Transmembrandomänen, die Histidinkinase- (**HisKA**) und die Empfängerdomäne (**REC**).

1.3.3 Die AI-2 abhängige Hybridsensorkinase LuxQ

Im Gegensatz zu LuxN besteht die aus 859 Aminosäuren mit einer relativen Molekülmasse von 96,9 kDa große Hybridsensorkinase LuxQ aus zwei Transmembrandomänen (TM), die durch eine periplasmatische Schleife verbunden sind. Die Schleife wird aus zwei PAS-Domänen gebildet; benannt nach den Proteinen: PER (periodisches Protein in der Regulation des circadianen Rhythmus in *Drosophila*), ARNT

(das AHR-nukleare Translokatorprotein für die Signaltransduktion in Säugetieren), und SIM (das Protein des *Single-Minded* Locus in *Drosophila*) (Gu *et al.*, 2000) (Abb. 1.5). An die beiden PAS-Domänen ist das periplasmatische Protein LuxP gebunden. Zwischen der zweiten Transmembrandomäne und der Histidinkinasedomäne mit dem konservierten Histidinrest an Position 492 (H492) befinden sich eine HAMP- und eine weitere PAS-Domäne, sowie eine *Coiled-Coil*-Struktur. Über HAMP-Domänen weiß man, dass sie extrazelluläre Sensordomänen mit intrazellulären Signaldomänen verbinden. Sie bestehen aus vier helikalen, parallelen *Coiled-coil*-Bereichen. Durch Rotation zweier Helices im Uhrzeigersinn und Rotation zwei weiterer Helices entgegen dem Uhrzeigersinn um je 26° kann zwischen zwei verschiedenen helikalen Anordnungen, so genannter „*Packing modes*“, unterschieden werden. Dies entspricht einem binären Schalter (Hulko *et al.*, 2006). Durch eine Konformationsänderung in LuxQ kann so ein Alles-oder-Nichts-Signal produziert werden.

Der konservierte Aspartatrest der Empfängerdomäne befindet sich an Position 785 (D785) (Neiditch *et al.*, 2005). Erst kürzlich wurde von Stambrau (2008) nachgewiesen, dass LuxQ die Phosphorylgruppe auf LuxU bis zu zehnmal langsamer überträgt als LuxN; die Phosphataseaktivität von LuxQ ist dagegen nur vierfach langsamer als die von LuxN. Ebenfalls konnte bei diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass LuxP, zusammen mit dem Autoinduktor AI-2, die Kinaseaktivität von LuxQ um maximal 40% reduziert, während die Phosphataseaktivität davon unberührt bleibt. AI-2-freies LuxP hat keinen Einfluss auf die Phosphatübertragung von LuxQ auf LuxU (Stambrau, 2008).

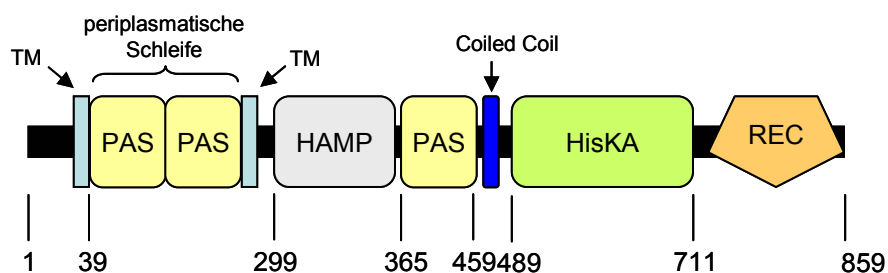


Abb. 1.5: Domänenstruktur von LuxQ. Dargestellt sind die zwei Transmembrandomänen (TM) mit den dazwischenliegenden PAS-Domänen, die nachfolgende HAMP- und eine dritte PAS-Domäne, sowie eine *Coiled-Coil*-Struktur und die Histidinkinase- (HisKA) und Empfängerdomäne (REC).

1.3.4 Die CAI-1 abhängige Hybridsensorkinase CqsS

Das Protein CqsS besteht aus 661 Aminosäuren mit einer relativen Molekülmasse von ca. 75,5 kDa (Abb. 1.6). Es hat vier Transmembrandomänen, an die sich die Histidinkinase- (HisKA) und die Antwortregulatordomäne (REC) anschließen (Henke und Bassler, 2004).

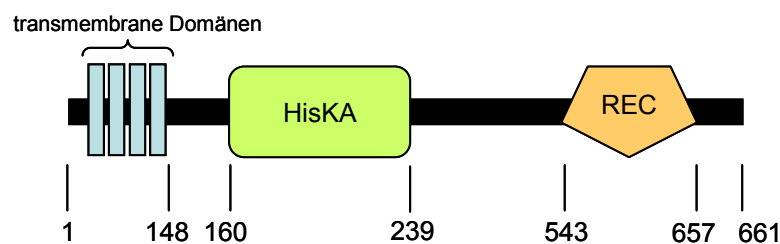


Abb. 1.6: Domänenstruktur von CqsS. Dargestellt sind der transmembrane Bereich, die Histidinkinase- (HisKA) und die Empfängerdomäne (REC).

1.3.5 Das Phosphorelay-Protein (HPt) LuxU

Die Gene *luxU* und *luxO* sind zusammen in einem Operon organisiert (*luxOU*-Operon), wobei sich beide Gene um 4 Nukleotide überlappen. Das Gen *luxU* codiert für ein 114 Aminosäuren großes cytosolisches Protein (LuxU) mit einer relativen Molekülmasse von ca. 13 kDa. Ein in LuxU identifizierter Bereich aus 20 Aminosäuren mit einem konservierten Histidinrest (in LuxU: H58) ist bei Mitgliedern der Phosphorelay-Protein-Familie, wie z. B. BvgS, ArcB und Ypd1, konserviert. Der Histidinrest an Position 58 in LuxU ließ daher auf eine Phosphorelay-Funktion schließen. Genetische und phänotypische Analysen zeigten, dass bei Abwesenheit von LuxU oder wenn der Histidinrest H58 ausgetauscht ist, eine Induktion der Biolumineszenz-Gene nicht möglich ist. Daraus wurde gefolgert, dass LuxU essentiell für die Quorum sensing-Signaltransduktionskaskade in *V. harveyi* ist (Freeman und Bassler, 1999a). Timmen *et al.* (2006) konnten durch den Austausch des Aminosäurerestes H58 gegen Glutamin (H58Q) biochemisch nachweisen, dass durch diesen Austausch eine Phosphorylierung des

Proteins ausgehend von LuxN verhindert wird. Es wird davon ausgegangen, dass LuxU die Phosphorylgruppe auf LuxO weiterleitet und dadurch sowohl als Phosphoryldonor, als auch als Phosphorylakzeptor dient. Mittels NMR-Studien wurde kürzlich die dreidimensionale Struktur des Proteins LuxU aufgeklärt (Ulrich *et al.*, 2005).

1.3.6 Der σ^{54} -abhängige Antwortregulator LuxO

Der Antwortregulator LuxO hat mit 453 Aminosäuren eine relative Molekülmasse von ca. 50 kDa und befindet sich im Cytoplasma. Er gehört zur Familie der σ^{54} -abhängigen Transkriptionsaktivatoren (Lilley und Bassler, 2000). Proteine dieser Familie haben eine Empfängerdomäne (*receiver*, REC) mit einem konservierten Aspartatrest (in LuxO: D47) und ein Helix-turn-Helix-Motiv (HTH) am C-terminalen Ende. LuxO besitzt außerdem eine AAA⁺-ATPase-Domäne, eine konservierte Region von ca. 220 Aminosäuren zwischen der Empfängerdomäne und dem Helix-turn-Helix-Motiv (AAA: “*ATPases associated with a variety of cellular activities*”) (Abb. 1.7). Damit zählt LuxO, wie das Protein NtrC, zur Familie der AAA-Superfamilie (Cullen *et al.*, 1996; Elderkin *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2003; Neuwald *et al.*, 1999). Zu den von AAA-Proteinen ausgeführten zellulären Aktivitäten zählen u. a. Proteolyse, Proteinfaltung, Transmembrantransport, Biogenese von Organellen und DNA-Replikation (Vale, 2000).

Auf die Empfängerdomäne im N-terminalen Bereich mit dem konservierten Aspartatrest D47 wird vermutlich in der Signaltransduktionskaskade die Phosphorylgruppe von LuxU übertragen. Freeman und Bassler (1999b) wiesen für den Aspartatrest D47 mittels phänotypischer Analysen eine entscheidende Signalfunktion in LuxO nach. Durch Austausch gegen die Aminosäuren Alanin (D47→A) und Asparagin (D47→N) wurde festgestellt, dass dadurch eine Phosphorylierung von LuxO nicht mehr möglich ist und das *lux*-Operon konstitutiv exprimiert wird. Der Austausch gegen Glutamat (D47→E) hingegen bewirkte, dass der phosphorylierte Zustand von LuxO simuliert wird und die Zellen kein Licht produzieren (Freeman und Bassler, 1999b). Die Empfängerdomäne ist daher eine regulatorische Domäne, die die Aktivität des AAA-Aktivators kontrolliert. Durch die Phosphorylierung am Aspartatrest wird möglicherweise

eine Konformationsänderung induziert, die die Oligomerisierung der zentralen ATPase-Domäne bewirkt. Die Oligomerisierung ist vermutlich notwendig für die ATP-Hydrolyse und den Kontakt mit dem Sigma-Faktor σ^{54} (Lee *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass die AAA-Domänen als „ATP-abhängige Proteinklammern“ fungieren (Confalonieri und Duguet, 1995). Das Helix-turn-Helix-Motiv befindet sich C-terminal und ist zuständig für die Bindung an die DNA.

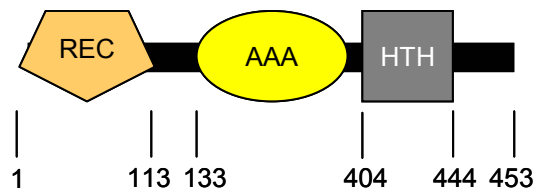


Abb. 1.7: Domänenstruktur von LuxO. Dargestellt sind die N-terminale Empfängerdomäne (REC), die AAA⁺-ATPase-Domäne (AAA) und die DNA-Bindedomäne (HTH).

Mit dem Programm PyMol von DeLano Scientific LLC (<http://pymol.sourceforge.net/>) konnte anhand ausreichender Identitäten der Aminosäuresequenz von LuxO und dem Protein NtrC die Struktur von LuxO für den Aminosäure-Bereich 1-378 erstellt werden (Abb. 1.8). Eindeutig erkennbar ist ein großer Anteil α -helikaler Strukturen im Protein.

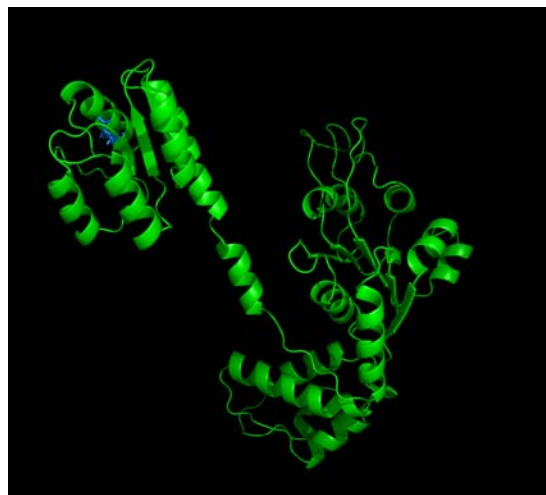


Abb. 1.8: Tertiärstrukturmodell von LuxO des Aminosäurebereichs 1-378. Modelliert wurde die Struktur mit dem Programm PyMol anhand ausreichender Identitäten der Aminosäuresequenz von LuxO und NtrC.

Das Protein LuxO konnte bisher biochemisch noch nicht näher charakterisiert werden. Die heterologen Untersuchungen in *E. coli* beschränkten sich hauptsächlich auf die Erzielung von LuxO in löslicher Form. Aktivitätsmessungen mit radioaktivem Acetylphosphat oder ATP des nur unzureichend isolierten und angereicherten LuxO waren nicht erfolgreich (Timmen, 2005). So konnte der Phosphotransfer von LuxU auf LuxO bisher noch nicht nachgewiesen werden.

1.4 Aufgabenstellung

Das Quorum sensing-System in *V. harveyi* wurde bisher hauptsächlich mittels genetischer Studien untersucht. Da ein System jedoch nur durch biochemische Studien vollständig charakterisiert werden kann, war es Ziel dieser Arbeit einzelne Komponenten auf proteinbiochemischer Ebene *in vitro* zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Protein LuxN bezüglich seiner Membrantopologie und seiner enzymatischen Aktivität bei der Autoinduktor-Bindung von HAI-1 charakterisiert werden. Die von Timmen (2005) erhaltenen Ergebnisse zur Topologie sollen ergänzt und die Lokalisation des N-Terminus untersucht werden, um die Anzahl der Transmembrandomänen endgültig zu klären. Weiterhin sollen die HAI-1-Bindestelle von LuxN charakterisiert und der Einfluss von HAI-1 auf die Signalweiterleitung untersucht werden. Im Zuge der biochemischen Charakterisierung soll LuxN gereinigt und rekonstituiert werden.

Für das Protein LuxO konnte bisher nur in genetischen und phänotypischen Untersuchungen eine Antwortregulatoraktivität nachgewiesen werden. Die tatsächliche Aktivität dieses Proteins konnte noch nicht gezeigt werden, da es heterolog in *E. coli* hauptsächlich in Form von *Inclusion Bodies* (Einschlusskörperchen) produziert wird. Durch weitere Versuche zur heterologen Produktion einer löslichen Form bzw. durch Reinigung und anschließende Renaturierung des Proteins aus den *Inclusion Bodies* soll ein enzymatisch aktives Protein gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Folgende Materialien fanden in dieser Arbeit Verwendung:

Tab. 2.1: Verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
Acetylphosphat	Sigma (Deisenhofen)
Agar Agar	Biotechnologie Euler (Frankfurt)
Agarose	Serva (Heidelberg)
Alkalische Phosphatase (AP)	NEB (Frankfurt)
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth (Karlsruhe)
Anti- β -Galaktosidase-Antikörper	Promega (Mannheim)
Anti-AP-konjugierter Antikörper	Caltag Laboratories (Burlingame, Californien, USA)
AP-konjugiertes Anti-Maus IgG	GE Healthcare (Braunschweig)
L-Arginin-HCl	Roth (Karlsruhe)
[γ - ³² P]-ATP	GE Healthcare (Braunschweig) bzw. PerkinElmer (Rodgau-Jügesheim)
BioBeads	BioRad (München)
Carbenicillin (Dinatriumsalz)	Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Sigma (Deisenhofen)
Desoxyribonuklease I (DNase)	Sigma (Deisenhofen)
DNA-Standard (1 kb bzw. 2-log-Ladder)	NEB (Frankfurt)
DNeasy Tissue Kit	QIAgen GmbH (Hilden)

(Fortsetzung Tab. 2.1: Verwendete Materialien)

Materialien	Hersteller
dNTPs (Desoxy-Nukleotidtriphosphate)	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> total Lipid-Extract	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama)
HAI-1	Universität Göttingen
Isopropyl-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	PeqLab (Erlangen)
Kanamycin (Sulfat)	Roth (Karlsruhe)
Kieselgel 60 DC-Alufolie (10 x 10 cm)	Merck (Darmstadt)
Molybdänblau-Sprühreagenz	Sigma (Deisenhofen)
Lauryldimethylaminoxid (LDAO), purum, ~30% in H ₂ O	Fluka (Neu-Ulm)
Lysophosphatidylethanolamin	Sigma (Deisenhofen)
n-Dodecyl- β -D-maltosid	Calbiochem (La Jolla, Kalifornien)
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	QIAgen GmbH (Hilden)
Ninhydrin-Reagenz	Riedel-de Haën (Seelze)
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Nucleotide Removal Kit	QIAgen GmbH (Hilden)
Oligonukleotide	Invitrogen (Karlsruhe) bzw. Operon (Köln)
ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (oNPG)	Sigma (Deisenhofen)
Page Ruler TM Prestained Proteinstandard	Fermentas (St. Leon-Rot)
Pefabloc [®] SC (AEBSF)	Boehringer Mannheim
Penta-His-Antikörper	QIAgen GmbH (Hilden)
Pfu-DNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Phusion-DNA-Polymerase	Finnzymes Diagnostics (Espoo)

(Fortsetzung Tab. 2.1: Verwendete Materialien)

Materialien	Hersteller
PMSF	Sigma (Deisenhofen)
[³² P]- <i>ortho</i> -Phosphat	GE Healthcare (Braunschweig)
“Prestained”-HMW-Proteinstandard	Sigma (Deisenhofen)
Pyridin	Sigma (Deisenhofen)
QIA-prep-spin Plasmid Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
QIAquick-Gel-Extraction Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
QIAquick-PCR-Purification Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
Restriktionsenzyme	NEB (Frankfurt)
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
SeeBlue Plus2 Prestained Proteinstandard	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase	NEB (Frankfurt)
T4 -Polynukleotidkinase	NEB (Frankfurt)
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen Bayer (Leverkusen), Biomol (Hamburg), BioRad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio), E. Merck (Darmstadt), Riedel-de Haën (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad “pro analysis“ bezogen.

2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.2.1 Verwendete Stämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli*- und *Vibrio harveyi*-Stämme sind in Tab. 2.2 aufgelistet:

Tab. 2.2: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(T_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^R)	Studier <i>et al.</i> , 1991
<i>E. coli</i> CC118	<i>araD139 Δara leu76a7 ΔlacX74 ΔphoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE (am) recA1</i>	Manoil und Beckwith, 1985
<i>E. coli</i> CC181	F128 <i>lacI^f Δ(ara, leu)7679 ΔlacX74 Δ(phoA)20 galE galK thi rpsE rpoB argE(am) lacY328 (am) recA1</i>	Calamia und Manoil, 1990
<i>E. coli</i> JM109	F ⁻ <i>traD36 proA⁺ B⁺ lacI^f Δ(lacZ) M15/Δ(lac-proAB) glnV44 e14⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> MG1655	F ⁻ K12 Referenzstamm	Blattner <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> MM39	<i>araD lacIΔU1269 malE444</i> (Str ^R)	Jonathan Beckwith, persönliche Gabe
<i>E. coli</i> TKR2000	<i>ΔkdpABCDE thi rha lacZ habA trkA405 trkD1 atp706</i>	Kollmann und Altendorf, 1993
<i>V. harveyi</i> BB120	Wildtyp	Bassler <i>et al.</i> , 1997
<i>V. harveyi</i> BB170	<i>V. harveyi</i> BB120 <i>luxN::Tn5</i>	Bassler <i>et al.</i> , 1993

2.2.2 Plasmide

In Tab. 2.3 sind die verwendeten und neu konstruierten Plasmide aufgelistet:

Tab. 2.3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Genotyp	Referenz
pTLuxN-6His	Amp ^R	<i>luxN</i> in pT7-5	Timmen, 2005
pTPutP(S502)lacZ	Amp ^R	<i>putPS502</i> und <i>lacZ</i> in pT7-5	Heinrich Jung, persönliche Gabe
pTPutP(S502)phoA	Amp ^R	<i>putPS502</i> und <i>phoA</i> in pT7-5	Heinrich Jung, persönliche Gabe
pTLuxNE40lacZ	Amp ^R	<i>luxM</i> -40 <i>lacZ</i> in pT7-5	diese Arbeit
pTLuxNQ150lacZ	Amp ^R	<i>luxM</i> -150 <i>lacZ</i> in pT7-5	diese Arbeit
pTLuxNA190phoA	Amp ^R	<i>luxM</i> -190 <i>phoA</i> in pT7-5	diese Arbeit
pTLuxNP276lacZ	Amp ^R	<i>luxM</i> -276 <i>lacZ</i> in pT7-5	diese Arbeit
pTLuxNP276phoA	Amp ^R	<i>luxM</i> -276 <i>phoA</i> in pT7-5	Timmen, 2005
pT7Pol26	Kan ^R	Helferplasmid	Mertens <i>et al.</i> , 1995
pMAL-p2X	Amp ^R	Expressionsvektor	NEB (Frankfurt)
pMAL-c2X	Amp ^R	Expressionsvektor	NEB (Frankfurt)
pMALpLuxNb-6His	Amp ^R	<i>luxNb</i> in pMAL-p2x	diese Arbeit
pMALcLuxNb-6His	Amp ^R	<i>luxNb</i> in pMAL-c2x	diese Arbeit
pKKLuxNb-6His	Amp ^R	<i>luxNb</i> in pKK223-3	Timmen, 2005
pKKLuxNbY50F-6His	Amp ^R	<i>luxNb</i> Y50F in pKK223-3	diese Arbeit

(Fortsetzung Tab. 2.3: Verwendete Plasmide)

pKKLuxNbY53F-6His	Amp ^R	<i>luxNbY53F</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbS54A-6His	Amp ^R	<i>luxNbS54A</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbC56A-6His	Amp ^R	<i>luxNbC56A</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbI58A-6His	Amp ^R	<i>luxNbI58A</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbW60F-6His	Amp ^R	<i>luxNbW60F</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbS62A-6His	Amp ^R	<i>luxNbS62A</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbS63A-6His	Amp ^R	<i>luxNbS63A</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbY66C-6His	Amp ^R	<i>luxNbY66C</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbT69V-6His	Amp ^R	<i>luxNbT69V</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbD70C-6His	Amp ^R	<i>luxNbD70C</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbD70E-6His	Amp ^R	<i>luxNbD70E</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbP73C-6His	Amp ^R	<i>luxNbP73C</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbE74Q-6His	Amp ^R	<i>luxNbE74Q</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbS78A-6His	Amp ^R	<i>luxNbS78A</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbK85L-6His	Amp ^R	<i>luxNbK85L</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbL166R-6His	Amp ^R	<i>luxNbL166R</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pKKLuxNbY66D70P73C-6His	Amp ^R	<i>luxNbY66D70P73C</i> in pKK223-3	diese Arbeit
pUC19-CadC2	Amp ^R	<i>cadC2</i> in pUC19 (Fermentas)	Ina Haneburger, persönliche Gabe

(Fortsetzung Tab. 2.3: Verwendete Plasmide)

pUCLuxNb-6His	Amp ^R	<i>luxNb</i> -6His in pUC19-CadC2	diese Arbeit
pUCLuxNbY66C-6His	Amp ^R	<i>luxNbY66C</i> -6His in pUC19-CadC2	diese Arbeit
pUCLuxNbD70C-6His	Amp ^R	<i>luxNbD70C</i> -6His in pUC19-CadC2	diese Arbeit
pUCLuxNbP73C-6His	Amp ^R	<i>luxNbP73C</i> -6His in pUC19-CadC2	diese Arbeit
pUCLuxNbD70C-6His	Amp ^R	<i>luxNbD70C</i> -6His in pUC19-CadC2	diese Arbeit
pUCLuxNbY66D70P73C-6His	Amp ^R	<i>luxNbY66D70P73C</i> -6His in pUC19-CadC2	diese Arbeit
pUCLuxNbP73C-6His	Amp ^R	<i>luxNbP73C</i> -6His in pUC19-CadC2	diese Arbeit
pUCLuxNbL166R-6His	Amp ^R	<i>luxNbL166R</i> -6His in pUC19-CadC2	diese Arbeit
pFED368	Cm ^R	<i>luxPQ</i> in pEVS143 <i>plus Cm-Kassette</i>	Neiditch, 2006
pFEDLuxNb-6His	Cm ^R	<i>luxNb</i> -6His in pFED368	diese Arbeit
pFEDLuxNbY66C-6His	Cm ^R	<i>luxNbY66C</i> -6His in pFED368	diese Arbeit
pFEDLuxNbD70C-6His	Cm ^R	<i>luxNbD70C</i> -6His in pFED368	diese Arbeit
pFEDLuxNbP73C-6His	Cm ^R	<i>luxNbP73C</i> -6His in pFED368	diese Arbeit
pFEDLuxNbY66D70P73C-6His	Cm ^R	<i>luxNbY66D70P73C</i> -6His in pFED368	diese Arbeit
pFEDLuxNbL166R-6His	Cm ^R	<i>luxNbL166R</i> -in pFED368	diese Arbeit
pRK2013	Kan ^R	Helferplasmid für Konjugation	Ditta <i>et al.</i> , 1980
pQELuxU-6His	Amp ^R	<i>luxU</i> in pQE30 (QIAGEN)	Timmen, 2005
pETLuxO-10His	Amp ^R	<i>luxO</i> in pET16b (Novagen)	Timmen, 2005

(Fortsetzung Tab. 2.3: Verwendete Plasmide)

pETLuxO1-130-10His	Amp ^R	10His- <i>luxO1</i> -130 in pET16b	diese Arbeit
pETLuxO1-386-10His	Amp ^R	10His- <i>luxO1</i> -386 in pET16b	diese Arbeit
pElloLuxO-10His	Amp ^R	<i>luxO</i> in pEllo10His	Timmen, 2005
pMALp-LuxO10His	Amp ^R	10His- <i>luxO</i> in pMAL-p2x	diese Arbeit

2.2.3 Verwendete Oligonukleotide

In Tab. 2.4 sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide verzeichnet:

Tab. 24: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
LuxNBamHI sense	5' - AAAGGGGGATCCATGTTTGTATTTAGCCTAGAG - 3'
LuxNE40Nhe-neu-as	5' - CCAAAGCTAGCTTCATTTTTTTGCTTAAGTCG - 3'
LuxNQ150Nhe antisense	5' - TCGATGCTAGCTTGACTTGGGCCGACAATATC - 3'
LuxNA190Nhe antisense	5' - TAGTTGCTAGCGGCTAGAGTCAGCTTACTGC - 3'
pKK7000	5' - GTCAGGCAGCCATCGGAAGCT - 3'
LuxNH471Q antisense	5' - TTACGCATTTCTTGAGCAATA - 3'
LuxNY50Fs	5' - CCACGCAGCTTTTATTGCGTACTCG - 3'
LuxNY50Fas	5' - CGAGTACGCAATAAAAGCTGCGTGG - 3'
LuxNY53Fs	5' - GCTTATATTGCGTTCTCGGTGTGTATC - 3'
LuxNY53Fas	5' - GATACACACCGAGAACGCAATATAAGC - 3'

(Fortsetzung Tab. 2.4: Verwendete Oligonukleotide)

LuxNS54Aas	5' - AATGATACACACCGCGTACGCAATATAAGC - 3'
LuxNC56As	5' - GTACTCGGTGGCTATCATTGCGTGG - 3'
LuxNC56as	5' - CCACGCAATGATAGCCACCGAGTACG - 3'
LuxNI58As	5' - GGTGTGTATCGCTGCGTGGATCAG - 3'
LuxNI58Aas	5' - GATCCACGCAGCGATACACACCG - 3'
LuxNW60Fs	5' - TATCATTGCGTTTATCAGCAGCAA - 3'
LuxNW60Fas	5' - TGCTGCTGATGAACGCAATGATAC - 3'
LuxNS62As	5' - TCGGTGGATCGCTAGCAATGCTT - 3'
LuxNS62Aas	5' - AAGCATTGCTCGCGATCCACGCAATG - 3'
LuxNS63As	5' - TCGGTGGATCAGCGCCAATGCTTATTTC - 3'
LuxNS63Aas	5' - AATAAGCATTGCGGCTGATCCACG - 3'
LuxNY66Cs	5' - CAGCAATGCTTGTTTCCATACCG - 3'
LuxNY66Cas	5' - CGGTATGGAAACAAGCATTGCTG - 3'
LuxNT69Vs	5' - TTATTTCCATGTGCGATTTACTGC - 3'
LuxNT69Vas	5' - GCAGTAAATCGACATGGAAATAAG - 3'
LuxND70Cs	5' - TTTCCATACCTGTTTACTGCC - 3'
LuxND70Cas	5' - GGCAGTAAACAGGTATGGAAATAAGC - 3'
LuxND70E-sense	5' - TTTCCATACCGAATTACTGCCCG - 3'
LuxND70E-antisense	5' - CGGGCAGTAATTCGGTATGGAAATA - 3'
LuxNP73Cs	5' - CTCCGAGCTCGCACAGTAAATCG - 3'
LuxNP73Cas	5' - CGATTTACTGTGCGAGCTCGGAGC - 3'
LuxNY66D70P73Cs	5' - CAGCAATGCTTGTTTCCATACCTGTTTACTGTGCGA GCTCGGAG - 3'
LuxNY66D70P73Cas	5' - CTCCGAGCTCGCACAGTAAACAGGTATGGAAACA AGCATTGCTG - 3'

(Fortsetzung Tab. 2.4: Verwendete Oligonukleotide)

LuxNE74Qs	5' - ATTTACTGCCCCAGCTCGGAGCTTCG - 3'
LuxNE74Qas	5' - AAGCTCCGAGCTGGGGCAGTAAATC - 3'
LuxNS78As	5' - GCTCGGAGCTGCAGCTGGCATGTTC - 3'
LuxNS78Aas	5' - GAACATGCCAGCTGCAGCTCCGAGCTC - 3'
LuxNK85Ls	5' - ATGTTTCATGGCCCTGTTTGCCAACCTCG - 3'
LuxNK85Las	5' - AGGTTGGCAAACAGGGCCATGAACAT - 3'
LuxNL166R-sense	5' - TTCTTTATCGGCCGCGTTAGCTTTG - 3'
LuxNL166R-as	5' - AACAAAGCTAACGCGGCCGATAAAG - 3'
pKKLuxNpFED sense	5' - GATATACCATGGCATGATGTTTGATTTTAGCCTAG AGG - 3'
LuxNpFEDAatII as	5' - TTCATAGACGTCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC TGC - 3'
LuxONdeI sense	5' - TATCTACATATGGTTGAAGACACCGCATCC - 3'
LuxO(110)BamHI antisense	5' - ATATGCGGATCCTCAATTGTTACCGTGACACG - 3'
LuxOT130BamHI-as	5' - GCTACTGGATCCTTATTATTAGTAATTTGGTTACC GGGG - 3'
LuxOV386BamHI-as	5' - GTCAGGGGATCCTTATTATTATACCGATTGGCGCA CAACAG - 3'
Qrr1-BamHI	5' - TTA CTGGATCCTTGGCTTCTGTGAACATGTCG - 3'
Qrr1Promotor-EcoRI	5' - TGATTCGAATTCGGCTTTCAATGGCGTCTCTG - 3'

2.3 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, aerob bei 37°C in speziellen Vollmedien. *E. coli* JM109, CC118, CC181, BL21(DE3)/pLysS, MG1655 und MM39 wurden je nach Anwendung in Luria-Bertani (LB)-Medium [1% (w/v) Trypton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) Hefeextrakt] oder in KML-Medium [1% Trypton; 1% (w/v) KCl; 0,5% Hefeextrakt] kultiviert. *E. coli* TKR2000 wurde ausschließlich in KML-Medium kultiviert.

Die Kultivierung von *V. harveyi*-Stämmen (BB120, BB170) erfolgte aerob bei 30°C in LM-Vollmedium (LM) [2% (w/v) NaCl; 1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt] oder AB-Minimalmedium (AB-MM) nach Greenberg (Greenberg *et al.*, 1979) [1,75% (w/v) NaCl; 1,23% (w/v) MgSO₄; 0,2% (w/v) Caseinhydrolysat; pH 7,5 mit KOH eingestellt; nach Sterilisation steril zugeben: 1% (w/v) Glycerol; 1 mM L-Arginin; 10 mM KPi-Puffer (pH 7,0)]. Antibiotika wurden in den Konzentrationen von 100 µg/ml (Ampicillin, Carbenicillin), 50 µg/ml (Kanamycin, Streptomycin) bzw. 34 µg/ml oder 10 µg/ml für *V. harveyi* BB170 (Chloramphenicol) zugesetzt. Die Optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem „Spekol 1100“ Photometer (Analytic Jena, Jena) oder alternativ in einem „Eppendorf Biophotometer“ (Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Plasmidisolierung

Plasmid-DNA wurde aus 4 ml aus Übernachtskulturen mittels des „QIA-prep-spin-Plasmid“-Kits nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA wurde in 50 µl Elutionspuffer [10 mM Tris/HCl (pH 8,5)] aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.4.2 Isolierung von genomischer DNA

Chromosomale DNA wurde aus 250 µl Übernachtskultur von *V. harveyi* BB120 mittels des „DNeasy Tissue“-Kit nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.4.3 Modifikation von DNA

Die Standard-DNA-Techniken wurden, falls nicht anders beschrieben, nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die *in vitro*-Veränderungen von DNA-Molekülen wie Restriktionen und Ligationen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zur Verhinderung einer Religation 30 min bei 37°C mit Alkalischer Phosphatase behandelt.

2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 1,0 - 1,6% (w/v) Agarose in TAE-Puffer [40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8,0] verwendet, die mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Vor dem Lauf wurde zu den Proben 10x DNA-Probenpuffer [50% (v/v) Glycerol; 0,1 M EDTA; 1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) Bromphenolblau] gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragment-Größen diente der 2-Log-Ladder-Standard. Der Gellauf wurde in einer „Mini Sub DNA Cell“-Agarosegel-Laufkammer (BioRad, München) bei konstant 100 V für 30 - 60 min durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 304 nm, die Dokumentation der Gele mit einer Gel-Dokumentationsanlage der Firma PeqLab.

2.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels des „QIAquick-Gel-Extraction“-Kits nach Angaben des Herstellers aus den Agarosegelen extrahiert. Die DNA wurde in 30 µl EB-Puffer [10 mM Tris/HCl (pH 8,5)] aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.4.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration von Plasmid-Präparationen wurde photometrisch in einem „Eppendorf BioPhotometer“ (Eppendorf, Hamburg) oder einem „Spekol 1100“ Photometer (Analytic Jena, Jena) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.4.7 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde durch den Sequenzierservice des Bereichs Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Diese erfolgte nach dem Prinzip des “Cycle Sequencing”, welches auf dem nach Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden basiert. Die Sequenzierreaktion wurde in einem Endvolumen von 10 µl mit ca. 600 ng Plasmid-DNA, 2 pmol Oligonukleotid und 1 µl „BigDye® Terminator v3.1 Sequencing“-Mix in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgte dabei pro Reaktionszyklus für 10 s bei 96°C, das Anlagern der Oligonukleotide für 15 s bei 50°C und die DNA-Amplifikation für 4 min bei 60°C. Nach 30 Zyklen wurde die Reaktion beendet und die Reaktionsansätze bis zur Weiterbearbeitung bei 16°C gekühlt. Die Proben wurden anschließend vom Sequenzierservice weiter bearbeitet.

Alternativ wurden DNA-Sequenzanalysen durch die Firma GATC (Konstanz) mit entsprechendem Plasmid und Oligonukleotiden durchgeführt und ausgewertet.

2.4.8 Markierung von DNA

Die Herstellung einer DNA-Sonde für Bindeexperimente mit dem Protein LuxO erfolgte mittels PCR. Als Template-DNA für die „spezifische DNA“ diente genomische DNA aus dem *luxOU*-Operon aus *V. harveyi* BB120 (bp -258 stromabwärts des Start-Codons von *luxO* bis +116 stromaufwärts des Start-Codons von *luxO*), die mit den Oligonukleotiden Qrr1-BamHI als Sense-Primer und Qrr1Promotor-EcoRI als Antisense-

Primer amplifiziert wurde. Die „unspezifische DNA“ wurde aus dem Gen *luxO* (bp +1 bis +110 stromaufwärts des Start-Codons von *luxO*) mit den Oligonukleotiden LuxONdeI sense als Sense-Primer und LuxO(110)BamHI antisense als Antisense-Primer amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte nach folgendem PCR-Programm: die initiale Denaturierung der doppelsträngigen DNA dauerte 2 min bei 94°C, die Denaturierung erfolgte dann pro Reaktionszyklus für 48 s bei 94°C, das Anlagern der Oligonukleotide für 48 s bei 60°C und die DNA-Elongation für 1 min bei 72°C. Die finale Elongation dauerte 10 min bei 72°C. Nach 30 Zyklen wurde die Reaktion beendet und die Reaktionsansätze bis zur Weiterbearbeitung bei 16°C gekühlt. Die Amplifikate der „unspezifischen DNA“ (366 bp) und der „spezifischen DNA“ (110 bp) wurden mittels Gelelektrophorese verifiziert und isoliert. Je 1 µg der Amplifikate wurden zunächst für 1 h bei 37°C durch Zugabe von 5 U Alkalische Phosphatase dephosphoryliert und danach mit dem „Qiaquick-PCR-Purification Kit“ extrahiert. Die Markierung des PCR-Fragments erfolgte durch 5'-Endmarkierung mit 10 µCi [γ -³²P]-ATP (3000 Ci/mmol) durch die T4-Polynukleotidkinase [10 U] für 1 h bei 37°C nach dem Protokoll von NEB (Frankfurt). Überschüssige Nukleotide wurden nach dem Protokoll des „Nucleotide Removal Kits“ entfernt. Die DNA wurde dann in 30 µl EB-Puffer [10 mM Tris/HCl (pH 8,5)] aufgenommen.

2.4.9 Präparation kompetenter Zellen und Transformation

Die Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten RbCl-Methode (Promega, 1994). Zur Präparation von kompetenten Zellen wurde eine Übernachtskultur 1:100 in frisches Medium überimpft und aerob bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,2 - 0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C bei 4500xg für 5 min abzentrifugiert und in dem halben Volumen kalter Lösung A [10 mM MOPS; 10 mM RbCl; pH 7,0] resuspendiert. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 4500xg wurden die Zellen im gleichen Volumen kalter Lösung B [100 mM MOPS; 50 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; pH 6,5] resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren

Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Lösung B (10% des Ausgangsvolumens) aufgenommen und dann direkt für die Transformationen verwendet. Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen mit 100 - 200 ng Plasmid-DNA oder einem ganzen Ligationsansatz mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 s bei 42°C) wurde zu jedem Ansatz 1 ml LB- bzw. KML-Medium (bei *E. coli* TKR2000 ausschließlich KML-Medium) gegeben und für mindestens eine Stunde aerob bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf geeignetem Selektionsnährboden ausplattiert. Bei Plasmidtransformationen wurden 70 - 100 µl des Transformationsansatzes ausplattiert; bei Ligationstransformationen wurde der gesamte Ansatz für 3 min bei 5100xg und RT abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im restlichen Überstand (ca. 100 - 130 µl) resuspendiert und ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4.10 Komplementation von *E. coli* MM39 und *V. harveyi* BB170

2.4.10.1 Komplementation von *E. coli* MM39

Zur Komplementation des Stammes *E. coli* MM39 wurden *E. coli* MM39-Zellen mit den Plasmiden pMAL_p-LuxN und pMAL_c-LuxN, sowie den Leerplasmiden pMAL-p2X und pMAL-c2X (NEB, Frankfurt) transformiert. Die Zellen wurden aus einer ÜNK wie in 2.3 beschrieben kultiviert, auf Agarplatten mit M9-Minimalmedium (mit 0,1% Maltose als einzige Kohlenstoffquelle) ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

2.4.10.2 Komplementation von *V. harveyi* BB170 via *Triparental Mating* mit anschließendem Biolumineszenz-Assay

Komplementation: Für die Komplementation von *V. harveyi* BB170 wurde ein *Triparental Mating* durchgeführt. Hierzu wurden *E. coli* CC118/pRK2013, *E. coli* CC118 mit den Plasmiden pFEDLuxNb-6His, pFEDLuxNbL166R-6His, pFEDLuxNbY66C-6His, pFEDLuxNbD70C-6His, pFEDLuxNbP73C-6His und pFEDLuxNbY66D70P73C-6His, und

V. harveyi BB170 verwendet. Von den Donor- und Empfängerstämmen sowie vom Helferstamm *E. coli* CC118/pRK2013 wurden stationäre Kulturen hergestellt. In einem Eppendorfgesäß wurden 100 µl des Donor-, 100 µl des Helfer- und 25 µl des Empfängerstammes vermischt. Die Zellen wurden in die Mitte von LB-Agarplatten getropft und bei 30°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens von der Agarplatte in ein Eppendorfgesäß mit 1 ml BHI-Medium [2% (w/v) NaCl; 2,5% (w/v) Hirn-Herz-Bouillon (Difco)] überführt (abgeändert nach: Freeman und Bassler, 1999b). Nach Verdünnung mit BHI-Medium wurden die Zellen aus dem BHI-Medium in einem 13-Impfösaustreich zur besseren Vereinzlung auf Selektionsplatten [BHI-Agar (BHI-Medium mit 2% Agar) + Antibiotika] ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden mit einem sterilen Holzstäbchen abgenommen und in AB-Medium (+ Antibiotikum und alternativ 266 µM FeCl₃) über Nacht kultiviert. Alternativ kann auch Rinderherz-Bouillon (HI) verwendet werden (Freeman und Bassler, 1999b).

Biolumineszenz-Assay: Übernachtskulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,02 pro Well (Gesamtvolumen: 200 µl) eingestellt und bei 30°C und 600 rpm für einen Zeitraum von 17-20 h im Platteninkubator (Eppendorf) aerob inkubiert. Als Kontrolle diente AB-Medium im gleichen Volumen. Die Inkubation erfolgte direkt in 96-Well-costar“-Platten (Corning Incorporated, New York). Diese speziellen schwarzen Platten mit durchsichtigem Boden ermöglichen die Messung der Lumineszenz im Platten-Luminometer (Centro CB960, Berthold) in RLU (*relative light units*, entsprechen: *Counts* pro Sekunde, bezogen auf OD₆₀₀ 1; wobei OD₆₀₀ 1 = 1 x 10⁹ Zellen/ml), und die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm im Platten-Photometer (Sunrise, Tecan) zur Bestimmung der Zellzahl. Die Biolumineszenz wurde in RLU/OD berechnet. Die verwendeten Platten wurden nach Gebrauch mit Hilfe eines Platten-Reinigungsgerätes (Columbus Pro) mit einer Mischung aus SDS [1% (w/v)] und Wasserstoffperoxid [0,3% (v/v)] gewaschen, anschließend über Nacht mit UV-Licht bestrahlt und erneut verwendet.

2.4.11 Konstruktion der Plasmide

Die Konstrukte, die bei den Untersuchungen zur Topologie von LuxN mittels *lacZ/phoA*-Fusionen Verwendung fanden, wurden nach folgendem Prinzip hergestellt:

Mit Hilfe eines Antisense-Primers (LuxNE40Nhe-neu-as, LuxNQ150Nhe antisense und LuxNA190Nhe antisense) und dem Primer LuxNBamHI sense wurde per PCR das jeweilige Fragment amplifiziert, welches an der gewünschten Stelle (markiert durch Angabe der Position der letzten vorhandenen Aminosäure) eine NheI-Schnittstelle trug. Mit den Restriktionsenzymen NheI und BamHI wurde das Fragment sequentiell geschnitten und für eine Fusion mit dem *lacZ*-Gen mit dem entsprechend linearisierten Vektor pTPutP(S502)*lacZ* bzw. für eine *phoA*-Genfusion mit dem entsprechend linearisierten Vektor pTPutP(S502)*phoA* ligiert. Der Vektor pTLuxN276*lacZ* entstand durch Umsetzen des Fragments *luxM*-276 durch Restriktion mit NheI und BamHI aus dem Vektor pTLuxNP276*phoA* in den Vektor pTPutP(S502)*lacZ*.

Die Lage des N-Terminus von LuxN wurde mit Hilfe einer Fusion des Gens *luxNb* an *malE* durchgeführt. Hierzu wurde *luxNb* aus pKKLuxNb-6His in die Vektoren pMAL-p2X bzw. pMAL-c2X über die Schnittstellen BamHI und HindIII umgesetzt.

Die pKK-Derivate zur Identifizierung der HAI-1-Bindestelle wurden durch Zwei-Stufen-PCR hergestellt. In der ersten Stufe mit dem Sense 1-Primer pKK7000 und Antisense 1-Primer, der zu dem entsprechenden Aminosäureaustausch führt, entstand das Amplifikat 1. Mit dem Sense 2-Primer, der zum Aminosäureaustausch führt, und dem Antisense 2-Primer LuxNH471Q antisense, entstand das Amplifikat 2. Beide Amplifikate dienten als DNA-Template für die zweite Stufe, die mit dem Primer-Paar pKK7000/LuxNH471Q antisense vorgenommen wurde. Die so hergestellten Gene *luxNbL166R* und *luxNbD70E* wurden mit den Restriktionsenzymen AflII und XhoI geschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pKKLuxNb-6His ligiert. Die Gene *luxNbY50F*, *luxNbY53F*, *luxNbS54A*, *luxNbC56A*, *luxNbI58A*, *luxNbW60F*, *luxNS62A*, *luxNbS63A*, *luxNbY66C*, *luxNbT69V*, *luxNbD70C*, *luxNbP73C*, *luxNbE74Q*, *luxNS78A*, *luxNbK85L*, *luxNbY66D70P73C* wurden alternativ mit den

Restriktionsenzymen XmaI und XhoI geschnitten und in den entsprechend linearisierten Vektor pKKLuxNb-6His ligiert.

Die pFEDLuxN-Derivate für den *in vivo*-Assay in *V. harveyi* BB170 (pFEDLuxNb-6His, pFEDLuxNbL166R-6His, pFEDLuxNbY66C-6His, pFEDLuxNbD70C-6His, pFEDLuxNbP73C-6His und pFEDLuxNbY66D70P73C-6His) wurden folgendermaßen hergestellt: mittels PCR mit dem Primer-Paar pKKLuxNpFED sense/LuxNpFEDAatII antisense wurde eine NcoI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine AatII-Schnittstelle am 3'-Ende des Gens *luxNb*-6His angefügt. Als Template diente hierbei der jeweilige zur Identifizierung der HAI-1-Bindestelle hergestellte pKK-Vektor (s. o.). Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen AatII und NcoI geschnitten. Die Fragmente mussten über den Vektor pUC19-CadC2 subkloniert werden, da die Ligation mit dem Vektor pFED368 schwierig war. Der Vektor pUC19-CadC2 musste nach der Restriktion mit AatII/NcoI zusätzlich mit BamHI geschnitten werden, da es durch AatII/NcoI zu gleichgroßen Fragmenten kam. Das jeweilige *luxNb*-Fragment wurde dann über die Schnittstellen AatII/NcoI mit dem Vektor pUC19-CadC2 ligiert. Die daraus entstandenen pUCLuxN-Plasmide wurden daraufhin mit den Restriktionsenzymen PvuI/HindIII geschnitten, da eine Restriktion mit den Restriktionsenzymen AatII/NcoI wie oben erwähnt, zu zwei gleichgroßen Fragmenten geführt hätte. Die mit PvuI/HindIII-geschnittene DNA wurde danach mit AatII/NcoI geschnitten und in den Vektor pFED368 ligiert.

Die Plasmide zur Verkürzung von LuxO wurden nach dem folgenden Prinzip hergestellt: Das Plasmid pETLuxO1-130-10His entstand durch PCR mit dem Primer-Paar LuxONdeI sense/LuxOT130BamHI antisense und dem Vektor pETLuxO-10His als Template. Das Plasmid pETLuxO1-368-10His entstand durch PCR mit dem Primer-Paar LuxONdeI sense/LuxOV368BamHI antisense und dem Vektor pETLuxO-10His als Template. Beide Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI/BamHI geschnitten und in den entsprechend linearisierten Vektor pETLuxO-10His ligiert.

Für die Konstruktion des Plasmids pMalp-LuxO10His wurde der Vektor pElloLuxO10His mit den Restriktionsenzymen EcoRI/BamHI geschnitten. Das entstandene Fragment wurde in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pMAL-p2X umgesetzt.

2.5 Biochemische und analytische Methoden

2.5.1 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden in der Regel in Abwandlung des Protokolls von Lowry *et al.* (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1977) durchgeführt. Für Lösungen mit geringerer Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford *et al.* (1976) angewendet. Als Standardprotein für die Herstellung von Eichgeraden wurde BSA verwendet.

2.5.2 SDS-Page nach Laemmli (1970)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Dazu wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 7 x 10 cm oder 16 x 20 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 4,9%. Im Trenngel variierte die Acrylamidkonzentration je nach gewünschter Auftrennung der Proteine zwischen 7,5 und 15%. Die SDS-Gele wurden mit Hilfe von Protogel-Fertiglösung [30 % Acrylamid (v/v); 0,8% Bisacrylamid (w/v)] hergestellt. Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit SDS-Probenpuffer versetzt, so dass eine Endkonzentration von 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerol, 2% SDS (w/v), 5% (v/v) β -Mercapto-ethanol und 0,005% (w/v) Bromphenolblau erzielt wurde. Der Gellauf wurde in einer Gellaufanlage (Modell 45-1010-I, Peqlab) bei 200 V bzw. in einer SE400-Elektrophoresekammer (Hoefer) bei 25 mA durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Serva Blau G-250 (Coomassie-Blau) detektiert (Weber und Osborn, 1969), wobei die Färbelösung zur Fixierung der Proteine zusätzlich 10% (w/v) TCA enthielt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in Entfärberlösung mit 5% (v/v) Methanol (alternativ Ethanol) und 7,5% (v/v) Essigsäure. Alternativ wurden die Proteine zum sensitiveren Nachweis mittels Silberfärbung gefärbt (Blum *et al.*, 1987). Zur Konservierung wurden die Gele anschließend bei 80°C in einem Gelrockner GD-4534 (Scie-Plas, UK) getrocknet.

2.5.3 Western-Immunoblot

Die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer Nassblot-Apparatur (Peqlab) durch horizontale Elektrophorese für 1 h bei 300 mA, oder über Nacht bei 80 mA vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell; Porendurchmesser 0,45 μm) transferiert (Western-Blot). Dafür wurden die Membran, das Filterpapier und das Gel vorher kurz in Blotpuffer [25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol] inkubiert. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 1 h bei RT in TBS-Puffer [0,9% (w/v) NaCl; 50 mM Tris/HCl (pH 7,4)] mit 3% (w/v) BSA inkubiert. Als erster Antikörper wurde ein Penta-His-Antikörper in einer Endkonzentration von 1:2500 zugegeben und 1 h bei RT in TBS mit 3% (w/v) BSA inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch mehrfaches Waschen mit TBS + Tween/Triton [20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 500 mM NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20; 0,2% (v/v) Triton X-100] entfernt. Als zweiter Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Mouse-IgG-Antikörper in einer Endkonzentration von 1:2500 zugegeben und der Blot wiederum 1 h bei RT in TBS + 3% (w/v) BSA inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der Immunoblot durch Zugabe einer Färbe-Substratlösung [50 mM Natriumcarbonatpuffer (pH 9,5); 0,01% (w/v) Nitro-Blue-Tetrazolium; 0,045% (w/v) 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat] entwickelt. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Membran zwischen Filterpapier getrocknet. Die Detektion der LacZ- und PhoA-Hybridproteine erfolgte zunächst durch Blockieren unspezifischer Bindungen für 1 h bei RT in TBS-Puffer [0,9% (w/v) NaCl; 50 mM Tris/HCl (pH 7,4)] mit 5% (w/v) Magermilchpulver. Der Primärantikörper gegen LacZ war Anti- β -Galaktosidase-Antikörper, der in einer Endkonzentration von 1:1000 dazu gegeben wurde. Als Primärantikörper gegen PhoA wurde Anti-Mouse-AP-konjugierter Antikörper in einer Endkonzentration von 1:5000 zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde die Membran je 2x für 10 min mit TBS + Tween/Triton [20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 500 mM NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20; 0,2% (v/v) Triton X-100] und 2x für 10 min mit TBS-Puffer [0,9% (w/v) NaCl; 50 mM Tris/HCl (pH 7,4)] gewaschen. Als

Sekundärantikörper wurde AP-konjugiertes Anti-Maus IgG in einer Endkonzentration von 1:2500 zu TBS-Puffer [0,9% (w/v) NaCl; 50 mM Tris/HCl (pH 7,4)] mit 5% (w/v) Magermilchpulver zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Entwicklung des Blots erfolgte wie oben angegeben.

2.5.4 Quantitativer Western-Blot

Quantitative Western-Blots wurden mit einer Auflösung von 300 dpi in 256 Grautönen gescannt und als TIFF-Datei in ImageQuant® (Version 5.0, Molecular Dynamics) importiert.

2.5.5 Präparation von Zellfraktionen zur Gewinnung der Lux-Proteine

Geeignete Expressionsstämme wurden mit Plasmiden transformiert, die für das gewünschte *lux*-Gen codieren. pT-Derivate wurden in den *E. coli*-Stämmen JM109 (LuxN- β -Galaktosidase-Derivate), CC181 (LuxN-Alkalische Phosphatase-Derivate) oder BL21(DE3)/pLysS exprimiert. pKK- und pQE-Derivate wurden zur Expression in JM109 oder TKR2000 transformiert. pET-Derivate wurden in BL21(DE3)/pLysS exprimiert. Die Zellen wurden im entsprechenden Medium bei 37°C aerob bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,5 - 0,8 kultiviert. Die Expression der heterologen Proteine erfolgte nach Induktion der Zellen mit 0,5 mM IPTG für 2 Stunden. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer Sorval RC5C-Zentrifuge für 15 min bei 7000xg und 4°C pelletiert, in Waschpuffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10 mM MgCl₂] resuspendiert und erneut pelletiert. Das Zellpellet wurde in Aufschlusspuffer [50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10% (v/v) Glycerol; 0,5 mM PMSF; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 30 ng/ml DNase] resuspendiert [0,2 g Zellen (Feuchtgewicht)/ml] und nach Homogenisierung mit Hilfe eines Hochdruck-Zellaufschlussgerätes (Constant Cell Disruptor Systems, Modell Basic-Z, IUL Instruments GmbH, Königswinter) bei einem Druck von 1,35 kbar (Düse Ø 0,18 mm) und 4°C aufgeschlossen. Kleine Mengen Zellsuspensionen (bis 10 ml) wurden mittels Ultraschallbehandlung (3x 30 s in Eiswasser mit jeweils 1 min Pause, Branson-Sonifier)

aufgeschlossen. In diesem Fall wurde das Zellpellet zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 10 resuspendiert.

Nicht aufgeschlossene Zellen und *Inclusion Bodies* (Einschlusskörper) wurden durch niedertourige Zentrifugation für 10 min bei 11.200xg und 4°C in einer Sorval RC5C-Zentrifuge (SS34-Rotor) entfernt (*Low Speed Pellet*, LSP). Im Fall von LuxO (aus *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pET-LuxO-10His), das hauptsächlich im LSP zu finden ist, wurde die niedertourige Fraktion bis zur weiteren Verwendung bei -20°C bzw. -80°C aufbewahrt.

Die Cytoplasmamembranen wurden als invertierte Membranvesikel bei 244.000xg (Sorvall@Discovery™ 90 SE oder Beckman Coulter Optima™ L-90K) in 1 h bei 4°C pelletiert und so von den löslichen Proteinen getrennt. Das Membranpellet wurde anschließend in niederionischem Waschpuffer [1 mM Tris/HCl (pH 8,0); 3 mM EDTA] gewaschen und die Membranvesikel in TG-Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 % (v/v) Glycerol] aufgenommen. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -20°C bzw. -80°C.

2.5.6 Präparation von Periplasma

Die Präparation von Periplasma erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Aus einer 3 ml-ÜNK wurden 1 ml Zellen bei 13.200 rpm und 4°C für 1 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Zell-Lyse-Puffer [30 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA; 20% (w/v) Saccharose; 1 mg/ml Lysozym] für 10 min auf Eis resuspendiert. Danach wurden die Zellen wieder bei 13.200 rpm und 4°C für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand (Periplasma) wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Das Zellpellet wurde mit 100 µl 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) resuspendiert und durch 3maliges Einfrieren auf Trockeneis (ca. -78°C) und Auftauen bei 37°C lysiert. Nach Zentrifugation der Suspension bei 13.200 rpm und 4°C für 5 min in Überstand und Pellet, wurde das Pellet in 100 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen. Die Lokalisation der Proteine in den einzelnen Fraktionen erfolgte durch eine SDS-PAGE. Dabei wurden von allen Fraktionen gleiche Volumina aufgetragen.

2.5.7 Präparation von Sphäroplasten und Proteolyse mit Trypsin

Sphäroplasten-Präparation: Für die Präparation von Sphäroplasten wurde LuxN aus *E. coli* TKR2000/pKKLuxNb-6His und aus *E. coli* TKR2000/pMALp-LuxNb-6His bzw. pMALc-LuxNb-6His überproduziert. Die Zellen wurden in KML-Medium bei 37°C aerob bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,5 - 0,8 kultiviert. Die Expression der heterologen Proteine erfolgte nach Induktion der Zellen mit 0,5 mM IPTG für 2 Stunden. Bei einer OD₆₀₀ ~1 wurden die Zellen für 10 min bei 4.500xg und 4°C pelletiert. Die anschließende Präparation der Sphäroplasten erfolgte nach dem Protokoll von Mendrola *et al.* (2002). Die pelletierten Zellen wurden in 90 µl Resuspensionspuffer [100 mM Tris/HCl (pH 7,5); 0,5 M Saccharose; 0,5 M EDTA; 2,5 mg/ml Lysozym] resuspendiert. Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 Volumen eiskaltes H₂O bidest. zugegeben, vermischt und auf Eis inkubiert. Dazu wurde 10 mM MgCl₂ zugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Sphäroplasten kann man im Lichtmikroskop beobachten. Danach wurden die Sphäroplasten durch Zentrifugation bei 500xg und 4°C für 5 min pelletiert. Der Überstand (Periplasma) wurde abgenommen, das Pellet hingegen in 90 µl Resuspensionspuffer (ohne Lysozym) aufgenommen und in 3 µl-Aliquots à 30 µl aufgeteilt.

Proteolyse der Sphäroplasten: Die 30 µl-Aliquots wurden wie folgt behandelt: zu einem Aliquot wurde 3 µl Resuspensionspuffer (ohne Lysozym) und Trypsin [Trypsin:Protein = 1:10 (w/w)], zum zweiten Aliquot wurde 3 µl 10% (v/v) Triton X-100 und Trypsin [Trypsin:Protein = 1:10 (w/w)], und zum dritten Aliquot zur Kontrolle 3 µl Resuspensionspuffer (ohne Lysozym) zugegeben. Die Proteolyse der drei Ansätze wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proteine mit 3,5 µl 100% (w/v) TCA präzipitiert, bei 500xg für 5 min bei RT pelletiert und in 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Zur Lokalisation der Proteine wurden alle drei Ansätze in gleichen Volumina in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

2.5.8 Reinigung von LuxU mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Für die Reinigung von LuxU wurden Zellen einer Kultur von *E. coli* JM109/pQELuxU-6His verwendet. Die Ni²⁺-NTA-Agarose wurde nach Angaben des Herstellers dreimal mit dem zehnfachen Volumen Äquilibriumspuffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10% (v/v) Glycerol; 10 mM Imidazol; 200 mM NaCl; 2 mM β -Mercaptoethanol] äquilibriert. Die für die Reinigung einzusetzende Menge Agarose ergab sich aus der Proteinkonzentration und der Bindekapazität der Ni²⁺-NTA-Agarose (5 - 10 mg/ml abgesetzte Agarose, nach Angaben des Herstellers). Für überproduzierte cytosolische Proteine wird angenommen, dass sie ca. 10% der löslichen Proteine ausmachen.

Zur Bindung des 6His-getaggten Proteins wurde der Proteinrohextrakt mit 500 mM NaCl und 10 mM Imidazol versetzt, zur äquilibrierten Agarose gegeben und 30 min bei 4°C geschwenkt. Nach Absetzen des Säulenmaterials wurde der Überstand entfernt und die Agarose dreimal mit dem zehnfachen Ausgangsvolumen Äquilibriumspuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte zweimal mit Elutionspuffer (Äquilibriumspuffer mit zusätzlich 250 mM Imidazol) in 1/20 des Ausgangsvolumens. Das Eluat wurde bei 4°C für 4 h gegen TG-Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10% (v/v) Glycerol] dialysiert, um das Imidazol zu entfernen. Die Konzentration des gereinigten Proteins wurde nach Bradford (Bradford, 1976) oder Lowry/Petersen (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1977) bestimmt. Die Reinigungsfractionen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.5.9 Solubilisierung, Reinigung und Renaturierung von LuxO

Die Solubilisierung und Reinigung von LuxO erfolgte nach Protokoll 10 und 17 aus „The QIAexpressionist™“ von QIAgen.

Solubilisierung: Zunächst wurde LuxO aus dem LSP, wie in Protokoll 10 beschrieben, solubilisiert. Hierfür wurde das LSP bei 4.500xg für 10 min und 4°C abzentrifugiert, das Pellet gewogen und entsprechend 5 mg Nassgewicht/ml in Lysis-Puffer [Puffer A: 100 mM KH₂PO₄; 10 mM Tris; 6 M Guanidinhydrochlorid; pH 8,0] für

15 - 60 min bei RT gerührt, bis die Lösung lichtdurchlässig wurde. Das Solubilisat wurde bei 10.000xg für 30 min bei RT zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand (Lysat) gereinigt.

Reinigung: Die Reinigung von LuxO erfolgte danach mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie durch Umpufferung mit 8 M Harnstoff und Herabsetzen des pH-Wertes (nach Protokoll 17). Die für die Reinigung einzusetzende Menge Agarose ergab sich aus der Proteinkonzentration und der Bindekapazität der Ni²⁺-NTA-Agarose (5 - 10 mg/ml abgesetzte Agarose, nach Angaben des Herstellers). Die Agarose wurde mit dem 10fachen Volumen Puffer A äquilibriert. Die Bindung des Lysats an die Agarose erfolgte für 20 - 30 min bei RT durch Schwenken. Danach erfolgte die Umpufferung mit 8 M Harnstoff. Dieser war in Puffer C enthalten, mit dem die Agarose 3x im 3fachen Volumen gewaschen wurde [100 mM KH₂PO₄; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff; pH 7,0]. Die Elution erfolgte zunächst 4x in ¼ des Ausgangsvolumens mit Elutionspuffer D [100 mM KH₂PO₄; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff; pH 5,9] und danach 4x in ¼ des Ausgangsvolumens mit Elutionspuffer E [100 mM KH₂PO₄; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff; pH 4,5]. Die Elutionsfraktionen wurden um einen pH 7,5 zu erhalten, sofort in Puffer D mit pH 9,1 bzw. Puffer E mit pH 10,5 aufgefangen. Die Proben wurden bei 4°C aufbewahrt.

Renaturierung: Die Renaturierung des gereinigten LuxO erfolgte durch schrittweise Reduktion des Harnstoffs in Dialysepuffer [50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10% (v/v) Glycerol; 200 mM KCl; 1 mM DTT] über 6 - 3 - 2 - 0,5 M und 2x ohne Harnstoff bei 4°C für je mindestens 3 h. Der erste Dialyseschritt gegen 6 M erfolgte meist über Nacht, ebenso der erst 0 M-Dialyseschritt.

In einem weiteren Versuch wurde 20 µM Lysophosphatidylethanolamin zu 5 µM LuxO in den Dialyseschritten 3 - 2 - 0,5 - 0 M Harnstoff zugegeben. Alternativ wurde LuxO durch Zusatz von 10 mM β-Mercaptoethanol im Reinigungspuffer gereinigt und durch Zugabe von 400 mM L-Arginin in allen Dialysepuffern renaturiert.

2.5.10 Solubilisierung und Reinigung von LuxN mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Die Reinigung von LuxN aus Membranvesikeln erfolgte „im batch“ mittels Ni²⁺-NTA-Agarose. Die für die Reinigung einzusetzende Menge Agarose ergab sich aus der Proteinkonzentration und der Bindekapazität der Ni²⁺-NTA-Agarose (5 - 10 mg/ml abgesetzte Agarose, nach Angaben des Herstellers). Dazu wurde die Ni²⁺-NTA-Agarose 3x mit dem Äquilibrierungspuffer [50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10% (v/v) Glycerol; 10 mM Imidazol; 500 mM KCl; 10 mM β -Mercaptoethanol; 2 mM Pefabloc; 0,05% (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid] äquilibriert. Die Membranvesikel wurden in einer Proteinmenge von 40 mg im Solubilisierungspuffer [50 mM Tris/HCl (pH8,0); 10% (v/v) Glycerol; 500 mM KCl; 10 mM β -Mercaptoethanol; 2 mM Pefabloc] mit 2 ml 2% (v/v) LDAO durch Portionsweise Zugabe [400 μ l/min] für 30 min auf Eis solubilisiert. Nach Zentrifugation der Proben bei 264.000xg und 4°C für 45 min wurde der Überstand mit 10 mM Imidazol versetzt, zur äquilibrierten Ni²⁺-NTA-Agarose gegeben und 30 min bei 4°C geschwenkt. Die Reinigung erfolgte mit drei Waschschrritten mit dem Äquilibrierungspuffer. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte zweimal mit Elutionspuffer [Äquilibrierungspuffer mit zusätzlich 250 mM Imidazol] in 1/20 des Ausgangsvolumens. Das gereinigte Protein wurde vor der Weiterverwendung bei 4°C aufbewahrt.

Alternativ wurde Lysophosphatidylethanolamin in einer Konzentration von 0,25 mg/ml zugesetzt.

2.5.11 Rekonstitution von LuxN

Nach der Reinigung wurde das solubilisierte Membranprotein LuxN, gemäß der von Jung *et al.* (1997) abgewandelten Methode nach Rigaud *et al.* (1995), in Liposomen aus *E. coli*-Phospholipiden (aus: *E. coli* total Lipid-Extract) rekonstituiert. Hierfür wurde das gereinigte solubilisierte Protein zu den zuvor mit 0,47% (v/v) Triton X-100 solubilisierten und in TG-Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10% (v/v) Glycerol] aufgenommenen *E. coli*-Phospholipiden [10 mg/ml] in einem Lipid:Protein-Verhältnis von 25:1 zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss daran erfolgte die

Zugabe von BioBeads, um die Detergenzien zu entfernen. Die BioBeads in TG-Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10% (v/v) Glycerol] wurden in einem BioBeads:Detergenz-Verhältnis von 5:1 zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Danach wurde noch einmal die gleiche Menge BioBeads zugegeben und eine weitere Stunde bei RT gerührt. Anschließend wurden zur Inkubation über Nacht bei 4°C BioBeads in einem BioBeads:Detergenz-Verhältnis von 10:1 zugegeben. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen, 1 h bei 289.000 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in TG-Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10% (v/v) Glycerol] resuspendiert und die Proteoliposomen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proteoliposomen erfolgte bei -20°C (für kurze Zeit) bzw. bei -80°C.

Alternativ wurde LuxN mit extrahierten Phospholipiden aus *V. harveyi* BB120 (siehe 2.5.15) rekonstituiert. Die Solubilisierung des Proteins mit 2% (v/v) LDAO erfolgte wie in 2.5.10 beschrieben. Für die Rekonstitution wurden zwei Solubilisierungstufen getestet: die partielle Solubilisierung mit 0,09% (v/v) LDAO und totale Solubilisierung mit 0,15% (v/v) LDAO. Die *V. harveyi*-Lipide wurden hierzu wie in 2.5.15 extrahiert und anstatt in 0,4 ml Chloroform/Methanol (2:1 v/v), in TG-Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10% (v/v) Glycerol] aufgenommen. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, das Detergenz durch BioBead-Zugabe entfernt und die Proteoliposomen behandelt.

2.5.12 *In vitro*-Phosphorylierung der Lux-Proteine

Alle Phosphorylierungsreaktionen enthielten die zu charakterisierenden Proteine von Anfang an zusammen in einem Ansatz (alternativ wurde LuxU erst nach 1 min Vorinkubation von LuxN zugegeben) und wurden in Phosphorylierungspuffer [50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10% (v/v) Glycerol; 0,5 M KCl; 2 mM DTT] bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Die Reaktion wurde (wenn nicht anders angegeben) durch Zugabe von 100 µM [γ -³²P]-ATP (spezifische Radioaktivität = 0,94 Ci/mmol) und 110 µM MgCl₂ gestartet (Timmen *et al.*, 2006). Für die *in vitro*-Phosphorylierung von LuxO wurde zunächst die Reaktion zusammen mit LuxN und LuxU gestartet und nach 1 min LuxO zugegeben. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden dem Ansatz Proben entnommen und die

Reaktion durch Zugabe von 5x SDS-Probenpuffer gestoppt. Zur Bestimmung des Einflusses von HAI-1 wurde 10% (v/v) zellfreier Kulturüberstand aus *V. harveyi* BB120 (persönliche Gabe von Claudia Anetzberger) oder gereinigter HAI-1 (entweder 50 μM oder im Konzentrationsbereich 1 - 2 - 5 - 10 - 20 - 40 - 80 - 160 μM) zum Ansatz (wie oben) gegeben. Nach ca. 5minütiger Vorinkubation wurde die Reaktion mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ gestartet, zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen und die Reaktion mit 5x SDS-Probenpuffer beendet.

Die Proteinproben wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Quantifizierung wurde kurz vor Ende des Gellaufs ein ATP-Standard ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -Lösung, 1:5000 verdünnt) aufgetragen. Die Gele wurden bei 80°C in einem Gelrockner GD-4534 (Scie-Plas, UK) getrocknet und über Nacht auf einem „Storage Phospho Screen“ (Molecular Dynamics) exponiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mittels „PhosphoImager Storm 820“ (Molecular Dynamics) detektiert und die Phosphorylierung mittels der Software ImageQuant® (Version 5.0, Molecular Dynamics) anhand des ATP-Standards quantifiziert.

2.5.12.1 Bestimmung der Kinaseaktivität

Die Bestimmung der Kinaseaktivität der Hybridsensorkinase LuxN erfolgte wie von Timmen *et al.* (2006) beschrieben. Für die *in vitro*-Phosphorylierung von LuxN und den Phosphotransfer auf das Phosphotransferprotein LuxU wurden LuxN-haltige invertierte Membranvesikel des *E. coli*-Stamms TKR2000 in einer Konzentration von 3 - 8 mg/ml und gereinigtes LuxU in einer Konzentration von 0,1 mg/ml im Reaktionsansatz [entspricht: 144 pmol/Spur] verwendet. Das molare Verhältnis von Sensorkinase zu LuxU betrug etwa 1:20 bzw. 1:30.

2.5.12.2 *In vitro*-Phosphorylierung mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-Acetylphosphat}$

Für die Phosphorylierung von LuxO mit dem niedermolekularen Phosphodonor Acetylphosphat wurde $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-Acetylphosphat}$ nach einem modifizierten Protokoll nach

Stadtman (1957) hergestellt. Hierzu wurden 190 μl Pyridin, 300 μl 0,33 M K_2HPO_4 und 100 μl [^{32}P]-*ortho*-Phosphat (1 mCi) auf Eis unter Rühren inkubiert. 22 μl 98%iges Essigsäureanhydrid wurden langsam zugegeben und insgesamt 6 min auf Eis inkubiert. Mit 4 M LiOH wurde der pH-Wert neutralisiert und das gebildete [γ - ^{32}P]-Acetylphosphat mit 4,5 ml eiskaltem 100%igen Ethanol zur Präzipitation auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde pelletiert, zweimal mit je 5 ml Ethanol gewaschen und über KOH-Pellets über Nacht getrocknet. Nach Aufnahme des getrockneten [γ - ^{32}P]Acetylphosphat in TEGD-Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 5% (v/v) Glycerol; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT] wurde die Konzentration nach Lipman und Tuttle (1945) bestimmt. Die Ausbeute lag bei ca. 80 - 95%, die spezifische Radioaktivität des [γ - ^{32}P]-Acetylphosphat betrug 10 - 13 mCi/mmol. Für die *in vitro*-Phosphorylierung wurden 40 mM [γ - ^{32}P]-Acetylphosphat eingesetzt und die Inkubation der Proteine erfolgte bei 25°C im Thermoblock für bis zu 60 min. Die Reaktion wurde mit 5x SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mittels „Trans-Blot SD semidry“ Anlage (BioRad, München) für 20 min bei 20 V auf eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 μm) geblottet und auf einem „Storage Phospho Screen“ (Molecular Dynamics) exponiert. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Proteine mittels „PhosphoImager Storm 820“ (Molecular Dynamics) detektiert.

2.5.13 DNA-Bindeexperimente

Gelretardationsexperimente wurden in Anlehnung an das Protokoll von Fried und Crothers (1981) durchgeführt. Die DNA-Fragmente „spezifische DNA“ (bp -258 stromabwärts des Start-Codons von *luxO* bis +116 stromaufwärts des Start-Codons von *luxO*) und „unspezifische DNA“ (bp +1 bis +110 stromaufwärts des Start-Codons von *luxO*), wurden durch Annealing der Oligonukleotide Qrr1-BamHI und Qrr1Promotor-EcoRI („spezifische DNA“), LuxONdeI sense und LuxO(110)BamHI antisense („unspezifische DNA“) als Primern, wie in 2.4.8 beschrieben, hergestellt.

Die Markierung der DNA-Fragmente am 5'-Ende erfolgte wie unter 2.4.8 beschrieben. Die Phosphorylierung des Antwortregulators LuxO im Dialysepuffer

[50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 1 mM DTT; 10% Glycerol] erfolgte mit 40 mM kaltem (nicht-radioaktiv markierten) Acetylphosphat im Phosphorylierungspuffer [50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 1 mM DTT; 10% Glycerol; 20 mM MgCl₂] für 1 h bei 30°C in einem Volumen von 100 µl. LuxO hatte dabei eine Konzentration von 1,83 µM.

Für das DNA-Bindeexperiment wurden verschiedene Proteinkonzentrationen (1,5 – 4,5 – 13,5 – 40,5 – 121,5 – 364,5 – 1093,5 nM LuxO) eingesetzt. Zur jeweiligen Proteinkonzentration (Volumen: 21 µl) wurden für einen 30 µl Ansatz, 5,9 µl LuxO-Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 1 mM DTT; 10% (v/v) Glycerol], 1,5 µl Lachssperma-DNA [1 mg/ml], als unkompetitiver Inhibitor, und 1,5 µl [γ -³²P]-ATP-markierte DNA zugegeben. Der Versuchsansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 6 µl 3x Sucrose-Dye-Solution (0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol; 40% (w/v) Saccharose) abgestoppt. Die Proben wurden auf ein 5%iges natives PAA-Gel [37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid] aufgetragen. Als Laufpuffer diente 0,5fach TBE-Puffer [44,5 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; 44,5 mM Borsäure; pH 8,3]. Der Gellauf erfolgte für 1 - 2 h bei konstant 200 V. Anschließend wurde das Gel 1 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Die Exposition erfolgte für 2 h im „Storage Phospho Screen“ (Molecular Dynamics).

2.5.14 Bestimmung der β -Galaktosidase- und Alkalische Phosphatase Reportergen-Aktivitäten

Für die Bestimmung der Reportergen-Aktivitäten der β -Galaktosidase- oder Alkalische Phosphatase-LuxN-Hybridproteine wurden Zellen mit dem zu testenden Plasmid transformiert. Um die Expression der Hybridproteine zu steigern, wurde das Helferplasmid pT7Pol26 (enthält das Gen für die T7-Polymerase unter Kontrolle des *lac*-Promotors) cotransformiert. Die Zellen wurden in KML-Vollmedium aerob bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,5 - 0,8 kultiviert und die Expression der T7-Polymerase des Helferplasmids und der Hybridproteine dann für 2 - 3 h mit 0,5 mM IPTG induziert, bevor ein Aliquot der Zellsuspension (0,25 – 2 ml) bei 16.000xg für 1-3 min

abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet eingefroren. Für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (Miller, 1972) wurde das Zellpellet in 1 ml 200 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen. Zum Aufschluss der Zellen wurde 100 μ l 99% Chloroform und 50 μ l 0,1% (w/v) SDS zugegeben, gemischt und 5 min bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 200 μ l oNPG (4 mg/ml) wurde die Reaktion gestartet. Nach Gelbfärbung wurde die Reaktion mit 500 μ l 1 M Na₂CO₃ abgestoppt und Zelltrümmer bei 16000xg für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde die Intensität der durch die Reaktion hervorgerufenen Färbung als Absorption bei 420 nm (A_{420}) im Photometer bestimmt.

In ähnlicher Weise wurde mit den Proben zur Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase verfahren (Brickman und Beckwith, 1975). Das Zellpellet wurde in 1 ml Tris/Zink-Puffer [1 M Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM ZnCl₂] resuspendiert. Die Zellen wurden mit 50 μ l 99% Chloroform und 25 μ l 0,1% (w/v) SDS aufgeschlossen. Durch Zugabe von 200 μ l pNPP (p-Nitrophenyl-Phosphat) (4 mg/ml) wurde die Reaktion gestartet und nach Gelbfärbung mit 500 μ l 2,5 M K₂HPO₄ gestoppt. Vor der Messung der Absorption bei 420 nm wurden die Zelltrümmer 10 min bei 16.000xg abzentrifugiert.

Die Aktivität der Reporterproteine wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität [Units]} = (A_{420} \times 1000) / (t \times V \times OD_{600})$$

A_{420} ist die Absorption der Reaktionslösung, t die Reaktionszeit, V das Probenvolumen in ml und OD_{600} die optische Dichte der Zellsuspension.

2.5.15 Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie

Lipidextraktion: Die Extraktion der Phospholipide aus *E. coli* MG1655 und *V. harveyi* BB120 erfolgte nach Minnikin, *et al.* (1984). Zunächst wurden die Zellen in entsprechendem Medium kultiviert: *E. coli* in LB-Medium bei 37°C und *V. harveyi* in LM-Medium bei 30°C. Das Wachstum erfolgte bis zur exponentiellen Phase ($OD_{600} \sim 1$). Danach wurden die Zellen für 15 min bei 7.000xg und 4°C abzentrifugiert. Anschließend

wurden die Zellen in Waschpuffer [50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM MgCl₂] gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden gewogen, in 0,5g-Aliquots in N₂ (l) schockgefroren und bis zur nächsten Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Zur Analyse wurden 0,5 g Zellen (Feuchtgewicht) in Pyrex-Röhrchen mit 2,3 ml Chloroform/Methanol/0,3% (w/v) NaCl-Lösung (90:100:30 v/v) bei RT für 1 h unter Schütteln „End over end“ inkubiert. Der Extraktionsansatz wurde anschließend 3 min bei 2.000xg und RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Pyrex-Röhrchen überführt. Mit dem Pellet wurde ein zweiter und dritter Extraktionsschritt durch Zugabe von 0,75 ml Chloroform/Methanol/0,3% (w/v) NaCl-Lösung (50:100:40 v/v) mit jeweils 30 min „End over end“-Schütteln bei RT und anschließendes Zentrifugieren für 3 min bei 2.000xg und RT durchgeführt. Die Überstände wurden vereinigt, mit 1,3 ml Chloroform und 1,3 ml 0,3% NaCl versetzt und die Röhrchen 2x vorsichtig gedreht. Danach wurden die Lipid-Lösung für 3 min bei 2.000xg und RT zentrifugiert. Von den zwei entstandenen Phasen wurde die untere vorsichtig abgenommen; die obere Phase wurde verworfen. Die untere Phase wurde durch Begasung mit Argon (g) zur Trockne eingengt. Die Lipide wurden gewogen und in 0,4 ml Chloroform/Methanol (2:1 v/v) aufgenommen.

Dünnschichtchromatographie: Von den Lipiden wurde je 1 mg auf eine Kieselgel 60 DC-Alufolie (10 x 10 cm) aufgetropft und einer 2-dimensionalen Chromatographie unterzogen. Das Laufmittel für die erste Dimension enthielt Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4 v/v), das für die zweite Dimension Chloroform/Essigsäure/Methanol/Wasser (80:15:12:4 v/v). Nach Trocknung der Platten wurden diese mit Ninhydrin-Reagenz besprüht und 5 min bei 100°C inkubiert. Nach Abkühlung wurden die Platten mit Molybdänblau-Sprühreagenz (1,3% Molybdänoxid in 4,2 M H₂SO₄) besprüht.

2.5.16 Trübungsmessung der Solubilisierung von *V. harveyi* BB120-Phospholipiden

Für die Trübungsmessung der Solubilisierung von Phospholipiden wurde zunächst der Lipidgehalt von *V. harveyi* mit dem von *E. coli* gleichgesetzt. Der Phospholipidgehalt in

E. coli wurde von Ames *et al.* (1968) untersucht und beträgt 3,4% des Trockengewichts. Das Trockengewicht wiederum macht 20 - 30% des Feuchtgewichts aus. Für 0,5 g Zellen (Feuchtgewicht) von *V. harveyi* wurde angenommen, dass 20% (w/w) ca. 0,1 g Zellen Trockengewicht und damit 3,4 mg Lipiden entsprechen.

Die *V. harveyi*-Phospholipide wurden entsprechend 2.5.15 kultiviert und extrahiert, sodass sie in einem Phospholipidgehalt von ca. 1,5 mg/ml in H₂O bidest. und 2 mM β -Mercaptoethanol aufgenommen werden konnten. Die Lipidsuspension wurde in einer Küvette in einem Volumen von 1 ml durch schrittweise Erhöhung von 1 μ l bzw. 5 μ l Zugabe von 30% (v/v) LDAO bzw. 3% (v/v) Triton X-100 solubilisiert. Die Solubilisierung wurde durch Absorptionsmessung bei 600 nm in einem Spektralphotometer (Beckman DU640) durchgeführt. Die Änderung der Absorption wurde kontinuierlich bis zur Einstellung eines Gleichgewichts verfolgt. Entsprechend der Zugabe konnte die eingesetzte Menge der Detergenzien errechnet und graphisch gegen die Absorption dargestellt werden.

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 Circulardichroismus-Analyse von LuxO

Das Fern-UV-Circulardichroismus-Spektrum des gereinigten und renaturierten Proteins LuxO wurde mit dem Spektropolarimeter Jasco J-810 des Botanischen Instituts der LMU mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Hugo Scherr (Emeritus des Botanischen Instituts) durchgeführt. Hierfür wurden 250 μ l der einzelnen Dialyseschritte aus 2.5.9 mit einer Absorption von 0,2 bei 280 nm verwendet. Die Extinktionen wurden im „Spekol 1100“ Photometer (Analytic Jena, Jena) gemessen. Das CD-Spektrum wurde bei 10°C in einem Absorptionsbereich von 250 – 190 nm durchgeführt.

3 Ergebnisse

Das Quorum sensing-System in *V. harveyi* ist bisher hauptsächlich mittels genotypischer Studien untersucht worden. Biochemische Studien wurden bisher kaum durchgeführt. Erste Arbeiten zur Hybridsensorkinase LuxN zeigten eine vom Autoinduktor HAI-1 abhängige Kinaseaktivität und eine Phosphataseaktivität unabhängig von HAI-1. Ebenso konnte das Protein LuxU charakterisiert werden (Timmen, 2005; Timmen *et al.*, 2006). Auch die Hybridsensorkinase LuxQ wurde mittlerweile zusammen mit LuxP näher charakterisiert und zeigte ebenfalls eine vom Autoinduktor AI-2 abhängige Kinaseaktivität, aber unabhängige Phosphataseaktivität (Stambrau, 2008). Ziel dieser Arbeit war es, die Proteinkomponenten LuxN und LuxO bezüglich ihrer Rolle in der Signaltransduktionskaskade weiter zu charakterisieren.

3.1 Untersuchungen zur Topologie von LuxN mittels Reporterfusionen

Für das Membranprotein LuxN wurde mit Hilfe diverser Analyse-Programme [TopPred (Claros und Heijne, 1994), Tmpred (Hofmann und Stoffel, 1993), SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) und TMHMM (Krogh *et al.*, 2001)] eine Sekundärstruktur mit bis zu neun transmembranen Domänen vorhergesagt.

Zur genauen Bestimmung der Topologie von LuxN wurden Reporterfusionen von *luxN* in den vorhergesagten transmembranen Domänen bzw. cytoplasmatischen und periplasmatischen Schleifen an die Reportergene *lacZ* und *phoA* vorgenommen (Timmen, 2005). Die schon untersuchten Reporterfusionen wurden in der vorliegenden Arbeit durch folgende Fusionspunkte ergänzt: E40, Q150 und P276 (*lacZ*-Konstrukt), sowie A190 (*phoA*-Konstrukt). Hierfür wurden wie unter 2.4.11 beschrieben *luxN*-Fragmente unterschiedlicher Länge (ausgehend vom Startcodon) mit dem *lacZ*- bzw. *phoA*-Gen fusioniert. Zur Bestimmung der Aktivität und zum Nachweis der Hybridproteine wurden die Stämme *E. coli* JM109 (für *lacZ*) bzw. *E. coli* CC181 (für *phoA*) wie in Timmen (2005) beschrieben, mit den Plasmiden, die für die vier Reporterproteine codieren, zusammen

mit dem Helferplasmid pT7Pol26 transformiert und die Zellen kultiviert (siehe 2.5.5). Das Helferplasmid pT7Pol26 codiert für die T7-Polymerase und wurde verwendet, um die Produktion der Hybridproteine zu steigern und den immunologischen Nachweis, besonders der inaktiven Derivate, zu ermöglichen (Mertens *et al.*, 1995).

Die Reporterogenaktivitäten der β -Galaktosidase (BG)- und alkalische Phosphatase (AP) wurden wie unter 2.5.15 beschrieben gemessen. In Tab. 3.1 sind die BG- und AP-Aktivitäten in Miller Units, das Verhältnis der einzelnen Aktivitäten zueinander und die daraus ermittelte Lokalisation der Fusionspunkte aufgelistet. Für die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurden je 3 unabhängige Messwerte herangezogen. Dabei deutet das Verhältnis BG:AP mit einem Wert > 6 auf eine cytoplasmatische Lokalisation der Fusionspunkte, ein Verhältnis ≤ 6 auf eine periplasmatische Lokalisation hin. Für den Fusionspunkt S305 wurde keine alkalische Phosphatase-Reporterogenaktivität getestet, da sich dieser Fusionspunkt durch die Lokalisation der Histidinkinase- (H471) und Aspartatkinasedomäne (D771) im Cytoplasma befinden muss. Die hohen Standardabweichungen, z. B. für den Fusionspunkt V114 (203 ± 133 Miller Units), deuten auf starke Schwankungen der Messwerte hin. Dies liegt wahrscheinlich an diversen Ungenauigkeiten im Mess-System. So wurden die Proteinderivate wahrscheinlich nicht bei jeder Kultivierung im gleichen Maße exprimiert, da konstant gleiche Kultivierungsbedingungen nicht gewährleistet werden konnten. Zum anderen wurden die Aktivitäten auf die Zeit bezogen, die benötigt wird, um eine ausreichende Gelbfärbung zu erhalten, was bei verschiedenen Messreihen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann.

Tab. 3.1: β -Galaktosidase- (BG) und Alkalische Phosphataseaktivitäten (AP) der LuxN-LacZ- und LuxN-PhoA-Hybridproteine. Die entlang des *luxN*-Gens stromabwärts gelegenen Fusionspunkte sind im Einbuchstabencode mit der Position der entsprechenden Aminosäure angegeben. Die Aktivitäten sind in Miller Units angegeben. Ein Verhältnis BG:AP > 6 entspricht einer Lokalisation im Cytoplasma, ≤ 6 einer Lokalisation im Periplasma.

Konstrukt (Fusionspunkt)	BG-Aktivität [Miller Units]	AP-Aktivität [Miller Units]	Verhältnis BG:AP	Lokalisation
Kontrolle	$2 \pm 2^{1,2}$	$1 \pm 0^{1,2}$	2	
LuxN1-40 (E40)	1768 ± 162^1	$25 \pm 9^{1,2}$	70	Cytoplasma
LuxN1-50 (Y50)	465 ± 101^2	2 ± 0^2	233	Cytoplasma
LuxN1-61 (I61)	102 ± 52^2	179 ± 61^2	0.6	Periplasma
LuxN1-69 (T69)	1 ± 1^2	1 ± 1^2	1	Periplasma
LuxN1-109 (Q109)	858 ± 263^2	12 ± 8^2	70	Cytoplasma
LuxN1-114 (V114)	203 ± 133^2	3 ± 1^2	76	Cytoplasma
LuxN1-150 (Q150)	857 ± 265^1	150 ± 20^2	6	Periplasma
LuxN1-183 (N183)	378 ± 245^2	$25 \pm 3^{1,2}$	15	Cytoplasma
LuxN1-190 (A190)	412 ± 66^2	14 ± 2^1	28	Cytoplasma
LuxN1-217 (M217)	48 ± 24^2	$18 \pm 4^{1,2}$	3	Periplasma
LuxN1-247 (Y247)	986 ± 208^2	7 ± 5^2	132	Periplasma
LuxN1-276 (P276)	220 ± 23^1	90 ± 5^2	2	Periplasma
LuxN1-305 (S305)	$1113 \pm 93^{1,2}$	n.ü. ³	n.ü. ³	Cytoplasma

¹Daten dieser Arbeit

²Daten von Melanie Timmen bzw. Matthias Polkahn (unveröffentlichte und veröffentlichte Daten aus: Timmen, 2005)

³n.ü.: nicht überprüft

Die LuxN-LacZ/PhoA-Hybridproteine der Fusionspunkte E40, Y50, Q109, V114, Q150, N183, A190, L229, Y247 und S305 zeigten eine mittlere bis hohe BG-Aktivität, wohingegen die Hybridproteine der Fusionspunkte I61, Q150 und P276 eine hohe AP-

Gens stromabwärts gelegenen Fusionspunkte wurden die Hybridproteine in zunehmender Größe produziert. Abbaubanden, die der Größe der Reporterproteine entsprachen, wurden in nahezu allen Proteinproben detektiert. Trotz der Verwendung des Helferplasmids konnte eine gewisse Instabilität der Hybridproteine nicht verhindert werden. Derartige Ergebnisse wurden auch schon in anderen Studien beschrieben (Buhr und Erni, 1993; Haardt und Bremer, 1996; Jung *et al.*, 1998; Pourcher *et al.*, 1996). Die Hybridproteine LuxN1-50-PhoA, LuxN1-69-PhoA, LuxN1-114-PhoA und LuxN1-183-PhoA waren so instabil, dass sie nicht detektiert werden konnten (Abb. 3.2B).

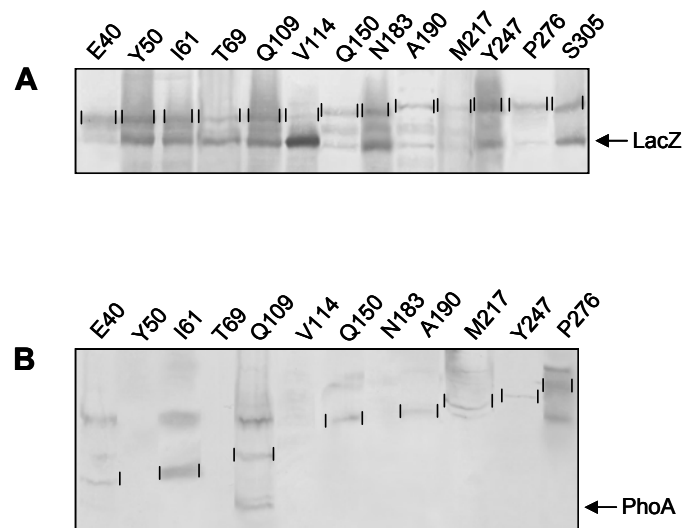


Abb. 3.2: Immunologische Detektion der LuxN-LacZ- und LuxN-PhoA-Hybridproteine. Dargestellt sind in (A) die LuxN-LacZ-Hybridproteine, in (B) die LuxN-PhoA-Hybridproteine. Die entlang des *luxN*-Gens stromabwärts gelegenen Fusionspunkte an *lacZ* bzw. *phoA* sind im Einbuchstabencode mit der Position der entsprechenden Aminosäure angegeben: E40, Y50, I61, T69, Q109, V114, Q150, N183, A190, M217, Y247, P276. Mittels 7,5%iger SDS-PAGE wurden je 200 µg Protein/Spur aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte mit Anti-β-Galaktosidase-Antikörper gegen LacZ und Anti-Alkalische Phosphatase-Antikörper gegen PhoA. Die Hybridproteine sind mit schwarzen Strichen markiert. Die Abbaubanden entsprechen den Reporterproteinen LacZ und PhoA. Die Konstrukte, die trotz des Einsatzes des Helferplasmids pT7Pol26 nicht nachgewiesen werden konnten, waren LuxN1-50-PhoA, LuxN1-69-PhoA, LuxN1-114-PhoA und LuxN1-183-PhoA.

Zusammen mit den Ergebnissen der Reportergenaktivitäten und der Verteilung positiv und negativ geladener Aminosäuren, entsprechend der „*positive inside rule*“ (von Heijne,

1992), können 8 Transmembrandomänen mit dazwischen liegenden periplasmatischen und cytoplasmatischen Schleifen im Bereich der Aminosäuren 40 – 305 (TM II-IX; Abb. 4.1) als gesichert angenommen werden. Die Lokalisation des N-Terminus blieb weiterhin unklar, sodass dieser anderweitig untersucht werden musste, um die Topologie von LuxN vollständig aufklären zu können (Kap. 3.2). Erste Untersuchungen diesbezüglich von Timmen (2005) wiesen auf eine periplasmatische Lage des N-Terminus und damit auf 9 Transmembrandomänen hin.

3.2 Untersuchung der Lokalisation des N-Terminus mit dem Maltosebindeprotein

Zur Aufklärung des N-terminalen Bereichs von LuxN (Aminosäuren 1 - 40) wurde eine neue Strategie verfolgt. In diesem Experiment wurde der N-Terminus von LuxN an das Maltosebindeprotein (MBP) fusioniert. Zum Vergleich wurden hierbei zwei unterschiedliche MBPs angewendet. Zum einen wurde LuxN an das MBP mit der Signalsequenz für den Transport des Proteins ins Periplasma (MBP_p-LuxN), zum anderen an das MBP ohne Signalsequenz (MBP_c-LuxN) fusioniert (siehe 2.4.11). Anschließend wurden die beiden Hybridproteine MBP_p-LuxN - mit dem N-Terminus im Periplasma - und MBP_c-LuxN - mit dem N-Terminus im Cytoplasma - heterolog in *E. coli* überproduziert. Aufgrund der postulierten 9 Transmembrandomänen wurde angenommen, dass sich der N-Terminus im Periplasma befindet. Entsprechend wäre ein Hybridprotein mit dem MBP im Periplasma korrekt gefaltet und damit das Protein enzymatisch aktiv (Abb. 3.3A). Das Hybridprotein MBP_c-LuxN mit dem im Cytoplasma lokalisierten MBP wäre hingegen nicht korrekt gefaltet und dementsprechend inaktiv (Abb. 3.3B).

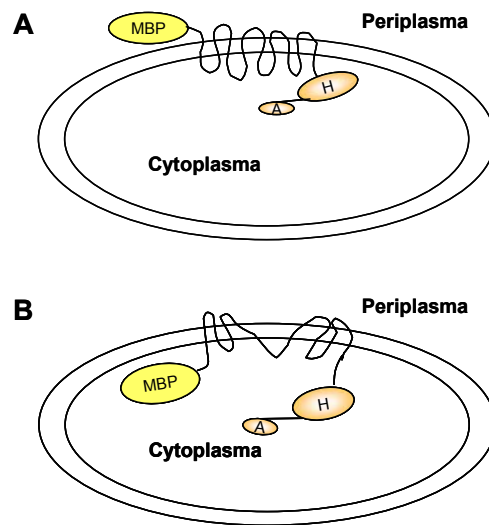


Abb. 3.3: Vorhersage der Orientierung der MBP-LuxN-Hybridproteine. Dargestellt sind das Hybridprotein mit dem MBP im Periplasma (MBP_p-LuxN), das aufgrund der Vorhersage von 9 Transmembrandomänen von LuxN durch die Position des MBP im Periplasma wahrscheinlich korrekt gefaltet ist (A), sowie das Hybridprotein mit dem MBP im Cytoplasma (MBP_c-LuxN) und der dadurch vermutlich inkorrekten Faltung von LuxN (B). **MBP:** Maltosebindeprotein, **H:** konservierter Histidinrest, **A:** konservierter Aspartatrest.

3.2.2 *malE*-Komplementation von *E. coli* MM39

Durch Komplementation von *E. coli* MM39, einem Stamm ohne MBP, konnte die Lokalisation und Aktivität des MBP in den MBP-LuxN-Hybridproteinen nachgewiesen werden. Der *malE*-defiziente Stamm wächst nur dann, wenn Maltose in die Zelle transportiert werden kann. Das Maltosebindeprotein muss hierfür im Periplasma lokalisiert und aktiv sein, um die Maltose dort zu binden und an den Maltosetransporter MalFGK₂ abzugeben, über den sie ins Cytoplasma transportiert wird. Die *malE*-Komplementation wurde daher bezüglich der Wachstumsfähigkeit des Stammes MM39 auf M9-Minimalmedium mit 0,1% Maltose als einziger Kohlenstoffquelle untersucht. Zum Vergleich wurde der Wildtyp-Stamm *E. coli* MG1655, der Stamm *E. coli* MM39, transformiert mit den Leerplasmiden pMAL-p2X und pMAL-c2X, sowie den Plasmiden pMAL_p-LuxN und pMAL_c-LuxN, als auch nicht-transformierte *E. coli* MM39 auf dem Agar ausgestrichen (siehe 2.4.10.1). Wie erwartet, konnten nur solche Stämme wachsen, bei denen das Maltosebindeprotein periplasmatisch lokalisiert und aktiv war: *E. coli*

MG1655, und der Stamm *E. coli* MM39 mit dem periplasmatisch lokalisierten MBP (*E. coli* MM39/pMAL-p2x und *E. coli* MM39/pMAL_p-LuxN). Stämme, bei denen das MBP cytoplasmatisch lokalisiert war, konnten nicht wachsen: *E. coli* MM39/pMAL_c-LuxN und *E. coli* MM39/pMAL-c2x (Abb. 3.4).

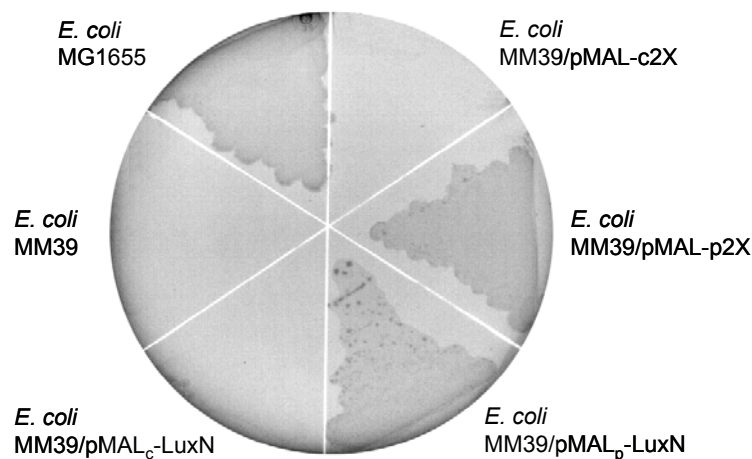


Abb. 3.4: Komplementation von *E. coli* MM39 (*malE*⁻) mit den MBP-LuxN-Hybridproteinen. Transformiert wurden MM39-Zellen mit den Plasmiden pMAL-p2X, pMAL-c2X, pMAL_p-LuxN und pMAL_c-LuxN. Als Kontrolle dienten *E. coli* MG1655, nicht-transformierte und die mit den Leerplasmiden (pMAL-p2X, pMAL-c2X) transformierte MM39-Zellen.

3.2.3 Autokinase- und Phosphotransferaseaktivität der MBP-LuxN-Hybridproteine

Mit dem Test auf die Autokinase- und Phosphotransferaseaktivität von LuxN wurde untersucht, ob die MBP-LuxN-Hybridproteine enzymatisch aktiv sind. Wie in Abb. 3.3 dargestellt, wurde erwartet, dass nur das Hybridprotein enzymatisch aktiv ist, bei dem der N-Terminus auf der Seite der Membran lokalisiert ist, die die korrekte Faltung von LuxN bedingt (Abb. 3.3A). Ausgehend von den 9 postulierten Transmembrandomänen wäre dies der Fall, wenn der N-Terminus im Periplasma lokalisiert ist. Für die Messung des Phosphotransfers von LuxN auf LuxU wurden die Hybridproteine im F₁F₀-ATP-Synthase-defizienten Stamm *E. coli* TKR2000 überproduziert (2.5.5) und in Form von Membranvesikeln für die *in vitro*-Phosphorylierung eingesetzt (siehe 2.5.12 und 2.5.12.1). Das Hybridprotein mit dem periplasmatisch überproduzierten MBP (MBP_p-LuxN) zeigte

sowohl Autokinase- als auch Phosphotransferaseaktivität in ähnlicher Größenordnung wie LuxN-WT (Abb. 3.5A, Spur 3 bzw. 1). Dabei war eine zeitabhängige Phosphorylierung von LuxU zu beobachten. Das autophosphorylierte LuxN ist wie schon zuvor von Timmen *et al.* (2006) gezeigt, im Gegensatz zum phosphorylierten LuxU bei dem *in vitro*-Versuch kaum detektierbar. Die Menge der überproduzierten Proteine war dabei sehr unterschiedlich. Für den Phosphotransfer wurden gleiche Mengen von LuxN eingesetzt, woraus allerdings unterschiedliche Mengen eingesetzter Membranvesikel pro Spur resultierten (Abb. 3.5B). Das Hybridprotein mit dem cytoplasmatisch lokalisierten MBP (MBP_c-LuxN) hingegen zeigte, wenngleich in ausreichenden Mengen produziert, keine enzymatische Aktivität. Diese Ergebnisse werden durch die immunochemische Detektion mit dem Penta-His-Antikörper verdeutlicht (Abb. 3.5B, Spur 1-3) und zeigen, dass LuxN nur dann richtig in der Membran gefaltet ist, wenn MBP periplasmatisch fusioniert ist. Da der Penta-His-Antikörper nicht sehr sensitiv ist, wurden zur Kontrolle Membranvesikel aus *E. coli* TKR2000 ohne Plasmid und Zusatz von LuxU immunochemisch mitbehandelt, die außer LuxN die gleichen Proteinbanden aufwiesen wie die Membranvesikel aus den transformierten Zellen (Abb. 3.5B, Spur 4).

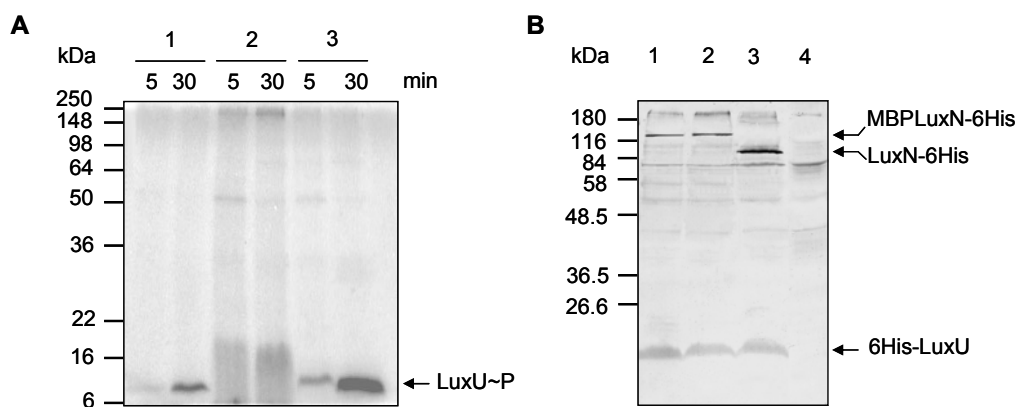


Abb. 3.5: Autokinase- und Phosphotransferaseaktivität von LuxN-WT und den MBP-LuxN-Hybridproteinen. LuxN-haltige Membranvesikel wurden mit 100 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ für 1 min bei RT vorinkubiert, bevor gereinigtes LuxU (2 $\mu\text{g}/\text{Spur}$) zugegeben wurde. Nach 5 und 30 min wurden Proben genommen, mit 5x SDS-Probenpuffer vermischt und durch eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Die Exposition erfolgte mit einem Phosphor-Screen. Der immunologische Nachweis wurde mit dem Penta-His-Antikörper durchgeführt. Für die Phosphorylierung wurden gleiche Mengen an LuxN eingesetzt. Zur Kontrolle wurden Membranvesikel aus *E. coli* TKR2000 ohne Plasmid und Zusatz von LuxU aufgetragen. **A:** Autoradiogramm, **B:** Western Blot. **1:** MBP_p-LuxN-6His (9,6 $\mu\text{g}/\text{Spur}$), **2:** MBP_c-LuxN-6His (70 $\mu\text{g}/\text{Spur}$), **3:** LuxN-6His (51 $\mu\text{g}/\text{Spur}$), **4:** *E. coli* TKR2000 (25 $\mu\text{g}/\text{Spur}$).

3.2.4 Zugänglichkeitsstudien an den MBP-LuxN-Hybridproteinen

Zur weiteren Bestimmung der Lokalisation des N-Terminus von LuxN wurden Protease-Zugänglichkeitstudien an den MBP-LuxN-Hybridproteinen und dem Wildtyp-Protein durchgeführt. Mit dem Programm „*Peptide Cutter*“ (Gasteiger *et al.*, 2005) (<http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/>) wurde die Protease Trypsin ermittelt, deren Schnittstellen die Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) sind. Diese Aminosäuren kommen nur im Maltosebindeprotein, in den vorhergesagten Transmembrandomänen und cytoplasmatischen Schleifen vor. Die vorhergesagten periplasmatischen Schleifen dagegen bleiben vom Trypsin unberührt (Abb. 3.6). Das Hybridprotein MBP_p-LuxN mit den postulierten 9 Transmembrandomänen hat die entsprechenden Schnittstellen im MBP, in den Transmembrandomänen und im Cytoplasma (Abb. 3.6A). In Abb. 3.6B ist das Hybridprotein MBP_c-LuxN mit acht Transmembrandomänen gezeigt, bei dem sich drei Trypsin-Schnittstellen im Periplasma im Bereich vor der zweiten vorhergesagten Transmembrandomäne befinden würden.

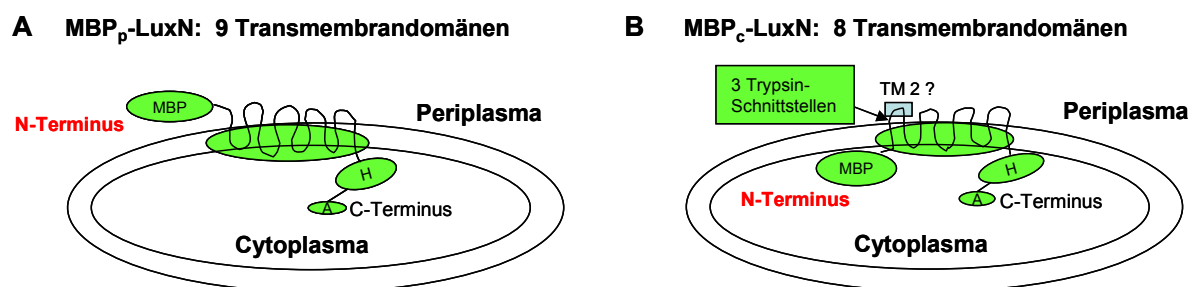


Abb. 3.6: Vorhersage der Anzahl der Transmembrandomänen in LuxN. Dargestellt sind in (A) das MBP_p-LuxN mit 9 Transmembrandomänen und dem N-Terminus im Periplasma, in (B) das MBP_c-LuxN mit 8 Transmembrandomänen und dem MBP im Cytoplasma. Grün markiert sind die Bereiche mit den vorhergesagten Trypsin-Schnittstellen. Blau gekennzeichnet ist der Bereich der zweiten Transmembrandomäne (TM2), vor dem sich 3 Trypsin-Schnittstellen befinden würden. **MBP**: Maltosebindeprotein, **H**: konservierter Histidinrest, **A**: konservierter Aspartatrest.

Für die Zugänglichkeitsstudien wurden wie in 2.5.7 beschrieben Sphäroplasten aus *E. coli* TKR2000 mit dem Wildtyp-Protein und den beiden Hybridproteinen präpariert.

Diese wurden einmal mit und einmal ohne Trypsin für 30 min bei 37°C inkubiert. Der anschließende immunologische Nachweis mit dem Penta-His-Antikörper dokumentierte, dass das Hybridprotein MBP_c-LuxN durch die Behandlung mit Trypsin vollständig erhalten blieb, wohingegen beim MBP_p-LuxN das Maltosebindeprotein abgebaut wurde (Abb. 3.7). Zusätzlich wurden die Sphäroplasten mit dem Detergenz Triton X-100 permeabilisiert, sodass MBP-LuxN komplett durch die Protease zugänglich wurde, wodurch ein vollständiger Abbau erfolgte.

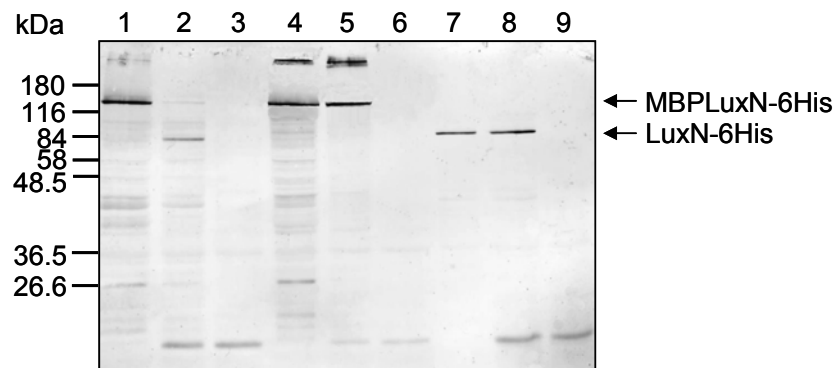


Abb. 3.7: Zugänglichkeitsstudien an den MBP-LuxN-Hybridproteinen mit Trypsin. MBP_p-LuxN-6His (Spur 1-3), MBP_c-LuxN-6His (Spur 4-6), und LuxN-6His (Spur 7-9) wurden mit bzw. ohne Trypsin (1:10, w/w), sowie zur vollständigen Permeabilisierung der Proteine mit dem Detergenz Triton X-100 (10% v/v) für 30 min bei 37°C inkubiert. Aufgetragen wurden 30 µg Protein/Spur. Die Proben wurden in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem Penta-His-Antikörper. **1/4/7:** Behandlung ohne Trypsin, **2/5/8:** Behandlung mit Trypsin, **3/6/9:** Behandlung mit Trypsin und Triton X-100.

Die unter 3.2 dargestellten Ergebnisse weisen daraufhin, dass es sich bei LuxN um ein Membranprotein mit neun Transmembrandomänen handelt, dessen N-Terminus periplasmatisch lokalisiert ist.

3.3 Versuche zur Identifizierung der HAI-1-Bindestelle in LuxN

Für die weitere Charakterisierung des Proteins LuxN sollte die Bindestelle des Autoinduktors HAI-1 identifiziert und näher untersucht werden. Freeman *et al.* (2000) entdeckten bei einer ungerichteten Mutagenese des Gens *luxN* eine Mutation, die zu dem Aminosäureaustausch im Protein an Position 166 durch Arginin führte (L166→R). Diese Mutation bewirkte, nach Ersetzen des $\Delta luxN$ -Cm^R-Allels mit dem *luxN*L166→R-Allel im Chromosom von *V. harveyi* BNL63, einen dunklen Phänotyp des Bakteriums. Die Autoren vermuteten hier eine sensorische Domäne, die an der Wahrnehmung des Autoinduktors beteiligt ist, und postulierten weiter, dass dies ein Hinweis auf eine potentielle Bindestelle ist. Anhand dieses Postulats wurde in der vorliegenden Arbeit auf Proteinebene nach der Bindestelle in LuxN gesucht.

Grundlage für die Identifizierung der Autoinduktor-Bindestelle war die von Timmen *et al.* (2006) nachgewiesene Hemmung der Kinaseaktivität von Wildtyp-LuxN (LuxN-WT) durch Zugabe des Autoinduktors HAI-1 und die dadurch erfolgte Abnahme der LuxU~P-Menge. Durch Punktmutationen, die zu entsprechenden Aminosäureaustauschen im Protein führten, wurde die Bindestelle biochemisch mittels Phosphorylierungsreaktion von LuxN-Membranvesikeln untersucht. Ein erster Schritt hierzu war der oben erwähnte Hinweis auf die Aminosäure L166.

3.3.2 Untersuchung der potentiellen Bindestelle L166 in LuxN

Zunächst wurde die Aminosäure L166 durch gezielte Punktmutation in *luxN* durch Arginin ausgetauscht (L166R). Das dadurch entstandene LuxN-Derivat wurde in *E. coli* TKR2000 heterolog überproduziert und die nach 2.5.5 erhaltenen Membranvesikel für den Phosphotransfer auf LuxU (nach 2.5.12 und 2.5.12.1) eingesetzt. Als Autoinduktor wurde bei diesem Experiment 10% (v/v) Kulturüberstand von *V. harveyi* BB120 eingesetzt. Dies entspricht einer Konzentration von ca. 20 μ M HAI-1 (Timmen, 2005).

Für LuxN-WT konnte abermals gezeigt werden, dass die Zugabe von Autoinduktor die Kinaseaktivität von LuxN hemmt, wodurch die Menge an LuxU~P abnimmt (Abb. 3.8A). Zur Verdeutlichung der Reaktionsgeschwindigkeit wurden die LuxU~P-Werte auf 100% des jeweiligen Höchstwertes normalisiert (Abb. 3.8B,D). Der Aminosäureaustausch L166R zeigte bei der *in vitro*-Phosphorylierung mit LuxN-L166R-haltigen Membranvesikeln hingegen ein gegenteiliges Bild des Postulats von Freeman *et al.* (2000) (Abb. 3.8C). Ohne Autoinduktor war die Kinaseaktivität zwar niedriger als die des Wildtyp-Proteins, sobald jedoch Autoinduktor zugesetzt wurde, stieg die Kinaseaktivität an und die Menge an LuxU~P nahm stark zu. Die eingesetzten Proteinmengen waren dabei gleich (Abb. 3.8E). Die Kinaseaktivität wird demnach durch die Zugabe von HAI-1 angeregt und nicht, wie erwartet, gehemmt. Dieser Effekt weist darauf hin, dass es sich hier nicht um eine an der Bindung von HAI-1 beteiligte Aminosäure handelt.

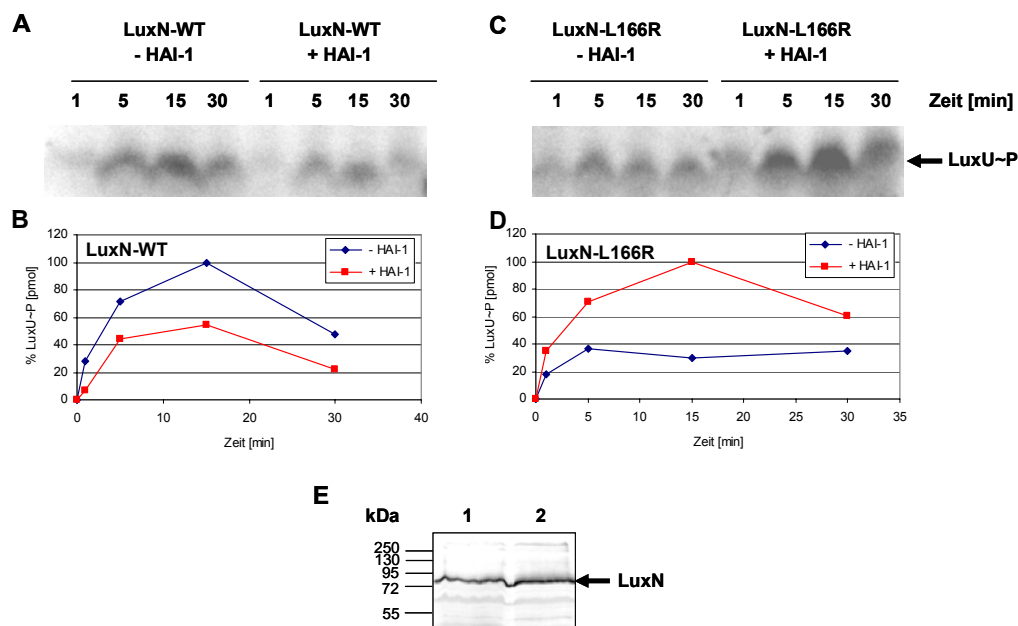


Abb. 3.8: Rolle des Aminosäureaustausches L166R in LuxN bezüglich der HAI-1-Bindung. LuxN-haltige Membranvesikel wurden zusammen mit LuxU (2 µg/Spur) bei 25°C vorinkubiert. HAI-1 wurde in Form von 10% (v/v) Kulturüberstand von *V. harveyi* BB120 zugegeben. Die Kontrolle ohne HAI-1 erfolgte mit AB-Medium. Die Reaktion wurde erst nach 5 min Vorinkubation mit dem Autoinduktor mit 100 µM [γ - 32 P]ATP gestartet. Nach 1 – 5 – 15 und 30 min wurden Proben entnommen, mit 5x SDS-Probenpuffer vermischt und durch eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Trocknung und Exposition auf einem Phosphor-Screen wurde aus dem Autoradiogramm die Menge an LuxU~P in pmol bestimmt. Die Werte wurden auf 100% des jeweiligen Höchstwertes normalisiert. Für die Phosphorylierung wurde die gleiche Menge von LuxN eingesetzt, je 160 µg MV/Spur.

A/C: Autoradiogramm, **B/D:** Quantifizierung der Menge an LuxU~P. **A/B:** LuxN-WT, **C/D:** LuxN-L166R; **blau:** ohne HAI-1, **rot:** mit HAI-1. **E:** Western Blot, **1:** LuxN-WT, **2:** LuxN-L166R.

3.3.3 Identifizierung der HAI-1-Bindestelle anhand weiterer Aminosäuren

Zur weiteren Suche nach möglichen Bindestellen wurden die Sequenzen mehrerer Proteine der LuxR-Familie mit den Sequenzen von LuxN-Proteinen verglichen. Bei einem Alignment von 16 Proteinen der LuxR-Familie mit dem Programm MAFFT (Katoh *et al.*, 2002; Katoh *et al.*, 2005) konnten mehrere identische Aminosäuren des Musters Y-X₃-W-X₃-Y-X₈-D-P ermittelt werden (Abb. 3.10, fett gedruckt). Für das Protein LasR aus *P. aeruginosa*, das ebenfalls ein Acylhomoserinlacton (AHL) bindet (3-Oxo-C₁₂-Acylhomoserinlacton (Abb. 3.9A)) sind die Bindestellen mittlerweile bekannt (Abb. 3.10, rot markiert) (Bottomley *et al.*, 2007). Bottomley *et al.* (2007) konnten die Struktur von LasR kristallographisch aufklären, wobei die Löslichkeit des Proteins abhängig von der Anwesenheit des Autoinduktors war. Dies nahmen sie zum Anlass, eine detaillierte Analyse der AHL-Bindetasche vorzunehmen. Einige Aminosäuren der AHL-Bindetasche liegen in anderen Proteinen der LuxR-Familie zum Großteil konserviert vor, was bedeutet, dass der durch die Bindung der AHLs entstehende Aktivierungsmechanismus der Proteine auf identischen HSL-Kopfgruppen beruht (Bottomley *et al.*, 2007). Ein struktureller Vergleich der Autoinduktoren von LasR und LuxN aus *V. harveyi* ist in Abb. 3.9 dargestellt. Deutlich erkennbar ist die Ähnlichkeit der HSL-Kopfgruppen bis zur Amidgruppe. Zu den konservierten Aminosäuren gehören die in LasR vorkommenden Aminosäuren Y56, W60, Y64, D73, P74 und die weniger konservierte Aminosäure S129 (Abb. 3.10).

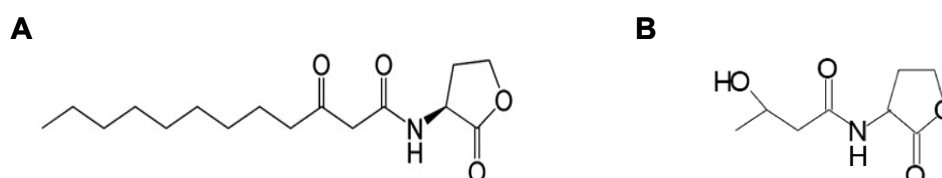


Abb. 3.9: Vergleich der Autoinduktoren von LasR und LuxN.

A: LasR, 3-Oxo-C₁₂-Acylhomoserinlacton, **B:** LuxN, N-(D-3)-Hydroxybutanoyl-Homoserinlacton.

In einem Alignment mit dem Programm ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) von LuxN aus *V. harveyi* mit 9 homologen LuxN-Proteinen (LuxN aus *Vibrio splendidus*, VanN aus *Vibrio anguillarum*, OpaN aus *Vibrio parahaemolyticus*, LuxN aus *Vibrio alginolyticus*, LuxN aus *Vibrio campbellii*, LuxN aus *Vibrio fischeri*, LuxN aus *Vibrio angustum*, LuxN aus *Photobacterium profundum*, LuxN aus *Photobacterium phosphoreum*) wurde ein ähnliches Aminosäuremuster (Y-X₆-W-X₅-Y-X₃-D-X₂-P) identifiziert, das in fast allen LuxN-Proteinen vorkommt und daher an der Bindung des Acylhomoserinlactons beteiligt sein könnte (Abb. 3.11). Im Protein LuxN aus *V. harveyi* handelt es sich um die Aminosäuren Y53, W60, Y66, D70 und P73. Die Aminosäuren Y53, W60 und Y66 liegen dabei in allen dargestellten LuxN-Proteinen konserviert vor. Die Aminosäure D70 ist in den LuxN-Proteinen zu 60% identisch, P73 zu 40%. Interessanterweise handelt es sich hierbei um Aminosäuren im Bereich der Transmembrandomäne II, für den die Sekundärstruktur-Vorhersagen nur ungenaue Angaben machen konnten und sogar eine Faltblatt-Struktur vorhersagten (Abb. 3.1), sowie der nachfolgenden periplasmatischen Schleife.

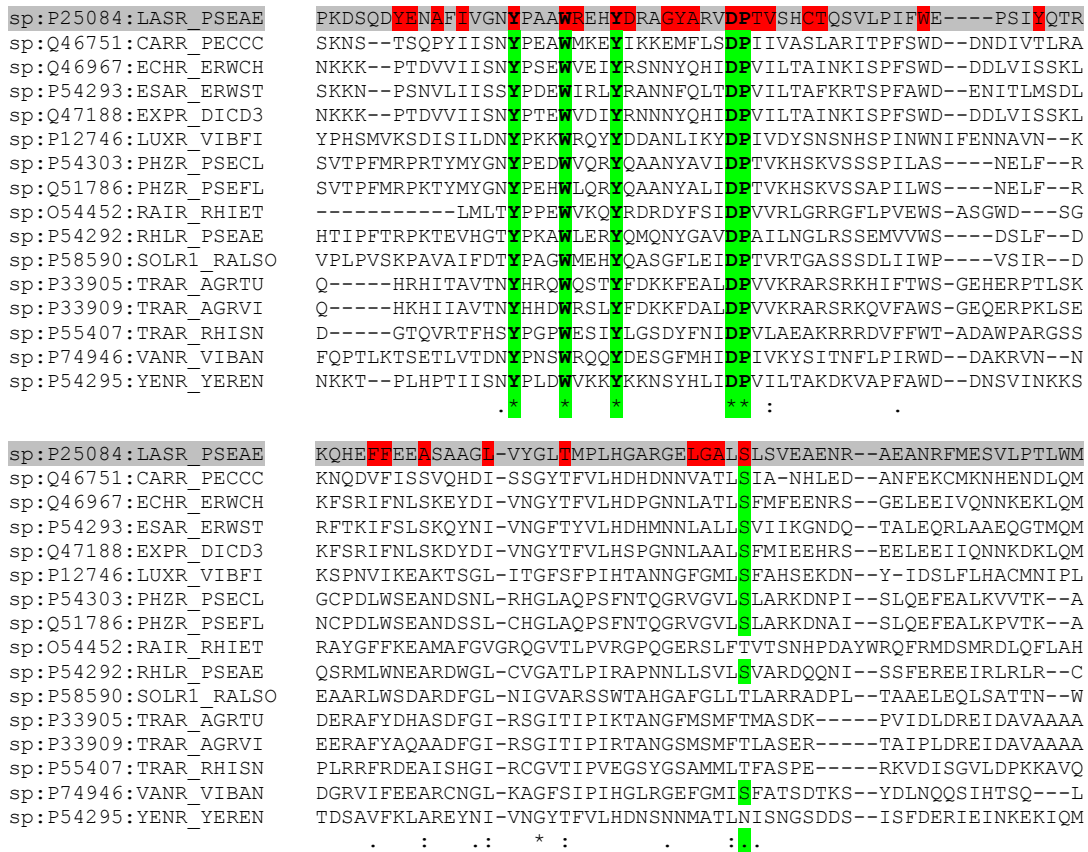


Abb. 3.10: Alignment von Proteinen der LuxR-Familie (Ausschnitt). Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code von: LasR aus *P. aeruginosa* (LASR_PSEAE) (grau markiert), CarR aus *Pectobacterium carotovorum* (CARR_PECCC), EchR aus *Erwinia chrysanthemii* (ECHR_ERWCH), EsaR aus *Erwinia stewartii* (ESAR_ERWST), ExpR aus *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemii*) (EXPR_DICD3), LuxR aus *V. fischeri* (LUXR_VIBFI), PhzR aus *Pseudomonas chlororaphis* (*Pseudomonas aureofaciens*) (PHZR_PSECL), PhzR aus *Pseudomonas fluoreszens* (PHZR_PSEFL), RaiR aus *Rhizobium etli* (RAIR_RHIET), RhlR aus *Pseudomonas aeruginosa* (RHLR_PSEAE), SolR1 aus *Ralstonia solanacearum* (SOLR1_RALSO), TraR aus *Agrobacterium tumefaciens* (TRAR_AGRTU), TraR aus *Agrobacterium vitis* (TRAR_AGRVI), TraR aus *Rhizobium sp.* (TRAR_RHISN), VanR aus *V. anguillarum* (VANR_VIBAN) und YenR aus *Yersinia enterocolitica* (YENR_YEREN). Die Aminosäuren Y56, W60, Y64, D73, P74 und S129 aus LasR, die identisch in anderen LuxR-Proteinen sind, sind grün markiert. Aminosäuren, die die AHL-Bindetasche in LasR bilden, sind rot markiert. Das Alignment wurde mit dem Programm MAFFT FFT-NS-2 (Version 6.240) (Katoh *et al.*, 2002; Katoh *et al.*, 2005) erstellt. Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*), ähnliche durch einen Doppelpunkt (:), bei einer Abweichung bzw. durch einen Punkt (.) bei mehr als einer Abweichung gekennzeichnet. Das vollständige Alignment befindet sich im Anhang.

```

LuxN Vibrio harveyi --MFDFSLEAIVYAKAISLLATVAVVMMWLFYYCYRLKQKNEVI-FGTHH 47
LuxN Vibrio splendidus MNMFDFGLEAIVYAKAITLLATVAIVVMWLLYYCYRLKQKNEVI-FGTHH 49
VanN Vibrio anguillarum --MLNLNDPILYPKAITLIAAVAMVLVWLTYCYRLKQKNEVI-FGTHH 47
OpaN Vibrio parahaemolyticus MNMLDIGLSGLLYPKAITLFATVAVVLVWLLYYCYRLKQKNEVI-LGSYH 49
LuxN Vibrio alginolyticus --MLDVHLHGLFYPKAMALYATVLLIVFAWLLYYCYRLKQKSESI-LGSHH 47
LuxN Vibrio campbellii --MTETFITHMLYSKAIVLTLASFLVLTWVSFFCRSLYLNRGPR-SIGNY 47
LuxN Vibrio fischeri --MLTT-----LSKVYLLLTSAIILLWVGYFVRSLYKERTKV-NPYIY 41
LuxN Vibrio angustum --MADLYQAVTTNVIAIFLIAISAVIAVWTGYFARFLHSPSLSHDKRIY 48
LuxN Photobacterium profundum --MHDFIQSTLANMVAIFLVAIALVVVIWATYFARILAKHLPGS-SRQVY 47
LuxN Photobacterium phosphoreum --MPDPLLLLFSEPRGALLFFAAGIILAWLGYFSFTLFTSRPGA-NRNVY 47
      * * * * *
LuxN Vibrio harveyi AAYIAYSVCIIAWISSNAYFHTDLLPELGASAGMFMAKIFANLASFFAF 97
LuxN Vibrio splendidus APYIAYSICIVANICSNAYFHTDLLPELGASAAVYAAKLANLASFCFAF 99
VanN Vibrio anguillarum ASYIAYSSCIIAWIGSNAYFHTDVLVELGVNRAIFMAEIANISASLAFVF 97
OpaN Vibrio parahaemolyticus APYIAYSTCIIWISSNAYFHTDLLPELGSEGGIFMAKLANLASFFAF 99
LuxN Vibrio alginolyticus APYIAYSSCIIWISSNAYFHTDLLPELGSVGGIFMAKLANLASFFAF 97
LuxN Vibrio campbellii TFYIIYITIGLFFWILSNAYFHSGFLLLYSKQAAIKMAILANISAYIAFAA 97
LuxN Vibrio fischeri SSIYFVALFIIWILSNAYFQSPLLTYFDESAAIFMALFANMTSYLAF 91
LuxN Vibrio angustum FPYIIYTSFISLWILSNAYFQSSLLIERSDIVAVNIALAANIFSGLAFIF 98
LuxN Photobacterium profundum FPYTLYSVFISAWILSNAYFQSPLLVYFGADTAIIMALLANIFSGLAFAY 97
LuxN Photobacterium phosphoreum YPYLAYSVSIFLWILSNAYFQSPLLTYSESTAVTMALFANLVSFCAFIS 97
      * * * * *

```

Abb. 3.11: Alignment von LuxN-ähnlichen Proteinen (Ausschnitt). Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von LuxN aus *V. harveyi* und 9 LuxN-homologen Proteinen aus der Datenbank von NCBI im Ein-Buchstaben-Code. Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW (Version 1.83) (Thompson *et al.*, 1994) erstellt. Die zu den in LuxR-Proteinen vorkommenden ähnlichen Aminosäuren sind grün markiert (in LuxN aus *V. harveyi* gelb markiert: Y53, W60, Y66, D70, P73). Aminosäuren, die zur Identifizierung der HAI-1-Bindestelle in LuxN untersucht wurden, sind gelb markiert: Y50, Y53, S54, C56, I58, W60, S62, S63, Y66, T69, D70, P73, E74, S78, K85.

Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*), ähnliche durch einen Doppelpunkt bei einer Abweichung (:) bzw. durch einen Punkt bei mehr als einer Abweichung (.) gekennzeichnet. Zahlen geben die Position der Aminosäuren an. Das vollständige Alignment befindet sich im Anhang.

3.3.3.1 Untersuchung der Aminosäuren Y66, D70 und P73 in einem Dreifachaustausch

Aufgrund des ähnlichen Musters der Aminosäuren Y66, D70, P73, sowie ihrer Lokalisation in der periplasmatischen Schleife nach TM II, wurde *luxN* durch gezielte Punktmutation modifiziert, so dass ein dreifacher Aminosäureaustausch durch je einen Cysteinrest entstand: Y66C-D70C-P73C (einfach: Y66D70P73C). Das so erhaltene LuxN-Derivat wurde in *E. coli* TKR2000 heterolog exprimiert. Die nach 2.5.5 erhaltenen Membranvesikel wurden für den Phosphotransfer auf LuxU, entsprechend 2.5.12 und 2.5.12.1, eingesetzt. Als Autoinduktor wurde in diesem Fall gereinigter HAI-1 in der Konzentration von 50 µM verwendet.

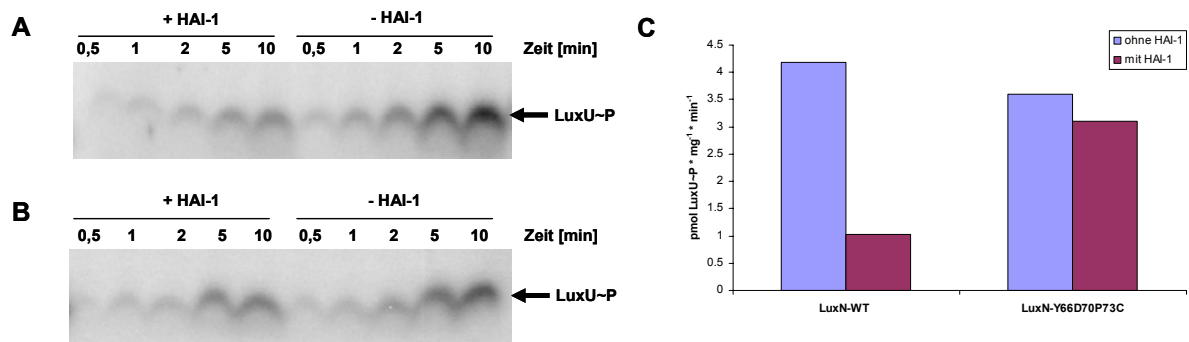


Abb. 3.12: Einfluss von HAI-1 auf die Phosphotransferaktivität von LuxN-Y66D70P73C. Für die Phosphorylierung wurden von LuxN-WT 66 µg/Spur und von LuxN-Y66D70P73C 126 µg/Spur eingesetzt (entspricht gleicher Menge von LuxN, Vgl. Abb. 3.14). Die LuxN-haltigen Membranvesikel wurden zusammen mit LuxU (2 µg/Spur) bei 25°C vorinkubiert. Als Autoinduktor wurde 50 µM gereinigter HAI-1 zugegeben. Die Kontrolle ohne HAI-1 erfolgte mit H₂O. Die Reaktion wurde bei Zugabe von HAI-1 erst nach 5 min Vorinkubation mit dem Autoinduktor mit 100 µM [γ -³²P]-ATP gestartet. Bei Zugabe von H₂O wurde die Reaktion sofort gestartet. Nach 0,5 – 1 – 2 – 5 und 10 min wurden Proben genommen, mit 5x SDS-Probenpuffer vermischt und durch eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Trocknung und Exposition auf einem Phosphor-Screen wurde aus dem Autoradiogramm der Umsatz von LuxU~P in pmol/(mg * min) bestimmt. In (C) sind die Initialgeschwindigkeiten als Balkendiagramm dargestellt.

A: LuxN-WT, **B:** LuxN-Y66D70P73C; **blau:** ohne HAI-1, **violett:** mit HAI-1.

Auch in diesem Experiment kann die Abnahme der LuxU~P-Menge bei Zugabe von HAI-1 zu LuxN-WT bestätigt werden (Abb. 3.12A,C). Im Gegensatz dazu bleibt die Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung durch das Derivat LuxN-Y66D70P73C nahezu auf dem gleichen Level (Abb. 3.12B,C). LuxU wird durch LuxN-WT, solange kein Autoinduktor vorhanden ist, in einer Initialgeschwindigkeit von 4 pmol/(mg * min) zu LuxU~P umgesetzt. Diese Geschwindigkeit verringert sich bei Zugabe von HAI-1 um das 4fache. Demnach wird die Kinaseaktivität von LuxN-WT durch HAI-1 bis zu 75% gehemmt. Bei LuxN-Y66D70P73C dagegen bleibt diese ungefähr gleich (3,6 pmol/(mg * min) zu 3,1 pmol/(mg * min)). Durch den Dreifachaustausch Y66D70P73C bleibt die Initialgeschwindigkeit von LuxN unverändert, was auf eine Bindestelle in einer der drei oder allen drei Aminosäuren hinweist.

3.3.3.2 Untersuchung weiterer Aminosäuren in LuxN bezüglich HAI-1-Bindung

Nachdem das Ergebnis des Dreifachaustauschs auf eine potentielle Bindung in diesem Bereich hindeutete, wurden die drei Aminosäuren Y66, D70 und P73 noch einmal einzeln gegen Cystein ausgetauscht. Außerdem wurden weitere Aminosäuren in LuxN untersucht. Da die Bindetasche in LasR hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren gebildet wird, wurden in LuxN u. a. mehrere hydrophobe Aminosäuren und andere, den Bereich der zweiten Transmembrandomäne und der nachfolgenden periplasmatischen Schleife abdeckende Aminosäuren, ausgetauscht: Y50→F, Y53→F, S54→A, C56→A, I58→A, W60→F, S62→A, S63→A, T69→V, E74→Q, S78→A und K85→L. Wie bisher beschrieben, wurden die verschiedenen LuxN-Derivate in *E. coli* TKR2000 heterolog überproduziert, Membranvesikel präpariert (2.5.5) und diese in der *in vitro*-Phosphorylierung von LuxU (nach 2.5.12 und 2.5.12.1) eingesetzt. Auch in diesem Fall war die Menge der überproduzierten Proteine sehr unterschiedlich, so dass für den Phosphotransfer zwar gleiche Mengen von LuxN eingesetzt, aber unterschiedliche Mengen eingesetzter Membranvesikel pro Spur aufgetragen wurden (Abb. 3.14).

Um den inhibitorischen Effekt von HAI-1 auf die spezifische enzymatische Aktivität der einzelnen LuxN-Derivate zu untersuchen, wurde gereinigter HAI-1 in steigender Konzentration (0-160 μM) zu der Phosphorylierungsreaktion zugegeben. Zur Bestimmung der Initialgeschwindigkeit wurde die Reaktion nach 30 s und 1 min, durch Vermischung der einzelnen Proben mit 5x SDS-Probenpuffer, abgestoppt. Die Werte wurden auf 100% des Kontrollwertes (Abwesenheit von HAI-1) normalisiert. In Abb. 3.13 und Tab. 3.2 ist ersichtlich, dass sich vier der 18 LuxN-Derivate schon bei äußerst niedriger HAI-1-Konzentration (1 μM) deutlich von LuxN-WT unterscheiden: LuxN-L166R (s. auch Kap. 3.3.1), LuxN-Y53F, LuxN-D70C und LuxN-Y66D70P73C. Die Phosphotransferaktivität von LuxN-WT wurde durch HAI-1 um 70% inhibiert (siehe auch Timmen, *et al.* (2006)); bei LuxN-Y53F und LuxN-Y66D70P73C lag die maximale Abnahme der Initialgeschwindigkeit nur bei ca. 40% und bei LuxN-D70C bei ca. 30%.

Da sich die Werte ab einer Konzentration von 5 μM HAI-1 nicht mehr effektiv änderten, wurde in Abb. 3.13 zur besseren Ersichtlichkeit nur der Konzentrationsbereich

von 0 – 20 μM dargestellt. In Tab. 3.2 sind auch die Werte für die Konzentrationszugabe von 160 μM dargestellt, mit der die maximale Inhibition erreicht wurde. Für LuxN-L166R konnte auch in diesem Experiment ein Ansteigen der Kinaseaktivität nachgewiesen werden. Die Abnahme der Kinaseaktivität um gerade einmal 30 bzw. 40% von LuxN-Y53F und LuxN-D70C deuten auf eine Bindungsstelle dieser Aminosäuren hin. Die Aminosäure D70 wurde zusätzlich noch gegen Glutamat ausgetauscht (D70E). LuxN-D70E wies aber die gleiche Kinaseaktivität auf wie LuxN-WT. Dies liegt wahrscheinlich an der ähnlichen Struktur der Aminosäuren Aspartat und Glutamat, die sich nur durch eine zusätzliche Methylen-Gruppe im Glutamat unterscheiden. Das Ergebnis des Einzelaustauschs LuxN-D70C bestätigte die zuvor erworbenen Daten mit dem Dreifachaustausch LuxN-Y66D70P73C.

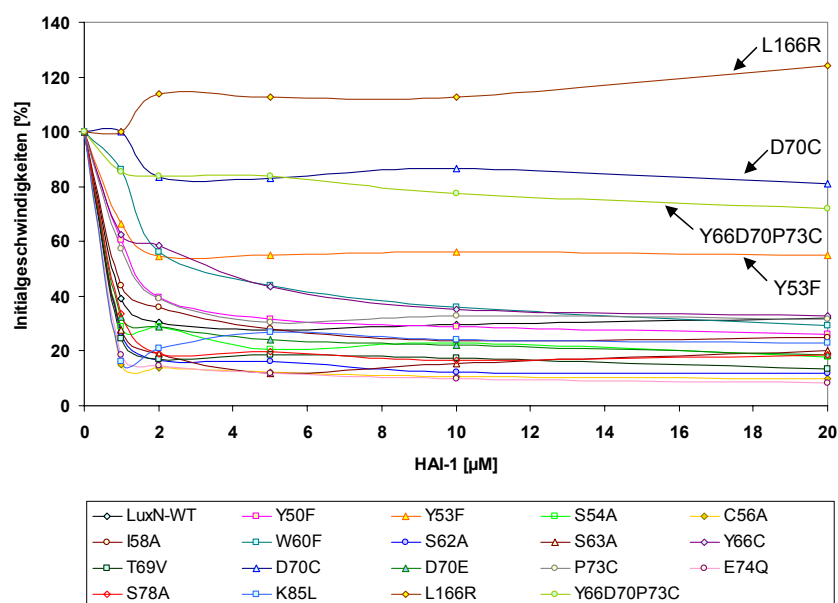


Abb. 3.13: Versuche zur Identifizierung der HAI-1-Bindestelle in LuxN. LuxN-haltigen Membranvesikel (LuxN-WT, LuxN-Y50F, LuxN-Y53F, LuxN-S54A, LuxN-C56A, LuxN-I58A, LuxN-W60F, LuxN-S62A, LuxN-S63A, LuxN-Y66C, LuxN-T69V, LuxN-D70C, LuxN-D70E, LuxN-P73C, LuxN-E74Q, LuxN-S78A, LuxN-K85L, LuxN-L166R, LuxN-Y66D70P73C) wurden zusammen mit LuxU (2 $\mu\text{g}/\text{Spur}$) bei 25°C vorinkubiert. Gereinigter HAI-1 wurde in steigender Konzentration zum Reaktionsansatz zugegeben: 0 (H_2O) – 1 – 2 – 5 – 10 – 20 – 40 – 80 – 160 μM HAI-1. Dargestellt ist der Konzentrationsbereich von 0–20 μM . Die Reaktion wurde nach 5 min Vorinkubation mit HAI-1 mit 100 μM [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]-ATP gestartet. Bei Zugabe von H_2O wurde die Reaktion sofort gestartet. Nach 30 s und 1 min wurden Proben genommen, mit 5x SDS-Probenpuffer vermischt und durch eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Trocknung und Exposition auf einem Phosphor-Screen wurden aus den Autoradiogrammen die Initialgeschwindigkeiten von LuxN~P mittels ImageQuant® (Version 5.0, Molecular Dynamics) quantifiziert und in $\text{pmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ bestimmt. Für die Phosphorylierung wurden gleiche Mengen von LuxN eingesetzt (s. Abb. 3.14).

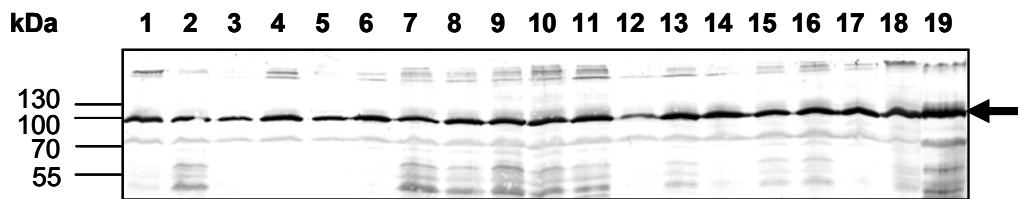


Abb. 3.14: Mengenvergleich der LuxN-haltigen Membranvesikel, entsprechend dem Phosphotransfer auf LuxU (Vgl. Abb. 3.13). Die Proteinbande von LuxN ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die LuxN-haltigen Membranvesikel wurde in folgender Konzentration eingesetzt: **1:** LuxN-WT [63 µg/Spur], **2:** LuxN-Y50F [31 µg/Spur], **3:** LuxN-Y53F [31 µg/Spur], **4:** LuxNS54A [63 µg/Spur], **5:** LuxN-C56A [31 µg/Spur], **6:** LuxN-I58A [31 µg/Spur], **7:** LuxN-W60F [63 µg/Spur], **8:** LuxN-S62A [63 µg/Spur], **9:** LuxN-S63A [63 µg/Spur], **10:** LuxN-Y66C [92 µg/Spur], **11:** LuxN-T69V [63 µg/Spur], **12:** LuxN-D70C [190 µg/Spur], **13:** LuxN-D70E [63 µg/Spur], **14:** LuxN-P37C [94 µg/Spur], **15:** LuxN-E74Q [31 µg/Spur], **16:** LuxN-S78A [31 µg/Spur], **17:** LuxN-K85L [31 µg/Spur], **18:** LuxN-Y66D70P73C [126 µg/Spur], **19:** LuxN-L166R [94 µg/Spur].

Tab. 3.2: Maximale Inhibition der Kinaseaktivität der LuxN-Derivate in Prozent [%] nach Zugabe von 1, 2, 5, 10, 20 und 160 µM HAI-1. Die Derivate LuxN-Y53F, LuxN-D70C und LuxN-Y66D70P73C wurden gelb markiert. Werte, die aufgrund zu hoher Hintergrundstrahlung auf dem Phosphor-Screen zu niedrig quantifiziert wurden, sind in Klammern angegeben.

HAI-1 [µM]	1	2	5	10	20	160
LuxN-WT	61	61	67	68	63	69
LuxN-Y50F	39	61	68	71	74	73
LuxN-Y53F	34	45	(32)	44	(34)	49
LuxN-S54A	71	71	79	77	82	(75)
LuxN-C56A	85	86	88	89	90	90
LuxN-I58A	56	64	72	76	75	74
LuxN-W60F	14	44	56	64	71	81
LuxN-S62A	73	83	84	88	88	90
LuxN-S63A	72	81	88	85	80	91
LuxN-Y66C	38	41	56	65	67	78
LuxN-T69V	75	83	82	82	87	86
LuxN-D70C	34	(18)	25	(13)	24	28
LuxN-D70E	68	71	76	78	81	81
LuxN-P73C	43	61	70	67	69	74
LuxN-E74Q	82	85	88	90	92	92
LuxN-S78A	66	81	80	83	81	(76)
LuxN-K85L	84	79	73	(56)	77	81
LuxN-L166R	(4)	-	-	-	-	-
LuxN-Y66D70P73C	14	16	16	22	28	43

3.3.4 Komplementation von *V. harveyi* BB170

Um die einzelnen LuxN-Derivate *in vivo* untersuchen zu können, wurden die Derivate mittels des Plasmid pFED368 (Neiditch *et al.*, 2006) via *Triparental Mating* in *V. harveyi* BB170 konjugiert. Zunächst wurden die pFED-LuxN-Derivate wie in 2.4.11 beschrieben hergestellt. *V. harveyi* BB170 wurde mit den Plasmiden pFEDLuxNb-6His, pFEDLuxNbL166R-6His, pFEDLuxNbY66C-6His, pFEDLuxNbD70C-6His, pFEDLuxNbP73C-6His und pFEDLuxNbY66D70P73C-6His via *Triparental Mating* nach der Methode aus 2.4.10.2 transformiert. Für den *in vivo*-Biolumineszenz-Assay wurden einzelne *V. harveyi*-Klone in AB-Medium, alternativ mit 266 μM FeCl₃ zur Verbesserung des Wachstums (Vilchez *et al.*, 2007), über Nacht kultiviert. Aus der ÜNK wurden die Wells von Mikrotiterplatten in einem Volumen von 200 μl in AB-Medium und beimpft. Die Mikrotiterplatten mit den komplementierten BB170-Zellen wurden für 17-20 h bei 30°C aerob inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Biolumineszenz der Konjugate im Platten-Luminometer (Centro 960, Berthold) bestimmt. Es zeigte sich bei allen untersuchten Zellen eine erhöhte Biolumineszenz, die möglicherweise durch das zusätzlich vorhandene AI-2 entstand (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die weiteren pFED-LuxN-Derivate mit diesem Stamm nicht mehr getestet.

3.4 Reinigung und Rekonstitution von LuxN

Für die vollständige Charakterisierung eines Proteins ist dessen Reinigung ein wesentlicher Faktor. Bisher konnte LuxN lediglich in Membranvesikeln für die Untersuchungen eingesetzt werden. Da LuxN schätzungsweise aber nur zu 1% in den Membranvesikeln enthalten ist, ist es empfehlenswert andere, die Tests störenden Proteine, zu entfernen. In dieser Arbeit sollte nun das Protein LuxN gereinigt werden, um die Signaltransduktionskaskade mit gereinigten Proteinkomponenten *in vitro* rekonstruieren zu können.

Da Membranproteine kaum löslich sind und eine Lipid-haltige Umgebung benötigen, müssen sie zunächst durch Solubilisierung mit einem Detergenz aus der Membran herausgelöst werden. Für die anschließende Rekonstitution des Proteins werden *E. coli*-Phospholipide verwendet. Durch gleichzeitige Entfernung des Detergenz lagern sich die einzelnen Proteinmoleküle mit den Phospholipiden zu einem so genannten Proteoliposom zusammen.

3.4.1 Reinigung und Rekonstitution von LuxN

Zunächst wurde das in der Membran verankerte Protein LuxN mit Hilfe des Detergenz LDAO (2%) aus der Membran solubilisiert (siehe 2.5.10). Dadurch werden die hydrophoben Anteile des Proteins LuxN von der wässrigen Lösung des Cytosols abgeschirmt. Anschließend wurde das solubilisierte Protein auf der Ni²⁺-NTA-Agarose-Matrix mit 0,05% Dodecylmaltosid umgepuffert und mit 250 mM Imidazol entsprechend der Methode nach 2.5.10 eluiert. Das Protein wurde zu 30 - 60% aus den Membranvesikeln gereinigt. Die anschließende Rekonstitution des gereinigten LuxN erfolgte mit *E. coli*-Phospholipiden im Verhältnis 25:1 (Lipid:Protein); das Entfernen des Detergenz im Verhältnis 5:1 (BioBead:Detergenz). Der Nachweis der Reinigung und Rekonstitution erfolgte mittels Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) (Abb. 3.15, Spur 1-4) und immunochemischer Behandlung mit dem Penta-His-Antikörper (Abb. 3.15, Spur 5). Die rekonstituierten Proteoliposomen wurden wie in 2.5.12 bzw. 2.5.12.1 beschrieben für einen Phosphotransfer in einem molaren Verhältnis LuxN zu LuxU von 1:20 eingesetzt. Eine enzymatische Aktivität der LuxN-Proteoliposomen war im Gegensatz zur Kontrolle mit LuxN-Membranvesikeln allerdings nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt).

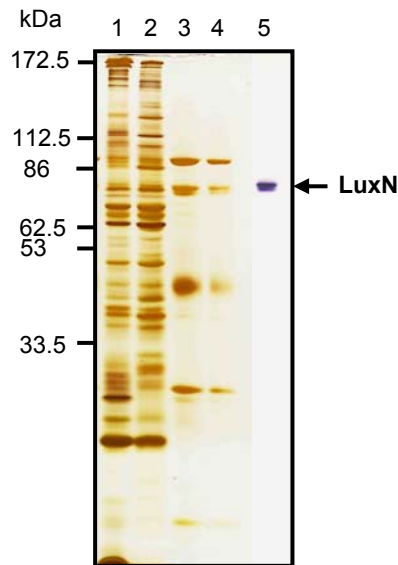


Abb. 3.15: Reinigung und Rekonstitution von LuxN. Dargestellt ist die Solubilisierung von LuxN mittels 2% LDAO, die Reinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie durch Umpufferung mit 0,05% Dodecylmaltosid und Elution mit 250 mM Imidazol, und die anschließende Rekonstitution mit *E. coli*-Phospholipiden im Verhältnis 25:1 (Lipid:Protein). **Spur 1-4:** Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987), **Spur 5:** Immunodetektion von LuxN in Proteoliposomen mit dem Penta-His-Antikörper. **1:** Membranvesikel (20 μg /Spur) **2:** LDAO-solubilisierete Proteine (20 μg /Spur), **3:** Dodecylmaltosid-solubilisierete Proteine nach Reinigung über die Ni^{2+} -NTA-Agarose mit 250 mM Imidazol (3 μg /Spur), **4/5:** Rekonstituiertes LuxN in Proteoliposomen (3 μg /Spur).

3.4.2 Lipidanalyse von *V. harveyi* BB120 und *E. coli* MG1655

Da für das Protein LuxN nach der Rekonstitution keine enzymatische Aktivität nachweisbar war, bestand die Möglichkeit, dass es nicht in seiner nativen Form rekonstituiert wurde. Ein Grund hierfür könnte sein, dass für die Rekonstitution *E. coli*-Phospholipide verwendet wurden, die dem Protein möglicherweise nicht seine natürliche Umgebung bieten. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich die Lipidzusammensetzung von *V. harveyi* und *E. coli* voneinander unterscheiden. Hierzu wurden die Phospholipide aus *V. harveyi* BB120 und *E. coli* MG1655 nach der Methode von Minnikin, *et al.* (1984) wie unter 2.5.15 beschrieben, extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Phospholipide wurden anschließend durch Färbung mit Ninhydrin und Molybdänoxid sichtbar gemacht (Abb. 3.16). Ninhydrin färbt primäre Amine, weshalb die Phospholipide Phosphatidylethanolamin

und Lysophosphatidylethanolamin Ninhydrin-positiv sind; Molybdänoxid färbt die Phosphatgruppe, sodass Cardiolipin und Phosphatidylglycerol erst dadurch sichtbar werden.

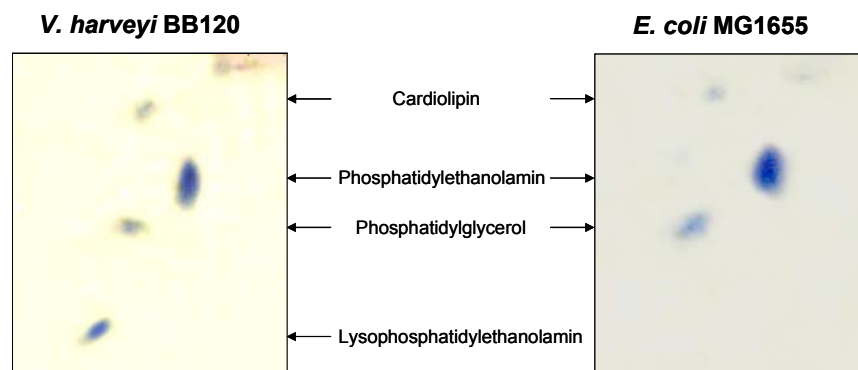


Abb. 3.16: Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie von extrahierten *V. harveyi*- und *E. coli*-Lipiden. Die Färbung erfolgte durch Ninhydrin und Molybdänoxid nach Minnikin *et al.* (1984). Die einzelnen Phospholipide wurden mit Pfeilen gekennzeichnet: Cardiolipin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Lysophosphatidylethanolamin.

Der prozentuale Gehalt der einzelnen Phospholipide wurde mit dem Analyseprogramm ImageQuant® (Version 5.0, Molecular Dynamics) ausgewertet (Tab. 3.3). Beide Bakterienarten unterscheiden sich vor allem dadurch, dass *V. harveyi* BB120 das Phospholipid Lysophosphatidylethanolamin (LPE) enthält, das in *E. coli* MG1655 nicht nachgewiesen wurde. Prozentual macht LPE einen Gehalt von 32% der Gesamtphospholipide in *V. harveyi* BB120 aus. Seit den 1970er Jahren ist bekannt, dass LPE zu einem großen Anteil in der Lipidzusammensetzung von diversen *Vibrio*-Spezies und nicht differenzierten marinen Bakterien vorkommt (Bhakoo und Herbert, 1979; Danevcic *et al.*, 2005; Diervo und Reynolds, 1975; Oliver und Colwell, 1973). Den größten Anteil in beiden Bakterienarten hat das Phospholipid Phosphatidylethanolamin: in *E. coli* mit 66% und in *V. harveyi* mit 43%. Der Gehalt an Cardiolipin ist in beiden Bakterienarten gleich (11 bzw. 12%). Phosphatidylglycerol ist in *E. coli* zu 23% enthalten, in *V. harveyi* nur zu 13%.

Tab. 3.3: Vergleich des Phospholipidgehalts von *E. coli* MG1655 und *V. harveyi* BB120. Die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Lipidextraktionen sind in Prozent angegeben.

Phospholipid	<i>E. coli</i> MG1655	<i>V. harveyi</i> BB120
Cardiolipin	11 %	12 %
Phosphatidylglycerol	23 %	13 %
Phosphatidylethanolamin	66 %	43 %
Lysophosphatidylethanolamin	—	32 %

3.4.2.1 Rekonstitution von LuxN mit *V. harveyi*-Phospholipiden

Da bei der Phospholipidzusammensetzung von *V. harveyi* und *E. coli* ein deutlicher Unterschied besteht, sollten die extrahierten *V. harveyi*-Phospholipide zur Rekonstitution des gereinigten LuxN eingesetzt werden. Zuvor war es allerdings notwendig, den Prozess der Solubilisierung der Liposomen in Abhängigkeit von der Detergenz-Konzentration zu bestimmen. In diesem Fall wurden die beiden Detergenzien Triton X-100 und LDAO verwendet (siehe 2.5.16). Die Liposomen-Solubilisierung erfolgte nach dem „Drei-Stufen-Modell“, wonach die beginnende, partielle und totale Solubilisierung unterschieden werden (Lichtenberg, 1985). Die Trübung der Solubilisierung wurde dabei photometrisch bei 600 nm verfolgt (Abb. 3.17).

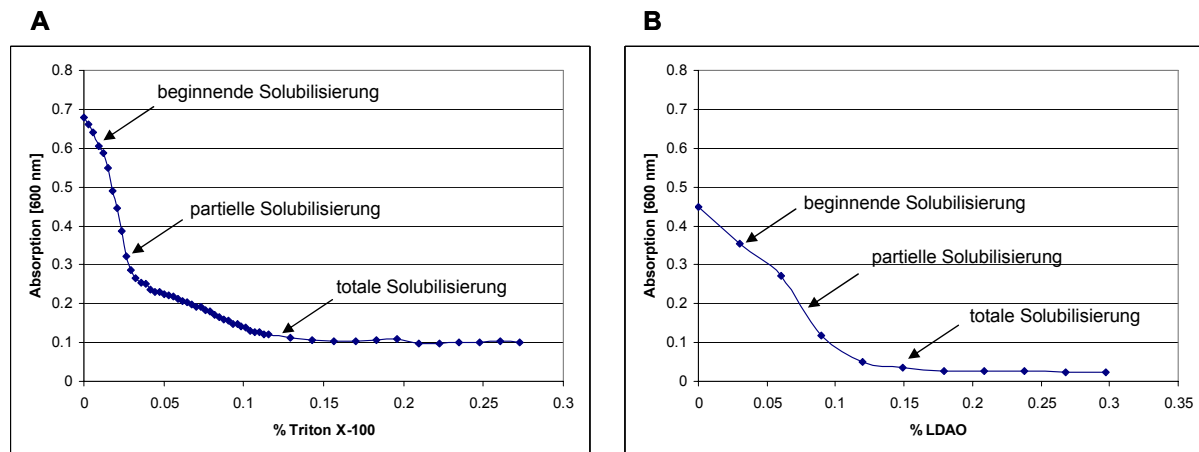


Abb. 3.17: Bestimmung der Abhängigkeit der Solubilisierung der *V. harveyi*-Phospholipide von der Detergenz-Konzentration. Die *V. harveyi*-Phospholipide wurden wie in 2.5.15 beschrieben extrahiert. Zur Solubilisierung der Phospholipide [1,5 mg/ml] wurden die Detergenzien 3% Triton X-100 (A) und 30% LDAO (B) verwendet. Die Trübung wurde nach 2.5.16 photometrisch bei 600 nm verfolgt.

Eine partielle Solubilisierung mit Triton X-100 wurde bei ca. 0,034% und die totale Solubilisierung ab einer Konzentration von 0,115% erreicht (Abb.3.17A). Mit LDAO erfolgte die partielle Solubilisierung bei einer Konzentration zwischen 0,06 und 0,09%, wohingegen die totale Solubilisierung ab einer Konzentration von 0,15% erreicht wurde (Abb. 3.17B). Die Phospholipide in LDAO wurden dann zur Rekonstitution von LuxN eingesetzt (siehe 2.5.11). Hierfür wurden zwei Solubilisierungsstufen getestet: partiell mit 0,09% LDAO und total mit 0,15% LDAO. LuxN wurde zunächst entsprechend 2.5.10 mit 2% LDAO solubilisiert, durch Umpufferung mit 0,05% Dodecylmaltosid über die Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt und wie alternativ in 2.5.11 beschrieben, rekonstituiert. Das Protein wurde dabei zu 10-20% aus den Membranvesikeln gereinigt und zu ca. 1% in den *V. harveyi*-Lipiden rekonstituiert. Die gereinigten und rekonstituierten Proteinfractionen wurden mittels Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) nachgewiesen (Abb. 3.18). Für die Kontrolle auf das Vorhandensein und die enzymatische Aktivität von LuxN in den Proteoliposomen wurden gleiche Mengen für die Silberfärbung und die *in vitro*-Phosphorylierung auf LuxU eingesetzt. Eine enzymatische Aktivität von LuxN in den Proteoliposomen wie für die LuxN-haltigen Membranvesikel (Vgl. Abb. 3.5A, Spur 3) konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

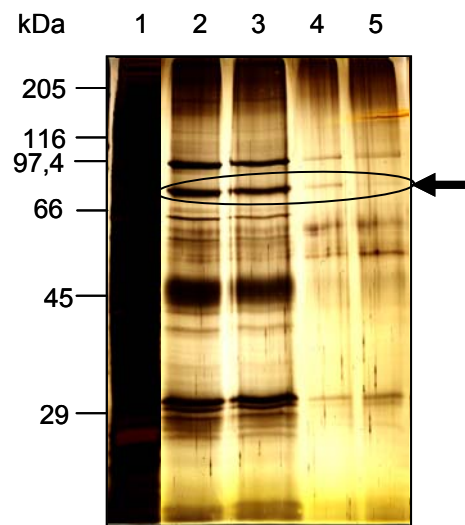


Abb. 3.18: Rekonstitution von LuxN mit extrahierten *V. harveyi*-Phospholipiden. Dargestellt ist die Reinigung von mit 2% LDAO solubilisiertem LuxN mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie durch Umpufferung mit 0,05% Dodecylmaltosid und Elution mit 250 mM Imidazol, und die anschließende Rekonstitution mit 0,09% und 0,15% LDAO-solubilisierten *V. harveyi*-Phospholipiden im Verhältnis 25:1 (Lipid:Protein). Der Nachweis erfolgte durch Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987). Die Proteinbande von LuxN ist mit einem Kreis und einem Pfeil gekennzeichnet. **1:** Membranvesikel (20 µg/Spur), **2:** Eluat 1 der Dodecylmaltosid-solubilisierten Proteine nach Reinigung über die Ni²⁺-NTA-Agarose mit 250 mM Imidazol (0,8 µg/Spur), **3:** Eluat 2 (0,4 µg/Spur), **4:** Proteoliposomen nach partieller Solubilisierung der Phospholipide mit 0,09% LDAO, **5:** Proteoliposomen nach totaler Solubilisierung der Phospholipide mit 0,15% LDAO.

3.4.2 Reinigung von LuxN mit Lysophosphatidylethanolamin

Neben dem Versuch extrahierte *V. harveyi*-Phospholipide zur Rekonstitution zu verwenden, wurde in Betracht gezogen, dem Protein bei der Reinigung das zu 32% in *V. harveyi* vorhandene Phospholipid Lysophosphatidylethanolamin zuzusetzen. Das von Sigma verwendete Lysophosphatidylethanolamin besteht aus 30 - 34% Palmitinsäure und 60 - 65% Stearinsäure, und wurde während der Reinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie zum Äquilibrierungspuffer (siehe 2.5.10) mit einer Konzentration von 0,25 mg/ml eingesetzt. Die Rekonstitution erfolgte wie unter 2.5.11 angegeben. Anschließend wurde das Vorhandensein von LuxN in den Proteoliposomen mittels Silberfärbung untersucht. Hierzu wurden der Rekonstitutionsansatz vor der

Ultrazentrifugation, der Überstand und die pelletierten Proteoliposomen im gleichen Volumen auf das SDS-Gel aufgetragen (Abb. 3.19). Die Proteoliposomen hatten dabei eine Proteinkonzentration von 0,4 mg/ml, was einer Rekonstitution des aus den Membranvesikeln gereinigten Proteins von ca. 50% entsprach. Die Hälfte des Proteins wurde nicht in den Proteoliposomen rekonstituiert und war im Überstand der Ultrazentrifugation zu finden. Zum Test der enzymatischen Aktivität wurden die auf diese Weise erhaltenen Proteoliposomen für den Phosphotransfer auf LuxU eingesetzt. Zur Kontrolle wurden auch LuxN-haltige Membranvesikel verwendet. In diesem Fall wurde die Phosphorylierung in einem Verhältnis von 1:4 - 1:10 und 1:20 von LuxN zu LuxU durchgeführt. Die eingesetzte LuxN-Proteinmenge entsprach bei 1:4 einer Menge von 29,6 pmol/Spur (Proteoliposomen) und 6,1 pmol/Spur (Membranvesikel); bei 1:10 einer Menge von 11,8 pmol/Spur (Proteoliposomen) und 2,6 pmol/Spur (Membranvesikel); bei 1:20 einer Menge von 5,9 pmol/Spur (Proteoliposomen) und 1,3 pmol/Spur (Membranvesikel). Trotzdem konnte nur der Phosphotransfer ausgehend von den LuxN-haltigen Membranvesikeln (Vgl. Abb. 3.5A, Spur 3) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

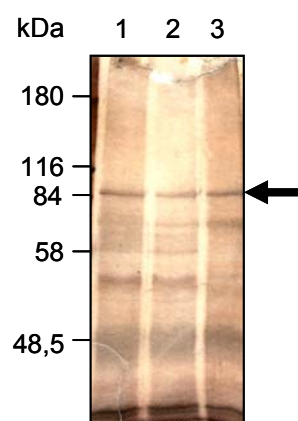


Abb. 3.19: Rekonstitution von mit Lysophosphatidylethanolamin gereinigtem LuxN. Die Proteinbande von LuxN ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. **1:** Rekonstitutionsansatz vor der Ultrazentrifugation (10 µl/Spur), **2:** Überstand nach der Ultrazentrifugation (10 µl/Spur), **3:** LuxN-haltige Proteoliposomen [0,4 mg/ml] (10 µl/Spur).

3.5 Der Antwortregulator LuxO

Der Antwortregulator LuxO der Phosphorylierungskaskade $\text{LuxN} \rightarrow \text{LuxU} \rightarrow \text{LuxO}$ wurde von Timmen (2005) in den Vektor pET16b kloniert und in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS-Zellen überproduziert. Das 10His-getaggte LuxO hat eine theoretische Molekülmasse von 52,880 kDa und befindet sich laut Hydrophobizitätsanalysen im Cytosol. Es wird immunologisch mit dem Penta-His-Antikörper nachgewiesen. Wie schon von Timmen (2005) beschrieben, wird LuxO heterolog in *E. coli* zum größten Teil in Form von *Inclusion Bodies* (Einschlusskörperchen) überproduziert. Nachweisbar ist es in der niedertourigen Fraktion (LSP), sowie zu einem geringen Anteil in der Membranfraktion. Timmen konnte nachweisen, dass es sich bei den Proteinen in der niedertourigen Fraktion tatsächlich um *Inclusion Bodies* handelt. Verschiedene Versuche wurden bisher unternommen, um LuxO in löslicher Form zu exprimieren (Timmen, 2005; Stambrau, 2008). Auch in dieser Arbeit sollte das Protein entweder im löslichen Zustand überproduziert, oder alternativ aus den *Inclusion Bodies* gereinigt werden.

3.5.1 Optimierungsexperimente zur Löslichkeit von LuxO

Um die Löslichkeit von LuxO bei der heterologen Überproduktion in *E. coli* zu verbessern, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Strategien verfolgt. Eine bisher noch nicht angewandte Methode war die Verkürzung des Proteins. Hart und Tarendeau (2006) beschreiben dies als eine gute Möglichkeit für die Expression löslicher Produkte. Im Fall von LuxO wurden daher zwei unterschiedlich verkürzte Formen von LuxO hergestellt (siehe 2.4.11): LuxO1-130, das nur die Empfängerdomäne mit dem Aspartatrest D47 enthält, und LuxO1-386, das um die DNA-Bindedomäne verkürzt wurde. Das Protein LuxO1-130 hat eine relative Molekülmasse von 16,5 kDa, die verkürzte Form LuxO1-386 eine relative Molekülmasse von 46,6 kDa. Die weitere Idee dahinter war, ein Protein zu erhalten, dem die möglicherweise bei der *in vitro*-Phosphorylierung störenden Domänen AAA⁺-ATPase und HTH-Motiv fehlen. Die beiden Fusionsproteine wurden analog zu

LuxO in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS überproduziert und die einzelnen Zellfraktionen wie unter 2.5.5 beschrieben präpariert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem Penta-His-Antikörper, zeigte aber auch hier die Überproduktion des Proteins in Form von *Inclusion Bodies* (niedertourige Fraktion, LSP) (Abb. 3.20A,B).

Alternativ wurde das Protein mit dem periplasmatischen Maltosebindeprotein (MBP_p) fusioniert (wie unter 2.4.11 beschrieben). Hintergrund der Idee war, dass im Periplasma von *E. coli* kaum reduzierende Bedingungen herrschen, wodurch die Ausbildung von Disulfidbrücken erleichtert wird (Riggs, 1994; Nallamsetty *et al.*, 2005). In der Aminosäuresequenz von LuxO sind insgesamt 6 Cysteine enthalten, die möglicherweise zur Ausbildung von Disulfidbrücken genutzt werden. Das an das MBP mit Signalsequenz fusionierte LuxO mit N-terminalem 10His-Tag (MBP_p-LuxO) wurde ebenfalls in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS überproduziert (nach 2.5.5). MBP_p-LuxO hat dabei eine relative Molekülmasse von 95,5 kDa. Die *E. coli*-Zellen mit dem überproduzierten MBP_p-LuxO wurden nach der Methode aus 2.5.6 in die Fraktionen Periplasma, Überstand und Pellet (LSP) aufgetrennt. Die nachfolgende Immunodetektion mit dem Penta-His-Antikörper zeigte auch hier wieder die Überproduktion des Hybridproteins hauptsächlich in der unlöslichen Fraktion, bestehend aus unaufgeschlossenen Zellen und *Inclusion Bodies* (Abb. 3.20C, LSP). Ein kleiner Anteil war auch im Überstand (bestehend aus Cytosol und Membranen) nachweisbar, wohingegen im Periplasma kaum Protein detektiert wurde. Die Fraktionen Überstand und Pellet wiesen zusätzliche Abbaubanden auf. Eine Kontamination der einzelnen Fraktionen untereinander kann ausgeschlossen werden, da der größte Anteil in aggregierter Form in der unlöslichen Fraktion zu finden ist.



Abb. 3.20. Heterologe Überproduktion von LuxO in verkürzter Form und als Fusionsprotein mit periplasmatischem Maltosebindeprotein. Der immunochemische Nachweis wurde mit dem Penta-His-Antikörper durchgeführt. **A:** LuxO1-130, **B:** LuxO1-386, **C:** MBP_p-LuxO. **C:** Cytoplasma, **LSP:** *Low Speed Pellet*, niedertourige Fraktion, **MF:** Membranfraktion, **PP:** Periplasma, **ÜS:** Überstand.

Da LuxO in beiden Strategien wiederum hauptsächlich nur in der niedertourigen Zentrifugation und somit in Form von *Inclusion Bodies* produziert werden konnte, wurde das Experiment zur Optimierung der Löslichkeit nicht weiter verfolgt und LuxO aus den *Inclusion Bodies* der Präparation aus *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pETLuxO-10His gereinigt (Kap. 3.5.2).

3.5.2 Reinigung und Renaturierung von LuxO aus *Inclusion Bodies*

Um LuxO in löslicher Form zu erhalten, wurde das Protein aus den *Inclusion Bodies* gereinigt und diverse Versuche unternommen, es in löslicher und nativer Form wiederherzustellen. Die meisten Proteine in *Inclusion Bodies* werden durch Detergenzien oder denaturierende Stoffe, wie z. B. 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidiniumhydrochlorid, vor dem Reinigungsschritt solubilisiert.

Die Solubilisierung von LuxO aus dem Pellet der niedertourigen Zentrifugation (LSP) wurde nach dem Protokoll 10 des QIA Express Systems (QIAgen) vorgenommen (siehe 2.5.9). Die Solubilisierung erfolgte mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid. Dieses Reagenz ermöglicht eine effizientere Solubilisierung als Harnstoff. In der anschließenden Reinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie wurde das Protein in 8 M Harnstoff umgepuffert. Dabei konnte LuxO in ausreichendem Maße angereichert werden (Abb. 3.21). Das Protein wurde in 0,5 ml- bzw. 1 ml-Schritten eluiert. Die größte Proteinmenge wurde mit den Elutionsfraktionen mit pH 4,5 erreicht. Um das Protein möglichst kurz den sauren Bedingungen auszusetzen, wurden die Elutionsfraktionen im gleichen Volumen eines Puffers aufgefangen, mit dem ein neutraler pH erreicht wurde (siehe 2.5.9). In Abb. 3.21 und 3.22 ist zu sehen, dass LuxO nicht vollständig an die Agarose bindet. Die Fraktionen der Elution mit pH 4,5 wurden, um eine größere Proteinmenge zu erhalten, vermischt und zur Renaturierung eingesetzt. Der Renaturierungsprozess erfolgte über schrittweise Reduktion des Harnstoffs mittels Dialyse (Li und Plamann, 1996). Je nach Reinigung wurden zwischen 0,6 und 1,6 mg/ml erhalten. Der in der Elutionsfraktion enthaltene 8 M Harnstoff wurde dabei gegen 6 – 3 – 2 – 0,5

und zweimal gegen 0 M Harnstoff im Dialysepuffer ausgetauscht. Während der Dialyse fiel das Protein bis zu 85% aus (Abb. 3.23). Nach dem ersten 0 M-Dialyseschritt blieb das Protein stabil.

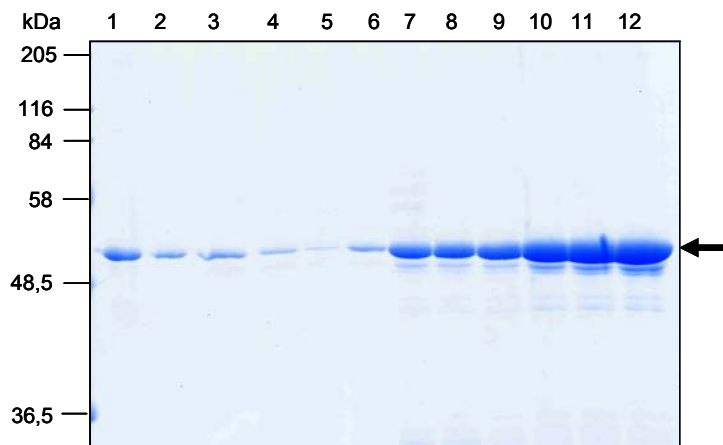


Abb. 3.21: Reinigung von LuxO mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie. Die Elution erfolgte je nach Reinigungsprozess in 0,5 ml- bzw. 1 ml-Schritten. Gezeigt ist ein 10%iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl/Spur. Die Proteinbande von LuxO ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. **1:** Säulendurchfluss, **2-4:** Waschschrift mit pH 7,0, **5-8:** Elution mit pH 5,9, **9-12:** Elution mit pH 4,5.

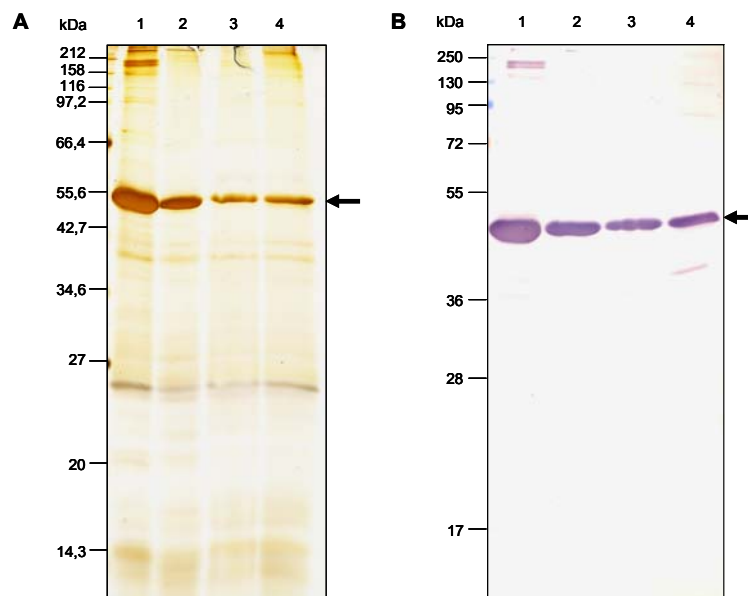


Abb. 3.22: Silberfärbung und Western-Blot des mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigten LuxO. Gezeigt ist jeweils ein 10%iges SDS-Gel nach Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) (**A**) und Immunodetektion mit Penta-His-Antikörper (**B**). Aufgetragen wurden jeweils 5 µg/Spur. Die Proteinbande von LuxO ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. **1:** Pellet der niedertourigen Zentrifugation (LSP), **2:** Eluat mit pH 4,5 (nach Reinigung des mit 8 M Harnstoff solubilisierten Proteins), **3:** renaturiertes Protein des ersten 0 M-Dialyseschritts, **4:** renaturiertes Protein des zweiten 0 M-Dialyseschritts.

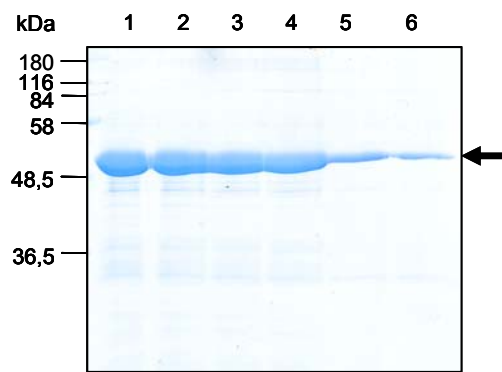


Abb. 3.23: Dialyse von LuxO. Gezeigt ist ein 10%iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils 5 μ l/Spur. **1:** LuxO [1,6 mg/ml] in 8 M Harnstoff vor der Dialyse, **2:** LuxO in 6 M Harnstoff, **3:** LuxO in 3 M Harnstoff, **4:** LuxO in 2 M Harnstoff, **5:** LuxO in 0,5 M Harnstoff, **6:** LuxO [0,26 mg/ml] in 0 M Harnstoff.

3.5.2.1 Strukturaufklärung des renaturierten LuxO mittels Circular dichroismus-Analyse

Um die Renaturierung von LuxO biophysikalisch zu verfolgen, wurde entsprechend 2.6.1 mit dem Spektropolarimeter Jasco J-810 des Botanischen Instituts der LMU mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Hugo Scherr (Emeritus des Botanischen Instituts) ein Circular dichroismus (CD) - Spektrum des Renaturierungsprozesses der verschiedenen Dialysestufen erstellt. Mit einem CD-Spektrum kann geklärt werden, ob ein Protein ungefaltet, eher helikal oder β -Faltblatt-artig aufgebaut ist. Die Methode beruht darauf, dass die chromophoren Gruppen in den Proteinen mit den beiden Komponenten des zirkular polarisierten Lichts unterschiedlich wechselwirken und daher unterschiedlich absorbiert werden. Dies ist dann der Fall, wenn optisch aktive Verbindungen vorliegen. Die Absorption ist dabei abhängig von der Wellenlänge. Messbar sind zwei Spektralbereiche: (1) Fern-UV: 180 - 240 nm (Amidregion), wodurch der Sekundärstrukturgehalt eines Proteins bestimmt wird; (2) Nah-UV: 250 - 290 nm (Aromatenbereich), welcher der Charakterisierung der Tertiärumgebung von aromatischen Seitenketten dient (Kelly *et al.*, 2005; Kelly und Price, 1997).

Zur Aufklärung der Struktur von LuxO wurde eine Fern-UV-Circulardichroismus-Analyse vorgenommen. Die Proteinkonzentration wurde hierfür auf eine Absorption von 0,2 bei 280 nm eingestellt. Gemessen wurde der Absorptionsbereich von 250 – 190 nm bei 10°C (Abb. 3.24). Es zeigte sich die Ausbildung einer α -helikalen Struktur während des Renaturierungsprozesses, erkennbar an dem negativen Peak im Bereich von 205 – 220 nm. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 Messungen einer Probe. In der noch denaturierenden Konzentration von 3 M Harnstoff ist das Protein noch nicht vollständig zurückgefaltet, aber auch nicht mehr komplett entfaltet, wohingegen im Bereich von 2 M Harnstoff eine eindeutige α -helikale Strukturausbildung erkennbar ist. Das bedeutet, dass sich LuxO auch unter denaturierenden Bedingungen (ab 3 M) beginnt zurückzufalten. Ein negativer Peak bei 205 nm der 2 M-Lösung deutet auf eine gute α -helikale Strukturausbildung hin (pers. Kommunikation Prof. Dr. Scherr). Bei 0,5 und 0 M Harnstoff ist kein Peak mehr erkennbar, was wahrscheinlich daran lag, dass das Protein zum Großteil in diesen Lösungen aggregiert vorlag. Die Aggregation des Proteins während der Dialyse wurde schon in Kap. 3.5.2 erwähnt. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration nach der CD-Spektroskopie wurde eine Absorptionsmessung im Bereich von 280 - 320 nm durchgeführt. Dabei sollte die zuvor eingestellte Extinktion von 0,2 bei 280 nm bei der Wellenlänge von 320 nm gegen Null gehen. Tatsächlich lag die Konzentration der Proben von LuxO in 0,5 und 2 M Harnstoff bei höheren Extinktionswerten (Daten nicht gezeigt). Zur Berechnung wurden diese Werte normalisiert.

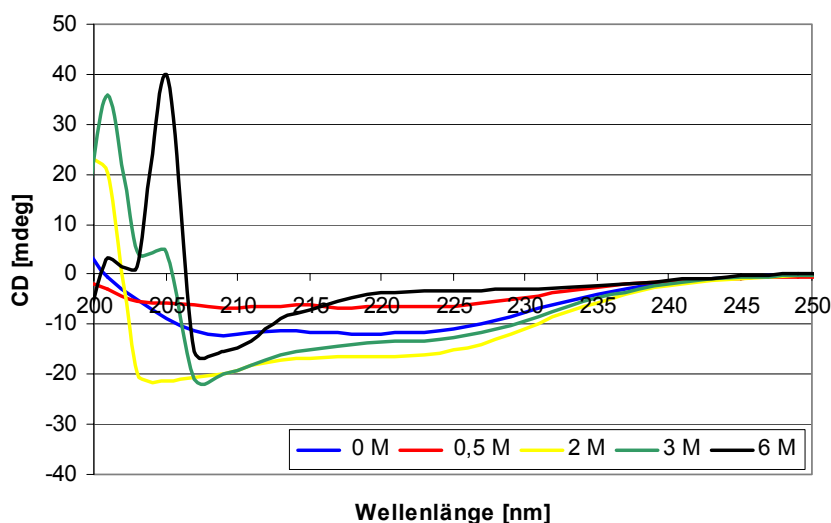


Abb. 3.24: Fern-UV-Circulardichroismus vom Renaturierungsprozess von LuxO. Gemessen wurden die Proben in 6 - 3 - 2 - 0,5 - 0 M Harnstoff bei 10°C in einem Bereich von 200 – 250 nm. Der CD-Wert wird in Millidegree [mdeg] angegeben. Linien: **blau:** LuxO in 0 M Harnstoff, **rot:** LuxO in 0,5 M Harnstoff, **gelb:** LuxO in 2 M Harnstoff, **grün:** LuxO in 3 M Harnstoff, **schwarz:** LuxO in 6 M Harnstoff.

Das Programm GOR IV (Garnier *et al.*, 1996) sagt folgende Strukturverteilung im Protein LuxO voraus: 40,4% α -Helix (183 AS), 44,59% β -Faltblatt (202 AS) und 15,01% *Random Coil* (68 AS). Basierend auf der Voraussage von 40,4% konnte der α -helikale Anteil in den einzelnen Renaturierungsstufen anhand der erhaltenen Extinktionswerte rechnerisch nach der vereinfachten Formel (1) nach Greenfield und Fasman (1969) bestimmt werden.

$$(1) \quad \% \alpha\text{-Helix} = \frac{(-[\theta]_{208 \text{ nm}} - 4000)}{270}$$

Hierbei ist $[\theta]_{208 \text{ nm}}$ (θ , Elliptizität) der Circulardichroismus bei 208 nm, bezogen auf einen Aminosäurerest. Er errechnet sich nach Formel (2):

$$(2) \quad [\theta]_{208 \text{ nm}} = \frac{\theta_{208 \text{ nm}}}{c * n_{aa}}$$

Der Wert $\theta_{208 \text{ nm}}$ ist dabei der gemessene CD-Wert in einer 1 mm-Küvette, c ist die Konzentration in [M] und n_{aa} die Zahl der Aminosäuren (LuxO: 453 AS). Die Konzentration c erhält man nach Formel (3):

$$(3) \quad c = \frac{E_{280 \text{ nm}}}{\epsilon_{280 \text{ nm}}}$$

Die Extinktion bei 280 nm wird für 1 cm Schichtdicke bestimmt. Der Wert für den Extinktionskoeffizienten ϵ beträgt für LuxO: $\epsilon_{280} = 40255 / (\text{M} \cdot \text{cm})$ [aus der Datenbank von ProtParam (Gasteiger, 2005)].

Zur abschätzenden Berechnung des α -helikalen Anteils in einem Protein verwendet man die CD-Signalwerte bei 208 bzw. 220 nm (Barrow *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 2005; Kelly und Price, 1997). Aufgrund der gemessenen Daten wurde für LuxO der Wert bei 220 nm verwendet. Trotz der Aggregation eines Großteils des Proteins in der 0,5 M- und 0 M-Lösung sind einige rückgefaltete Proteinmoleküle vorhanden, die eine α -helikale Struktur im CD-Spektrum aufweisen. Ausgehend von 40,4% α -Helix, gleichgesetzt maximaler α -helikaler Struktur (entspricht 100%), wurde der prozentuale Anteil an α -Helix in den verschiedenen Proben berechnet. Das Protein LuxO wurde dabei im Verlauf der Renaturierung bis zu 100% [in 0 M Harnstoff] in seiner α -helikalen Struktur renaturiert (Tab. 3.4). Das renaturierte Protein in 0 – 0,5 – 2 M Harnstoff wurde enzymatisch in der *in vitro*-Phosphorylierung von LuxN \rightarrow LxuU \rightarrow LuxO (entsprechend 2.5.12) eingesetzt. Trotz der protokollierten Ausbildung von α -helikalen Bereichen konnte allerdings keine enzymatische Aktivität des renaturierten Proteins nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.4: Prozentualer α -helikaler Anteil im Protein LuxO während des Renaturierungsprozesses.

Protein-Probe in x M Harnstoff	% α -Helix	% renaturiertes Protein (basierend auf 40,4%)
3 M	9	22
2 M	14	35
0,5 M	31	75
0 M	45	100

3.5.2.2 Renaturierung von LuxO mit verschiedenen Additiven

Da das Protein trotz des anscheinend funktionierenden Rückfaltungsprozesses keine enzymatische Aktivität aufwies, wurde versucht die Renaturierung durch Zusatz von Additiven zu verbessern. Additive, wie z. B. L-Arginin, unterstützen die Rückfaltung von denaturierten Proteinen, indem sie die Aggregatbildung, ein häufiges Problem, unterdrücken. Dabei erhöhen sie vermutlich die Löslichkeit der Faltungsintermediate durch Abschirmung hydrophober Bereiche (Tsumoto *et al.*, 2004; Umetsu *et al.*, 2003; Vallejo und Rinas, 2004). Bei Proteinen, die wie LuxO Cysteine enthalten, können die *Inclusion Bodies* willkürlich Disulfidbrücken zu anderen Proteinen ausbilden. Durch die Zugabe von reduzierenden Agenzien (z. B. Dithiotreitol, β -Mercaptoethanol) können solche unerwünschten Disulfidbrücken reduziert werden (Rudolph und Lilie, 1996). Aus diesem Grund wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem das Protein wie unter 2.5.9 beschrieben gereinigt wurde, und mit dem Zusatz von 10 mM β -Mercaptoethanol im Reinigungspuffer, sowie durch Zugabe von 400 mM L-Arginin im Dialysepuffer renaturiert wurde. Die anschließende Phosphorylierung von LuxO über LuxN und LuxU ergab aber auch hier keine enzymatische Aktivität des renaturierten LuxO (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres Experiment war der Versuch, die Renaturierung mit dem Phospholipid Lysophosphatidylethanolamin (LPE) zu unterstützen. Dieses wird auch als eine Art Chaperon zur Faltung von Proteinen angewendet, die zuvor mit Harnstoff denaturiert wurden (Kern *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich LuxO mit Hilfe dieses Phospholipids in eine aktive Form rückfalten lässt. Für die Renaturierung der Citrat-Synthase konnte mit 20 μ M LPE eine maximale Renaturierung erreicht werden (Kern *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde 20 μ M LPE zu 5 μ M LuxO in den Dialyseschritten 3 – 2 – 0,5 – 0 M Harnstoff gegeben. Für den anschließenden Phosphotransfer (nach 2.5.12) wurde LuxO aus den Puffern mit 0 - 0,5 und 2 M Harnstoff (Restharnstoff im Reaktionsansatz: aus 0,5 M-Puffer \rightarrow 0,11 M; aus 2 M-Puffer \rightarrow 0,362 M) eingesetzt. Zunächst zeigte sich eine schwächere Phosphorylierung von LuxU durch das LuxO in 0,5 M Puffer im Gegensatz zur Pufferkontrolle mit Dialysepuffer, was bei einem

weiteren Test aber nicht bestätigt werden konnte. Möglicherweise war LuxU~P im ersten Fall präzipitiert. Demnach wurde auch durch Zusatz von LPE während der Renaturierung keine Aktivität von LuxO als Antwortregulator nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.5.3 Markierung von LuxO mit [γ - 32 P]-Acetylphosphat

Um die Aktivität des Antwortregulators in der Signaltransduktionskaskade nachzuweisen, wurde untersucht, ob sich LuxO mit niedermolekularen Phosphodonoren, wie z. B. [γ - 32 P]-Acetylphosphat, phosphorylieren lässt. Dieses wurde auch schon erfolgreich für andere Proteine eingesetzt (Feng *et al.*, 1992; Heermann *et al.*, 2003; Lukat *et al.*, 1992; McCleary und Stock, 1994). Aus diesem Grund wurde [γ - 32 P]-Acetylphosphat wie unter 2.5.12.2 beschrieben synthetisiert und zur Markierung von LuxO eingesetzt. Als Nachweis für die Aktivität des synthetisierten radioaktiv markierten Acetylphosphats wurde KdpE-10His verwendet, das nach 30 min eine starke Markierung aufwies (Abb. 3.25A). Das gereinigte und renaturierte LuxO aus den Dialysestufen 0 - 0,5 und 2 M Harnstoff wurde wie folgt getestet. Bei der Reaktion mit dem Protein in der Lösung ohne Harnstoff wurde nach jeweils 5 - 15 - 30 und 60 min eine Probe entnommen und die Reaktion mit 5x SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Proteinproben wurden anschließend mittels Semidry-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Exposition auf einem Phosphor-Screen konnten Banden detektiert werden (Abb. 3.25A). Zum ersten Mal konnte eine schwache Aktivität des renaturierten Proteins nachgewiesen werden. Bis 5 min ist das radioaktiv markierte Protein stabil, die Aktivität nahm aber schon nach weiteren 10 min ab (Abb. 3.25A). Die Markierung von LuxO in 0,5 und 2 M Harnstoff wurde deshalb bereits nach 0,67 - 2 - 5 - 10 und 15 min mit 5x SDS-Probenpuffer abgestoppt und erneut auf die Nitrocellulosemembran transferiert (Abb. 3.25B). Für das Protein in der 0,5 M-Lösung ist eine ähnlich hohe Markierung erkennbar wie für das Protein in der Harnstoff-freien Lösung. Das Protein bleibt auch in der 2 M-Harnstoff-Lösung stabil und zeigt eine stärkere Markierung, die aber auf die 6fach höher eingesetzte Proteinmenge zurückzuführen ist. Tatsächlich war bei allen drei

LuxO-Dialysestufen eine Phosphorylierung des Proteins nachzuweisen. Der Test mit dem Acetylphosphat gibt demnach erste Hinweise darauf, dass das wie in Kap. 3.5.2 beschrieben, aus den *Inclusion Bodies* gereinigte und renaturierte LuxO, tatsächlich aktiv ist bzw. dass zumindest die Phosphatbindestelle frei zugänglich ist. Eine Detektion der Phosphorylierung anhand eines Autoradiogramms war nicht möglich, da die Hintergrundstrahlung anscheinend höher war als die Strahlung des markierten LuxO.

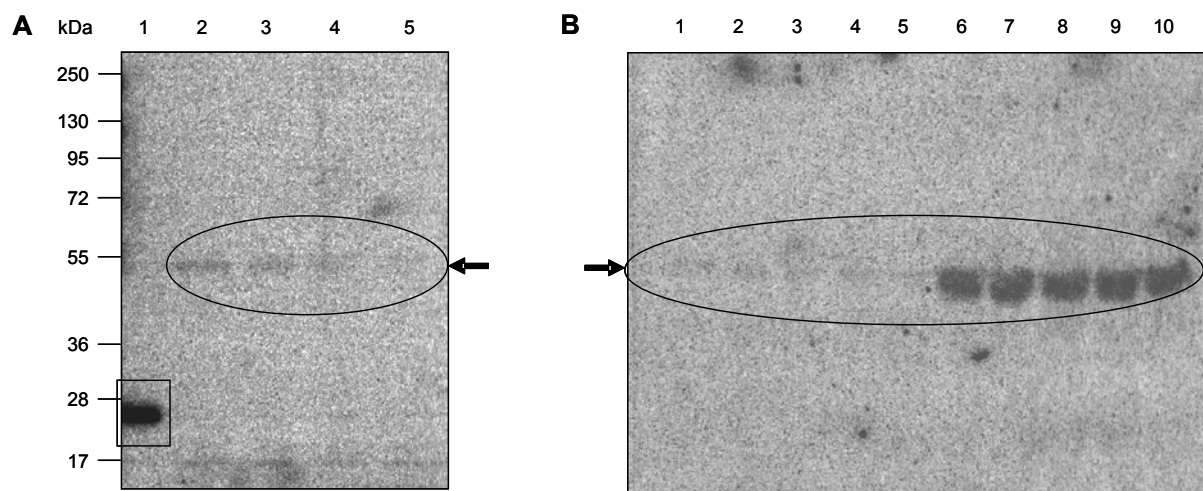


Abb. 3.25: Phosphorylierung von LuxO mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Acetylphosphat. Getestet wurden LuxO-Proben aus den Dialysestufen mit 0 - 0,5 und 2 M Harnstoff. Die Reaktion wurde mit 40 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Acetylphosphat gestartet, und nach gegebenen Zeitpunkten mit 5x SDS-Probenpuffer vermischt. Danach wurden die Proteinproben in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Gellauf durch einen Semidry-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Blot wurde auf einem Phosphor-Screen exponiert. Als Kontrolle für die Radioaktivität des synthetisierten $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Acetylphosphats wurde das Protein KdpE-10His mitgeführt (Probenentnahme nach 30 min), das mit einem Rechteck gekennzeichnet wurde (**A, Spur 1: 47 $\mu\text{g}/\text{Spur}$**). Die Proteinbanden von LuxO sind mit einem Pfeil und einer Ellipse markiert.

A: LuxO in 0 M (Spur 2-5; 2,7 $\mu\text{g}/\text{Spur}$), **1:** nach 5 min, **2:** nach 15 min, **3:** nach 30 min, **4:** nach 60 min.
B: LuxO in 0,5 M (Spur 1-5; 6 $\mu\text{g}/\text{Spur}$) und 2 M Harnstoff (Spur 6-10; 17 $\mu\text{g}/\text{Spur}$); **1/6:** nach 0,67 min, **2/7:** nach 2 min, **3/8:** nach 5 min, **4/9:** nach 10 min, **5/10:** nach 15 min.

3.5.4 DNA-Bindungsexperiment mit LuxO *in vitro*

Vor kurzem wurden für *V. cholerae* und *V. harveyi* zum ersten Mal vier bis fünf kleine regulatorische sRNA-Moleküle beschrieben, die an der Regulation von LuxR durch LuxO beteiligt sind (Lenz *et al.*, 2004). Mittlerweile hat man in *V. cholerae* vier und in *V. harveyi* fünf sRNA-Moleküle identifiziert (Tu und Bassler, 2007). Diese kleinen sRNAs werden zusammen mit dem Sigma-Faktor σ^{54} durch das aktive LuxO (LuxO~P) reguliert. Mittels genetischer Analysen der Regionen stromaufwärts der sRNA-Loci wurde eine hoch konservierte Region mit der Konsensussequenz **TTGCAW₃TGCAA** (mit W als A/T) stromaufwärts der hypothetischen σ^{54} -Bindestelle identifiziert. Diese Region wird als hypothetische LuxO~P-Bindestelle vermutet (Lenz *et al.*, 2004). Ein Auszug aus der DNA-Sequenz des *luxOU*-Operons mit der Konsensussequenz von *qrr1*, der hypothetischen σ^{54} -Bindestelle und der hypothetischen LuxO~P-Bindestelle, sowie ein Teil von *luxO* (bp +1 bis +216 bp stromaufwärts des Start-Codons), ist in Abb. 3.26 dargestellt.

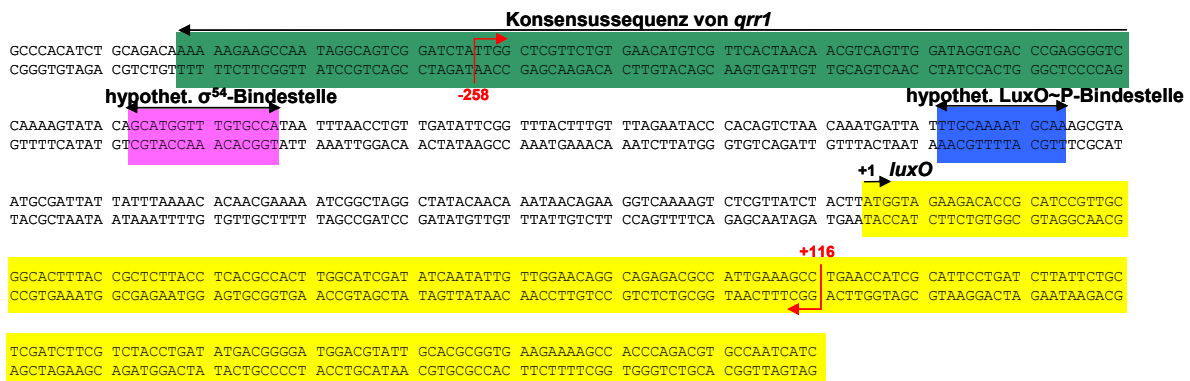


Abb. 3.26: Auszug aus der DNA-Sequenz des *luxOU*-Operons. **grün:** Konsensussequenz von *qrr1*, **rosa:** hypothetische σ^{54} -Bindestelle, **blau:** hypothetische LuxO~P-Bindestelle, **gelb:** ein Teil der DNA von *luxO* (bp +1 bis +216 bp stromaufwärts des Start-Codons), **rote Pfeile:** Bindestellen der Primer zur Amplifizierung von spezifischer DNA (bp -258 stromabwärts des Start-Codons von *luxO* bis bp +116 stromaufwärts des Start-Codons von *luxO*).

Ausgehend von den Untersuchungen mit radioaktivem Acetylphosphat, in denen das renaturierte LuxO eine frei zugängliche Phosphatbindestelle aufwies, wurde die Aktivität des renaturierten LuxO dahingehend untersucht, ob das aktivierte LuxO (LuxO~P) an die

DNA bindet. Für diese Untersuchung wurde LuxO wie unter 2.5.13 beschrieben mit nicht radioaktiv markiertem Acetylphosphat markiert und mit spezifischer DNA (aus 2.4.8: bp -258 stromabwärts des Start-Codons von *luxO* bis bp +116 stromaufwärts des Start-Codons von *luxO*) inkubiert. Als Kontrolle dienten H₂O und unspezifische DNA (aus 2.4.8: bp +1 bis +110 stromaufwärts des Start-Codons von *luxO*). LuxO mit der Konzentration von 0,12 mg/ml [entsprechend 1,83 µM] wurde wie unter 2.5.13 angegeben in aufsteigender Konzentration (0 – 1,5 – 4,5 – 13,5 – 40,5 – 121,5 – 364,5 – 1093,5 nM) mit Acetylphosphat phosphoryliert, zu der markierten DNA gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde die Reaktion mit H₂O anstatt Acetylphosphat durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in 6x Sucrose-Dye-Solution aufgenommen und in einem 5%igen nativen Gel aufgetrennt. Anhand Abb. 3.27 ist zu sehen, dass das renaturierte LuxO nur an die spezifische DNA, aber nicht an die unspezifische DNA bindet, erkennbar an der Abnahme der freien DNA bei Zunahme der LuxO-Menge. LuxO bindet dabei sowohl im phosphorylierten als auch im unphosphorylierten Zustand an die DNA. Ein Bandshift ist dabei nicht erkennbar, sondern eine Verteilung der gebundenen DNA über einen größeren Bereich des Gels, erkennbar an einer dunkleren Verfärbung des Gellaufs von 1093,5 nM LuxO (Abb. 3.27A). Die Bindung des phosphorylierten Proteins zeigt allerdings durch die beginnende Abnahme der freien DNA im Konzentrationsbereich von 364,5 nM eine höhere Affinität zur DNA als das unphosphorylierte Protein. Im Gegensatz dazu bindet das unphosphorylierte LuxO die freie DNA erst bei einer 3fach höheren Zugabe von LuxO (1093,5 nM). Eine höhere Molarität von LuxO konnte aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration nicht getestet werden. Hierfür müsste die Renaturierung noch weiter optimiert werden. Mit diesem Experiment konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das renaturierte LuxO in einer aktiven Form vorliegt.

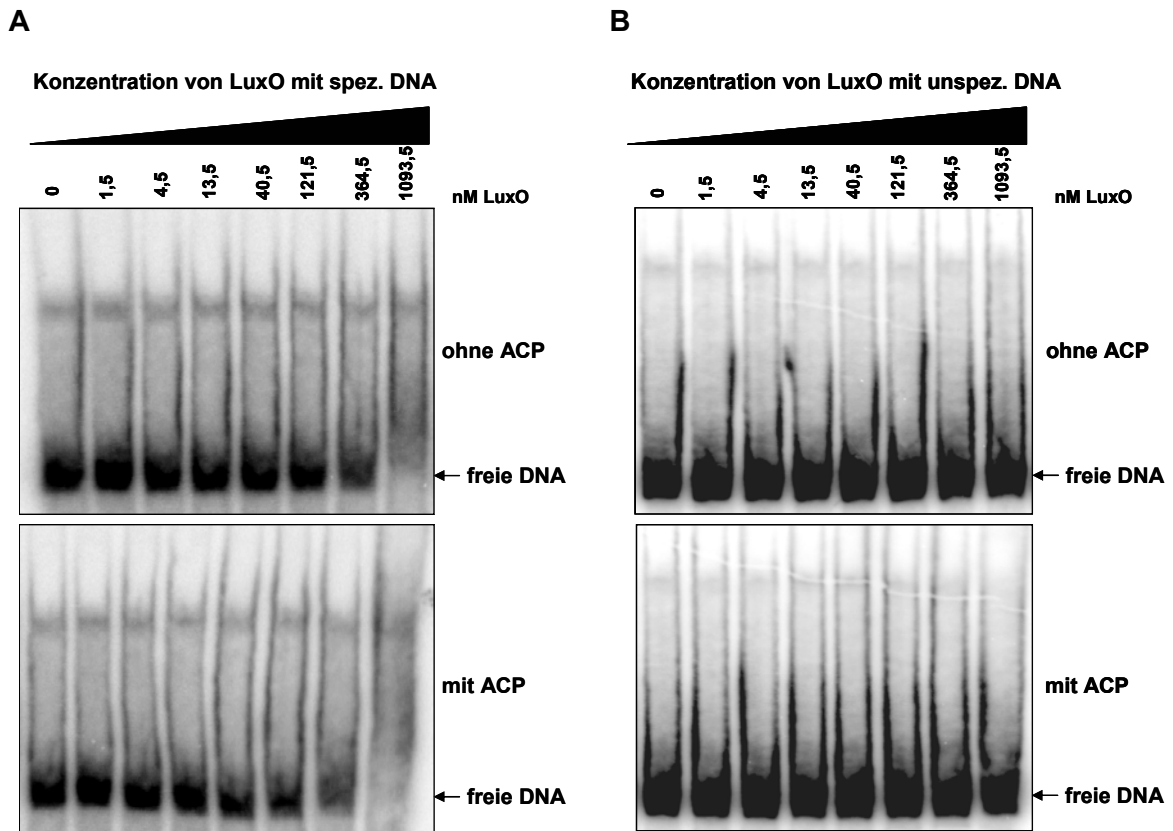


Abb. 3.27: Bindung von LuxO an die spezifische DNA des *luxUO*-Operons *in vitro*. Radioaktiv markierte DNA-Fragmente (spezifische DNA (A) und unspezifische DNA (B)) wurden mit gereinigtem und renaturiertem LuxO (in 0 M-Harnstoff) in steigender Konzentration: 0 – 1,5 – 4,5 – 13,5 – 40,5 – 121,5 – 364,5 – 1093,5 nM (markiert mit einem schwarzen Dreieck), mit Acetylphosphat (**mit ACP**) bzw. zur Kontrolle mit destilliertem H₂O (**ohne ACP**) inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 5%igen nativen Gel. Aufgetragen wurden jeweils 4,5 nM LuxO/Spur. Die freie DNA wurde mit einem Pfeil markiert.

4 Diskussion

Das Interesse an der Forschung über Quorum sensing ist in den letzten Jahren gestiegen. Die Aufklärung von Quorum sensing ist dabei nicht nur vom akademischen Standpunkt aus interessant, sondern auch für die Industrie. Quorum sensing wird von Bakterien betrieben, um Prozesse zu regulieren, die für einzelne Bakterien ineffizient wären. Dazu zählen z. B. die Produktion von Antibiotika, Proteasen und Siderophoren, sowie Toxinen, die Biolumineszenz und die Bildung von Biofilmen. Die Genregulation dieser Prozesse wird erst durch die Sekretion und Resorption von Signalmolekülen, so genannter Autoinduktoren, ermöglicht. Das Zelldichte-abhängige System ist bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien unterschiedlich aufgebaut. Seit einiger Zeit ist ein System bekannt, das beide Systeme vereinigt: das Phosphorelay-System, bei dem die Phosphorylgruppe über mehrere Histidin- und Aspartatreste (His → Asp → His → Asp), unter Beteiligung eines Phosphorelay-Proteins (HPt-Protein) und des Antwortregulators, geleitet wird. Dieses System kommt z. B. in dem marinen solitär lebenden Gram-negativen Bakterium *V. harveyi* vor. Das Quorum sensing-System in *V. harveyi* ist bisher fast ausschließlich durch genetische Analysen untersucht worden. Für die Charakterisierung der Signalaufnahme und -weiterleitung stehen nun auch biochemische Untersuchungen im Vordergrund. Die Aktivität der Hybridsensorkinase LuxN und des Phosphorelay-Proteins LuxU konnten von Timmen *et al.* (2006) schon weitestgehend geklärt werden; ebenso die der Hybridsensorkinase LuxQ (Stambrau, 2008). Weiterhin interessant blieb die Strukturaufklärung der Hybridsensorkinasen in Bezug auf die Signalaufnahme. Erste Untersuchungen zur Topologie von LuxN wurden von Timmen (2005) vorgenommen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Charakterisierung von LuxN und LuxO fortzusetzen und zu ergänzen.

4.1 Die Hybridsensorkinase LuxN

4.1.1 Aufklärung der Membrantopologie von LuxN mit Bestimmung der Lokalisation des N-Terminus

Um ein Protein genau charakterisieren zu können, sollte man seine Topologie kennen. Anhand der Aminosäuresequenz kann man mit Hilfe von Hydropathieuntersuchungen mittels Computerprogrammen schon einiges ableiten. Eine genaue Analyse mit Hilfe von molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden ergibt dann ein endgültiges Bild vom Protein.

Für das Protein LuxN mit 849 Aminosäuren sagten diverse Hydropathieanalysen bis zu neun transmembrane Domänen im Bereich der ersten 300 Aminosäuren voraus. In einer früheren Arbeit (Timmen, 2005) wurden erste Untersuchungen aufgrund dieser Angaben vorgenommen. Die angewandte Methode hierfür war die Reporterfusion des *luxN*-Fragmentes unterschiedlicher Länge an die Reportergene *lacZ* und *phoA*. Das Reportergen *lacZ* codiert für die β -Galaktosidase (LacZ; BG), die nur im Cytoplasma aktiv ist. *phoA* codiert für die alkalische Phosphatase (PhoA; AP), die erst durch die nicht-reduzierende Umgebung im Periplasma dimerisieren kann und dadurch aktiv wird. Durch die Bestimmung der Aktivitäten der beiden Reporterproteine dienen diese als Indikatoren für die Lokalisation der verkürzten Proteindomänen (Manoil, 1991; Manoil, 1990; Manoil und Beckwith, 1986).

Durch die Lokalisation der Histidin- (H471) und Aspartatkinasedomäne (D771) im Cytoplasma, und die sehr hohe BG-Aktivität (1113 ± 93 Miller Units) des Hybridproteins LuxN1-305-LacZ, konnte davon ausgegangen werden, dass sich dieser Aminosäurerest im Cytoplasma befindet (Abb. 4.1). Fusionspunkte deren entsprechende Hybridproteine bisher keine eindeutigen Ergebnisse aufwiesen, wurden in dieser Arbeit um folgende Reporterfusionen ergänzt: E40, Q150 und P276 (*lacZ*-Konstrukt), sowie A190 (*phoA*-Konstrukt). Das Hybridprotein LuxN1-40-PhoA aus Timmen (2005) zeigte eine zwar niedrige AP-Aktivität, die Messung der BG-Aktivität des in dieser Arbeit hergestellten Hybridproteins LuxN1-40-LacZ hingegen erwies eine der höchst gemessenen BG-

Aktivitäten mit 1768 ± 162 Miller Units. Damit ist der Fusionspunkt E40 eindeutig cytoplasmatisch lokalisiert. Für die Hybridproteine des Fusionspunktes Q150 wurde eine hohe AP- (150 ± 20 Miller Units), aber ebenso eine hohe BG-Aktivität (857 ± 265 Miller Units) nachgewiesen. Die AP-Aktivität von LuxN1-150-PhoA ist im Vergleich zu allen hier gemessenen AP-Aktivitäten die zweithöchste; auch das Verhältnis von BG zu AP-Aktivität ist sehr niedrig, sodass von einer falsch-positiven BG-Aktivität auszugehen ist (Tab. 3.1).

Derartige Ergebnisse wurden auch für die Proteine CorS aus *Pseudomonas syringae* (Smirnova und Ullrich, 2004) oder MntB aus *Synechocystis sp.* (Bartsevich und Pankrasi, 1999) erzielt. Es ist bekannt, dass LacZ nicht so zuverlässige Reporteraktivitäten aufweist wie PhoA (Bartsevich und Pakrasi, 1999). LacZ-Fusionen an periplasmatischen Domänen weisen oftmals hohe Aktivitäten auf, da durch das große Reporterprotein die Membranintegration des Hybridproteins gestört wird (Bartsevich und Pakrasi, 1999). Da der Fusionspunkt Q150 zusätzlich inmitten von zwei postulierten Transmembrandomänen liegt und von drei negativ geladenen Aminosäuren (Aspartat (D) und Glutamat (E)) umgeben ist, ist nach der „*positive inside rule*“ nach von Heijne (1992) eine periplasmatische Lokalisation eindeutig. Für das von Timmen (2005) hergestellte Hybridprotein LuxN1-190-PhoA wurde eine äußerst niedrige Aktivität bestimmt (14 ± 2 Miller Units). Im Vergleich dazu hat das LacZ-Hybridprotein (LuxN1-190-LacZ) aus dieser Arbeit an diesem Punkt eine mittlere Aktivität (412 ± 66 Miller Units), sodass dieser Fusionspunkt tatsächlich cytoplasmatisch lokalisiert ist. Das in dieser Arbeit untersuchte Hybridprotein LuxN1-276 mit einer LacZ-Fusion hatte eine niedrige Aktivität (220 ± 23 Miller Units) im Vergleich zu der von Timmen (2005) bestimmten hohen AP-Aktivität von LuxN1-276-PhoA (90 ± 5 Miller Units). Demnach ist dieser Punkt einer periplasmatischen Lokalisation zuzuweisen. Aufgrund der Ergebnisse für die Fusionspunkte E40, I61 und Q109, müssen sich zwischen E40 und Q109 zwei transmembrane Domänen befinden. So bestätigen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse die von Timmen erhaltenen (2005) als einen Nachweis über das Vorhandensein von zumindest 8 Transmembrandomänen im Bereich der Aminosäuren 40-305 (Abb. 4.1).

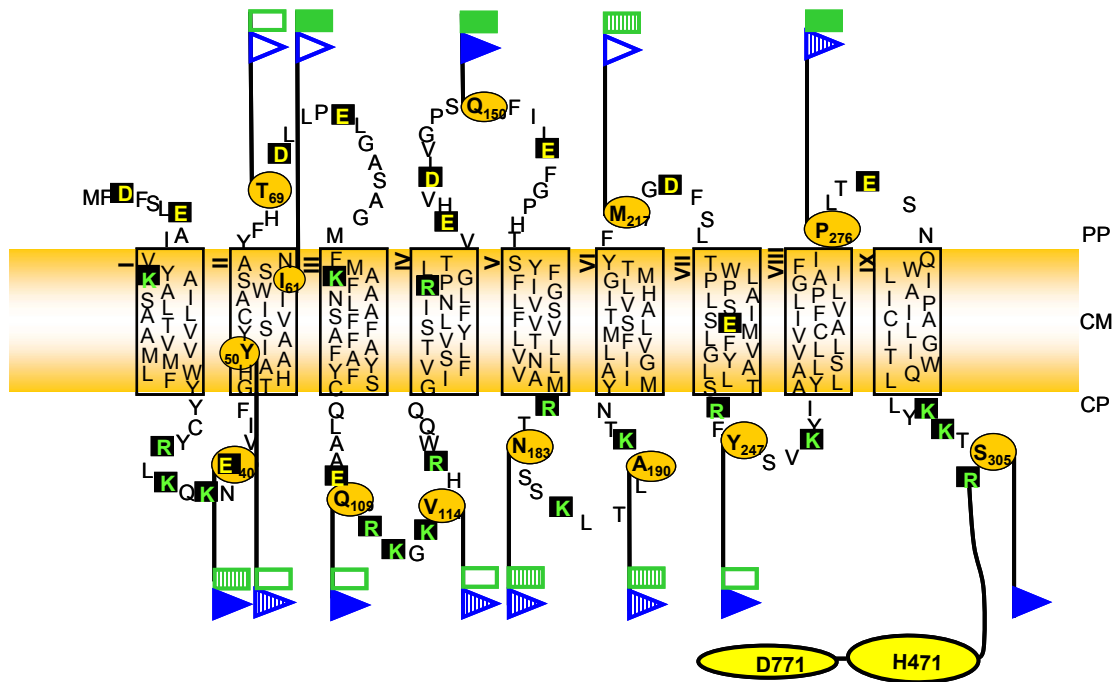


Abb. 4.1: Sekundärstrukturmodell von LuxN ausgehend von den Aktivitätsbestimmungen der LuxN- β -Galaktosidase- und der LuxN-Alkalische Phosphatase-Hybridproteine. Die Sequenz von LuxN ist im Einbuchstaben-Code für Aminosäuren wiedergegeben. Geladene Aminosäuren wurden schwarz unterlegt (**gelb:** negative Ladung (D, E), **hellgrün:** positive Ladung (K, R)). Die goldfarbenen Kreise kennzeichnen die Position der Fusionspunkte. Hybridproteine aus dieser Arbeit sind: LuxN1-40-LacZ, LuxN1-150-LacZ, LuxN1-190-PhoA und LuxN1-276-LacZ; alle anderen Hybridproteine wurden in Timmen (2005) untersucht. Die blauen Fähnchen markieren die Aktivität der β -Galaktosidase, die grünen Kästchen die Aktivität der alkalischen Phosphatase: **ausgefüllt:** hohe Aktivität, **gestreift:** mittlere Aktivität, **ohne Füllung:** keine Aktivität. Aminosäuren, die zu einer Transmembrandomäne gehören, wurden mit einem schwarzen Rahmen versehen. Die Transmembrandomänen sind mit römischen Zahlen gekennzeichnet. **PP:** Periplasma, **CM:** Cytoplasmamembran, **CP:** Cytoplasma, **H471:** Histidinkinasedomäne mit dem konservierten Histidinrest H471, **D771:** Aspartatkinasedomäne mit dem konservierten Aspartatrest D771.

Mit der Bestimmung der Reporterogenaktivitäten konnte das Vorhandensein von 8 transmembranen Domänen in LuxN abgesichert werden. Die Lokalisation des N-Terminus konnte mit dieser Strategie nicht verfolgt werden, da der Bereich der Aminosäuren 1-10 zu kurz ist, ein entsprechendes Reporterprotein zu fusionieren und dieses als Hybridprotein zu detektieren.

Eine erfolgsversprechende Strategie diese Annahme zu bestätigen, war die in dieser Arbeit verwendete Fusion des N-Terminus an das Maltosebindeprotein, die auch schon für andere Membranproteine angewendet wurde (Dassa und Lambert, 1997; Miller *et al.*, 1993). Das Maltosebindeprotein (MBP oder MalE) wird von dem Gen *malE* codiert und besteht aus 369 Aminosäuren mit einem relativen Molekulargewicht von 40,661. Es wird

bei Gram-negativen Bakterien für den Transport von Maltose und Maltodextrin benötigt und hierfür posttranslational über das Sec-System ins Periplasma transportiert. Dort werden die beiden Zucker durch MalE komplexiert und über einen ABC-Transporter, bestehend aus den Proteinen MalF, MalG und MalK₂, ins Cytoplasma transportiert. Die Struktur des MBP wurde Anfang der 1990er Jahre aufgeklärt (Spurlino *et al.*, 1991). Es handelt sich um ein monomeres Protein mit zwei getrennten globulären Domänen, zwischen denen sich die Substratbindestelle befindet.

Für die Untersuchung des N-Terminus wurde das 5'-Ende von *luxN* an ein an das für das MBP mit Signalsequenz codierende *malE* fusioniert, woraus das Hybridprotein MBP_p-LuxN resultierte. Zum anderen wurde das 5'-Ende von *luxN* an das für das MBP mit deletierter Signalsequenz (di Guana *et al.*, 1988) codierende *malE* fusioniert, woraus das Hybridprotein MBP_c-LuxN gebildet wurde. Das periplasmatische MBP (MBP_p) bewirkt, dass der N-Terminus eines Proteins ins Periplasma transportiert wird, während dieser mit dem cytoplasmatischen MBP (MBP_c) im Cytoplasma lokalisiert ist. Grund für die Verwendung der unterschiedlich lokalisierten Reporterproteine war die Annahme, dass LuxN nur dann richtig gefaltet ist, wenn der N-Terminus auf der richtigen Seite der Membran positioniert ist. Da von 9 Transmembrandomänen auszugehen war, wurde angenommen, dass sich das Protein LuxN nur dann richtig faltet, wenn das MBP ins Periplasma transportiert wird (Abb. 3.3). Um diese Annahme zu bestätigen, wurden mehrere Tests durchgeführt.

Die Lokalisation des MBP der Hybridproteine MBP_p-LuxN und MBP_c-LuxN wurde zunächst durch Komplementationsstudien mit *malE*-defiziente *E. coli* MM39 untersucht, die mit den entsprechenden Plasmiden (pMAL_p-LuxN und pMAL_c-LuxN) transformiert wurden. Als Kontrolle dienten *E. coli* MG1655 (Wildtyp mit funktionellem Maltosetransportsystem) und zwei mit den Leerplasmiden (pMAL-p2X und pMAL-c2X) transformierte *E. coli* MM39. Die komplementierten *E. coli* wurden auf M9-Minimalmedium-Agar, der 0,1% Maltose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, ausgestrichen. Nur Bakterien mit periplasmatisch lokalisiertem MBP (*E. coli* MG1655, *E. coli* MM39/pMAL-p2X, *E. coli* MM39/pMAL_p-LuxN) waren in der Lage auf dem

Minimalagar zu wachsen (Abb. 3.4). Damit wurde gezeigt, dass die Hybridproteine tatsächlich in der richtigen Form überproduziert wurden und aktiv Maltose transportieren, sofern das MBP periplasmatisch lokalisiert ist (Jung *et al.*, 2007). Ähnliche Ergebnisse durch die Anwendung der Komplementation *malE*-defizienter *E. coli* MM39-Zellen wurden auch in Topologiestudien der Proteine ToxR (Russ und Engelman, 1999) und ErbB (Mendrola *et al.*, 2002) erzielt.

Die Hypothese, dass nur ein korrekt gefaltetes Hybridprotein, bei dem der N-Terminus auf der richtigen Seite der Membran lokalisiert ist, auch enzymatisch aktiv ist, wurde mit Hilfe des Kinase-Assays untersucht. Die in *E. coli* TKR2000 überproduzierten Hybridproteine wurden in Form von invertierten Membranvesikeln für die *in vitro*-Phosphorylierung von LuxN auf LuxU eingesetzt. Eine dem LuxN-WT ähnlich große Autokinase- und Phosphotransferaseaktivität war nur für das Hybridprotein mit dem periplasmatisch fusioniertem MBP (MBP_p-LuxN) detektierbar. Wobei lediglich phosphoryliertes LuxU zu beobachten war; autophosphoryliertes LuxN ist in diesem *in vitro*-Versuch kaum detektierbar (Timmen *et al.*, 2006). Die Expression der Hybridproteine mit C-terminalem 6His-Tag wurde immunochemisch mit dem Anti-His-Antikörper nachgewiesen. MBP_c-LuxN wurde zwar in ausreichender Menge produziert, zeigte aber keine enzymatische Aktivität (Abb. 3.5). Demnach ist dies ein weiterer Hinweis auf die Position des N-Terminus im Periplasma (Jung *et al.*, 2007).

Ein weiterer Test zur Bestimmung der Lokalisation des MBP in den Hybridproteinen war die Zugänglichkeit einer Proteasen-Schnittstelle zu untersuchen. Mit Hilfe des Programms „*Peptide Cutter*“ (<http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/>) (Gasteiger *et al.*, 2005) wurde Trypsin als geeignete Protease ermittelt, die nur im Maltosebindeprotein und den vorhergesagten cytoplasmatischen Schleifen bzw. Transmembrandomänen (Schnittstellen sind die Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R)) von LuxN schneidet (Abb. 3.6). Hierfür wurden Sphäroplasten, die die beiden Hybridproteine und LuxN-WT enthielten, präpariert und mit bzw. ohne Trypsin behandelt. Da Sphäroplasten Zellen mit defekter oder sogar vollkommen aufgelöster Zellwand aber noch intakter Cytoplasmamembran sind, wurde das periplasmatische MBP durch das Trypsin abgebaut,

das cytoplasmatische MBP hingegen nicht, wie in Abb. 3.7 zu sehen ist. Durch Permeabilisierung der Sphäroplasten mit dem Detergenz Triton X-100 konnte gezeigt werden, dass auch das cytoplasmatische MBP durch die Protease Trypsin abgebaut wird. Alle Resultate der Studien aus Kap. 3.2 zusammengefasst, zeigen, dass LuxN ein Membranprotein mit neun Transmembrandomänen ist, dessen N-Terminus sich im Periplasma befindet (Jung *et al.*, 2007).

Die Lokalisation eines N-Terminus im Periplasma ist äußerst ungewöhnlich, da die meisten Sensorkinasen aus zwei transmembranen Domänen aufgebaut sind, wobei solche mit mehr als zwei Domänen meistens aus einer geraden Anzahl bestehen (vier bis sechs) und daher auch einen cytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus besitzen (Ethier und Boyd, 2000; Piazza *et al.*, 1999; Smirnova und Ullrich, 2004; Zimmermann *et al.*, 1995). In den letzten Jahren wurde schon häufiger über periplasmatisch lokalisierte N-Termini berichtet. Das Protein PutP in *E. coli* zum Beispiel besteht aus 13 Helices, was charakteristisch ist für Proteine der Na⁺/Solut-Kotransporter-Familie (SCF) (Jung *et al.*, 1998). Das Protein AgrC, eine Histidinkinase aus *Staphylococcus aureus* und ebenfalls ein Quorum sensing-Protein mit fünf prognostizierten transmembranen Domänen, von denen drei Domänen durch alkalische Phosphatase-Experimente nachgewiesen wurden, ist die bisher einzige Histidinkinase, für die ein periplasmatischer N-Terminus bekannt ist (Lina *et al.*, 1998).

4.1.2 Identifizierung der HAI-1-Bindestelle in LuxN

Für das Verständnis der Signaltransduktionskaskade ist es wichtig die Reizwahrnehmung und Signalweiterleitung zu kennen. Die Struktur des von LuxN detektierten Autoinduktors HAI-1 (*N*-3-Hydroxybutanoyl-Homoserinlacton) ist schon seit Ende der 1980er Jahre bekannt (Abb. 3.9B) (Bassler *et al.*, 1993; Cao und Meighen, 1993; Cao und Meighen, 1989; Henke und Bassler, 2004). Die Bindestelle in LuxN war bisher noch unklar. Als potentielle an der Bindung beteiligte Aminosäure wurde Leucin an Position 166 von der Arbeitsgruppe Bassler mittels genotypischer Analysen

identifiziert (Freeman *et al.*, 2000). Die Autoren vermuteten an dieser Stelle eine sensorische Domäne in LuxN, die an der Erkennung des Autoinduktors beteiligt ist. Diese Untersuchung war der Ausgangspunkt zur Identifizierung der Bindestelle auf Proteinebene in der vorliegenden Arbeit. Für den Nachweis der potentiellen Bindestelle wurden Membranvesikel präpariert und die Bindung von HAI-1 mittels Phosphotransfer von LuxN-haltigen Membranvesikel auf LuxU untersucht. Grund für die Anwendung dieser Methode war die Tatsache, dass HAI-1 den Phosphotransfer nachweisbar hemmt, wodurch die LuxU~P-Menge abnimmt (Timmen *et al.*, 2006). So konnte anhand einer gleich bleibenden LuxU~P-Menge die Bindung des Autoinduktors bestimmt werden.

Durch gezielte Punktmutation von *luxN* wurde ein Aminosäureaustausch von L166 gegen Arginin erreicht. Bei der *in vitro*-Phosphorylierung von LuxU durch LuxN-L166R stieg die Kinaseaktivität von LuxN-L166R durch Zugabe von HAI-1 und es kam zu einer höheren LuxU~P-Menge als ohne Autoinduktor (Abb. 3.8). Erwartet wurde nach dem Postulat von Freeman *et al.* (2000), dass die LuxU~P-Menge gleich bleibt, wenn diese Aminosäure an der Bindung des Autoinduktors beteiligt ist. Das Ergebnis hier deutet aber daraufhin, dass es sich auf keinen Fall um eine potentielle Bindestelle handelt, sondern dass der Aminosäureaustausch eine Erhöhung der Kinaseaktivität HAI-1-abhängig von LuxN bewirkt.

Nachdem die Aminosäure L166 nicht an der Bindung des HAI-1 beteiligt zu sein schien, wurden die Sequenzen von 16 Acylhomoserinlacton-bindenden Proteine der LuxR-Familie mit den Sequenzen von LuxN-Proteinen verglichen. Das Protein LasR aus *P. aeruginosa* zum Beispiel bindet das 3-Oxo-C₁₂-Acylhomoserinlacton, dessen Struktur bis zur Amidgruppe identisch ist zum N-(D-3)-Hydroxybutanoyl-Homoserinlacton aus *V. harveyi*. Bei dem Alignment der LuxR-Proteine fiel ein Aminosäuremuster auf (Y-X₃-W-X₃-Y-X₈-D-P), das sich ähnlich auch im Alignment von nahezu allen LuxN-Proteinen fand (Y-X₆-W-X₅-Y-X₃-D-X₂-P) (Abb. 3.10 und 3.11). Die Aminosäuren dieses Musters sind an der Bindung des AHLs in LasR beteiligt, wie bei der Strukturaufklärung des Proteins durch Kristallographie und detaillierter Analyse der AHL-Bindestellen von Bottomley *et al.* (2007) herausgefunden wurde. Dabei wurde festgestellt, dass das AHL in

einer so genannten Bindetasche aus 33 Aminosäuren gebunden wird. Die Acylkette ragt in die von hydrophoben Aminosäuren gesäumte Bindetasche, die zum Teil nur in LasR aber nicht in anderen LuxR-Homologen vorkommen. Einige an der Bindung beteiligten Aminosäuren (Y56, W60, D73, S129 in LasR) sind auch in anderen LuxR-Homologen konserviert. Der Homoserinlactonring bindet in LasR u. a. an der Aminosäure W60, der Stickstoff der Amidgruppe an D73 und T75, der Sauerstoff der Amidgruppe an den Aminosäuren Y56 und S129 (Bottomley *et al.*, 2007).

Bei dem Alignment mit Hilfe des Programms ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) von LuxN aus *V. harveyi* mit neun homologen LuxN-Proteinen (LuxN aus *V. splendidus*, VanN aus *V. anguillarum*, OpaN aus *V. parahaemolyticus*, LuxN aus *V. alginolyticus*, LuxN aus *V. campbellii*, LuxN aus *V. fischeri*, LuxN aus *V. angustum*, LuxN aus *P. profundum*, LuxN aus *P. phosphoreum*) wurde das oben erwähnte Aminosäuremuster Y-X₆-W-X₅-Y-X₃-D-X₂-P identifiziert. Die Aminosäuren Y53, W60 und Y66 des Proteins LuxN aus *V. harveyi* liegen dabei konserviert in allen dargestellten LuxN-Proteinen vor. Die Aminosäure D70 ist zu 60% und P73 zu 40% in den dargestellten LuxN-Proteinen enthalten (Abb. 3.11). Aufgrund des zu den LuxR-Proteinen ähnlichen Musters in LuxN aus *V. harveyi* wurde davon ausgegangen, dass die Aminosäuren Y53, W60, Y66, D70 und P73 in LuxN an der Bindung von HAI-1 beteiligt sein könnten. Um die Bindestelle in LuxN besser eingrenzen zu können, wurden zunächst drei Aminosäuren, die sehr eng beieinander liegen in einem Dreifachaustausch durch Cystein überprüft: Y66D70P73C. Mit dem daraus entstandenen Derivat LuxN-Y66D70P73C wurde zum ersten Mal ein nahezu gleich bleibender Level der Kinaseaktivität bei Vorhandensein des Autoinduktors im Gegensatz zu LuxN-WT protokolliert (ohne HAI-1: 3,6 pmol/(mg * min), mit HAI-1: 3,1 pmol/(mg * min) (Abb. 3.12). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde anschließend eine detaillierte Analyse der Aminosäuren Y66, D70 und P73 durch Einzelaustausch gegen Cystein durchgeführt.

Da die Bindetasche in LasR überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren gebildet wird, wurden zur Untersuchung in LuxN ebenfalls hauptsächlich hydrophobe Reste herangezogen [Ausnahmen: Aspartat (D70), Glutamat (E74) und Lysin (K85)]. Als äußerst

interessant galt nach dem Ergebnis mit dem Dreifachaustausch der Bereich der zweiten Transmembrandomäne und der nachfolgenden periplasmatischen Schleife. Der Bereich der zweiten Transmembrandomäne wird in verschiedenen Proteinstrukturvorhersage-Programmen wie z. B. PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000) und GOR IV (Garnier *et al.*, 1996) unterschiedlich definiert (Abb. 3.1). PSIPRED gibt eine helikale Struktur im Bereich der Aminosäure 49 - 62 an, was den Ergebnissen der Topologie-Studie und der Lokalisationsstudie des N-Terminus entspricht (Abb. 3.1A). Im Gegensatz dazu gibt das Programm GOR IV in diesem Bereich keine Helix, sondern eine Faltblatt-Struktur an (Abb. 3.1B). Faltblatt-Elemente sind ungewöhnlich für Proteine, die in der Cytoplasmamembran integriert sind; aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei eher um eine Transmembranhelix handelt.

Weitere Reste, die deshalb untersucht wurden, waren Einzelaustausche der Aminosäuren Y66, D70 und P73 gegen Cystein, sowie die Aminosäuren Y50→F, Y53→F, S54→A, C56→A, I58→A, W60→F, S62→A, S63→A, T69→V, E74→Q, S78→A und K85→L. Alle Aminosäuren wurden gegen solche ausgetauscht, bei denen die Länge und Art der Seitenkette erhalten bleibt, aber eine Bindung des Autoinduktors, z. B. durch eine Wasserstoffbrücke, nicht mehr möglich ist. Die erhaltenen LuxN-Derivate wurden in der *in vitro*-Phosphorylierung von LuxU mit einem großen Konzentrationsbereich des Autoinduktors (0 – 160 μ M) getestet (Abb. 3.12). Hierbei zeigte sich schon mit 5 μ M gereinigtem HAI-1 keine Änderung mehr. Von allen untersuchten Derivaten wurden nur LuxN-Y66D70P73C, LuxN-D70C und LuxN-Y53F durch eine signifikante Abnahme der Kinaseaktivität von LuxN gehemmt: um 30 - 40%. Die Kinaseaktivität von LuxN-WT hingegen wird durch den Autoinduktor um ca. 70% gehemmt. Da der Autoinduktor keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Derivate LuxN-Y66C und LuxN-P73C hatte (Abb. 3.13 und Tab. 3.2), kann davon ausgegangen werden, dass der Austausch D70C der kritische Faktor beim Dreifachaustausch ist. Zum Vergleich wurde die Aminosäure D70 gegen Glutamat (D70→E) ausgetauscht, der sich nur durch eine zusätzliche CH₂-Einheit vom Aspartat unterscheidet. LuxN-D70E hatte die gleiche Kinaseaktivität wie LuxN-WT, womit gezeigt wurde, dass durch den Austausch mit dem

hydrophoben Cystein die Bindung des Autoinduktors zu einem Großteil womöglich durch die Thiolgruppe im Cystein bzw. die fehlende negative Ladung des Cysteins unterbunden wird. Die Menge von LuxN in den Derivaten war bei allen *in vitro*-Phosphorylierungen gleich, wie anhand des Western Blots zu erkennen ist (Abb. 3.14). Die einzige Ausnahme bildet hierbei das Derivat LuxN-D70C, das in vergleichbar geringerem Maße überproduziert wurde.

Ungewöhnlich ist die Tatsache, dass die TM II aus 8 hydrophilen (S, N, H, T) und drei hydrophoben Aminosäuren mit hydrophilen Eigenschaften (Y, W) besteht, umrahmt von 11 hydrophoben Aminosäuren (A, I, C, V). Derart viele hydrophile Aminosäuren könnten möglicherweise eine hydrophile Spalte in dieser TM bilden. Interessanterweise ist die Aminosäure Y53 eher in der Nähe der cytoplasmatischen Seite in der TM lokalisiert. Verglichen mit der Bindetasche in LasR könnte dies der Grund dafür sein, dass der Autoinduktor an die Aminosäure Y53 zu binden scheint. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten weitere Untersuchungen diesbezüglich unternommen werden.

Kürzlich wurden von Swem *et al.* (2008) 14 Aminosäuren identifiziert, die ebenfalls an der Bindung von HAI-1 beteiligt sind. Die Autoren führten allerdings genetische Studien durch, um die HAI-1-Bindestellen zu ermitteln. Mit Hilfe von direkter Mutagenese der ersten 950 bp von *luxN*, die für den Bereich der Membrandomäne codiert, wurden Mutanten generiert, die phänotypisch bezüglich einer Reduktion der Biolumineszenz charakterisiert wurden. Bei den dadurch ermittelten Aminosäuren handelt es sich um solche im Bereich der TM IV – VIII mit den dazwischenliegenden periplasmatischen Schleifen II und III: T139, V143, I153, F155, F163, S184, T206, T241, F220, W224, P226, P227, R245 und G271. Anhand dieser Daten ist erkennbar, dass LuxN mehrere Bindestellen, die über einen großen Membranbereich verteilt sind, zur Verfügung hat, wodurch womöglich eine schnellere Signalweiterleitung erreicht wird. Tatsächlich hat die Hybridsensorkinase LuxN die größte Signalstärke der drei vorhandenen Sensorkinasen (Vgl. Kap. 1.3.1).

Um die *in vitro*-Ergebnisse *in vivo* bestätigen zu können, wurden zunächst die Plasmide pFEDLuxNb-6His, pFEDLuxNbL166R-6His, pFEDLuxNbY66C-6His,

pFEDLuxNbD70C-6His, pFEDLuxNbP73C-6His und pFEDLuxNbY66D70P73C-6His in den Vektor pFED368 kloniert, der schon erfolgreich für Untersuchungen zu LuxPQ in *V. harveyi* angewendet wurde (Neiditch *et al.*, 2006). Dieser Vektor basiert auf dem Plasmid pEVS143, welches aus dem Plasmid pES213 generiert wurde. Letzteres wurde aus einem *V. fischeri*-Stamm aus dem Tintenfisch *Euprymna scolopes* isoliert (Boettcher und Ruby, 1994) und enthält damit einen für *Vibrios* speziellen Replikationsursprung, ein θ -artiges Replikon. pES213 und dessen Derivate sind in mehreren *Vibrio*-Stämmen stabil (*V. fischeri*, *V. splendidis*, *V. campbellii*) und erlauben nun *in vivo*-Untersuchungen von *Vibrio*-Proteinen, die bisher stets in *E. coli* untersucht wurden (Dunn *et al.*, 2005; Dunn *et al.*, 2006). Die Transformation der *Vibrio*-Spezies erfolgte mittels Konjugation (*Triparental Mating*) mit dem Helferplasmid pRK2013, das den *E. coli*-Donor-Stamm, der das Plasmid mit dem *Vibrio*-Gen trägt, durch Vorhandensein der *tra*-Gene zur Konjugation befähigt.

Der Versuch, die *in vitro*-Ergebnisse *in vivo* in *V. harveyi* BB170 zu bestätigen, scheiterte wahrscheinlich am zusätzlich von BB170 synthetisierten AI-2. Die untersuchten Zellen wiesen eine erhöhte Biolumineszenz auf. Der Versuch könnte mit einem LuxS-negativen Stamm wiederholt werden, z. B. mit dem Stamm *V. harveyi* JMH610, der aus dem mit dem Plasmid pKAS46- $\Delta luxS$ mutierten Stamm BB170 generiert wurde (Neiditch *et al.*, 2006).

4.1.3 Reinigung und Rekonstitution von LuxN

Um die Natur eines Proteins genau charakterisieren zu können, ist es von Vorteil, wenn es in reiner Form vorliegt. Bisher konnte LuxN nur in Form von Membranvesikeln für die Untersuchungen eingesetzt werden. Da LuxN aber nur zu ca. 1% in den Membranvesikeln enthalten ist, sollten mögliche störende Proteine und andere Substanzen entfernt werden. Aus diesem Grund wurde die Reinigung von LuxN durch Erhalt der nativen und enzymatisch aktiven Form angestrebt. Lösliche Proteine werden meist mittels Affinitätschromatographie oder Ionenaustauschchromatographie gereinigt.

Die Reinigung eines Membranproteins ist dagegen schwieriger, da sich Membranproteine in einer natürlichen Lipiddoppelschicht befinden, die sehr komplex, heterogen und dynamisch ist. Zusätzlich lassen sich Membranproteine im Allgemeinen in wässrigen Lösungen nicht lösen. Zu experimentellen Studien müssen die Membranproteine daher aus der Lipiddoppelschicht in eine künstliche Lipid-haltige Umgebung transferiert werden, bei der die hydrophoben Regionen in der ihnen natürlichen Umgebung verbleiben können. Die Herauslösung der Proteine gelingt mit Hilfe von Detergenzien - amphipatische Moleküle, die aus einer polaren Kopfgruppe und einer hydrophoben Kette bestehen und sich in wässrigen Lösungen spontan zu kugeligen mizellären Strukturen ausbilden. Da Membranproteine in solchen Mizellen meist löslich sind, bietet die Verwendung solcher Liposomen den zuvor mit Detergenzien aus der Membran gelösten und anschließend gereinigten Proteine eine Art natürliche Lipiddoppelschicht (Proteoliposomen). Hierfür wurde die nach Rigaud (1995) abgewandelte Methode von Jung *et al.* (1997) verwendet.

Das Protein LuxN wurde erfolgreich gereinigt und in ausreichender Menge in Form von Proteoliposomen rekonstituiert. Eine enzymatische Aktivität von LuxN war allerdings in dieser Form nicht mehr nachweisbar. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass Membranproteine zwar in vielen Detergenzien löslich, nach der Rekonstitution jedoch nicht unbedingt aktiv sind. Das richtige Detergenz zu finden kann daher eine langwierige Arbeit sein. Bisher sind weniger als 1% aller charakterisierten Proteine Membranproteine (Seddon *et al.*, 2004). Problematisch könnte auch sein, dass LuxN heterolog in *E. coli* exprimiert und in *E. coli*-Phospholipiden rekonstituiert wurde. Um dem Protein eine möglichst natürliche Umgebung bieten zu können, wurde deshalb eine Lipidanalyse von *V. harveyi* BB120, verglichen mit *E. coli* MG1655 (beides Wildtyp-Stämme), vorgenommen (Abb. 3.16). Hierbei wurde festgestellt, dass sich die Zusammensetzung der Phospholipide in *E. coli* MG1655 und *V. harveyi* BB120 unterscheiden. Nach dieser Analyse enthält die Membran von *V. harveyi* BB120 die Phospholipide Phosphatidylethanolamin (PE) (43%), Phosphatidylglycerol (PG) (13%) und Cardiolipin (CL) (12%), sowie zu einem Drittel das Lysophospholipid

Lysophosphatidylethanolamin (LPE) (32%), das bei *E. coli* nicht detektiert wurde (Tab. 3.3). Phosphatidylethanolamin wurde in der vorliegenden Arbeit zu 66% in *E. coli* MG1655 nachgewiesen. Dies entspricht dem von DeChavigny *et al.* (1991) publizierten Anteil von 70 - 80% des Gesamtglycerophospholipidgehalts in *E. coli*. Lysophospholipide entstehen entweder *de Novo* aus der Reaktion von Glycerol-3-Phosphat mit Fettsäure-Acyl-CoA oder durch Umwandlung von Glycerophospholipiden durch die A1- und A2-Phospholipasen. Umgekehrt werden die Lysophospholipide durch die Lysophospholipid-Acyltransferase wieder in Phospholipide umgewandelt (Kern *et al.*, 2001). Wie schon für andere *Vibrio*-Spezies beschrieben, enthält die Membran von *V. harveyi* zu einem großen Anteil das Lysophospholipid Lysophosphatidylethanolamin (Bhakoo und Herbert, 1979; Danevcic *et al.*, 2005; Diervo und Reynolds, 1975; Oliver und Colwell, 1973). Interessanterweise wurde bei der Spezies *V. parahaemolyticus* kein Lysophosphatidylethanolamin nachgewiesen (Danevcic *et al.*, 2005), obwohl dieser ein naher nicht-biolumineszenter Verwandter von *V. harveyi* ist (Jiang *et al.*, 2006).

Durch die Lipidanalyse war nun bekannt, dass in den *E. coli*-Phospholipiden ein möglicherweise entscheidendes Phospholipid zur Rekonstitution von LuxN aus *V. harveyi* in ausreichender Menge fehlt: Lysophosphatidylethanolamin. Daher wurde in einem weiteren Versuch LPE bei der Reinigung von LuxN zugesetzt, hatte aber keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität des Proteins. Möglicherweise wurden die optimalen Bedingungen hierfür noch nicht gefunden. Um dem Protein bestmögliche Bedingungen zu bieten, wäre es daher angebracht, *V. harveyi*-Lipide zu verwenden, anstatt den *E. coli*-Lipiden. Als Vorversuch wurden daher die extrahierten *V. harveyi*-Lipide auf ihre Abhängigkeit der Solubilisierung von der Detergenzkonzentration der Detergenzien Triton X-100 und LDAO bestimmt. Für die Rekonstitution von LuxN wurden zwei Solubilisierungsstufen des Detergenz LDAO getestet: partielle Solubilisierung (0,09% LDAO) und totale Solubilisierung (0,15% LDAO). Beim anschließenden *in vitro*-Phosphorylierungstest konnte allerdings für das in dieser Form rekonstituierte LuxN keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

4.2 Der Antwortregulator LuxO

4.2.1 Optimierungsexperimente zur Löslichkeit von LuxO

Zur Vervollständigung der Signaltransduktionskaskade mit gereinigten Proteinkomponenten sollte der Antwortregulator LuxO in dieser Arbeit charakterisiert werden. Voruntersuchungen hierzu wurden bereits von Timmen (2005) durchgeführt. Schwierig war allerdings, dass das im Cytoplasma lokalisierte LuxO durch die heterologe Expression in *E. coli* zum größten Teil in Form von *Inclusion Bodies* überproduziert wurde. Zur Vermeidung dieses Problems wurden von Timmen (2005) und Stambrau (2008), sowie in der vorliegenden Arbeit, verschiedene Versuche unternommen, das Fusionsprotein in löslicher Form zu exprimieren. So führt zum Beispiel die Expression verkürzter Proteine oftmals zu löslichen Produkten (Hart und Tarendeau, 2006). Die in dieser Arbeit verkürzten Derivate LuxO1-130 und LuxO1-386 wurden allerdings ebenfalls in der niedertourigen Zentrifugation (LSP) nachgewiesen, so dass diese hier nicht näher untersucht wurden (Abb. 3.20A, B). Die heterologe Überproduktion im reduzierenden Cytoplasma von *E. coli* könnte Grund dafür sein, dass es zu einer Fehl Ausbildung von Disulfidbrücken, ausgehend von den 6 Cysteinen im Protein LuxO, kommt. Solche Fehl ausbildungen können zu einer fehlerhaften Konformation des Proteins führen (Makrides, 1996). Aufgrund dessen wurde eine weitere Strategie verfolgt, das LuxO N-terminal mit dem periplasmatisch exprimierten Maltosebindeprotein zu fusionieren (MBP_p-LuxO). *E. coli*-Proteine bilden Disulfidbrücken eher im Periplasma aus, eine Umgebung, bei der manche „Fremdproteine“ annähernd natürliche Bedingungen finden (Riggs, 1994). Das MBP_p-LuxO wurde allerdings kaum im Periplasma, sondern wiederum hauptsächlich in der niedertourigen Zentrifugation (LSP) in Form von *Inclusion Bodies* detektiert (Abb. 3.20C). Da sowohl die verkürzten Derivate, als auch das MBP-LuxO-Fusionsprotein nicht die erwartete lösliche Lokalisation aufwiesen, wurden diese Konstrukte nicht näher untersucht.

4.2.2 Reinigung und Renaturierung von LuxO aus *Inclusion Bodies*

Neben den Versuchen zur Verbesserung der Löslichkeit wurde die Reinigung und Renaturierung von LuxO aus den *Inclusion Bodies* optimiert. Nach der Methode von QIAgen werden die *Inclusion Bodies* mit 6 M Guanidinhydrochlorid oder alternativ 8 M Harnstoff solubilisiert. Die Anwendung mit Guanidinhydrochlorid soll allerdings bessere Solubilisate erzielen, weshalb auch LuxO damit behandelt wurde. In der anschließenden Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie wurde das Protein gleichzeitig mit 8 M Harnstoff umgepuffert. Der Harnstoff wurde danach schrittweise durch Dialyse entfernt (6 – 3 – 2 – 0,5 – 0 M). Das Protein aggregierte zu 80% während der Dialyse, sodass nur noch mit einer geringen Proteinkonzentration im Bereich von 0,15 - 0,3 mg/ml weitergearbeitet werden konnte. Der Versuch, die Aggregation durch den Zusatz von L-Arginin als Aggregat-unterdrückendes Additiv (De Bernardez *et al.*, 1998; Rudolph und Lilie, 1996) zu verhindern, war nicht erfolgreich. Für die weiteren Versuche war die Proteinkonzentration ausreichend. Mittels eines Fern-UV-Circulardichroismus-Spektrums wurde der Renaturierungsprozess von LuxO verfolgt. Das CD-Spektrum gibt Aufschluss über den Anteil bestimmter Sekundärstrukturelemente in einem Protein, da sich der Dichroismus von α -Helix, β -Faltblatt und *Random Coil*-Strukturen voneinander unterscheidet. Anhand der Tertiärstruktur von LuxO, die anhand ausreichender Identitäten der Aminosäuresequenzen von LuxO und dem homologen Protein NtrC mit Hilfe des Programms PyMol [DeLano Scientific LLC (<http://pymol.sourceforge.net/>)] erstellt wurde, ist erkennbar, dass der Bereich der Aminosäuren 1 - 378 in LuxO zu einem Großteil aus helikalen Strukturen besteht (Abb. 1.8). Die Ausbildung α -helikaler Strukturen in LuxO konnte während des Renaturierungsprozesses nachgewiesen werden. Dabei zeigte das selbst in 2 M Harnstoff gelöste LuxO eine α -helikale Strukturausbildung, wohingegen bei 0,5 M und 0 M Harnstoff das Protein, wie schon zuvor beschrieben, aggregiert vorlag (Abb. 3.25). LuxO wurde während des Renaturierungsprozesses zu 100% α -helikal renaturiert (Tab. 3.4), wobei das nicht bedeutet, dass alle Proteinmoleküle komplett rückgefaltet wurden. Es bedeutet eher, dass einige komplett gefaltet waren, andere nur zum Teil oder überhaupt nicht. Hierbei handelt es sich lediglich um

Mittelwerte aller in Lösung vorkommenden Proteinmoleküle. Möglicherweise ist dies auch eine Erklärung dafür, dass die enzymatische Aktivität von LuxO in der Phosphorylierungskaskade $\text{LuxN} \rightarrow \text{LuxU} \rightarrow \text{LuxO}$ bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

Auch das Phospholipid Lysophosphatidylethanolamin, das als „Chaperon“ zur Rückfaltung von in Harnstoff denaturierten Proteinen eingesetzt wird (Kern *et al.*, 2001) brachte nicht den gewünschten Erfolg, ein für die *in vitro*-Phosphorylierung aktives Protein zu erhalten. Interessanterweise wurde bei der Lipidanalyse von *V. harveyi* BB120 festgestellt, dass die Membranen von *V. harveyi* genau dieses Phospholipid zu 32% enthalten, wohingegen es in den Membranen von *E. coli* überhaupt nicht vorkommt. Möglicherweise würde der Einsatz von nativem *V. harveyi*-Lysophosphatidylethanolamin die Rückfaltung eher unterstützen.

4.2.3 Untersuchung der enzymatischen Aktivität und DNA-Bindfähigkeit des renaturierten LuxO

Da eine enzymatische Aktivität des renaturierten Proteins bei dem Phosphotransfer von LuxN über LuxU auf LuxO bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob es sich *in vitro* mit niedermolekularen Phosphodonoren, wie z.B. Acetylphosphat, phosphorylieren lässt. Entsprechende Experimente mit Acetylphosphat, Carbamoylphosphat und Phosphoramidat wurden schon für andere Antwortregulatoren wie CheB und CheY, KdpE, NtrC, PhoB und OmpR erfolgreich durchgeführt (Feng *et al.*, 1992; Heermann *et al.*, 2003; Lukat *et al.*, 1992; McCleary und Stock, 1994). Tatsächlich wurde für das gereinigte und renaturierte LuxO nicht nur die Ausbildung α -helikaler Strukturen nachgewiesen, sondern konnte auch mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Acetylphosphat phosphoryliert werden (Abb. 3.26). Im Gegensatz dazu wies das Protein KdpE~P, das bei diesem Versuch als Kontrollprotein für das synthetisierte $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Acetylphosphat eingesetzt wurde, eine nachweisbar stärkere Aktivität auf als LuxO~P. Die Phosphorylierung des Proteins in 0 M Harnstoff mit dem radioaktiv markierten

Acetylphosphat blieb bis zu einem Zeitraum von 5 min stabil, die Aktivität nahm aber nach weiteren 10 min ab. Gleiches wurde auch schon bei der Phosphorylierung von NtrC mit [γ - ^{32}P]-Acetylphosphat festgestellt (Weiss *et al.*, 1991). Es wurde gefolgert, dass die Abnahme an NtrC~P mit dem Verbrauch von Acetylphosphat zusammenhängt. Mit diesem Experiment konnte zum ersten Mal selbst für das in 2 M Harnstoff vorliegende LuxO eine enzymatische Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden. Die vermeintlich stärkere Markierung des Proteins in 2 M Harnstoff war auf die 6fach höher eingesetzte Proteinmenge zurückzuführen.

Da LuxO neben der Receiver-Domäne (REC) mit dem konservierten Rest D47, aus einer AAA⁺-ATPase-Domäne (AAA: “*ATPases associated with a variety of cellular activities*”) und einem Helix-turn-Helix-Motiv (HTH) besteht, wurde untersucht, ob das renaturierte Protein an die DNA bindet. Eine hypothetische Bindestelle für das aktivierte Protein (LuxO~P) und eine hypothetische σ^{54} -Bindestelle wurden von Lenz *et al.* (2004) im *luxOU*-Operon identifiziert (Abb. 4.2). Die Bindung von LuxO an die DNA wurde nun in dieser Arbeit mit Hilfe eines Gelretardationsexperimentes untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass das gereinigte und renaturierte LuxO (in 0 M Harnstoff) sowohl im phosphorylierten als auch im unphosphorylierten Zustand an die spezifische DNA bindet und damit enzymatische Aktivität besitzt (Abb. 3.28). Die Bindung des phosphorylierten Proteins zeigte aber eine höhere Affinität zur DNA als das unphosphorylierte LuxO. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für andere Antwortregulatoren nachgewiesen, so z. B. für die Proteine PhoR aus *Corynebacterium glutamicum* (Schaaf und Bott, 2007) oder CitB aus *Klebsiella pneumoniae* (Meyer *et al.*, 1997).

Obwohl die Aktivität von LuxO in dieser Arbeit durch die Phosphorylierung mit dem niedermolekularen Phosphodonor Acetylphosphat und durch Bindungsexperimente an die DNA *in vitro* nachgewiesen werden konnte, war ein Nachweis dieser Aktivität in der Signaltransduktionskaskade mit den Proteinen LuxN und LuxU noch nicht möglich. Aus diesem Grund besteht der Verdacht, dass bei der *in vitro*-Phosphorylierung aller Proteinkomponenten ein entscheidender Faktor fehlt, der die Aktivität von LuxO

bestimmt. Erst kürzlich wurde im Quorum sensing-System von *V. cholerae* das Protein Fis (*Factor for inversion stimulation*) identifiziert, das wahrscheinlich direkt an die *qrr*-Promotoren bindet (Lenz und Bassler, 2007). Fis ist ein in γ -Proteobakterien nukleoid-assoziiertes Regulator-Protein (positiver und negativer Regulator) für die Transkription einer großen Anzahl von Genen (Finkel und Johnson, 1992; McLeod *et al.*, 1999). Phylogenetisch hat Fis seinen Ursprung in der COOH-terminalen Domäne eines Vorfahren des α -proteobakteriellen Proteins NtrC und wurde durch lateralen Transfer zusammen mit dem Gen *yhdG* in die Bakterienfamilien *Pasteurelaceae* und *Enterobacteriaceae* eingeschleust. Das Gen *yhdG* ist homolog zu dem Gen *nifR3*, welches in einigen α -Proteobakterien ein Operon mit dem Gen *ntrC* bildet (Morett und Bork, 1998). Fis liegt als Dimer vor und bindet mit einer Konsensussequenz von 15 bp an die DNA [GNNYRNNTNNYRNNC (Hübner und Arber, 1989)]. Dadurch wird diese um ca. 90° verbogen, sodass sie in eine dreidimensionale Form gebracht wird, an die verschiedene Proteine binden können (Dorman und Deighan, 2003; Finkel und Johnson, 1992). In *V. cholerae* wird so wahrscheinlich die DNA zwischen der LuxO-Bindestelle und der σ^{54} -Bindestelle durch Verbiegung beeinflusst, wodurch die σ^{54} -abhängige *qrr*-Expression gefördert wird (Lenz und Bassler, 2007). Interessanterweise gehört das HTH-Motiv von LuxO aus *V. harveyi* ebenfalls zum HTH-Motiv der Fis-Familie. Eine mögliche Bindestelle für Fis ist in der Sequenz des *luxOU*-Operons in Abb. 4.2 (grau) dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Faktor ebenso auch entscheidend zum Quorum sensing-System in *V. harveyi* beiträgt, ist groß.

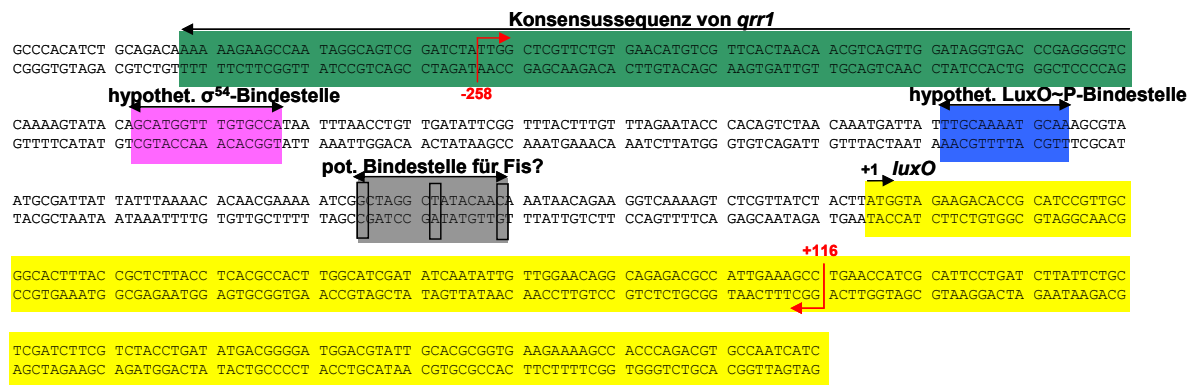


Abb. 4.2: Auszug aus der DNA-Sequenz des *luxOU*-Operons. grün: Konsensussequenz von *qrr1*, rosa: hypothetische σ^{54} -Bindestelle, blau: hypothetische LuxO-P-Bindestelle, gelb: ein Teil der DNA von *luxO* (bp +1 bis +216 bp stromaufwärts des Start-Codons), grau: potentielle Bindestelle für Fis (?), rote Pfeile: Bindestellen der Primer zur Amplifizierung von spezifischer DNA (bp -258 stromabwärts des Start-Codons von *luxO* bis bp +116 stromaufwärts des Start-Codons von *luxO*).

4.3 Ausblick

Bei der Untersuchung der HAI-1-Bindestelle in LuxN wurde festgestellt, dass die Aminosäuren Y53 und D70 an der Bindung beteiligt sind. Die Aminosäure D70 befindet sich in der periplasmatischen Schleife, Y53 hingegen in TM II in der Nähe des Cytoplasmas. Verglichen mit der AHL-Bindetasche von LasR, die hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren besteht, sprechen die Ergebnisse dieser Aminosäureaustausche für eine ebensolche Bindetasche bzw. hydrophile Spalte in LuxN. Um dies zu überprüfen, könnten in einem Cysteinfreien LuxN (LuxN besitzt 8 Cysteine) alle Aminosäuren der TM II durch Cysteinreste ausgetauscht und mit dem membranimpermeablen Reagenz PEG-Maleimid (o-(2-Maleimidoethyl)-o'-Methyl-Polyethylenglycol) markiert werden. Durch die Markierung von frei zugänglichen Cysteinresten erhöht sich das Molekulargewicht des Proteins um 10 - 15 kDa (Lu und Deutsch, 2001). Diese höhermolekularen Proteinbanden sind aufgrund der langsameren Laufgeschwindigkeit in einer SDS-PAGE sichtbar. Da PEG-Maleimid membranimpermeabel ist, könnten bei Vorhandensein einer Spalte nur Cysteine innerhalb der TM markiert werden. Ähnliche Experimente zu Transmembrandomänen von z. B. PutP in

E. coli (Pirch *et al.*, 2003) und V-ATPasen (vakuolare Protonen-translozierende Adenosintriphosphatasen) der Hefe (Wang *et al.*, 2008), wurden ebenfalls mit PEG-Maleimid bzw. NEM (N-Ethylmaleimid, membran-permeabel) erfolgreich vorgenommen. Die von Pirch *et al.* (2003) auf eine hydrophile Spalte untersuchte TM II von PutP wurde kürzlich durch Kristallisierung des homologen *V. parahaemolyticus* Na⁺-Galaktose-Symporters (vSGLT) bestätigt (Faham *et al.*, 2008).

Zur Untersuchung der HAI-1-Bindung *in vivo* sollte die Komplementation von *V. harveyi* BB170 optimiert werden. Hierzu könnte ein AI-2-negativer Stamm, wie z. B. *V. harveyi* JMH610 (Neiditch *et al.*, 2006), verwendet werden.

Zur Vervollständigung der Signaltransduktionskaskade mit gereinigten Proteinkomponenten sollte die Reinigung des Proteins LuxN weiter optimiert werden. Der Einsatz von nativen *V. harveyi*-Phospholipiden wäre eine gute Möglichkeit, das Protein möglichst natürlichen Bedingungen auszusetzen. Daher wäre es von Vorteil, die Extraktion der *V. harveyi*-Phospholipide in einem größerem Maßstab zu optimieren.

Auch wenn der gereinigte und renaturierte Antwortregulator LuxO durch die Bindung an den niedermolekularen Phosphodonor Acetylphosphat markiert wurde, konnte für das Protein in der *in vitro*-Phosphorylierung mit allen Komponenten (LuxN, LuxU und LuxO) keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Möglicherweise reichen die Renaturierungsbedingungen zur vollständigen Rückfaltung des Proteins noch nicht aus, sodass dessen Reinigung weiter optimiert werden sollte. Es könnte aber auch sein, dass das in der Form renaturierte Protein schon richtig gefaltet und aktiv ist, aber dass ein entscheidender Faktor fehlt, der den Phosphotransfer vom Protein LuxU auf LuxO erst ermöglicht. Dieser Faktor könnte das Protein Fis sein, für das eine wichtige Rolle im Quorum sensing-System von *V. cholerae* nachgewiesen wurde. Die Rolle von Fis bei der Phosphorylierung des *V. harveyi*-LuxO zu untersuchen, wäre daher eine interessante Aufgabe für weitere Forschungen in diesem Bereich.

5 Zusammenfassung

Die Signaltransduktionskaskade des komplexen Quorum sensing-Systems von *V. harveyi* umfasst die drei Hybridsensorkinasen LuxN, LuxQ und CqsS, das Histidinphosphotransferprotein LuxU und den Antwortregulator LuxO. Bei niedriger Zelldichte funktionieren die Hybridsensorkinasen als Autokinasen. Die Phosphorylgruppe wird zunächst intramolekular übertragen und anschließend auf LuxU und LuxO weitergeleitet. Phosphoryliertes LuxO aktiviert die Expression von fünf regulatorischen RNAs, die im Zusammenspiel mit dem RNA-Chaperon Hfq die Translation der mRNA des Masterregulators LuxR inhibieren. Bei hoher Zelldichte wird die Kinaseaktivität der Hybridsensorkinasen durch die jeweiligen Autoinduktoren inhibiert, sodass es zum Abschalten der Phosphorylierungskaskade und zur Anreicherung von LuxR kommt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die von Timmen (2005) begonnene biochemische Charakterisierung der Proteine LuxN und LuxO fortgesetzt und ergänzt.

- Mit Hilfe diverser Methoden konnte die Topologie von LuxN, zusammen mit der Lage des N-Terminus, gelöst werden:
 - Basierend auf den Ergebnissen von Reporterfusionen des *luxN*-Fragments unterschiedlicher Länge an die Reportergene *lacZ* und *phoA* und dem von Timmen (2005) ermittelten cytoplasmatischen C-Terminus von LuxN, wurde die Anzahl von 8 Transmembrandomänen für den Aminosäurebereich 40 - 305 bestätigt.
 - Der N-terminale Bereich (AS 1 - 40) wurde durch Fusion des N-Terminus von LuxN an das Maltosebindeprotein (MBP) mit Signalsequenz (MBP_p-LuxN) und ohne Signalsequenz (MBP_c-LuxN) charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus periplasmatisch lokalisiert ist, wodurch auch die durch Sekundärstruktur-Vorhersagen und von Timmen (2005) postulierten 9 Transmembrandomänen nachgewiesen wurden. Hierzu wurde zunächst durch Komplementationsstudien eines *malE*-defizienten Stammes die Lokalisation des MBP im Periplasma bzw. Cytoplasma in den MBP-LuxN-Hybridproteinen bestätigt. Mit Hilfe von *in vitro*

Phosphorylierungen wurde nur für das Hybridprotein mit dem periplasmatisch lokalisierten MBP (MBP_p-LuxN) eine Autokinase- und Phosphotransferaseaktivität in der Größenordnung von LuxN-WT nachgewiesen. Durch Zugänglichkeitsstudien an den Hybridproteinen und LuxN-WT konnte die Protease-Zugänglichkeit des periplasmatisch lokalisierten MBP im enzymatisch aktiven MBP_p-LuxN im Gegensatz zum nicht zugänglichen cytoplasmatischen MBP in MBP_c-LuxN gezeigt werden. Die periplasmatischen Domänen waren in beiden Hybridproteinen nicht zugänglich, womit das Vorhandensein von 9 Transmembrandomänen in LuxN mit einem periplasmatisch lokalisierten N-Terminus abgesichert wurde.

- Im Zuge der biochemischen Charakterisierung von LuxN wurde die Bindestelle für den Autoinduktor HAI-1 untersucht. Es wurden zwei Aminosäuren identifiziert, die an der Bindung beteiligt sind: Y53 und D70. Die postulierte Bindestelle L166 (Freeman *et al.*, 2000) konnte biochemisch als solche nicht nachgewiesen werden. Das Protein LuxN-L166R war durch eine in Anwesenheit von HAI-1 stimulierbare Kinaseaktivität gekennzeichnet.
- Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung wurde das Membranprotein LuxN mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie erfolgreich gereinigt und in *E. coli*- und *V. harveyi*-basierten Proteoliposomen rekonstituiert; eine enzymatische Aktivität konnte aber nicht nachgewiesen werden. In einer zur Optimierung der Rekonstitution durchgeführten Lipidanalyse von *V. harveyi* BB120 wurde festgestellt, dass *V. harveyi* ein in großer Menge vorhandenes Phospholipid enthält (32%), das in *E. coli* nicht nachgewiesen wurde und daher möglicherweise bei der Rekonstitution mit *E. coli*-Phospholipiden fehlte: Lysophosphatidylethanolamin.
- Die Reinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie und Renaturierung des heterolog in *Inclusion Bodies* überproduzierten Antwortregulators LuxO wurde optimiert. Ein Fern-UV-Circulardichroismus-Spektrum zeigte für das renaturierte Protein die Ausbildung α -helikaler Strukturen zu 100%. Die Phosphorylierung dieses Proteins beim Phosphotransfer von LuxU auf LuxO konnte zwar nicht gezeigt werden,

doch wurde dieses erstmalig mit dem niedermolekularen Phosphodonor [γ - ^{32}P]-Acetylphosphat markiert. Mittels eines Gelretardationsexperiments wurde eine Bindung des renaturierten LuxO an die DNA in phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form im Bereich der hypothetischen σ^{54} - und LuxO-Bindestelle gezeigt.

6 Literaturverzeichnis

Ames, G. F. (1968) Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structure and metabolism. *J Bacteriol* **95**: 833-843.

Barrow, C. J., Yasuda, A., Kenny, P. T., und Zagorski, M. G. (1992) Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol* **225**: 1075-1093.

Bartsevich, V. V. und Pakrasi, H. B. (1999) Membrane topology of MntB, the transmembrane protein component of an ABC transporter system for manganese in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803. *J Bacteriol* **181**: 3591-3593.

Bassler, B. L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **2**: 582-587.

Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E., und Silverman, M. R. (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* **9**: 773-786.

Bassler, B. L., Wright, M., und Silverman, M. R. (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol* **13**: 273-286.

Bassler, B. L., Greenberg, E. P., und Stevens, A. M. (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **179**: 4043-4045.

Bhakoo, M. und Herbert, R. A. (1979) The effects of temperature on the fatty acid and phospholipid composition of four obligately psychrophilic *Vibrio Spp.* *Arch Microbiol* **121**: 121-127.

Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., ColladoVides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. und Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.

Blum, H., Beier, H., und Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.

- Boettcher, K. J. und Ruby, E. G. (1994) Occurrence of plasmid DNA in the sepiolid squid symbiont *Vibrio fischeri*. *Curr Microbiol* **29**: 279-286.
- Bottomley, M. J., Muraglia, E., Bazzo, R., und Carfi, A. (2007) Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *J Biol Chem* **282**: 13592-13600.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye-binding, *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brickman, E. und Beckwith, J. (1975) Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and phi80 transducing phages. *J Mol Biol* **96**: 307-316.
- Buhr, A. und Erni, B. (1993) Membrane topology of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 11599-11603.
- Burbulys, D., Trach, K. A., und Hoch, J. A. (1991) Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.
- Calamia, J. und Manoil, C. (1990) *lac* permease of *Escherichia coli*: topology and sequence elements promoting membrane insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4937-4941.
- Cao, J. G. und Meighen, E. A. (1989) Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *J Biol Chem* **264**: 21670-21676.
- Cao, J. G. und Meighen, E. A. (1993) Biosynthesis and stereochemistry of the autoinducer controlling luminescence in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **175**: 3856-3862.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van, D. A., Pelczer, I., Bassler, B. L. *et al.* (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* **415**: 545-549.
- Claros, M. G. und Heijne, von G. (1994) TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Computer Applications in the Biosciences* **10**: 685-686.
- Confalonieri, F. und Duguet, M. (1995) A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays* **17**: 639-650.

- Cullen, P. J., Bowman, W. C., und Kranz, R. G. (1996) In vitro reconstitution and characterization of the *Rhodobacter capsulatus* NtrB and NtrC two-component system. *J Biol Chem* **271**: 6530-6536.
- Danevcic, T., Rilfors, L., Strancar, J., Lindblom, G., und Stopar, D. (2005) Effects of lipid composition on the membrane activity and lipid phase behaviour of *Vibrio sp.* DSM14379 cells grown at various NaCl concentrations. *Biochim Biophys Acta* **1712**: 1-8.
- Dassa, E. und Lambert, P. (1997) Activity of protein MalE (maltose-binding protein) fused to cytoplasmic and periplasmic regions of an *Escherichia coli* inner membrane protein. *Res Microbiol* **148**: 389-395.
- De Bernardez, C. E., Hevehan, D., Szela, S., und Maachupalli-Reddy, J. (1998) Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme. Folding vs aggregation. *Biotechnol Prog* **14**: 47-54.
- DeChavigny, A., Heacock, P. N., und Dowhan, W. (1991) Sequence and inactivation of the pss gene of *Escherichia coli*. Phosphatidylethanolamine may not be essential for cell viability. *J Biol Chem* **266**: 10710.
- de Kievit, T. R. und Iglewski, B. H. (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* **68**: 4839-4849.
- di Guana, C., Lib, P., Riggsa, P. D., und Inouyeb, H. (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**: 21-30.
- Diervo, A. J. und Reynolds, J. W. (1975) Phospholipid composition and cardiolipin synthesis in fermentative and nonfermentative marine bacteria. *J Bacteriol* **123**: 294-301.
- Diggle, S. P., Matthijs, S., Wright, V. J., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Lamont, I. L. *et al.* (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol* **14**: 87-96.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., und Helinski, D. R. (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 7347-7351.
- Dorman, C. J. und Deighan, P. (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Gen & Dev* **13**: 179-184.
- Dubern, J. F. und Diggle, S. P. (2008) Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst* **4**: 882-888.

- Dunn, A. K., Martin, M. O., und Stabb, E. V. (2005) Characterization of pES213, a small mobilizable plasmid from *Vibrio fischeri*. *Plasmid* **54**: 114-134.
- Dunn, A. K., Millikan, D. S., Adin, D. M., Bose, J. L., und Stabb, E. V. (2006) New rfp- and pES213-derived tools for analyzing symbiotic *Vibrio fischeri* reveal patterns of infection and *lux* expression in situ. *Appl Environ Microbiol* **72**: 802-810.
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Neelson, K. H., und Oppenheimer, N. J. (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**: 2444-2449.
- Elderkin, S., Bordes, P., Jones, S., Rappas, M., und Buck, M. (2005) Molecular determinants for PspA-mediated repression of the AAA transcriptional activator PspF. *J Bacteriol* **187**: 3238-3248.
- Engbrecht, J., Neelson, K., und Silverman, M. (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* **32**: 773-781.
- Engbrecht, J. und Silverman, M. (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 4154-4158.
- Engbrecht, J. und Silverman, M. (1987) Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic Acids Res* **15**: 10455-10467.
- Ethier, J. und Boyd, J. M. (2000) Topological analysis and role of the transmembrane domain in polar targeting of PilS, a *Pseudomonas aeruginosa* sensor kinase. *Mol Microbiol* **38**: 891-903.
- Faham, S., Watanabe, A., Besserer, G. M., Cascio, D., Specht, A., Hirayama, B. A. *et al.* (2008) The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science* 1160406.
- Feng, J., Atkinson, M. R., McCleary, W., Stock, J. B., Wanner, B. L., und Ninfa, A. J. (1992) Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 6061-6070.
- Finkel, S. E. und Johnson, R. C. (1992) The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Mol Microbiol* **6**: 3257-3265.
- Freeman, J. A. und Bassler, B. L. (1999a) Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **181**: 899-906.

- Freeman, J. A. und Bassler, B. L. (1999b) A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* **31**: 665-677.
- Freeman, J. A., Lilley, B. N., und Bassler, B. L. (2000) A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* **35**: 139-149.
- Fried, M., und Crothers, D.M. (1981) Equilibria and kinetics of *lac* repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* (**9**): 6505-6525.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., und Greenberg, E. P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269-275.
- Fuqua, C., Winans, S. C., und Greenberg, E. P. (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**: 727-751.
- Garnier, J., Gibrat, J. F., und Robson, B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* **266**: 540-553.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., und Bairoch A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press.
- Greenberg, E. P., Hastings, J. W., und Ulitzur, S. (1979) Induction of luciferase synthesis in *Beneckea harveyi* by other marine bacteria, *Arch Microbiol* **120**: 87-91.
- Greenfield, N. und Fasman, G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**: 4108-4116.
- Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B., und Bradfield, C. A. (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 519-561.
- Haardt, M. und Bremer, E. (1996) Use of *phoA* and *lacZ* fusions to study the membrane topology of ProW, a component of the osmoregulated ProU transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 5370-5381.
- Hart, D. J. und Tarendeau, F. (2006) Combinatorial library approaches for improving soluble protein expression in *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**: 19-26.
- Heermann, R., Altendorf, K., und Jung, K. (2003) The N-terminal input domain of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* stabilizes the interaction between the cognate response regulator KdpE and the corresponding DNA-binding site. *J Biol Chem* **278**: 51277-51284.

- Henke, J. M. und Bassler, B. L. (2004) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **186**: 6902-6914.
- Higgins, D. A., Pomianek, M. E., Kraml, C. M., Taylor, R. K., Semmelhack, M. F., und Bassler, B. L. (2007) The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature* **450**: 883-886.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., und Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**: 378-379.
- Hofmann, K. und Stoffel, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **347**: 166 ff
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J. U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J. E., Lupas, A. N. und Coles, M. (2006) The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* **126**: 929-940.
- Hübner, P. und Arber, W. (1989) Mutational analysis of a prokaryotic recombinational enhancer element with two functions. *EMBO J* **8**: 577-585.
- Jiang, Y., Chan, C. H., und Cronan, J. E. (2006) The soluble acyl-acyl carrier protein synthetase of *Vibrio harveyi* B392 is a member of the medium chain acyl-CoA synthetase family. *Biochemistry* **45**: 10008-10019.
- Jung, H., Rubenhagen, R., Tebbe, S., Leifker, K., Tholema, N., Quick, M. *et al.* (1998) Topology of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **273**: 26400-26407.
- Jung, K., Tjaden, B., und Altendorf, K. (1997) Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 10847-10852.
- Jung, K., Odenbach, T. und Timmen, M. (2007) The quorum-sensing hybrid histidine kinase LuxN of *Vibrio harveyi* contains a periplasmically located N terminus. *J Bacteriol* **189**: 2945-2948.
- Kaplan, H. B. und Greenberg, E. P. (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**: 1210-1214.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., und Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**: 3059-3066.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., und Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* **33**: 511-518.

- Kelly, S. M. und Price, N. C. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta* **1338**: 161-185.
- Kelly, S. M., Jess, T. J., und Price, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* **1751**: 119-139.
- Kern, R., Joseleau-Petit, D., Chattopadhyay, M. K., und Richarme, G. (2001) Chaperone-like properties of lysophospholipids. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 1268-1274.
- Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P., und de Vos, W. M. (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**: 895-904.
- Kollmann, R. und Altendorf, K. (1993) ATP-driven potassium transport in right-side-out membrane vesicles via the Kdp system of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1143**: 62-66.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**: 567-580.
- Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, S. Y., De La, T. A., Yan, D., Kustu, S., Nixon, B. T., und Wemmer, D. E. (2003) Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA⁺ ATPase domains. *Genes Dev* **17**: 2552-2563.
- Lenz, D. H., Mok, K. C., Lilley, B. N., Kulkarni, R. V., Wingreen, N. S., und Bassler, B. L. (2004) The Small RNA Chaperone Hfq and Multiple Small RNAs Control Quorum Sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* **118**: 69-82.
- Lenz, D. H. und Bassler, B. L. (2007) The small nucleoid protein Fis is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing. *Mol Microbiol* **63**: 859-871.
- Li, Y. und Plamann, L. (1996) Purification and in vitro phosphorylation of *Myxococcus xanthus* AsgA protein. *J Bacteriol* **178**: 289-292.
- Lichtenberg, D. (1985) Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochim Biophys Acta* **821**: 470-478.
- Lilley, B. N. und Bassler, B. L. (2000) Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Mol Microbiol* **36**: 940-954.

- Lina, G., Jarraud, S., Ji, G., Greenland, T., Pedraza, A., Etienne, J. *et al.* (1998) Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **28**: 655-662.
- Lipman, F., Tuttle, L. C. (1945) Formation of complexes by acyl phosphates and hydroxylamine in the presence of ferric salts. *J Biol Chem* **159**: 21-28.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., und Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Lu, J. und Deutsch, C. (2001) Pegylation: A method for assessing topological accessibilities in Kv1.3. *Biochemistry* **40**: 13288-13301.
- Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M., und Stock, J. B. (1992) Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 718-722.
- Makrides, S. C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**: 512-538.
- Manoil, C. (1990) Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J Bacteriol* **172**: 1035-1042.
- Manoil, C. (1991) Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and beta-galactosidase gene fusions. *Methods Cell Biol* **34**: 61-75.
- Manoil, C., und Beckwith, J. (1985) TnphoA: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 8129-8133.
- Manoil, C. und Beckwith, J. (1986) A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* **233**: 1403-1408.
- McCleary, W. R. und Stock, J. B. (1994) Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem* **269**: 31567-31572.
- McGuffin, L. J., Bryson, K., und Jones, D. T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**: 404-405.
- McLeod, S. M., Xu, J., Cramton, S. E., Gaal, T., Gourse, R. L., und Johnson, R. C. (1999) Localization of amino acids required for Fis to function as a class II transcriptional activator at the RpoS-dependent *proPP2* promoter. *J Mol Biol* **294**: 333-346.
- Mendrola, J. M., Berger, M. B., King, M. C., und Lemmon, M. A. (2002) The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *J Biol Chem* **277**: 4704-4712.

- Mertens, N., Remaut, E., Fiers, W. (1995) Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. *Biotechnology (N. Y.)* **13**: 175-179.
- Meyer, M., Dimroth, P., und Bott, M. (1997) *In vitro* binding of the response regulator CitB and of its carboxy-terminal domain to A+T-rich DNA target sequences in the control region of the divergent *citC* and *citS* operons of *Klebsiella pneumoniae*. *J Mol Biol* **269**: 719-731.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, M. B. und Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165-199.
- Miller, M. B., Skorupski, K., Lenz, D. H., Taylor, R. K., und Bassler, B. L. (2002) Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* **110**: 303-314.
- Miller, K. W., Konen, P. L., Olson, J., und Ratanavanich, K. M. (1993) Membrane protein topology determination by proteolysis of maltose binding protein fusions. *Anal Biochem* **215**: 118-128.
- Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. *et al.* (1984) An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Meth* **2**: 233-241.
- Miyamoto, C. M., Smith, E. E., Swartzman, E., Cao, J. G., Graham, A. F., und Meighen, E. A. (1994) Proximal and distal sites bind LuxR independently and activate expression of the *Vibrio harveyi lux* operon. *Mol Microbiol* **14**: 255-262.
- Mok, K. C., Wingreen, N. S., und Bassler, B. L. (2003) *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *EMBO J* **22**: 870-881.
- Morett, E. und Bork, P. (1998) Evolution of new protein function: recombinational enhancer Fis originated by horizontal gene transfer from the transcriptional regulator NtrC. *FEBS Letters* **433**: 108-112.
- Nallamsetty, S., Austin, B. P., Penrose, K. J., und Waugh, D. S. (2005) Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His₆-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Sci* **14**: 2964-2971.
- Nealson, K. H., Platt, T., und Hastings, J. W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**: 313-322.
- Nealson, K. H. und Hastings, J. W. (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Mol Biol Rev* **43**: 496-518.

- Neiditch, M. B., Federle, M. J., Miller, S. T., Bassler, B. L., und Hughson, F. M. (2005) Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol Cell* **18**: 507-518.
- Neiditch, M. B., Federle, M. J., Pompeani, A. J., Kelly, R. C., Swem, D. L., Jeffrey, P. D. *et al.* (2006) Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell* **126**: 1095-1108.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., und Koonin, E. V. (1999) AAA⁺: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**: 27-43.
- Oliver, J. D. und Colwell, R. R. (1973) Extractable lipids of gram-negative marine bacteria: phospholipid composition. *J Bacteriol* **114**: 897-908.
- Perraud, A. L., Kimmel, B., Weiss, V., und Gross, R. (1998) Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal HPT domains of the sensor proteins. *Mol Microbiol* **27**: 875-887.
- Perraud, A. L., Weiss, V., und Gross, R. (1999) Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* **7**: 115-120.
- Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**: 346-356.
- Piazza, F., Tortosa, P., und Dubnau, D. (1999) Mutational analysis and membrane topology of ComP, a quorum-sensing histidine kinase of *Bacillus subtilis* controlling competence development. *J Bacteriol* **181**: 4540-4548.
- Pirch, T., Landmeier, S., und Jung, H. (2003) Transmembrane domain II of the Na⁺/proline transporter PutP of *Escherichia coli* forms part of a conformationally flexible, cytoplasmic exposed aqueous cavity within the membrane. *J Biol Chem* **278**: 42942-42949.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., und Saito, H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**: 865-875.
- Pourcher, T., Bibi, E., Kaback, H. R., und Leblanc, G. (1996) Membrane Topology of the Melibiose Permease of *Escherichia coli* Studied by *melB-phoA* Fusion Analysis. *Biochemistry* **35**: 4161-4168.
- Promega. Technical manual: Altered sites II in vitro mutagenesis systems. 1994.
- Reading, N. C., und Sperandio, V. (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **254**: 1-11.

- Rigaud, J. L., Pitard, B., und Levy, D. (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1231**: 223-246.
- Riggs, P. (1994) Expression and purification of maltose-binding protein fusions. *Current Protocols in Molecular Biology*. Supplement 28. Unit 16.6. 16.6.1-16.6.14
- Ruby, E. G. (1996) Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu Rev Microbiol* **50**: 591-624.
- Rudolph, J. und Oesterhelt, D. (1995) Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J* **14**: 667-673.
- Rudolph, R. und Lilie, H. (1996) *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J* **10**: 49-56.
- Russ, W. P. und Engelman, D. M. (1999) TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 863-868.
- Schaaf, S. und Bott, M. (2007) Target genes and DNA-binding sites of the response regulator PhoR from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **189**: 5002-5011.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Schaefer, A. L., Greenberg, E. P., Oliver, C. M., Oda, Y., Huang, J. J., Bittan-Banin, G. *et al.* (2008) A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* **454**: 595-599.
- Seddon, A. M., Curnow, P., und Booth, P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* **1666**: 105-117.
- Smirnova, A. V. und Ullrich, M. S. (2004) Topological and deletion analysis of CorS, a *Pseudomonas syringae* sensor kinase. *Microbiol* **150**: 2715-2726.
- Spurlino, J. C., Lu, G. Y., und Quioco, F. A. (1991) The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J Biol Chem* **266**: 5202-5219.
- Stabb, E. V., Schafer, A., Bose, J. L., und Ruby, E. G. (2008) Quorum signaling and symbiosis in the marine luminous bacterium *Vibrio fischeri*. Chemical Communication among Bacteria. Edited by S.C. Winans and B. L. Bassler. ASM Press, Washington, D. C.

- Stadtman, E. R. (1957) Preparation and assay of acetyl phosphate. *Methods Enzymo* **3**: 228–231.
- Stambrau, N. (2008) Der LuxP/AI-2 und LuxQ-abhängige Signaltransduktionsweg des Quorum sensing-Systems von *V. harveyi*. Doktorarbeit, Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., und Goudreau, P. N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Studier, F. W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system, *J. Mol. Biol.* **219**: 37-44.
- Sun, J., Daniel, R., Wagner-Döbler, I., und Zeng, A. P. (2004) Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol Biol* **4**: 36.
- Swem, L. R., Swem, D. L., Wingreen, N. S., und Bassler, B. L. (2008) Deducing receptor signaling parameters from in vivo analysis: LuxN/AI-1 quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Cell* **134**: 461-473.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Timmen, M. (2005) *In vitro*-Rekonstruktion der Quorum sensing-Signaltransduktionskaskade zur Charakterisierung der Hybridsensorkinase LuxN aus *Vibrio harveyi*. Doktorarbeit, Fakultät für Biologie/Chemie, Universität Osnabrück.
- Timmen, M., Bassler, B. L., und Jung, K. (2006) AI-1 influences the kinase activity but not the phosphatase activity of LuxN of *Vibrio harveyi*. *J Biol Chem* **281**: 24398-24404.
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S., und Arakawa, T. (2004) Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog* **20**: 1301-1308.
- Tsuzuki, M., Ishige, K., und Mizuno, T. (1995) Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcB, of *Escherichia coli*: in vitro studies with mutants. *Mol Microbiol* **18**: 953-962.
- Tu, K. C. und Bassler, B. L. (2007) Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes Dev* **21**: 221-233.
- Uhl, M. A. und Miller, J. F. (1996) Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem* **271**: 33176-33180.

- Ulrich, D. L., Kojetin, D., Bassler, B. L., Cavanagh, J., und Loria, J. P. (2005) Solution structure and dynamics of LuxU from *Vibrio harveyi*, a phosphotransferase protein involved in bacterial quorum sensing. *J Mol Biol* **347**: 297-307.
- Umetsu, M., Tsumoto, K., Hara, M., Ashish, K., Goda, S., Adschiri, T. *et al.* (2003) How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *J Biol Chem* **278**: 8979-8987.
- Vale, R. D. (2000) AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol* **150**: F13-F19.
- Vallejo, L. F. und Rinas, U. (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact* **3**: 11.
- Vilchez, R., Lemme, A., Thiel, V., Schulz, S., Sztajer, H., und Wagner-Döbler, I. (2007) Analysing traces of autoinducer-2 requires standardization of the *Vibrio harveyi* bioassay. *Anal Bioanal Chem* **387**: 489-496.
- von Heijne, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225**(2):487-94.
- Wang, Y., Toei, M., und Forgac, M. (2008) Analysis of the membrane topology of transmembrane segments in the C-terminal hydrophobic domain of the yeast vacuolar ATPase subunit a (Vph1p) by chemical modification. *J Biol Chem* M803258200.
- Waters, C. M. und Bassler, B. L. (2006) The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. *Genes Dev* **20**: 2754-2767.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**: 4406-4412.
- Weiss, D. S., Batut, J., Klose, K. E., Keener, J., und Kustu, S. (1991) The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell* **67**: 155-167.
- Xavier, K. B., Miller, S. T., Lu, W., Kim, J. H., Rabinowitz, J., Pelczer, I. *et al.* (2007) Phosphorylation and processing of the quorum-sensing molecule autoinducer-2 in enteric bacteria. *ACS Chem Biol* **2**: 128-136.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Zimmann, P., Puppe, W., und Altendorf, K. (1995) Membrane topology analysis of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**: 28282-28288.

sp:P25084:LASR_PSEAE
 sp:Q46751:CARR_PECCC
 sp:Q46967:ECHR_ERWCH
 sp:P54293:ESAR_ERWST
 sp:Q47189:EXPR_PECCC
 sp:P12746:LUXR_VIBFI
 sp:P54303:PHZR_PSECL
 sp:Q51786:PHZR_PSEFL
 sp:O54452:RAIR_RHIET
 sp:P54292:RHLR_PSEAE
 sp:P58590:SOLR1_RALSO
 sp:P33905:TRAR_AGRU
 sp:P33909:TRAR_AGRVI
 sp:P55407:TRAR_RHISN
 sp:P74946:VANR_VIBAN
 sp:P54295:YENR_YEREN

MALVDG-----FLELERSGKLEWSAILQKMA-----SDLGFSKILFGLL
 M-----DHEIHSFIKRL-----KVGDVWVFSYFMM
 MS-----ISFSNFDFINSTIQNYLNRKL-----KSYGDLKYAYLIM
 MF-----SFFLENQITDTLQTYIQRKL-----SPLGSPDYAYTVV
 MS-----QLFYNNETISRIKQSQDMAL-----SHYGDIKYAYMVL
 ---M--KN-----INADDTYRIINKIKACRSNNDINQCLSDMT-----KMHCEYLLAI
 ---MELGQ---QLGWDA-YFYISIFARTMDMQEFTAVALLRAL-----RELRFDFFRYGM
 MFKMELGQ---LLGWDA-YFYISIFAQAMNMEEFVVALRAL-----RELRFDFFRYGM
 MSPSHAEQFSFFLLSGPDLRIADIAGSGNDAGRSRPHLCDIAYGSPCDLAGATDSNPL--
 MR-NDGGF---LLWWDG---LRSEMQUIHDSQGVFAVLEKEV-----RRLGFDYIYAGVR
 ---MGPGF---Q---DA---YHAFHTAQDERQLFRQIASVV-----RQLGFDYCCYGR
 M--QHWLD-----KLTDLAAIEGDECILKTGLADIA-----DHFGFTGYAYLHI
 M--QHWLD-----KLTDLTAIEGDGICILKTGLADVA-----DHFGFTGYAYLHI
 MSVNGNLR-----SLIDMLEAAQDGHMIKIALRSFA-----HSCGYDRFAYLQK
 ---M-----YKILRLIQENQITSHDDLENVNLGN-----NLIGHEFFLFLGLS
 MI-----IDYFDNESINEDIKNIYIQRRI-----KTYGDLCSYSLVM

sp:P25084:LASR_PSEAE
 sp:Q46751:CARR_PECCC
 sp:Q46967:ECHR_ERWCH
 sp:P54293:ESAR_ERWST
 sp:Q47188:EXPR_DICD3
 sp:P12746:LUXR_VIBFI
 sp:P54303:PHZR_PSECL
 sp:Q51786:PHZR_PSEFL
 sp:O54452:RAIR_RHIET
 sp:P54292:RHLR_PSEAE
 sp:P58590:SOLR1_RALSO
 sp:P33905:TRAR_AGRU
 sp:P33909:TRAR_AGRVI
 sp:P55407:TRAR_RHISN
 sp:P74946:VANR_VIBAN
 sp:P54295:YENR_YEREN

PKDSQDYENAFIVGNYPAAWREHYRAGYARVDPVSHCQSVLPIFME---PSIYQTR
 SKNS--TSQPYIISNYPEAKMKEYIKKEMFLSDPIIVASLARITPFSWD--DNDIVTLRA
 NKKK--PTDVVIIISNYPSEWEIIRSNNYQHIDPVILTAINKISPFWD--DDLVISSKL
 SKKN--PSNVLIISYPDEWIRLRANNFQLTDPVILTAFKRTSPFAWD--ENITLMSDL
 NKKK--PTDVVIIISNYPTEWVDIIRNNNYQHIDPVILTAINKISPFWD--DDLVISSKL
 YPHSMVKSISILDNYPKKWRQYDDANLIKYDPIVDYSNSNHSPINWNIENNNAV--K
 SVTFPMRPRTMYGNYPEWVQRQAANYAVIDPTVKHSHVSSSILAS---NELF--R
 SVTFPMRPRTMYGNYPEWVQRQAANYAVIDPTVKHSHVSSSILAS---NELF--R
 -----LMLTYPEWVQRQRDRDYFSDPVVRLGRGFLPVEWS--ASGD---SG
 HTIPFTRPKTEVHGTYPKAWLERYQMNYGAVDPAIINGLRSSEMVVWS---DSL--D
 VPLPVSKPAVAIFDTPAGWMEHYQASGFLEIDPTVVRTGASSSDLIWIP---VSI--D
 Q-----HRHITAVTNYHROQSTYFDKKFEALDPVVKRARSRKHIFTWS--GEHERPTLSK
 Q-----HKHIIAVTNYHHDWRSLYFDKKFDALDPVVKRARSRKHQVFAWS--GEQERPKLSE
 D-----GTQVRTFHSYGPWESIYLGSDYFNIDPVLAEKRRRDVFFWT--ADAWPARGSS
 FQPTLTKSETLVTDNYPNSWRQYDESQGMHIDPIVKYSITNFLPWRD--DAKRVN--N
 NKKT--PLHPTIISNYPLDVPKKMKKNSYHLIDPVILTAKDKVAPFAWD--DNSVINKKS
 * * * * *

sp:P25084:LASR_PSEAE
 sp:Q46751:CARR_PECCC
 sp:Q46967:ECHR_ERWCH
 sp:P54293:ESAR_ERWST
 sp:Q47188:EXPR_DICD3
 sp:P12746:LUXR_VIBFI
 sp:P54303:PHZR_PSECL
 sp:Q51786:PHZR_PSEFL
 sp:O54452:RAIR_RHIET
 sp:P54292:RHLR_PSEAE
 sp:P58590:SOLR1_RALSO
 sp:P33905:TRAR_AGRU
 sp:P33909:TRAR_AGRVI
 sp:P55407:TRAR_RHISN
 sp:P74946:VANR_VIBAN
 sp:P54295:YENR_YEREN

KQHEFFEEA SAAG--VYGLMPLHGARGELGALSLSVEAENR--AEANRFMESVLPPTLWM
 KNQDVFISSVQHDI--SSGYTFVLHDHNNVATLSIA-NHLED--ANFEKCMKNHENDLQM
 KFSRIFNLSKEYDI--VNGYTFVLHDPGNLTLSEFMFEENRS--GELEEIQNNKDKLQM
 RFTKIFSLSKQYNI--VNGFTYVLDHDMNLLSVI IKGNDQ--TALEQRLAAEQTMQM
 KFSRIFNLSKDYDI--VNGYTFVLHSPGNLALSEFMIEEHS--EELEEIQNNKDKLQM
 KSPNVIKEAKTSGI--ITGFSFPIHTANNGFGMLSAHSEKDN--Y--IDSLFLHACMNIPL
 GCPDLWSEANDSNL--RHGLAQPSFNTQGRVGVLSLARKDNPI--SLQEFALKVVTN--A
 NCPDLWSEANDSSL--CHGLAQPSFNTQGRVGVLSLARKDNAI--SLQEFALKPVTK--A
 RAYGFFKEAMAFVGRQGVTLVPRGPGQERSLFTVTSNHPDAYWRQFRMDSMRDLQFLAH
 QSRMLWNEARDWGL--CVGATLPIRAPNNLLSVLSVARDQQNI--SSFEEIIRLRLR--C
 EAARLWSDARDFGL--NIGVARSSWTAHGAFGLLTLARRADPL--TAAEQQLSATEKN--W
 DERAFYDHASDFGI--RSGITIPIKTANGFMSMFTMASDK-----PVIDLDREIDAVAAAA
 EERAFYAQAADFGI--RSGITIPIRTANGSMSMFTLASER-----TAIPLDREIDAVAAAA
 PLRRFRDEAISHGI--RCGVTPVEGSYGSAMMLTFASPE-----RKVDISGVLDPKKAQV
 DGRVIFEEARCNGI--KAGFSIPIHGLRGEFGMIFATSDTKS--YDLNQSIHTSQ--L
 TDSAVFKLAREYNI--VNGYTFVLHDNSNNMATLNI SNGSDDS--ISFDRIEINKEIQM
 . : . : * : . : .

sp:P25084:LASR_PSEAE
 sp:Q46751:CARR_PECCC
 sp:Q46967:ECHR_ERWCH
 sp:P54293:ESAR_ERWST
 sp:Q47188:EXPR_DICD3
 sp:P12746:LUXR_VIBFI
 sp:P54303:PHZR_PSECL
 sp:Q51786:PHZR_PSEFL
 sp:O54452:RAIR_RHIET
 sp:P54292:RHLR_PSEAE
 sp:P58590:SOLR1_RALSO
 sp:P33905:TRAR_AGRU
 sp:P33909:TRAR_AGRVI
 sp:P55407:TRAR_RHISN
 sp:P74946:VANR_VIBAN
 sp:P54295:YENR_YEREN

LKDYALQSGA-----GLAFEPVSK--PVVLTREKEVLQWCAIGKTSWEISVI
 LLVNVHEKVM-----AYQRAINDQDNPPDNRNALLSPRETEVFLVSSGRTYKEVSRI
 LLISAHEKLT-----SLYREMSKNKNSKSQ--EPNIFSQRENEIYWASMGKTYQEIALI
 LLIDFNEQMY-----RLAGTEGERAPALNQSADKTI FSSRENEVLYWASMGKTYAEIAAI
 LLISAHEKLT-----SLYREMSRNRNNSKSQ--EADLFSQRENEI LHWASMGKTYQEIALI
 IVPSLVDNYR-----KINIANN--KSNNDLTKREKECLAWACEGKSSWDISKI
 FAAA VHEKIS-----ELES DVRFNTDVEFSGRECDVLRWTADGKTSEEIGVI
 FAAAAL EKIS-----ALETDVRAFNTDVEFSERECVLRWTADGKTSEEIGVI
 ---HLHDRAM-----VLSGMRKVADLPRLSRELEQLCEMTANGLLAKQICAR
 MIELLTQKLT-----DLEHPMLMSN--PVCLSHREREI LQWTADGKSSGEIAII
 LANLAHALMS-----PFLMPKLVPESSAALTAREREVLCWTGEGKTAYEIGQI
 TIGQIHARIS-----FLRITPTAEDA AAWLDPKTEATYLRWIAVGKTMEEIADV
 AVGQLHARIS-----FLRITPTAEDA AAWLDPKTEATYLRWIAVGKTMEEIADV
 LMMVHYQLK-----IIAAKT VLNPKQMLSPREMLCCLVWASGKKTASVTANL
 IVPLLAHNIG-----NI TRYHKDAKPRAVLTAREVQCLAWAAE GKS AWEIATI
 LLITHEKML-----GLYQNSDKNENRNTQIERDIFSPRENEIYWASMGKTYAEISII
 : : * * *

```

sp:P25084:LASR_PSEAE      CNCSEANVNFHMGNIIRKFGVTSRRVAAIMAVNLGLITL-----
sp:Q46751:CARR_PECCC     LGISEVTVKFIHNSVRKLDVINSRHAIKALELNLFHSPCEPVMKHM DAR
sp:Q46967:ECHR_ERWCH     LGITTTSTVKFHIHNSVRKLDVINSRHAIKALELNLFHSPCEPVMKHM DAR
sp:P54293:ESAR_ERWST     TGISVSTVKFHIKVVVKKLGVSNARQAIRLGVLDLI-RPA--ASAA----R
sp:Q47188:EXPR_DICD3     LGITTTSTVKFHIHNSVRKLDVINSRHAIKALELNLFHSPCEPVMKHM DAR
sp:P12746:LUXR_VIBFI     LGCSERTVTFHLTNAQMKLNTNRCQSIKAILTGAIDCPY-----FKN
sp:P54303:PHZR_PSECL     MGVCTDVTVNYHHRNIQRKIGASNRVQASRYAVAMGYI-----
sp:Q51786:PHZR_PSEFL     MGVCTDVTVNYHHRNIQRKIGASNRVQAVSYAVALGYI-----
sp:O54452:RAIR_RHIET     LSI SVSAVQLYLASARRKLTVAATSE--QLLGPRRSN-----
sp:P54292:RHLR_PSEAE     LSI SESTVNFHKNIQKFDAPNKTAAAAYAAALGLI-----
sp:P58590:SOLR1_RALSO    LRI SERTVNFHVNNVLLKLAATNKVQAVVKAIAIGLI-----
sp:P33905:TRAR_AGRTU     EGVKYN SVRVKLR EAMKRF DVRSKAHLTALAIKRKLI-----
sp:P33909:TRAR_AGRVI     EEVKYN SVRVKLR EAMKRF DVRSKAHLTALAIKRKLI-----
sp:P55407:TRAR_RHISN     TGINARTVQHLYDKARAKLDAESVQLVAIAKDRGLV-----
sp:P74946:VANR_VIBAN     INTSERTVKFHFNSACKKLGATNRYQAITKAILGGYIN-PY-----L--
sp:P54295:YENR_YEREN     LGIKRSTVKFHIHNSVRKLDVINSRHAIKALELNLFHSPCEPVMKHM DAR
*           .           :           .           .

```

Abb. 1: Alignment von Proteinen der LuxR-Familie. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code beginnend mit der ersten Aminosäure (M, Methionin) von: LasR aus *P. aeruginosa* (LASR_PSEAE) (grau markiert), CarR aus *Pectobacterium carotovorum* (CARR_PECCC), EchR aus *Erwinia chrysanthemii* (ECHR_ERWCH), EsaR aus *Erwinia stewartii* (ESAR_ERWST), ExpR aus *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemii*) (EXPR_DICD3), LuxR aus *V. fischeri* (LUXR_VIBFI), PhzR aus *Pseudomonas chlororaphis* (*Pseudomonas aureofaciens*) (PHZR_PSECL), PhzR aus *Pseudomonas fluoreszens* (PHZR_PSEFL), RaiR aus *Rhizobium etli* (RAIR_RHIET), RhIR aus *Pseudomonas aeruginosa* (RHLR_PSEAE), SolR1 aus *Ralstonia solanacearum* (SOLR1_RALSO), TraR aus *Agrobacterium tumefaciens* (TRAR_AGRTU), TraR aus *Agrobacterium vitis* (TRAR_AGRVI), TraR aus *Rhizobium sp.* (TRAR_RHISN), VanR aus *V. anguillarum* (VANR_VIBAN) und YenR aus *Yersinia enterocolitica* (YENR_YEREN). Die Aminosäuren Y56, W60, Y64, D73, P74 und S129 aus LasR, die identisch in anderen LuxR-Proteinen sind, sind grün markiert. Aminosäuren, die die AHL-Bindetasche in LasR bilden, sind rot markiert. Das Alignment wurde mit dem Programm MAFFT FFT-NS-2 (Version 6.240) (Katoh *et al.*, 2002; Katoh *et al.*, 2005) erstellt.

Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*), ähnliche durch einen Doppelpunkt (:), bei einer Abweichung bzw. durch einen Punkt (.) bei mehr als einer Abweichung gekennzeichnet.

LuxN *Vibrio harveyi* --MFDFSLEAIVYAKAISLLATVAVVMMWLFYYCYRLKQKNEVI-FGTHH 47
 LuxN *Vibrio splendidus* MNMFDFGLEAIVYAKAITLLATVAIVVMWLLYYCYRLRQKNKVI-FGTHH 49
 VanN *Vibrio anguillarum* --MLNLDLPILYPKAITLIAAVMVLVWLLYYCYRLKQKNEVI-FGTHH 47
 OpaN *Vibrio parahaemolyticus* MNMLDIGLSGLLYPKAITLFATVAVVWLLYYCYRLKQKNEVI-LGSHH 49
 LuxN *Vibrio alginolyticus* --MLDVHLHGLFYPKAMALYATVLIIVFAWLLYYCYRLKQKSESI-LGSHH 47
 LuxN *Vibrio campbellii* --MTETFITHMLYSKAVLTLASFLVLTWVSFFCRSLYLNRRGR-SIGNY 47
 LuxN *Vibrio fischeri* --MLTT-----LSKVYLLLTSAIILLWVGVFVRSLYKERTKV-NPYTY 41
 LuxN *Vibrio angustum* --MADLYQAVTTNVAIAIFLIAISAVIAVWVTGYFARFLHSPSLSHDKRIY 48
 LuxN *Photobacterium profundum* --MHDFIQSTLANMVAIFLVAIALVWVWATYFARILAKHLPGS-SRQVY 47
 LuxN *Photobacterium phosphoreum* --MPDPLLLLFSEPRGALLFFAAGIILAWLGYFSFTLFTSRPGA-NRRVY 47
 * * * * * : : * : : *

LuxN *Vibrio harveyi* AA^YY^IA^YS^VC^II^AW^IS^SN^AY^FH^TD^LL^PE^LG^AS^SA^GM^FM^AK^FA^NL^AS^FF^AF^AF 97
 LuxN *Vibrio splendidus* APYIAYSICIVANICSNAYFHTDLLPELGASAAYAAKLANLASFCFAF 99
 VanN *Vibrio anguillarum* ASYIAYSSCIIANIGSNAYFHTDVLVELGVNRAIFMAEIANISASLAFV 97
 OpaN *Vibrio parahaemolyticus* APYIAYSTCIIINWISSNAYFHTDLLPLLGSEGGIFMAKLANLASFFAF 99
 LuxN *Vibrio alginolyticus* APYIAYSSCIIIVWISSNAYFHTDLLPELGSVGGIFMAKLANLASFFAF 97
 LuxN *Vibrio campbellii* TFYIIYITGLFFWILSNAYFHSGLFLLYSKQAAIKMAILANISAYIAFA 97
 LuxN *Vibrio fischeri* SSIYFYALFIIILWILSNAYFQSPLLTYFDESAAIFMALFANMTSYLAF 91
 LuxN *Vibrio angustum* FPYIIYTSFISLWILSNAYFQSSLLIERSDIVAVNIALAANIFSGLAF 98
 LuxN *Photobacterium profundum* FPYTLYSVFISAWILSNAYFQSDLLVYFGADTAIIMALLANIFSGLAF 97
 LuxN *Photobacterium phosphoreum* YPYLAYSVSIFLWILSNAYFQSPLLTYSESTAVTMTALFANLVSFCAF 97
 * * : : ** *****: * . .: * **: : **

LuxN *Vibrio harveyi* AYYFSCQLAAEQKRGKGVHRWQQGIFVSLTVVYSLFINLRPGLTVEHVDIV 147
 LuxN *Vibrio splendidus* AYYFSCQLAAEQRNSKVPWQQAI FVTLTVYSFFINLSPGLTVEHVTDI 149
 VanN *Vibrio anguillarum* AYYFSCQLSAEQKRGKVLWQRLIFITTAAYSVLINLQSNLQNRHVDIV 147
 OpaN *Vibrio parahaemolyticus* AFYFSCQLAAEQKRGKVLWQQGIFIALTVVYSLVINLRPNLTVENVLDI 149
 LuxN *Vibrio alginolyticus* AFYFSCQLTADVKKTAVKVVQKVVVFTLATYSLYINLVNLTVENVTI 147
 LuxN *Vibrio campbellii* AYLFSCLRESISRKPTPKLQYALLICFTVFTAIINTYKGLAVDVVILA 147
 LuxN *Vibrio fischeri* AFLFSCLASKHPDKRLSKWQFGLTSITTFALIVNVIPLNLTIVGTIQA 141
 LuxN *Vibrio angustum* AYLFSCLRITSKKDNFSLTFTQKFLLYTSIIITLLTNIIPRINITSIDI 148
 LuxN *Photobacterium profundum* AFLFSCLRVSRSTFQLKTWQWILFSLTLCIIILVTNCSVPLNVKSVDI 147
 LuxN *Photobacterium phosphoreum* AYSFSCRLISTQPSDNLSLYQKLFISIIISLYALIINSSPGLTVKHVDI 147
 *: **:: * . : : : * .

LuxN *Vibrio harveyi* PSQFVIEFGPHTSYFFIGLVSVFVLTLVNLVAMRTNSSKLTFLAKTNYMIA 197
 LuxN *Vibrio splendidus* PSEFVIEFGPYTPYFFTGVISLIIITLLNLLAMRANSSKLTFLAKTNYM 199
 VanN *Vibrio anguillarum* PSEFVIEFGPHTPYFFNAMLCSVILTLFNLVVMRTNSSKLANLAKTNYIA 197
 OpaN *Vibrio parahaemolyticus* PSQFVIEFGPHTSYFFMGLVTFVVMTLTNLISMNRANSSKLSIAKNNY 199
 LuxN *Vibrio alginolyticus* PSQFVIEFGPHTSYFFISLLAFVLTLLNLIAMRANSSKLTFLAKTNYMIA 197
 LuxN *Vibrio campbellii* PSQFSIVFGPYTKFFVYVLTFLIALTFMNLLYLRNASGRLGQTKSNYMIA 197
 LuxN *Vibrio fischeri* PSVFTIEFGPFAPLEFFLNAFLFVILTSINFFKLRKSNIKLNKERSIYLM 191
 LuxN *Vibrio angustum* IGVFYINFGELSFIFGMLIIILLSTIINLLILHKNNTCINRVKAKYMIT 198
 LuxN *Photobacterium profundum* IGSFVIEFGPHTIGVFFGNLLLLLITLGNFILSSRSQKQKQKANYMIF 197
 LuxN *Photobacterium phosphoreum* PGDFVIEFGPQTSWFFLCLMSAVFLTFHNFLLIYKAGSPLIQKKSQYMI 197
 . * * * * ** : * * . : : * **:

LuxN *Vibrio harveyi* GILVFMSTAVIHGMYFMDGDFSLTWLPPALSISEMLFVGYALLTSRFY 247
 LuxN *Vibrio splendidus* GILVFMSTAVIHGMYFMDGDFSLTWLPPALSISEMLFVGYALLTSRFY 249
 VanN *Vibrio anguillarum* GILVFMSTLVIHIGITFFQDFSLSWLPPALSISEMFFVGYALLTSRFY 247
 OpaN *Vibrio parahaemolyticus* GILVFMSTAVIHGMYFMDGDFSLTWLPPALSISEMLFVGYALLTSRFY 249
 LuxN *Vibrio alginolyticus* GILVFMSTAVIHGMYFMDGDFSLTWLPPALSISEMLFVGYALLTSRFY 247
 LuxN *Vibrio campbellii* GIAIFMTSTAI FQLGFTYILHDFSLTWLPPALSISEMFFVGYALLTSRFY 247
 LuxN *Vibrio fischeri* GIFIYMI STIASQIIPVIMADEFSYTWVPPALSVEALLIGYTLHYRLY 241
 LuxN *Vibrio angustum* GIIAFISSTFLIHFAAVIFHDFTAAWLPPALSIVIEVFLIGYALFNSRFY 248
 LuxN *Photobacterium profundum* GMMAFIISTFFAHFLIPIFLNDFSKAWLPPALSIEVIVGYALLHHRFY 247
 LuxN *Photobacterium phosphoreum* GVII FMLSTLIVHLIIPFMDDFSLTWVPPALAI FETLLIGYALLFNRFY 247
 *: **: ** : : . : ** : ** : ** : * : ** : ** :

LuxN *Vibrio harveyi* SVKYIAYLALSLLVCAIFVLPGLGAI FIPLETESNQWLIAIPICALIGITW 297
 LuxN *Vibrio splendidus* SVKYLAYMSLNTLLVCAILVIFPGAIFIPLETDDNQWLIAIPICAVIGITW 299
 VanN *Vibrio anguillarum* SVKYLAYLCLNTALVCGVLFIPLGAIFIPLETDSNQWLIAIPICALIGITW 297
 OpaN *Vibrio parahaemolyticus* SAKYLAYLTSISLVFCTIFVLPGLGAVFIPMEDNQWLISIPICALIGITW 299
 LuxN *Vibrio alginolyticus* SAKYLTYLTVSALLVCAIFVLPGLGAI FIPLEDNQWLVAVPLCALIGITW 297
 LuxN *Vibrio campbellii* STKHIAFITLSVIGTSVAVFALSISLSTMFSTYNETVAVAGTLCFLVGLTW 297
 LuxN *Vibrio fischeri* SFKYLFLWLSYSINLILYLIPIIIYDILTTPSDLLYICIEIIFTGLFW 291
 LuxN *Vibrio angustum* SLKYIIFITSSTFINIIFYTAPVILLELYHIKET-PFFLVLTWLTITGFFW 297
 LuxN *Photobacterium profundum* SRYIGLITLSFVINAAYIIPIASVGVGTQDS-TLLLVIVWTLITGICW 296
 LuxN *Photobacterium phosphoreum* SPRYIISQFISHLVNVTLYLSPYLLIIAIGYEDN-PLLIGLWIALIGLW 296
 * : : : . . . : . . * : *

LuxN *Vibrio harveyi* QLLYKKTSTRYASFLIYGDKKTPVQQILSLEEDFKLSIDDAMRRLGKLLQI 347
LuxN *Vibrio splendidus* HLLYKRVS DYASFFIYGNKKT PVQQILALEEDFKLSIDDAMRRLGSLQLI 349
VanN *Vibrio anguillarum* NPLYKRLSRYSALLIYGNQQT PVQEQLALEEDFKRSIDDAMRRLGQLLYI 347
OpaN *Vibrio parahaemolyticus* HLVYKRVSRIASFFIYGNRQTPVQQILALEEEFKRSIDDAMRRLGSLTLLNI 349
LuxN *Vibrio alginolyticus* HLLFKRVSRYSYFIIYGRHTPVQQILGLEEEFKRSIDDAMRRLGSLLLNI 347
LuxN *Vibrio campbellii* TKIYYIVKRAVARVLYGSPYTPVEQVIALERDFQYSTRNPIERLAELLNI 347
LuxN *Vibrio fischeri* DKTLLKTKKIASII IYKDKQTPVEKIYKIAEEFKYSSNAI IKLASILNT 341
LuxN *Vibrio angustum* HRTLRLVRLFANKI IYHKKGNPVENITKI ISEFKISTDLGISKLNVTIHS 347
LuxN *Photobacterium profundum* YKSLAI IRRSVNRLLYKEKGD PVENICNLIGEFSYSTDAVIKLNQVLNA 346
LuxN *Photobacterium phosphoreum* KSSLIQIKRGTNRLLYKNGSPSENIQRVIGHFYQYSTEYGLGKLNELLNT 346

. . : * . * : : : . * . * : : * : :

LuxN *Vibrio harveyi* PNDKRLRLVTSNYNETFYEEYLSNRSVLFVDELSEEL-EYKVS AKRSMKA 396
LuxN *Vibrio splendidus* PEDKRLRLVNSNYNETFYEDYLSNKS SVLVFDELSQEL-DYTAPAKRSIKA 398
VanN *Vibrio anguillarum* ADDKLQFVNSNYNETVYERYLSKQTALVDFELFEKL-DNKTAAKNSIKA 396
OpaN *Vibrio parahaemolyticus* PNDKLQVLTSNYETFFYEDYLSNDSVLFVDELSEERL-DEKPNKSGSIKA 398
LuxN *Vibrio alginolyticus* PNNKLQVLTSNYETFFYEEYLPSSKSVLVDELSEEI-DYASSKSGSMRK 396
LuxN *Vibrio campbellii* PHEKLQVLTNNYQDIPYAKYLSKKSILIVDEIANELSDSOSNLDDTLSE 397
LuxN *Vibrio fischeri* PKEELLIGKNTNYNIFIPHLNQS HSALVKDELQYIHS PKTANAELHQ 391
LuxN *Vibrio angustum* NNGI IVQVS--NKNQLLRDYFKTGRNILLKQDLDVLLN-DNVLADNHLHL 394
LuxN *Photobacterium profundum* KSGRIQLKVSNGTENNIFVSYFHGNRSVLIKEEIEYQLKHEKPEGTKELSN 396
LuxN *Photobacterium phosphoreum* RSQQLINTHSDLAALKIYFEGKHSVLVKDELEFQIQYETHTELSNISW 396

: : : : . * : : : : : :

LuxN *Vibrio harveyi* LYDKMSSNNTALVMPLFGQGKSVTHLLISPHKSNQMFSSNEEISAVQTL 446
LuxN *Vibrio splendidus* LYDKMSSNTALVMPLFGQGKSVTHLLVSSHKSNDQMFSSNEEISALQTL 448
VanN *Vibrio anguillarum* LYDKMSSNNTALVMPLFGHSHKLVTHLLISPHKINNQMFSSNEEIAALQTL 446
OpaN *Vibrio parahaemolyticus* LYERMRSNTALVMPLFGREKSVSHLLISSHKS DNKLFSSNEEISALQTL 448
LuxN *Vibrio alginolyticus* LYERMRSNTALVMPLFGRGKSVTHLLISSHKIDNKLFSNEEISALQTL 446
LuxN *Vibrio campbellii* LHTKMHLNTALVPLPYDHDAAKVS HLLISSHKKDGS LFSNEEISALQV 447
LuxN *Vibrio fischeri* VQEKMSKKTALILPIFGENKLI SHFLISANKHDNTTFSNEEISAIQV 441
LuxN *Vibrio angustum* VSEQLHKMGVTLVVPILDES KKI THFYIASKEMSNVLFSC EEMGLQL 444
LuxN *Photobacterium profundum* VTREMVMNGVSLVLPITNERNEVTQLYMVSK EKENVLFSSEEIMGLQL 446
LuxN *Photobacterium phosphoreum* LKKNMDDANSALVLP IVSKNGDISHLFVMSK KDRDGLFSSEEIDALV 446

: : : : * : * : : : : : : . ** *** . : * : :

LuxN *Vibrio harveyi* TRVQSTIEADRRIRQSRALANSIAHEMRNPLAQVQLQFEALKQH IENHAP 496
LuxN *Vibrio splendidus* TRVQSTIEADRRIRQSRALANSIAHEMRNPLAQVQLQFELLKQH IDNQAP 498
VanN *Vibrio anguillarum* TRIQSIIEADRRVCQSRALANSIAHEMRNPLAQVQLHFEILKQH IDSQAP 496
OpaN *Vibrio parahaemolyticus* IRVQNTIESDRKIRQSRALANSIAHEMRNPLAQVQLQFEALKQH IDSNAS 498
LuxN *Vibrio alginolyticus* VRIQSTIEADRVKRSQALANSIAHEMRNPLAQVQLQFEALKQH IESNAS 496
LuxN *Vibrio campbellii* SKVQTYINANRKVSKSQALANSIAHEMRNPLAQVQLQFELHKLQVSN EEP 497
LuxN *Vibrio fischeri* TKVQGYIESERKVRQSQALANSIAHEMRNPLSQLYHF EKIKHHYQK NTE 491
LuxN *Vibrio angustum* ERANRFIDTEEKVRKSVLQAGSIAHEIRNPLSKIKYHFEKIDSDFLSVHK 494
LuxN *Photobacterium profundum* DKANCFIVTEDKIRKSVLVGTIAHEIRNPLTKIKYHFERIDADMFGIEN 496
LuxN *Photobacterium phosphoreum* EQANQYIRSEEQVRKSVLQAGSIAHEIRNPLSKIQYHFERIDADLFDVNN 496

: : * : : : : * . * . : * : * : : : : : : * * . .

LuxN *Vibrio harveyi* VEQ-----ITLDIENGQAAIQRGRQLIDIILREVSDSSPEHEPIA 536
LuxN *Vibrio splendidus* AKQ-----ILLDIENGQAAIQRGRQLIDIILREVSDSSPEHGPI 538
VanN *Vibrio anguillarum* AQQ-----IKQDIENGQAAIQRGRQLIDIILREVSDSSPEHEPIT 536
OpaN *Vibrio parahaemolyticus* DDK-----IRSDIEKGQAAIQRGRQLIDIILREVSDTS AVHEPLS 538
LuxN *Vibrio alginolyticus* LDT-----LKREIDKGEAAIQRGRQLIDIILREVSDSSPEHEPLA 536
LuxN *Vibrio campbellii* VQS-----ILGSDIKGTS AVLRGQQLIDIILREARHTS LQOEPTS 537
LuxN *Vibrio fischeri* HEKQ-----EQLIKNELNQGCLAIQKGAQLIDIILSEAKNTAISDDLPH 535
LuxN *Vibrio angustum* ESINSLATLEIEKIHQELTEGKKALQLGTFKFSVILDEL RGSSTSTSFQ 544
LuxN *Photobacterium profundum* TSLSPFASKEMKKIYQELSEGQKAVQLGSRFIDAILDEL RGESIGTTLFD 546
LuxN *Photobacterium phosphoreum* NSAHFPFLSEQMKGLYKELTESKKA VQLGTRFIDIIDEIKGNSINSQTFS 546

. : : . : * : * : : * * : * :

LuxN *Vibrio harveyi* MTSIHKAVDQAVSHYGFENEKIIERIRLPQHTDFVAKLNETLNFVIFNL 586
LuxN *Vibrio splendidus* MTSIHKAVDQAVSHYGFENEKIIERIRLP PHADFAKLNETLNFVIFNL 588
VanN *Vibrio anguillarum* MTSIHKAVDQAVSQYGFENEKIVIERIHLPPQDDFVAKLNETLNFVIFNL 586
OpaN *Vibrio parahaemolyticus* LTSIHKAVDLAVSRYGFENEHIIERVKLPQHDFVAKLNETLNFVIFNL 588
LuxN *Vibrio alginolyticus* LTSIHKAIDQAVSRYGFENDQIIERINLPQAHDFVAKLNETLNFVIFNL 586
LuxN *Vibrio campbellii* PSSIQUALSTALGRYGFENESFRQRIHFTGANDFIANINDTLFSFVFN 587
LuxN *Vibrio fischeri* HHSISLLTQQI IDEYVPDSEEMQKITLDDLEDDFIVNINDTLYGFILFNL 585
LuxN *Vibrio angustum* HYSAA SLTSQALNDFSLYSEEHKRIHLEATNNFYFGSDTLFSFVFN 594
LuxN *Photobacterium profundum* NYSVAKLTHQALNDFCFNSEEHKLRINIDTQSDFFFHGS DTLFSFVFN 596
LuxN *Photobacterium phosphoreum* SHSAGRLTEQALSEYGFVGNTYQARIANTQNDFFQFWGNLTF SFVFN 596

* : : : : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * :

LuxN <i>Vibrio harveyi</i>	IRNAIYYFDSYPDSQIEISTKTGPYENTLIFRDTGPGIDEITISHKIFDDF	636
LuxN <i>Vibrio splendidus</i>	IRNAIYYFDSYPDSQIEISTKTGAYENLVTRDTGPGIDEAIVHKIFDDF	638
VanN <i>Vibrio anguillarum</i>	IRNAIYYFDSYPNSQIEITTQIGTYENILIFRDTGPGIDDAISYKIFDDF	636
OpaN <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	IRNAIYYFDSYPDSQIEIRTLVGPYENTLVFRDTGPGIDDSIVHKIFDDF	638
LuxN <i>Vibrio alginolyticus</i>	IRNAIYYFDSYPDSQIEIRTQTGAYENILIFRDSGPGIDSSILHKIFDDF	636
LuxN <i>Vibrio campbellii</i>	LRNAIYYFDSYPDSQIEITLKGGEHENCILFRDSGPGIKPTLRHKIFDDF	637
LuxN <i>Vibrio fischeri</i>	LRNATYYFDEY-NSSISIRLVKGFATNKLIFRDTGPGIDSHILPNIFDDF	634
LuxN <i>Vibrio angustum</i>	LKNVYVYFDTFPESHISIQFEKGLKHNKIHVVRTGPGITEEQLENLFDEF	644
LuxN <i>Photobacterium profundum</i>	IKNAVYVFDTPNSQIRIYFQKERNYNKVHVVDTPGPGISPDKHILEEF	646
LuxN <i>Photobacterium phosphoreum</i>	VKNALHYFSQYQSTLSIHLERGESENCIIVTDTGPGIADNVIPHIFDEF	646
	::** :*. : : * : * * : . * :**** : : : : *	
LuxN <i>Vibrio harveyi</i>	FSYQKSGGSGGLGLGYCQRVMRSFGGRIECKSKLGTTFEFHLYFPVVPNAP	686
LuxN <i>Vibrio splendidus</i>	FSYQKSGGSGGLGLGYCQRVMRSFGGKVECHSKLGEFTEFHLYFPVVPNAP	688
VanN <i>Vibrio anguillarum</i>	FSYQKSGGSGGLGLGYCQRVMRSFGGRVECKSKLGEFTEFHLYFPVVPNAP	686
OpaN <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	FSPQKSGGSGGLGLGYCQRVMRSFGGRIECKSVTNEFTEFYLFHPVVPNAP	688
LuxN <i>Vibrio alginolyticus</i>	FSYQKSGGSGGLGLGYCQRVMRSFGGRIECKSELNEFTEFYLYFPVVPNAP	686
LuxN <i>Vibrio campbellii</i>	FTHNKNGGTGLGLGYCQRVMKTFGGRIECKSELDEFTEFQLYFPVVSHP	687
LuxN <i>Vibrio fischeri</i>	FTHNKEGSGGLGLSYCLRVMHAFEGNIACYSTKGEFTEFVLSFPHIEDI	684
LuxN <i>Vibrio angustum</i>	YSPGKVSNGNGLGLAYCKKVMESFSGSISCHSILGEFTEFTLTPAINIQS	694
LuxN <i>Photobacterium profundum</i>	YTNKGKVGNGGLGLSYCKRVIESFGGTITCQSELGEYTEFILLSFPSIDEDI	696
LuxN <i>Photobacterium phosphoreum</i>	YTLGKSDGSGGLGLAYCRVINAFGGNIHCQSKYGSYTRFTLTFPIINEER	696
	:: * *.****.*. :* : * * : * * . :* * * * * :	
LuxN <i>Vibrio harveyi</i>	KADTLR-----	692
LuxN <i>Vibrio splendidus</i>	KADALR-----	694
VanN <i>Vibrio anguillarum</i>	QADSLR-----	692
OpaN <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KVETLR-----	694
LuxN <i>Vibrio alginolyticus</i>	KPETLR-----	692
LuxN <i>Vibrio campbellii</i>	-TISLP-----	692
LuxN <i>Vibrio fischeri</i>	NALNSH-----	690
LuxN <i>Vibrio angustum</i>	NGELTNPRIKQHLSGQSCILSASSLSKLTESFNGLNMNIECSNDPSIG	744
LuxN <i>Photobacterium profundum</i>	HSEMSKEIKSYLTGMSGLVLSVEVGNWLSSEFKSLGVELCTAPDVKTG	746
LuxN <i>Photobacterium phosphoreum</i>	IPNNLFNELKEALTGKQVLVIGHKENTLISLSSGFGNIIVSTVDNGKSA	746
LuxN <i>Vibrio harveyi</i>	-----TPYFNDWKQNKRSNEHKVAPNVQINNQS-----	720
LuxN <i>Vibrio splendidus</i>	-----TPYFNDWKSNAATENKTNVDAKPDNQAATQNSE-----	728
VanN <i>Vibrio anguillarum</i>	-----TPDFKSWQQPKPNTERTVDNIQPIDKPFLLIN-----	724
OpaN <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-----TPNFYWNQK-VKTKPSPPEPVVQINKDA-----	721
LuxN <i>Vibrio alginolyticus</i>	-----APDFDSWKATPSHSENHSAQHVVQCKDA-----	720
LuxN <i>Vibrio campbellii</i>	-----ITSNDSTDRDTIDTGFSGLTPVNIKTPVG-----	721
LuxN <i>Vibrio fischeri</i>	-----KSN-----TPPLINKKDNS-----	704
LuxN <i>Vibrio angustum</i>	FTRIKDCPFNFIVIDHRLYITHYDQISMLREGKYGYLAQITPIFIFNSTS	794
LuxN <i>Photobacterium profundum</i>	LHHSQQAVDFIIMDHMLLNREMGSIKMLRAGTHGHQAQTTMPFLYGYTE	796
LuxN <i>Photobacterium phosphoreum</i>	AKYIGNNNVDFAFYDLSLSPQFEALKKIRSGDFGANAQKIPLIALSNE-	795
LuxN <i>Vibrio harveyi</i>	-----PT	722
LuxN <i>Vibrio splendidus</i>	-----PTSTLTPGNHLAPT	742
VanN <i>Vibrio anguillarum</i>	-----NKAPT	729
OpaN <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-----PT	723
LuxN <i>Vibrio alginolyticus</i>	-----PT	722
LuxN <i>Vibrio campbellii</i>	-----TTKKT	726
LuxN <i>Vibrio fischeri</i>	-----LKT	707
LuxN <i>Vibrio angustum</i>	INLNNDRINVPKYTQGYIDTLNGALAFECSSLEAIINDTKFAPLGSNDKT	844
LuxN <i>Photobacterium profundum</i>	NSEHLNSIELSPFFQGGIDGINDHQAFLHSLESLEDNDLFAKLGSLIGKT	846
LuxN <i>Photobacterium phosphoreum</i>	-NTRSTRFDTN-VFQGFRIISDSLPLFAQSLKLLIDSGSLKPLGLHIGKR	843
LuxN <i>Vibrio harveyi</i>	VLIVDDKEVQRALVQMYLNQLGVNSLQANNGENAVEVFKANHVLDLILMDV	772
LuxN <i>Vibrio splendidus</i>	VLIVDDKEVQRTLQVQMYLSRLGVNSLQAKNGENAVELFKTHKVDLILMDV	792
VanN <i>Vibrio anguillarum</i>	VLIVDDKEVQRSVLQVQMYLNQLGVNNLQANNGENAVEIFKANSIDLILMDI	779
OpaN <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VLIVDDKEVQRTLQVQMYLNRLGVNSLQANNGANAVELFQSHQVDLVLMDV	773
LuxN <i>Vibrio alginolyticus</i>	VLIVDDKEVQRTLQVQMYLQRLGVNSLQANNGASAVELFHSKIDVLVMDV	772
LuxN <i>Vibrio campbellii</i>	VLVVDDKEVQRLVLMKYLEQLDINVIQADNGETAVSIFHSNDVDLVLMDI	776
LuxN <i>Vibrio fischeri</i>	VLIVDDKQVQRMILHTTFINKDNLTLQAENGEAEVIAFNKLDLIFMDS	757
LuxN <i>Vibrio angustum</i>	VLVVDDMHANRLLVKAYLSKEGINVIQAASGYEAEIQVKNNIDLIFMDI	894
LuxN <i>Photobacterium profundum</i>	VLVVDDMQVNRMLVQAYLASEGITVVQASGDEAIEKVKKEPFLVLMDI	896
LuxN <i>Photobacterium phosphoreum</i>	VLVVDDMQINRMLVQSYLAQEGITVLAHQNGSVALCIAEQERPDLILMDI	893
	** :*** . : * * : : : . : . : ** * * * : . : * : ** :	

LuxN <i>Vibrio harveyi</i>	QMPVMNGFDASQRIKELSPQTPIVALSGESGERELDMINKLMDGRLEKPT	822
LuxN <i>Vibrio splendidus</i>	QMPIMNGFDASQIIKARSPQTPIIALSGESGQHELDMISKLMDGRLEKPT	842
VanN <i>Vibrio anguillarum</i>	QMPVMNGFEASQIIKAHSPQVPTPIIALSGESGERELEMIKLMMDGRLEKPT	829
OpaN <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	QMPVMNGFDASEKIKQCSPTTPIIALSGESGKELEMIKLMMDGRLEKPT	823
LuxN <i>Vibrio alginolyticus</i>	QMPVMNGFDASQRIKQITSSVPTPIIALSGESGARELELISKLMDDRLEKPT	822
LuxN <i>Vibrio campbellii</i>	QMPKMNGFEASKLIKEISPLIPIIALSGESGEHELDMVNELMDGRLEKPT	826
LuxN <i>Vibrio fischeri</i>	RMPVMNGIDAAKKIKI IYPNLPPIIALTGESSEHEEISAITQVMDGYLTKPV	807
LuxN <i>Vibrio angustum</i>	HMPGMNGIETAKQLKELDSTKPIIAISGEYGEKIVSDIHKVMDDYIVKPI	944
LuxN <i>Photobacterium profundum</i>	HMPGMSGIETHQIRHLFDAIPIVALSGEYNEEITRAISETMNDHLVKPI	946
LuxN <i>Photobacterium phosphoreum</i>	HMPEDMGLLEVSRILRQRGYNIPPIIALSGECCNEVTKEISQYMAYLMKPI	943
	:** *.*:... : :	**:*:* . : : * : *
LuxN <i>Vibrio harveyi</i>	TLNALRHVGLGNWLNKNTAS-SACEAERE-----	849
LuxN <i>Vibrio splendidus</i>	SLKALQHVLDNWLKGWASNTSKETESEE----	871
VanN <i>Vibrio anguillarum</i>	SLNALQQVISHWLNKDIPNAHTAKSGTVI---	859
OpaN <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	TLNALRDVLRVWLHFDKISVTNSYQIANE----	852
LuxN <i>Vibrio alginolyticus</i>	TLNALQVVIQRWLQNFAPSNTF-----	846
LuxN <i>Vibrio campbellii</i>	SLNALRHTLDNWLSDIVLSSIETERG-----	853
LuxN <i>Vibrio fischeri</i>	SKAQLQQVVDKWL-----	820
LuxN <i>Vibrio angustum</i>	EKSTLVSLTSKWLIIINKVKD-----	964
LuxN <i>Photobacterium profundum</i>	NKQQLLQTLTKWMT-----	960
LuxN <i>Photobacterium phosphoreum</i>	TRQQLIQKLQYWIPSEADKVISKQDIHIVHSI	976
	* *	:

Abb. 2: Alignment von LuxN-ähnlichen Proteinen. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von LuxN aus *V. harveyi* und 9 LuxN-homologen Proteinen aus der Datenbank von NCBI im Ein-Buchstaben-Code. Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW (Version 1.83) (Thompson *et al.*, 1994) erstellt. Die zu den in LuxR-Proteinen vorkommenden ähnlichen Aminosäuren sind grün markiert (in LuxN aus *V. harveyi* gelb markiert: Y53, W60, Y66, D70, P73). Aminosäuren, die zur Identifizierung der HAI-1-Bindestelle in LuxN untersucht wurden, sind gelb markiert: Y50, Y53, S54, C56, I58, W60, S62, S63, Y66, T69, D70, P73, E74, S78, K85.

Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*), ähnliche durch einen Doppelpunkt bei einer Abweichung (:) bzw. durch einen Punkt bei mehr als einer Abweichung (.) gekennzeichnet. Zahlen geben die Position der Aminosäuren an.

Danksagung

- ☺ Zuerst möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Kirsten Jung für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Vergabe dieses überaus interessanten Themas bedanken. Durch ihre stetige Diskussionsbereitschaft und ihre unermüdliche Unterstützung wurde diese Arbeit erst ermöglicht. Außerdem möchte ich ihr für die Möglichkeit danken, an wissenschaftlichen Tagungen teilzunehmen und dadurch Kontakte zu anderen Wissenschaftlern zu knüpfen.
- ☺ Ebenso möchte ich mich bedanken bei Emeritus Prof. Dr. Hugo Scherr vom Botanischen Institut der LMU München für seine hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung der CD-Spektren von LuxO.
- ☺ Bei Melanie Quitschau aus der Arbeitsgruppe von Stephanie Grond der Universität Göttingen bedanke ich mich für die Synthese und Reinigung des Autoinduktors HAI-1.
- ☺ Mein besonderer Dank gilt Dr. Melanie Timmen für die Einführung in das Lux-System in *Vibrio harveyi* und ihre hilfreiche telefonische Unterstützung. Ebenso gilt mein Dank den „Münchner Osnabrückern“ Dr. Ralf Heermann, Dr. Torsten Pirch, Dr. Arnim Weber und Dr. Christoph Küper für die Aufnahme von uns „Neuen“, den Münchnern und „Zugroasten“. Dr. Ralf Heermann und Dr. Torsten Pirch möchte ich hierbei noch einmal ganz besonders für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und wertvollen Tipps danken.
- ☺ Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Larissa Tetsch für ihre Unterstützung und gemeinsamen Spaziergänge im Nymphenburger Schlosspark.
- ☺ Vielen lieben Dank auch meinen „Mit-Doktoranden“ Claudia Anetzberger, Günther Gabriel, Ina Haneburger, Stephanie Kögl (mittlerweile Dr. S. Kögl), Christiane Koller (mittlerweile Dr. C. Koller), Tobias Kraxenberger und Nina Stambrau für jede Menge Spaß im Labor und außerhalb, und jegliche Unterstützung bei der Arbeit. Ein besonderes Dankeschön an Christiane für das Korrekturlesen dieser Arbeit und ihre nachhaltigen Tipps. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Laborbanknachbarinnen Simone Holpert, Ivana Ristovski und Sonja Kroll für ihre stetige Hilfsbereitschaft und viele lustige Zeiten an der gemeinsamen Laborbank. Ein ebenso großes Dankeschön gilt Korinna Burdack, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, sowie Ursula Holter für ihre Unterstützung.
- ☺ Mein Dank gilt auch allen ehemaligen Diplomanden und Praktikanten, die immer für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben. Ganz besonders danken möchte ich hierbei meinen Laborkolleginnen Melanie Herzog, Stephanie Linnebauer, Marie-Luise Lippert, Anna Münch, Isabella Rampp, Lavinia Stingl und Katja Zigann für jede Menge Spaß im Labor. Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei Prof. Dr. Heinrich Jung für seine hilfreiche Unterstützung und wertvollen Tipps, und bei seiner AG - vor allem bei Daniel Hilger.
- ☺ Vielen Dank Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann für die Annahme des Zweitgutachtens.
- ☺ Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meinen Eltern bedanken - dafür dass sie mich seit Beginn meines Lebens an mit ihrer ganzen Liebe begleiten und mir in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite stehen. Danke, dass Ihr mir dies alles ermöglicht habt! Ohne Euch wäre ich nicht die, die ich bin!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Tina Odenbach
Geburtsdatum: 27.01.1976
Geburtsort: Landau in der Pfalz
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1982 – 1986 Grundschule in Neustadt an der Weinstraße
1986 - 1989 Gymnasium in Neustadt an der Weinstraße
1989 - 1995 Gymnasium in Mannheim
1995 Abitur

Studium:

Okt. 1995 – Febr. 2003 Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe (TH)
Juli 1999 Vordiplom (Botanik, Zoologie, Chemie, Physik)
Februar 2003 Diplom (Mikrobiologie, Botanik, Ingenieurbiologie, Geologie)
Juni 2002 – Febr. 2003 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Karlsruhe (TH) unter Leitung von Prof. Dr. Walter Zumft mit dem Titel: „Heterologe Expression der Denitrifikationsgene *nirE* und *nirD* von *Pseudomonas stutzeri* ATCC 14405“

Auslandaufenthalt:

Sept. 1998 – Juni 1999 Studienaufenthalt an der Universität von Liverpool (Großbritannien)

Berufstätigkeit:

- Mai 2003 – April 2004 wissenschaftliche Angestellte am Institut für Mikrobiologie der Universität Karlsruhe (TH) bei Prof. Dr. Walter Zumft
- März 2008 – Juli 2008 wissenschaftliche Hilfskraft in der Verwaltung des Exzellenzclusters CiPSM – Bereich Frauenförderung

Promotion:

- seit Sept. 2004 Promotion an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Prof. Dr. Kirsten Jung

Tagungen (Posterbeiträge):

- VAAM 2005 (Göttingen) **Timmen, M., Odenbach, T., Kramer, N. und K. Jung:**
Structural and functional analysis of the AI-1 dependent signaling cascade of the quorum sensing system in *Vibrio harveyi*
- VAAM 2006 (Jena) **Kramer, N., Odenbach T., Timmen, M. und K. Jung:**
Biochemical analyses of HAI-1-sensing hybrid kinase LuxN and AI-2-sensing hybrid kinase LuxQ of the quorum sensing system in *Vibrio harveyi*
- VAAM 2007 (Osnabrück) **Kramer, N., Odenbach, T. und K. Jung:**
Reconstruction of the complex quorum sensing cascade of *Vibrio harveyi in vitro*
26. Symposium zu Mechanismen der Genregulation (2007, Königswinter) **Odenbach, T., Timmen, M. und K. Jung:**
Membrane topology of LuxN, a quorum sensing sensor kinase of *Vibrio harveyi*

Publikation:

- Jung, K., Odenbach, T., und M. Timmen (2007):** The quorum-sensing hybrid histidine kinase LuxN of *Vibrio harveyi* contains a periplasmically located N-terminus. *J Bacteriol* **189**: 2945-2948.

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, September 2008

(Tina Odenbach)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe und dass ich nicht ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, September 2008

(Tina Odenbach)