

Der LuxP/AI-2- und LuxQ-abhängige
Signaltransduktionsweg
des Quorum sensing-Systems
von *V. harveyi*

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Nina Stambrau

München, 07. Mai 2008



1. Gutachterin

Prof. Dr. Kirsten Jung
Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie
Ludwig-Maximilians-Universität München

2. Gutachter

Prof. Dr. Dirk Schüler
Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie
Ludwig-Maximilians-Universität München

Tag der mündlichen Prüfung

15. Oktober 2008

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	viii
Nomenklatur	x
1 Einleitung	1
1.1 Zell-Zell-Kommunikation bei Bakterien	1
1.2 Phosphorelaysysteme	2
1.3 Das Quorum sensing-System in <i>Vibrio harveyi</i>	6
1.4 Die membranständigen Hybridsensorkinasen in <i>V. harveyi</i>	7
1.4.1 Die HAI-1 abhängige Hybridsensorkinase LuxN	9
1.4.2 Die LuxP/AI-2 abhängige Hybridsensorkinase LuxQ	9
1.4.3 Die CAI-1 abhängige Hybridsensorkinase CqsS	10
1.5 Das Histidinphosphotransfer-Protein LuxU	11
1.6 Der σ^{54} -abhängige Antwortregulator LuxO	11
1.6.1 Empfängerdomäne eines Antwortregulators	12
1.6.2 AAA ⁺ ATPase-Domäne	12
1.6.3 DNA-Bindedomäne	13
1.6.4 Biochemische Untersuchungen des Antwortregulators LuxO	13
1.7 Aufgabenstellung	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	16
2.2.1 Verwendete Stämme	16
2.2.2 Verwendete Plasmide und Cosmide	17
2.2.3 Verwendete Oligonukleotide	19
2.3 Kultivierung	22
2.3.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	22
2.3.2 Kultivierung von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	23
2.3.3 Kultivierung von <i>Vibrio harveyi</i>	23
2.3.4 Kompetente Zellen und Transformation	23
2.4 Molekularbiologische Methoden	24
2.4.1 Plasmidisolierung	24

2.4.2	Isolierung von chromosomaler DNA	24
2.4.3	Modifikation von DNA	24
2.4.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	24
2.4.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	25
2.4.6	„In Gel“-Ligation und Transformation	25
2.4.7	Konstruktion der Plasmide	25
2.4.8	DNA-Sequenzanalyse	26
2.5	Biochemische und Analytische Methoden	30
2.5.1	Proteinbestimmung	30
2.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	30
2.5.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)	30
2.5.4	Quantitativer Western-Blot	31
2.5.5	Präparation von zellfreiem Kulturüberstand	31
2.5.6	Lokalisationsstudien von Proteinen	31
2.5.7	Präparation von Zellfraktionen zur Gewinnung der Lux-Proteine	32
2.5.8	Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	33
2.5.9	Proteolyse mit Thrombin	33
2.5.10	Heterologe Überproduktion und Reinigung von LuxU	33
2.5.11	Heterologe Überproduktion und Reinigung von LuxP	34
2.5.12	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung der Lux-Proteine	34
2.5.13	AI-2 Bioassay	37
2.5.14	ATPase-Aktivitätsmessung	37
2.6	Mathematische Modellierung des Lux-Systems	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Biochemische Untersuchungen der Hybridsensorkinase LuxQ	39
3.1.1	Heterologe Expression von LuxQ	39
3.1.2	Lokalisation von LuxQ und Präparation von Membranvesikeln	41
3.1.3	Autokinaseaktivität von LuxQ	41
3.1.4	LuxQ-spezifische Phosphorylierung von LuxU	42
3.1.5	Phosphataseaktivität von LuxQ	44
3.2	Einfluss des periplasmatischen Bindeproteins LuxP und AI-2 auf LuxQ	46
3.2.1	Heterologe Überproduktion und Reinigung von LuxP	46
3.2.2	Einfluss von LuxP und AI-2 auf die Kinaseaktivität von LuxQ	48
3.2.3	Einfluss von LuxP und AI-2 auf die Phosphataseaktivität von LuxQ	49
3.3	Biochemischer Vergleich der Hybridsensorkinasen LuxQ und LuxN	51
3.3.1	Vergleich der Kinaseaktivitäten	52

3.3.2	Vergleich der Phosphataseaktivitäten	55
3.3.3	Vergleich des Einflusses der Autoinduktoren HAI-1 und AI-2	56
3.3.4	Kinase-zu-Phosphatase-Verhältnis von LuxQ und LuxN	57
3.4	Mathematisches Modell des kombinierten LuxN- und LuxQ-Signalwegs	57
3.5	Das Zusammenspiel der Hybridsensorkinasen LuxQ und LuxN	61
3.5.1	Beeinflussung der LuxN-Kinaseaktivität durch LuxQ	62
3.5.2	Beeinflussung der LuxQ-Kinaseaktivität durch LuxN	65
3.5.3	Einfluss von HAI-1 auf das Zusammenspiel von LuxN und LuxQ	65
3.5.4	Dephosphorylierung von LuxU in Anwesenheit von LuxQ und LuxN	67
3.6	LuxQ/LuxN-Chimäre	68
3.7	Verkürzte LuxQ- und LuxN-Derivate	69
3.7.1	Heterologe Überproduktion der verkürzten Derivate	71
3.7.2	Einfluss von LuxQ(475-859) auf die LuxN-Kinaseaktivität	72
3.7.3	Überproduktion und Untersuchung von verkürzten LuxN- und LuxQ-Derivaten als Trx-Hybridprotein	73
3.8	Heterologe Überproduktion von LuxO in <i>E. coli</i>	74
3.8.1	Heterologe Überproduktion und Lokalisation von LuxO	75
3.8.1.1	Aufschlussbedingungen	75
3.8.1.2	Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	76
3.8.1.3	Anionenaustauschchromatographie	77
3.8.1.4	Phosphorylierung des Cytosols	77
3.8.2	Heterologe Überproduktion und Reinigung von Trx-LuxO	79
3.8.2.1	Kultivierungsbedingungen	79
3.8.2.2	Anreicherung von Trx-LuxO aus dem Cytoplasma	80
3.8.2.3	Proteolytische Abspaltung von Thioredoxin	81
3.8.2.4	ATPase Assay	82
3.8.2.5	Phosphorylierung	83
3.8.3	Weitere Expressionssysteme zur Überproduktion von LuxO	84
3.9	Überproduktion und Lokalisation von LuxO/NtrC-Chimären	85
3.9.1	Konstruktion der LuxO/NtrC-Chimäre	85
3.9.2	Lokalisation der LuxO/NtrC-Chimäre	86
3.10	Bestimmung der Löslichkeit von verkürzten LuxO-Derivaten	87
3.10.1	Bioinformatische Untersuchungen	87
3.10.2	Konstruktion und Lokalisation verkürzter LuxO-Derivate	88
3.11	„Rational Engineering“ von LuxO zur Erhöhung der Löslichkeit in Kooperation mit der Firma Sloning BioTechnology	91

3.12	Heterologe Überproduktion der Lux-Proteine in <i>R. sphaeroides</i>	96
4	Diskussion	98
4.1	Biochemische Untersuchungen der Hybridsensorkinase LuxQ	98
4.1.1	Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten von LuxQ	99
4.1.2	Einfluss von LuxP und Autoinduktor-2 auf LuxQ	102
4.1.3	Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von LuxQ und LuxN	103
4.2	Mathematische Modellierung des HAI-1- und LuxP/AI-2-abhängigen Signalwegs	104
4.3	Wechselwirkungen der Hybridsensorkinasen LuxQ und LuxN	106
4.3.1	Einfluss der LuxN/LuxQ-Chimäre auf die LuxN-Kinaseaktivität	108
4.3.2	Verkürzte LuxQ- und LuxN-Derivate	108
4.4	Heterologe Überproduktion von LuxO in <i>Escherichia coli</i>	112
4.4.1	Veränderte Kultivierungs- und Induktionsbedingungen	112
4.4.2	Herstellung von LuxO/NtrC-Chimären	115
4.4.3	Gezielte Veränderungen in LuxO zur Erhöhung der Löslichkeit	116
4.5	Heterologe Überproduktion der Lux-Proteine in <i>R. sphaeroides</i> DD13	119
4.6	Ausblick	120
5	Zusammenfassung	121
	Literatur	123
	Anhang	136

Abbildungsverzeichnis

1.1	Zweikomponenten- und Phosphorelay-Systeme	3
1.2	Das Quorum sensing-System von <i>Vibrio harveyi</i>	6
1.3	Domänenstruktur der Hybridsensorkinasen LuxN, LuxQ und CqsS	8
1.4	Domänen des Antwortregulators LuxO	12
3.1	Lokalisation der Hybridsensorkinase LuxQ	41
3.2	LuxQ-abhängige Phosphorylierung von LuxU.	43
3.3	LuxQ-abhängige Dephosphorylierung von LuxU	45
3.4	AI-2 Aktivitätsassay	47
3.5	Kinaseaktivität von LuxQ in Anwesenheit von LuxP/AI-2 und LuxP	49
3.6	Einfluss von LuxP/AI-2 auf die LuxQ-abhängige Phosphorylierung von LuxU	50
3.7	Einfluss von LuxP bzw. LuxP/AI-2 auf die Phosphataseaktivität von LuxQ	51
3.8	Vergleich der LuxQ- und LuxN-abhängigen Phosphorylierung von LuxU	52
3.9	ATP-Abhängigkeit der LuxQ- und LuxN-Kinaseaktivität	53
3.10	Bestimmung des K_m -Werts für ATP mittels Eadie-Hofstee-Diagramm	54
3.11	LuxQ- und LuxN-abhängige Dephosphorylierung von LuxU	55
3.12	Schema der Reaktionen	58
3.13	Einfluss der Autoinduktor-Konzentration auf den LuxU~P Output	61
3.14	Zusammenspiel der Hybridsensorkinasen LuxN und LuxQ	63
3.15	Beeinflussung der LuxU-Phosphorylierungsrate von LuxN durch LuxQ bzw. LuxQ-H492Q-haltige Membranvesikel	64
3.16	Einfluss von LuxN-D771N auf die LuxQ-Kinaseaktivität	66
3.17	Phosphorylierungsraten verschiedener Kombination von LuxN, LuxQ, HAI-1 und LuxP/AI-2	67
3.18	Effekt der LuxQ-Domänen auf die LuxN-Phosphorylierungsrate	69
3.19	Schematische Darstellung der verkürzten LuxQ- und LuxN-Derivate	70
3.20	Lokalisation des verkürzten Derivats LuxQ(475-859)	72
3.21	Einfluss von LuxQ(475-859) auf die LuxN-Kinaseaktivität	73
3.22	Prozentuale Verteilung von LuxO in den Fraktionen bei Aufschluss in Gegen- wart von Salz	76
3.23	Phosphorylierung von LuxO-haltigem Cytosol	78

3.24	Lokalisation von Thioredoxin-LuxO bei Kultivierung bei 18°C	80
3.25	Reinigung von Thioredoxin-LuxO	81
3.26	Thrombinbehandlung von Thioredoxin-LuxO	82
3.27	LuxO/NtrC-Chimäre	86
3.28	Lokalisation von LuxO, NtrC und der Chimäre LuxO/NtrC und NtrC/LuxO	87
3.29	Lokalisation der verkürzten LuxO-Derivate	90
3.30	3D Modell von LuxO	94
3.31	3D Modell der LuxO_C_Variante6	95
4.1	Modell der enzymatischen Aktivitäten von LuxQ	103
4.2	Dreidimensionale Darstellung des Einflusses der Autoinduktor-Konzentration auf den LuxU~P Output	105
4.3	Wechselwirkungen der Hybridsensorkinasen LuxN und LuxQ	111
4.4	Auszutauschende Aminosäuren des N-terminalen Bereichs im 3D Modell von LuxO	118
5.1	Alignment der Proteinsequenzen von <i>V. harveyi</i> LuxO und <i>E. coli</i> NtrC . .	136

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Materialien	15
2.2	Verwendete Stämme	16
2.3	Verwendete Plasmide und Cosmide	17
2.4	Verwendete Oligonukleotide	20
2.5	Konstruktion der Plasmide mittels einstufiger PCR	27
2.7	Konstruktion der Plasmide mittels zweistufiger PCR	29
2.9	Verwendete Antikörper zum immunologischen Nachweis von Proteinen	31
3.1	Namen und Werte der Parameter der mathematischen Modellierung	60
3.2	Vorhersagen zur Löslichkeit der LuxO-Fragmente	89
3.3	Aminosäuresubstitutionen in den LuxO_C_Varianten	93

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AAA ⁺ ATPase	ATPase associated with diverse cellular activity
AI-2	Autoinduktor-2
Amp ^R	Plasmidvermittelte Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAI-1	<i>cholerae</i> Autoinduktor-1
Cam ^R	Plasmidvermittelte Chloramphenicol-Resistenz
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNTB	5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure)
dNTP	desoxy-Ribonukleotidtriphosphat
DPD	4,5-Dihydroxyl-2,3-Pentandion
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HAI-1	<i>harveyi</i> Autoinduktor-1
HisKA	Histidin KinaseA-Domäne
HK	Histidinkinase
HPt-Protein /-Domäne	Histidin-Phosphotransfer-Protein /-Domäne
HSL	Acyl-Homoserinlaktone
HTH	Helix-turn-Helix
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan ^R	Plasmidvermittelte Kanamycin-Resistenz
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Konstante
KÜ	zellfreier Kulturüberstand
LB	Luria Bertani Medium
LDAO	N,N-Dimethylaminooxid-Octylglucosid

Abkürzung	Bedeutung
LM	Luria Marine Medium
LuxP/AI-2	AI-2 haltiges LuxP
LuxPQ	LuxP-LuxQ-Komplex
LuxPQ ₂	Dimer von LuxPQ
LuxPQ _p	periplasmatische Domänen von LuxPQ
NTA	Triazetonitril
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBP	periplasmatisches Bindepotein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro-AI-2	Vorstufe von Autoinduktor-2
REC	Empfängerdomäne eines Antwortregulators
Rf	Retentionsfaktor
RLU	„relative light unit“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RR	Antwortregulator
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRH	S-Ribosyl-Homocystein
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet ^R	Plasmidvermittelte Tetracyclin-Resistenz
TG	Tris/HCL-Glycerol
TM	Transmembrandomäne
TNB	2-Nitro-5-Thiobenzoat
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
3D-PSSM	„three-dimensional position-specific scoring matrix“

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 Einbuchstaben- oder Dreibuchstabencode angegeben.

Substitutionen im Genprodukt werden so bezeichnet, dass die native Aminosäure und deren Position, gefolgt von der Aminosäuresubstitution genannt werden.

1 Einleitung

1.1 Zell-Zell-Kommunikation bei Bakterien

Mikroorganismen sind zu einer Kommunikation untereinander befähigt. Auf diese Weise kann die Zelldichte einer Population wahrgenommen werden. Die Informationen über die Zelldichte werden kommuniziert, indem von den einzelnen Organismen Autoinduktoren in das Medium entlassen werden. Diese Autoinduktoren können von anderen Organismen wiederum detektiert werden. Bei einer geringen Zelldichte können sich die Signalmoleküle schnell verflüchtigen und werden kaum wahrgenommen. Ist die Zelldichte aber entsprechend hoch, akkumulieren sie und lösen, wenn sie einen Schwellenwert überschreiten, bestimmte Reaktionen aus.

Die Zelldichte-abhängige Regulation der Genexpression wird als „Quorum sensing“ bezeichnet (Quorum, lat.: die Anzahl von Mitgliedern (...) die für die Beschlussfähigkeit erforderlich ist). Der Begriff macht die Notwendigkeit deutlich, dass viele Individuen gemeinsam agieren müssen, um einen bestimmten Prozess in Gang zu setzen und ein sinnvolles Resultat zu erzielen.

Das Phänomen der Zelldichte-abhängig regulierten Biolumineszenz bei marinen, teilweise symbiotisch lebenden Bakterien wurde von Nealson und Hastings (1979) untersucht. Die auf diese Weise regulierten Prozesse sind vielfältig, zu ihnen gehören unter anderem die Biofilmbildung, Antibiotikaproduktion, Sporulation und Biolumineszenz (Fuqua et al., 1994, 1996; de Kievit und Iglewski, 2000; Miller und Bassler, 2001).

Die Komponenten eines Quorum sensing-Systems wurden erstmals für *Vibrio fischeri*, ein Gram-negatives, symbiotisch lebendes Bakterium beschrieben, das zur Biolumineszenz befähigt ist (Engebrecht und Silverman, 1984; Shadel et al., 1990). Ein artspezifisches Acyl-Homoserinlaktone (HSL) fungiert als Autoinduktor des Quorum sensing-Systems. Dieses wird von der Autoinduktorsynthase LuxI produziert und diffundiert frei durch die Cytoplasmamembran. Mit zunehmender Zelldichte steigt die extra- und somit auch die intrazelluläre Konzentration des HSL. Der Transkriptionsaktivator LuxR nimmt dessen Konzentration wahr und reguliert ab einem bestimmten Schwellenwert die Expression der Gene des *luxCDABE*-Operons. Mittlerweile sind mehr als 50 dieser LuxI-LuxR-Systeme bei Gram-negativen Organismen bekannt (Miller und Bassler, 2001).

Auch bei Gram-positiven Organismen ist die Zelldichte-abhängige Genregulation bekannt (Kleerebezem et al., 1997; Sturme et al., 2002), hier fungieren anstatt der HSL kurze Peptide als Signalmoleküle. Diese werden durch spezifische ABC-Transporter (ATP-binding cassette-Transporter) in die Umgebung sekretiert. Die extrazelluläre Konzentration der Peptide wird durch eine membranständige Sensor kinase wahrgenommen. Die darauf folgende Phosphorylierungskaskade enthält Komponenten eines typischen bakteriellen Zweikomponenten-Systems mit Histidinkinase (HK) und Antwortregulator (RR). Unter anderem werden die genetische Kompetenz in *B. subtilis* und *S. pneumoniae* (Cheng et al., 1997; Tortosa und Dubnau, 1999) und die Virulenz in *S. aureus* (de Kievit und Iglewski, 2000) auf diese Weise reguliert.

Die Informationen über die Zelldichte können auch über eine Mischung der für Gram-positive und Gram-negative Organismen beschriebenen Signaltransduktionswege, wie z.B. bei dem Quorum sensing-System in *Vibrio harveyi* (Bassler et al., 1993), weitergeleitet werden. Hier werden Homoserinlaktone durch membranständige Sensor kinasen wahrgenommen. Bei der Phosphorylierungskaskade handelt es sich um ein Phosphorelaysystem, welches aus einer His-Asp-His-Asp-Abfolge besteht. Beispiele für Phosphorelaysysteme werden im folgenden Kapitel beschrieben.

1.2 Phosphorelaysysteme

Extra- und intrazelluläre Signale werden häufig durch Phosphorylierungskaskaden auf Effektorproteine weitergeleitet. Die klassische Phosphotransferkaskade ist das Zweikomponenten-System. Der Prototyp eines Zweikomponenten-Systems besteht aus einer Histidinkinase und einem Antwortregulator, ein bekannter Vertreter ist das EnvZ-OmpR-System in *E. coli* (Abb. 1.1A). Solche Phosphotransfersysteme bestehen aus einer einfachen His-Asp-Abfolge, die drei Reaktionen umfasst: Autophosphorylierung am konservierten Histidin der Histidinkinase, Phosphoryltransfer auf das konservierte Aspartat des Antwortregulators und Dephosphorylierung des Antwortregulators (Stock et al., 2000).

Bei der Autophosphorylierung wird die γ -Phosphorylgruppe von ATP auf den konservierten Histidinrest übertragen, wodurch eine energiereiche Phosphoramidatbindung (His~P) entsteht. Bei dem Phosphoryltransfer auf das Aspartat des Antwortregulators entsteht ein ebenfalls energiereiches Acylphosphat (Asp~P), daher ist die Reaktion reversibel.

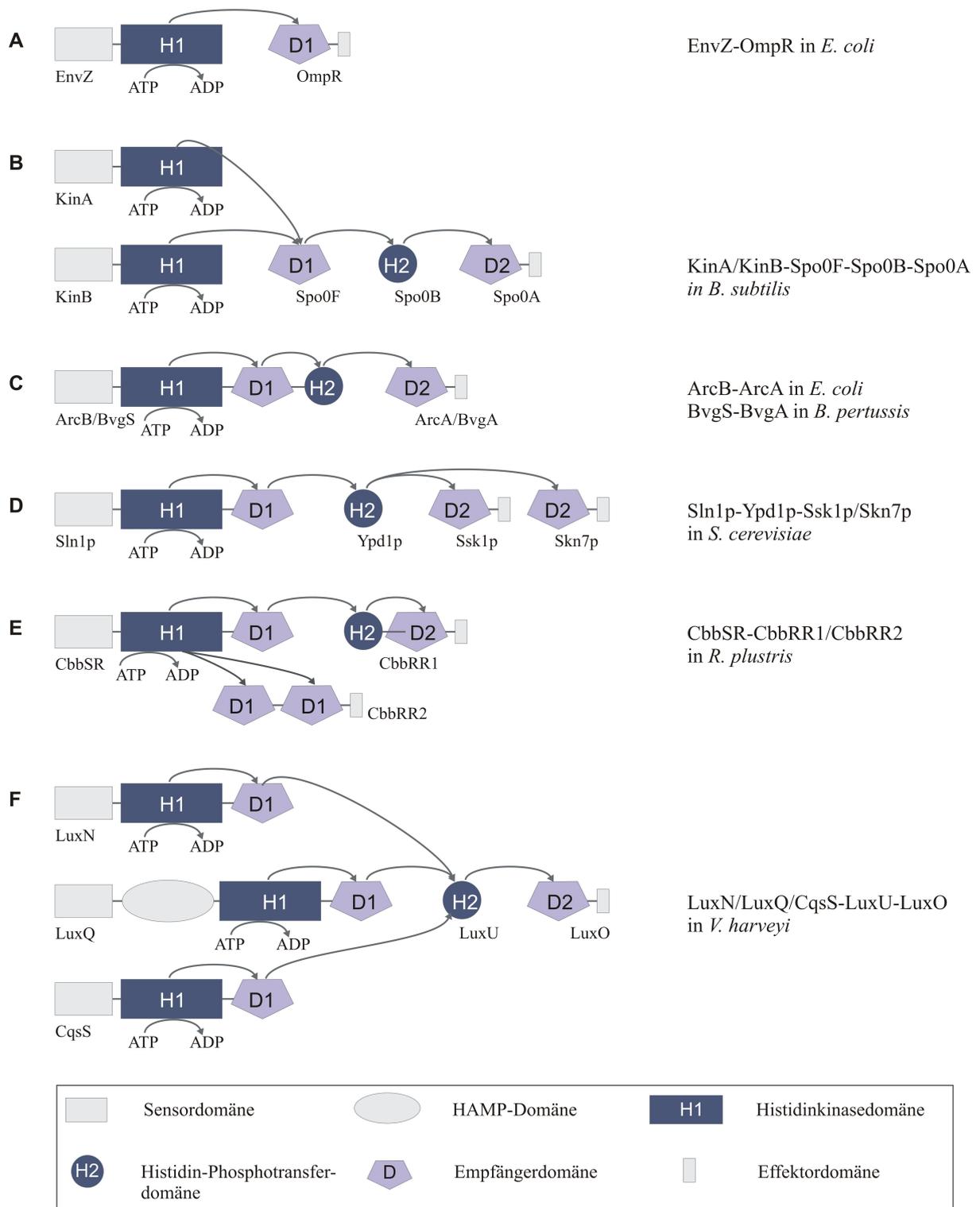


Abbildung 1.1: Zweikomponenten- und Phosphorelay-Systeme. Dargestellt ist die Domänenstruktur unterschiedlicher Zweikomponenten- und Phosphorelay-Systeme sowie Vertreter der einzelnen Phosphorylierungskaskaden (A-F). Pfeile stellen den intra- bzw. intermolekularen Transfer einer Phosphorylgruppe dar. *H1* Histidinrest der Histidinkinasedomäne. *H2* Histidinrest der HPT-Domäne. *D1* und *D2* Aspartatreste der Empfängerdomänen.

Neben dem klassischen Phosphotransfersystem gibt es Phosphorelaysysteme, welche aus einer His-Asp-His-Asp-Abfolge bestehen. Diese Systeme bestehen aus zusätzlichen Regulator- und HPt-Domänen. Hierbei können fünf Reaktionen unterschieden werden: Autophosphorylierung am konservierten Histidin der Histidinkinase, Phosphotransfer auf ein konserviertes Aspartat einer Antwortregulator-domäne, Phosphotransfer auf ein zweites konserviertes Histidin einer Histidin-Phosphotransferdomäne, Phosphotransfer auf ein zweites konserviertes Aspartat eines Antwortregulators und Dephosphorylierung des Antwortregulators (Perraud et al., 1999; Stock et al., 2000).

Während die Architektur des klassischen Zweikomponenten-Systems sehr konserviert ist, findet man unter den Phosphorelaysystemen eine hohe Variabilität der zusätzlichen Regulator- und Phosphotransferase-Domänen (Stock et al., 2000). Die Domänen können sich auf individuellen Proteinen befinden oder mit anderen Domänen auf Hybridproteinen assoziiert sein. Somit können die Systeme aus einer variierenden Anzahl Proteine bestehen. Unterschiedliche Phosphorelaysysteme sind in Abb. 1.1B-F dargestellt und werden im Folgenden kurz beschrieben.

Ein Beispiel ist das KinA,KinB-Spo0F-Spo0B-Spo0A-System, das die Sporulation in *B. subtilis* reguliert (Burbulys et al., 1991). In diesem Fall sind die vier phosphorakzeptierenden Reste auf vier unterschiedlichen Proteinen lokalisiert (Abb. 1.1B). Somit nimmt der Antwortregulator Spo0F eine Sonderstellung unter den prokaryotischen Antwortregulatoren ein, da seine Effektor-domäne den Phosphotransfer zwischen Histidinkinase KinA und Histidinphosphotransferprotein Spo0B katalysiert.

Das einzige Phosphorelaysystem in *S. cerevisiae* ist das an der Osmoregulation beteiligte Sln1p-Ypd1p-Ssk1p,Skn7p-System (Brewster et al., 1993). Hier handelt es sich bei Sln1 um eine Hybridsensorkinase, die aus einer Histidinkinase- und Antwortregulator-domäne besteht. Das System erhält zusätzliche Komplexität, da die Phosphorylgruppe des HPt-Protein Ypd1p auf zwei verschiedene Antwortregulatoren (Ssk1p und Skn7p) übertragen werden kann (Abb. 1.1D).

Eine Hybridhistidinkinase kann zusätzlich mit einer Phosphotransferdomäne verschmolzen sein. Die Histidinkinase ArcB des ArcB-ArcA-Systems in *E. coli* (Ishige et al., 1994) bzw. BvgS des BvgS-BvgA-Systems in *B. pertussis* (Uhl und Miller, 1994) stellen solche unorthodoxe Hybridsensorkinasen dar. Es finden zwei intramolekulare Phosphotransferreak-

tionen statt, bis schließlich der Antwortregulator ArcA bzw. BvgA phosphoryliert werden (Abb. 1.1C).

Einen verzweigten Phosphorylierungsweg weist das CbbSR-CbbRR1,CbbRR2-System (Calvin Benson Bassham) in *R. plustris* auf (Romagnoli und Tabita, 2006). Nach der Autophosphorylierung an der Histidinkinasedomäne von CbbSR kann es entweder zu einem intermolekularen Phosphotransfer auf eine der beiden Antwortregulordomänen von CbbRR2 kommen, oder zu einem intramolekularen Transfer auf die Antwortregulordomäne der Hybridsensorkinase (Abb. 1.1E). In diesem Fall wird die Phosphorylgruppe auf die mit dem Antwortregulator verschmolzene HPt-Domäne von CbbRR1 übertragen und es kommt zu einem weiteren intramolekularen Phosphotransfer auf die Antwortregulordomäne.

Das LuxN/LuxQ/CqsS-LuxU-LuxO-System in *V. harveyi* erhält durch die Anwesenheit von drei Hybridsensorkinasen zusätzliche Komplexität (Abb. 1.1F). Alle drei Hybridsensorkinasen übertragen nach einer intramolekularen Phosphotransferreaktion die Phosphorylgruppe auf das HPt-Protein LuxU (Bassler et al., 1993). Auf das Lux-System von *V. harveyi* wird in Kapitel 1.3 genauer eingegangen.

Mit der Anzahl der Komponenten und möglichen Phosphorylierungsreaktionen steigt die Komplexität der Phosphorelaysysteme, die häufig in Prozessen der Zelldifferenzierung wie z.B. die Sporulation und Fruchtkörperentwicklung in *M. xanthus* (Cho und Zusman, 1999; Kaiser, 2004) zu finden sind. Neben den vorwärts gerichteten Phosphorylierungsreaktionen enthalten die Systeme zusätzliche Regulationsmöglichkeiten durch Phosphataseaktivitäten der Histidinkinasen oder der Antwortregulatoren. Bifunktionale Histidinkinasen oder Antwortregulatoren, die eine Phosphataseaktivität oder eine kurze Halbwertszeit der phosphorylierten Form aufweisen, sind häufig in Phosphorylierungswegen zu finden, die einer schnellen Regulation bedürfen (Stock et al., 2000).

1.3 Das Quorum sensing-System in *Vibrio harveyi*

Bei dem Quorum sensing-System in *Vibrio harveyi* (Abbildung 1.2), einem Gram-negativen, freilebenden marinen Leuchtbakterium, handelt es sich um eine Mischung der für Gram-positive und Gram-negative Organismen beschriebenen Signaltransduktionswege (Bassler et al., 1993). Wie *V. fischeri* nutzt auch *V. harveyi* ein frei über die Cytoplasmamembran diffundierendes HSL als Signalmolekül, das Signal wird aber wie in Gram-positiven Organismen durch eine membranständige Hybridsensorkinase wahrgenommen und weitergeleitet.

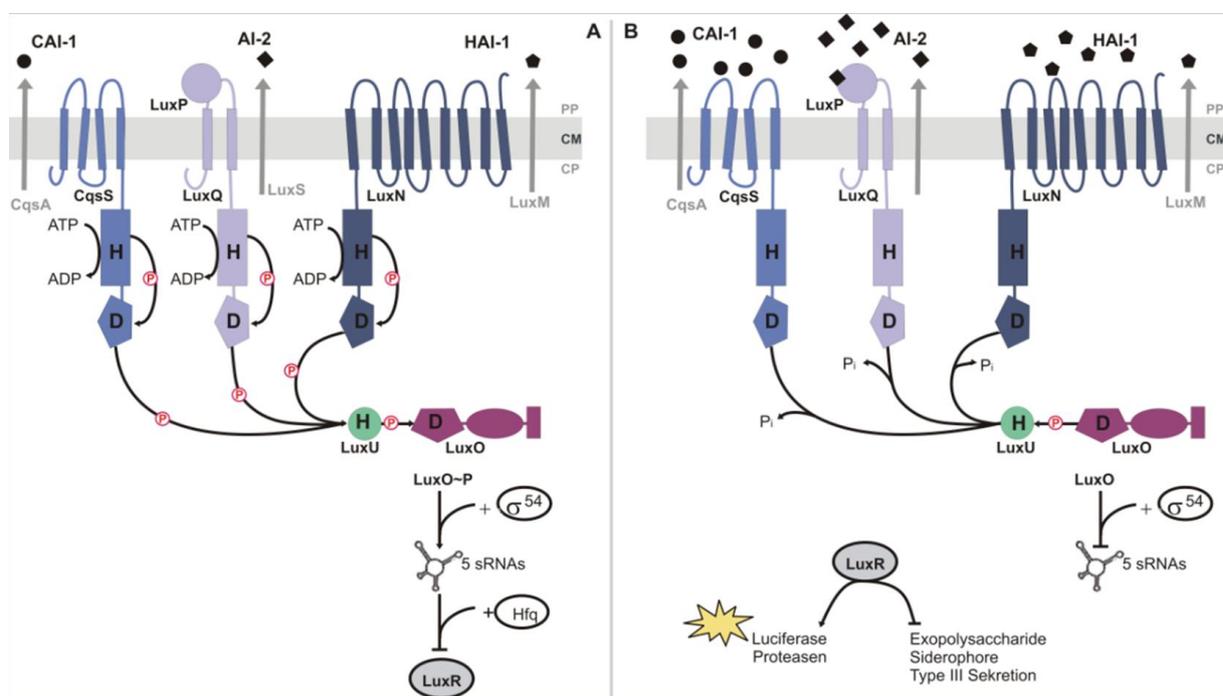


Abbildung 1.2: Das Quorum sensing-System von *Vibrio harveyi*. Dargestellt sind die dominierenden Reaktionen des Zelldichte-abhängigen Signaltransduktionswegs in *Vibrio harveyi* bei **A** niedriger Zelldichte und **B** hoher Zelldichte. *H* Histidinrest. *D* Aspartatrest. *PP* Periplasma. *CM* Cytoplasmamembran. *CP* Cytoplasma.

Allerdings handelt es sich hierbei nicht um ein klassisches Zweikomponenten-System sondern um ein Phosphorelaysystem. Nach Autophosphorylierung an der Histidinkinase-domäne der Hybridsensorkinase kommt es zu einem intramolekularen Phosphotransfer auf die Antwortregulordomäne. Die Phosphorylgruppe wird von der Hybridsensorkinase auf ein Histidinphosphotransfer-Protein (HPT-Protein) und danach auf einen Antwortregulator übertragen. Der phosphorylierte Antwortregulator reguliert die Produktion von fünf kleinen RNAs (sRNA). Diese wiederum destabilisieren gemeinsam mit dem Chaperon Hfq das

Transkript des Masterregulators LuxR, so dass die Biolumineszenzgene nicht abgelesen werden können. Bei hoher Zelldichte ist das Gleichgewicht in Richtung der unphosphorylierten Formen der Proteinkomponenten verschoben und die Biolumineszenzgene werden induziert. Die Expression des *luxCDABE*-Operons führt zur Produktion der Untereinheiten der Luciferase und somit zur Biolumineszenz und einem hellen Phänotyp. Neben der Biolumineszenz werden die Siderophor-Produktion, die Produktion einer Metalloprotease und eines Typ III Sekretionssystems in *V. harveyi* Zelldichte-abhängig reguliert (Lilley und Bassler, 2000; Mok et al., 2003; Henke und Bassler, 2004b).

Nicht nur die Art der Signalwahrnehmung und -weiterleitung, sondern auch die Tatsache, dass *V. harveyi* drei verschiedene Signalmoleküle produziert und detektiert, stellt eine Besonderheit dar. Neben dem N-Butanoyl-HSL, das als HAI-1 (*harveyi* Autoinduktor-1) bezeichnet wird, da es für die intraspezifische Kommunikation von *V. harveyi* zuständig ist, konnten zwei weitere Autoinduktoren identifiziert werden: AI-2 (Autoinduktor-2) und CAI-1 (*cholerae* Autoinduktor-1) (Waters und Bassler, 2005). Bei AI-2 handelt es sich um ein Furanosylboratdiester (Chen et al., 2002), welches ein Kommunikationssignal für verschiedene Bakteriengattungen darstellt. Die Struktur von CAI-1, welcher als interspezifisches Kommunikationssignal von *Vibrio*-Arten fungiert, konnte kürzlich aufgeklärt werden (Higgins et al., 2007). Es handelt sich hierbei um ein (S)-3-Hydroxytridekan-4-on.

1.4 Die membranständigen Hybridsensorkinasen in *V. harveyi*

Die drei Autoinduktoren von *V. harveyi* werden von drei unterschiedlichen Sensorkinasen wahrgenommen. LuxN detektiert den intraspezifischen HAI-1, LuxQ gemeinsam mit dem periplasmatischen Bindeprotein LuxP den weit verbreiteten AI-2 und CqsS den Vibriospezifischen CAI-1. Alle drei membranständigen Sensorkinasen gehören zu der Familie der Hybridsensorkinasen, die neben einer Histidinkinasedomäne eine Empfängerdomäne eines Antwortregulators besitzen. In Abb. 1.3 ist die Domänenstruktur der drei Hybridsensorkinasen LuxN, LuxQ und CqsS gezeigt. Somit kommt es nach der Autophosphorylierung zu einem intramolekularen Phosphotransfer von einem konservierten Histidin der Kinasedomäne zu einem konservierten Aspartat der Empfängerdomäne.

Bei allen drei Signalkaskaden führt eine niedrige Zelldichte zu einer Phosphorylierung der Sensorkinasen und der anderen Proteinkomponenten. Somit werden die Biolumineszenzgene

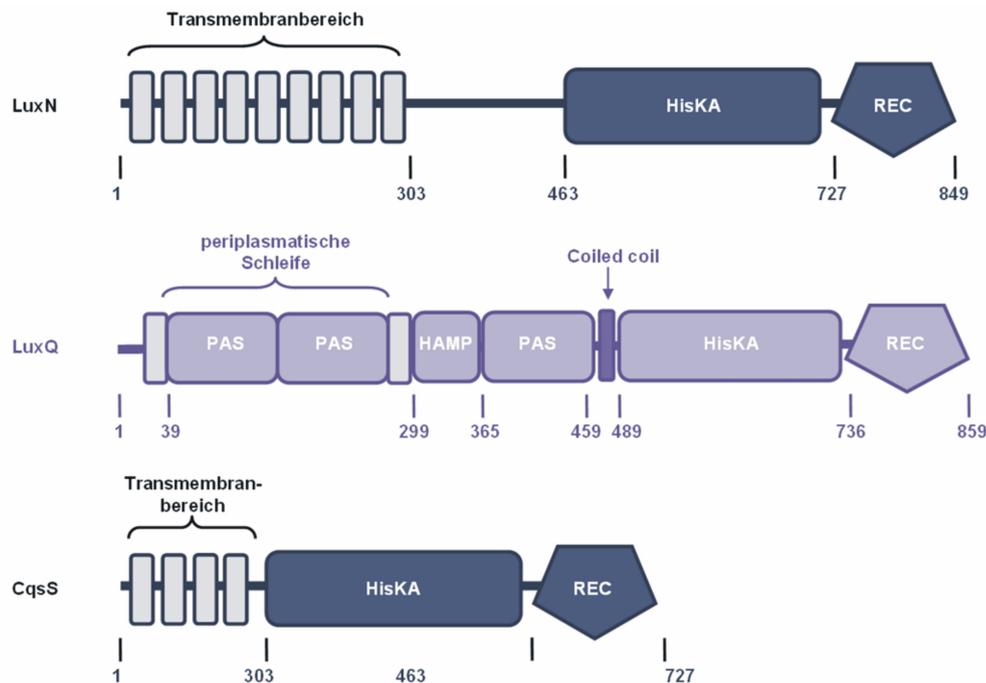


Abbildung 1.3: Domänenstruktur der Hybridsensorkinasen LuxN, LuxQ und CqsS in *V. harveyi*. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäure-Positionen in den Wildtyp-Proteinen.

nicht induziert. Bei hoher Zelldichte hingegen liegen die Proteinkomponenten in dephosphoryliertem Zustand vor (vergl. Abb. 1.2). Es wird postuliert, dass sich die drei Systeme in ihrem Kinase-zu-Phosphatase-Verhältnis der Hybridsensorkinasen ($\text{LuxN} > \text{LuxQ} > \text{CqsS}$) und in der Signalstärke der Autoinduktoren ($\text{HAI-1} > \text{CAI-1} > \text{AI-2}$) unterscheiden (Henke und Bassler, 2004a).

Durch die Anwesenheit von drei Signaltransduktionswegen ist es dem Organismus möglich, die Biolumineszenz sowie alle weiteren Zelldichte-abhängigen Prozesse differenziert zu koordinieren. So werden z.B. die Sensorkinasen LuxN und LuxQ bei unterschiedlichen Zelldichten aktiviert (Freeman und Bassler, 1999a). Waters und Bassler (2006) konnten 50 Promotoren identifizieren, die durch Quorum sensing reguliert werden. Die Promotoren zeigen graduelle Antworten in Abhängigkeit der Konzentrationen der verschiedenen Autoinduktoren. So ist es dem Organismus möglich, differenziert auf die verschiedenen Situationen zu reagieren.

Eine weitere Differenzierung und Möglichkeit der Integration von verschiedenen Signalen sind die sRNAs, deren Produktion durch den Phosphorylierungsgrad von LuxO reguliert wird. Nur vier der fünf sRNAs werden für die Destabilisierung der *luxR* mRNA benötigt. Während die sRNAs in *V. cholerae* redundant wirken, agieren die sRNAs in *V. harveyi*

additiv. Auf diese Weise wird ein LuxR-Gradient verursacht, der die Zielgene differentiell regulieren kann.

1.4.1 Die HAI-1 abhängige Hybridsensorkinase LuxN

Wie in Abb. 1.3 dargestellt besitzt LuxN eine Transmembrandomäne und ist dementsprechend in der Cytoplasmamembran verankert (Timmen et al., 2006). Die Topologie wurde von Jung et al. (2007) aufgeklärt: LuxN besitzt neun transmembrane Helizes, wobei der N-Terminus im Periplasma lokalisiert ist.

Die konservierten Reste konnten durch genetische Studien postuliert (Bassler et al., 1994; Freeman et al., 2000) und biochemisch bestätigt werden: Timmen et al. (2006) konnten zeigen, dass LuxN an dem konservierten Histidinrest 471 autophosphoryliert wird. Die Phosphorylgruppe wird auf den konservierten Aspartatrest 771 weitergeleitet und von dort auf das HPT-Protein LuxU übertragen. Neben der Kinaseaktivität besitzt LuxN eine LuxU-Phosphataseaktivität. Während für die Kinaseaktivität beide konservierten Reste essentiell sind, ist in der Dephosphorylierung von LuxU~P durch LuxN nur der konservierte Aspartatrest involviert.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität von LuxN durch die Anwesenheit von HAI-1 gehemmt wird, während die Phosphataseaktivität unabhängig von HAI-1 ist. Aufgrund der HSL-Bindung kommt es vermutlich zu einer Konformationsänderung der Histidinkinase, die zu einer verringerten Autokinaseaktivität führt. Das Gleichgewicht wird daher in Richtung der unphosphorylierte Form verschoben, somit wird ebenfalls die Menge an phosphoryliertem LuxU reduziert (Timmen et al., 2006). Die genaue HSL-Bindestelle ist bisher nicht bekannt.

1.4.2 Die LuxP/AI-2 abhängige Hybridsensorkinase LuxQ

LuxQ besitzt zwei Transmembrandomänen; zwischen den Transmembrandomänen befindet sich eine große periplasmatische Schleife bestehend aus zwei PAS-Domänen (benannt nach drei PAS-Proteinen: Per-period circadian Protein, Arint-Ah receptor nuclear translocator Protein, Sim-single-minded Protein). In Gegenwart als auch in Abwesenheit des Autoinduktors AI-2 ist das der Familie der periplasmatischen Bindeproteine (PBP, Quiocho und Ledvina, 1996) zugehörige Protein LuxP an die beiden PAS-Domänen gebunden. Obwohl pe-

riplasmatische Bindeproteine und PAS-Domänen unter den Lebewesen weit verbreitet sind, konnte zum ersten Mal eine Interaktion zwischen ihnen gezeigt (Neiditch et al., 2005).

Die cytoplasmatischen Histidinkinase-Domäne und Empfängerdomäne des Antwortregulators sind durch eine HAMP- und eine PAS-Domäne mit der Transmembrandomäne verbunden. Für HAMP-Domänen ist bekannt, dass sie extrazelluläre Sensordomänen mit intrazellulären Signaldomänen verbinden. Sie bestehen aus vier helikalen, parallelen Coiled-coil-Bereichen. Durch Rotation von zwei Helices im Uhrzeigersinn und Rotation von zwei Helices entgegen dem Uhrzeigersinn um jeweils 26° kann zwischen zwei verschiedenen „Packingmodes“ unterschieden werden, was einem binären Schalter entspricht (Hulko et al., 2006). Somit kann durch eine Konformationsänderung in LuxQ ein Alles-oder-Nichts-Signal produziert werden. Aminosäure-Sequenzanalysen von LuxQ zeigen einen hochkonservierten Histidin-Rest an Position H492 in der Histidinkinase-Domäne und einen Aspartat-Rest an Position D785 in der Empfängerdomäne. Diese beiden Reste kommen als mögliche Phosphorakzeptierende Aminosäuren bei der Signaltransduktion in Frage.

Der Autoinduktor AI-2 (Furanosylborat-Diester) wird von der Hybridsensorkinase LuxPQ im periplasmatischen Raum detektiert (Bassler et al., 1994), und das Signal wird ins Zellinnere weitergeleitet. Bei dem Autoinduktor-2 handelt es sich vermutlich um eine interspezifische Kommunikation zwischen verschiedenen Mikroorganismen. So konnte zum Beispiel die Induktion der Biolumineszenz eines *V. harveyi*-Reporterstamms durch den Überstand von *E. coli*- und *S. typhimurium*-Stämmen nachgewiesen werden (Bassler, 1999; Bassler et al., 1997; Surette und Bassler, 1998; Surette et al., 1999). Die Bedeutung der interspezifischen Kommunikation für *V. harveyi* konnte bisher nicht geklärt werden. Die Synthese des Furanosylboratdiesters schließt sich an einen Abbauzyklus eines toxischen Zwischenproduktes (S-Adenosyl-Homocystein (SAH)) des aktivierten Methylzyklus an. Zwei Abbauwege sind bekannt, bei einem wird SAH durch die Enzyme Pfs und LuxS in die Vorstufe des AI-2 (Pro-AI-2) umgewandelt. Autoinduktor-2 wird spontan aus dieser Vorstufe gebildet. Die Enzyme des AI-2-Synthesewegs kommen in einer sehr großen Zahl von Organismen vor (Sun et al., 2004). Bisher ist nur für *Vibrio*-Arten ein AI-2-Sensorsystem und nur für *E. coli* und *S. typhimurium* ein AI-2-Aufnahmesystem beschrieben worden. Bei anderen Organismen ist noch nicht bekannt, ob sie ein solches System besitzen.

1.4.3 Die CAI-1 abhängige Hybridsensorkinase CqsS

Bei *Vibrio cholerae* wurde ein weiteres Quorum sensing-System gefunden, bestehend aus der Autoinduktor-Synthase CqsA und der Hybridsensorkinase CqsS (*cholerae* Quorum sensing), welche den Autoinduktor CAI-1 wahrnimmt. Die Struktur von CAI-1 konnte kürzlich aufgeklärt werden, es handelt sich um ein (S)-3-Hydroxytridekan-4-on (Higgins et al., 2007). Auch *V. harveyi* besitzt diesen CAI-1-abhängigen Signalweg und die Komponenten CqsA und CqsS stellen somit ein drittes paralleles Quorum sensing-System dar, das ebenfalls das Signal auf das HPT-Protein LuxU und den Antwortregulator LuxO überträgt (Henke und Bassler, 2004b). Aufgrund von Sequenzvergleichen mit LuxN und LuxQ kommen H190 und D613 als phosphorakzeptierende Aminosäuren in Frage.

1.5 Das Histidinphosphotransfer-Protein LuxU

Das *luxU*-Gen ist zusammen mit *luxO* in einem Operon organisiert, die Überlappung um ein Codon spricht für eine gemeinsame Translation der beiden Gene (Freeman und Bassler, 1999b). *luxU* kodiert für ein kleines, cytosolisches Protein von 114 AS. Ein ca. 20AS großer Bereich mit einem konservierten Histidin-Rest (Position H58 in LuxU) ist bei den Mitgliedern der Phosphorelay-Protein-Familie konserviert.

Dieser konservierte Bereich kann wie bei ArcB in *E. coli* und CbbRR1 in *R. palustris* Teil einer Proteindomäne sein (Kato et al., 1998; Romagnoli und Tabita, 2007) oder ein einzelnes Protein bilden wie Ypd1p in *S. cerevisiae* oder auch Spo0B in *B. subtilis* (Janiak-Spens und West, 2000; Perraud et al., 1999). Die dreidimensionale Struktur von LuxU konnte von Ulrich et al. (2005) durch NMR aufgelöst werden. Das aktive Zentrum besteht aus einem Bündel von vier α -Helizes mit dem phosphoraktzeptierende Histidinrest 58 auf α -Helix C. Das reaktive Zentrum besteht aus einem Cluster aus positiv geladenen Resten, die sich an einer ansonsten hydrophoben Proteinoberfläche befinden.

Es wird davon ausgegangen, dass LuxU den Phosphorylrest von LuxN, LuxQ oder CqsS übernimmt und an LuxO weitergibt. Fehlt LuxU oder ist der konservierte Histidinrest 58 ausgetauscht, kann LuxO nicht phosphoryliert werden und die Biolumineszenz-Gene werden induziert (Freeman und Bassler, 1999b). Biochemisch konnte bisher der Phosphotransfer von LuxN auf LuxU sowie die Dephosphorylierung von LuxU durch LuxN gezeigt werden (Timmen et al., 2006).

Neben dem Histidinrest H58 besitzt LuxU einen weiteren, unter den Histidinphosphotransferproteinen nicht konservierten Histidinrest 103. Dieser Rest ist auf der α -Helix E lokalisiert und scheint nicht an der Phosphorylierung beteiligt zu sein, weist aber eine Affinität für anorganisches Phosphat auf (Ulrich et al., 2005).

1.6 Der σ^{54} -abhängige Antwortregulator LuxO

luxO kodiert für ein 50 kDa großes cytosolisches Protein, das zur Familie der σ^{54} -abhängigen Transkriptionsaktivatoren gezählt werden kann (Lilley und Bassler, 2000). Proteine dieser Familie besitzen eine N-terminale Empfängerdomäne eines Antwortregulators (REC) mit einem konservierten Aspartatrest (D47 in LuxO). Außerdem besitzt LuxO eine AAA⁺ ATPase-Domäne (AAA) sowie eine Helix-Turn-Helix-Domäne (HTH), die für die DNA-Bindung zuständig ist. Aufgrund der Domänenstruktur wird LuxO zu der NtrC-Familie der σ^{54} -abhängigen Transkriptionsaktivatoren gezählt. Die einzelnen Domänen von LuxO sind in Abb. 1.4 schematisch dargestellt.



Abbildung 1.4: Domänen des Antwortregulators

LuxO. *REC* Empfängerdomäne eines Antwortregulators.
AAA AAA⁺ ATPase-Domäne. *HTH* DNA-Bindedomäne.

Um die Rolle von LuxO näher zu charakterisieren, wurden *luxO*-Mutationen in das *V. harveyi*-Chromosom integriert und die Stämme phänotypisch untersucht (Freeman und Bassler, 1999a). LuxO ist essentiell für die Lux-Signaltransduktionskaskade. Freeman und Bassler (1999a) folgerten, dass die *luxCDABE*-Expression indirekt reprimiert wird, wenn LuxO im phosphorylierten Zustand vorliegt. Befindet sich LuxO im unphosphorylierten Zustand, wird eine Induktion der Gene bewirkt.

1.6.1 Empfängerdomäne eines Antwortregulators

Der konservierte Rest der Antwortregulator-domäne, auf den die Phosphorylgruppe von LuxU vermutlich übertragen wird, ist der Aspartatrest 47. Wird Aspartat gegen Asparagin (LuxO-D47N) ausgetauscht, ist eine Phosphorylierung von LuxO nicht mehr möglich und das *luxO*-

Operon wird konstitutiv exprimiert. Der Austausch gegen Glutamat (LuxO-D47E) hingegen bewirkt, dass der phosphorylierte Zustand des Antwortregulators simuliert wird und die Zellen kein Licht produzieren (Freeman und Bassler, 1999a). Die postulierte Phosphorylierungsstelle konnte biochemisch bisher nicht bewiesen werden.

1.6.2 AAA⁺ ATPase-Domäne

Der Antwortregulator LuxO besitzt eine AAA⁺ ATPase-Domäne (ATPases associated with diverse cellular activity). AAA⁺ ATPasen sind eine abgegrenzte Subfamilie der Walker-ATPasen, die zwei Konsensusmotive (Walker A- und Walker B-Motiv) enthalten. Die glycinreichen Walker Motive wurden erstmals von Walker et al. (1982) als gemeinsames Motiv zur Nukleotidbindung einiger ATP-abhängigen Enzyme beschrieben (u.a. F₁-ATPase und Myosin).

Zusätzlich besitzen AAA⁺ ATPasen eine weitere konservierte Region innerhalb der ATPase-Domäne, die so genannte SRH (Second Region of Homology), welche die AAA⁺ ATPasen von den Walker-ATPasen unterscheidet (Swaffield et al., 1992). Die zwischen 200 und 250 Aminosäuren große Sequenz, welche die Walker A- und Walker B-Motive sowie die SRH enthält, wird als AAA⁺-Modul bezeichnet. Anhand der Anzahl der AAA⁺-Module werden zwei unterschiedliche Typen an ATPasen unterschieden: Typ I ATPasen, welche nur ein AAA⁺-Modul enthält, und Typ II ATPasen, welche zwei AAA⁺-Module enthalten (Beyer, 1997).

Mittlerweile sind über 200 Vertreter dieser Familie bekannt, die sowohl in Archaeen, Bakterien und Eukaryoten zu finden sind und unterschiedliche zelluläre Funktionen ausüben (Confalonieri und Duguet, 1995; Patel und Latterich, 1998). Bekannte Vertreter der AAA⁺ Typ I ATPasen sind die Protease FtsH in *E. coli* sowie RuvB in *T. thermophilus* (Yamada-Inagawa et al., 2003; Ohnishi et al., 2005). Ein Vertreter der AAA⁺ Typ II ATPasen ist Drg1p in *S. cerevisiae* (Zakalskiy et al., 2002).

1.6.3 DNA-Bindedomäne

Aufgrund der Domänenstruktur können ca. 60% der Antwortregulatoren den OmpR-, NarL- und NtrC-Familien zugeordnet werden (Galperin, 2006). Eine weitere Klassifizierung bietet das DNA-Bindemotiv der Antwortregulatoren. Auf diese Weise können die Regulatoren in

unterschiedliche Klassen eingeteilt werden: „Helix-Turn-Helix-Domänen“ (NarL in *E. coli*), „winged Helix-Turn-Helix-Domänen“ (OmpR in *E. coli*), „Fis-like Domänen“ (factor of inversion stimulation; NarL in *E. coli*) und LyrTR-Domänen (YpdB in *E. coli*). Die Aminosäuren 404-444 von LuxO stellen ein so genanntes „Helix-Turn-Helix“-Motiv (HTH) dar, LuxO kann dementsprechend der ersten Klasse der Antwortregulatoren zugeordnet werden.

1.6.4 Biochemische Untersuchungen des Antwortregulators LuxO

Der σ^{54} -abhängige Antwortregulator LuxO konnte bisher nicht in löslicher und aktiver Form heterolog in *E. coli* überproduziert werden. LuxO lag auch bei veränderten Kultivierungsbedingungen zum größten Teil im Pellet der niedertourigen Zentrifugation vor (Timmen, 2005).

Die Überproduktion von LuxO als Hybridprotein mit Thioredoxin oder dem Maltosebindprotein hatte lediglich eine geringe Auswirkung auf die Löslichkeit von LuxO. Die geringen Mengen LuxO in der cytosolischen Fraktion reichten nicht für eine Anreicherung mittels Affinitätschromatographie aus.

1.7 Aufgabenstellung

Das Quorum sensing-System in *Vibrio harveyi* wurde bisher fast ausschließlich durch genetische Studien charakterisiert. Nur wenige biochemische Studien liegen vor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die enzymatischen Aktivitäten der Hybridsensorkinase LuxQ durch *in vitro*-Experimente charakterisiert und der Einfluss des periplasmatischen Bindepoteins LuxP und des Autoinduktors-2 bestimmt werden. Die Aktivitäten sollen mit denen von LuxN verglichen werden. Um die Reizintegration der Autoinduktoren und die Signalweiterleitung besser zu verstehen, soll ein mathematisches Modell des kombinierten LuxN- und LuxQ-Signalwegs erstellt werden. Zur Simulation der *in vivo*-Bedingungen, sollen das Zusammenspiel der beiden Sensorkinasen untersucht werden. Die HAI-1- und LuxP/AI-2-abhängige Signaltransduktionskaskade soll durch die Überproduktion und Charakterisierung von LuxO durch *in vitro*-Phosphorylierungen vervollständigt werden. Hierzu sollen geeignete Kultivierungsbedingungen gefunden werden, um LuxO löslich zu produzieren und zu reinigen. Der Ansatz des Rational Engineerings soll angewendet werden, um die intrinsische Löslichkeit von LuxO zu erhöhen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 2.1: Verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
Acetylphosphat	Sigma (Deisenhofen)
Alkalische Phosphatase (AP)	NEB (Frankfurt)
AP konjugiertes Anti-Kaninchen IgG	GE Healthcare (Braunschweig)
AP konjugiertes Anti-Maus IgG	GE Healthcare (Braunschweig)
$[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	GE Healthcare (Braunschweig)
$[\alpha^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	GE Healthcare (Braunschweig)
Biotinylated Thrombin Capture Kit	Novagen
DNase	Sigma (Deisenhofen)
DNA-Standard (1 kb bzw. 2-log-Ladder)	NEB (Frankfurt)
DNeasy Tissue Kit	QIAgen GmbH (Hilden)
HMW-Proteinstandard	Sigma (Deisenhofen)
Ni^{2+} -NTA-Agarose	QIAgen GmbH (Hilden)
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Nucleotid Removal Kit	QIAgen GmbH (Hilden)
Page Ruler TM Prestained Proteinstandard	Fermentas (St. Leon-Rot)
Penta-His-AK	QIAgen GmbH (Hilden)
PEI-Cellulose F TLC-Platte	Merck KGaA (Darmstadt)
Pfu-DNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Phusion-DNA-Polymerase	Finnzymes Diagnostics (Espoo)
Plaque GeneticPure Agarose	Biozym (Oldendorf)
PMSF	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)
Q Sepharose	GE Healthcare (Braunschweig)
Restriktionsenzyme	NEB (Frankfurt)
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH (Darmstadt)

(Fortsetzung Tabelle 2.1: Verwendete Materialien)

Materialien	Hersteller
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), Merck (Darmstadt), Riedel-de Hën (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*-, *Rhodobacter sphaeroides*- und *Vibrio harveyi*-Stämme sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 2.2: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Studier et al., 1990
<i>E. coli</i> JM109	F ⁻ <i>traD36 proA⁺B⁺lacI^a Δ(lacZ)</i> M15/Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>glnV44 e14- gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	Yanisch-Perron et al., 1985
<i>E. coli</i> MDAI2	<i>luxS::Tet^R</i> -Derivat von <i>E. coli</i> W3110 (F ⁻ λ ⁻ IN(<i>rrnD-rrnE</i>) <i>rph-1</i>)	DeLisa et al., 2001
<i>E. coli</i> MG1655	F ⁻ K12 Referenzstamm	Blattner et al., 1997
<i>E. coli</i> OrigamiB (DE3)/pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC</i> (DE3) <i>gor522::Tn10(Tet^R) trxB(Kan^R)</i> pLysS (Cam ^R)	Novagen

(Fortsetzung Tabelle 2.2: Verwendete Stämme)

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> S17-1	<i>thi pro hsdR⁻ hsdM⁺ recA</i> RP4-2 (Tet::Mu Km::Tn7)	Simon et al., 1983
<i>E. coli</i> TKR2000	$\Delta kdpFABCDE$ <i>thi rha lacZ habA</i> <i>trkA405 trkD1 atp706</i>	Kollmann und Alten- dorf, 1993
<i>R. sphaeroides</i> DD13	<i>pufBALMX::</i> (Kan ^R) <i>pucBA::</i> (Str ^R)	Jones et al., 1992b
<i>V. harveyi</i> BB120	Wildtyp	Bassler et al., 1997
<i>V. harveyi</i> MM77	<i>luxLM::</i> Tn5, <i>luxS::</i> Cam ^R	Mok et al., 2003

2.2.2 Verwendete Plasmide und Cosmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Cosmide sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide und Cosmide

Plasmid	Resistenz	Charakterisierung	Referenz
pT-LuxQ	Amp ^R	<i>luxQ</i> in pT7-5	Timmen, 2005
pT-LuxNb	Amp ^R	<i>luxN</i> in pT7-5	Timmen, 2005
pPV5-1	Amp ^R	<i>kdpCDE</i> (MluI bis BspMI) in pKK223-3	Walderhaug et al., 1992
pPV5-10	Amp ^R	KpnI-Schnittstelle in pPV5-1	diese Arbeit
pNKQ	Amp ^R	<i>luxQ</i> in pPV5-10	diese Arbeit
pNKQ-H492Q	Amp ^R	<i>luxQ</i> -H492Q in pPV5-10	diese Arbeit
pNKQ-D785N	Amp ^R	<i>luxQ</i> -D785N in pPV5-10	diese Arbeit
pNKN	Amp ^R	<i>luxN</i> in pPV5-10	diese Arbeit
pNKQ-1-NQN	Amp ^R	<i>luxN-luxQ</i> -Fusion in pPV5-10	Schön, 2007
pNKN-1-QNN	Amp ^R	<i>luxQ-luxN</i> -Fusion in pPV5-10	Schön, 2007
pNKQ-1-QQN	Amp ^R	<i>luxQ-luxN</i> -Fusion in pPV5-10	Schön, 2007
pNKN-1-QNQ	Amp ^R	<i>luxQ-luxN</i> -Fusion in pPV5-10	Schön, 2007
pNKQ-1-NQQ	Amp ^R	<i>luxN-luxQ</i> -Fusion in pPV5-10	Schön, 2007
pNKN-1-NNQ	Amp ^R	<i>luxN-luxQ</i> -Fusion in pPV5-10	Schön, 2007
pNKQ(299-859)	Amp ^R	verkürztes <i>luxQ</i> in pPV5-10	diese Arbeit

(Fortsetzung Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide und Cosmide)

Plasmid	Resistenz	Charakterisierung	Referenz
pNKQ(475-859)	Amp ^R	verkürztes <i>luxQ</i> in pPV5-10	diese Arbeit
pNKQ(733-859)	Amp ^R	verkürztes <i>luxQ</i> in pPV5-10	diese Arbeit
pNKN(454-849)	Amp ^R	verkürztes <i>luxN</i> in pPV5-10	diese Arbeit
pNKN(719-849)	Amp ^R	verkürztes <i>luxN</i> in pPV5-10	diese Arbeit
pET32a	Amp ^R	Expressionsvektor	Novagen
pET32-LuxQ(475-859)	Amp ^R	verkürztes <i>luxQ</i> in pET32	diese Arbeit
pET32-LuxQ(733-859)	Amp ^R	verkürztes <i>luxQ</i> in pET32	diese Arbeit
pET32-LuxN(454-859)	Amp ^R	verkürztes <i>luxN</i> in pET32	diese Arbeit
pET32-LuxN(719-859)	Amp ^R	verkürztes <i>luxN</i> in pET32	diese Arbeit
pET32-LuxO	Amp ^R	<i>luxO</i> in pET32a	Timmen, 2005
pET32-LuxO-K167A	Amp ^R	<i>luxO</i> -K167A in pET32a	diese Arbeit
pET16b	Amp ^R	Expressionsvektor	Novagen
pET-LuxO	Amp ^R	<i>luxO</i> in pET16b	Timmen, 2005
pET-LuxO(1-110)	Amp ^R	verkürztes <i>luxO</i> in pET16b	diese Arbeit
pET-LuxO(111-190)	Amp ^R	verkürztes <i>luxO</i> in pET16b	diese Arbeit
pET-LuxO(191-264)	Amp ^R	verkürztes <i>luxO</i> in pET16b	diese Arbeit
pET-LuxO(265-453)	Amp ^R	verkürztes <i>luxO</i> in pET16b	diese Arbeit
pET-LuxO(1-190)	Amp ^R	verkürztes <i>luxO</i> in pET16b	diese Arbeit
pET-LuxO(1-264)	Amp ^R	verkürztes <i>luxO</i> in pET16b	diese Arbeit
pET-LuxO(111-264)	Amp ^R	verkürztes <i>luxO</i> in pET16b	diese Arbeit
pET-LuxO(111-453)	Amp ^R	verkürztes <i>luxO</i> in pET16b	diese Arbeit
pET-LuxO(191-453)	Amp ^R	verkürztes <i>luxO</i> in pET16b	diese Arbeit
pET-LuxO_C_Var1 bis pET-LuxO_C_Var7	Amp ^R	<i>luxO</i> _C-Varianten in pET16b (Aminosäuresubstitutionen siehe Tabelle 3.3)	diese Arbeit
pET-NtrC	Amp ^R	<i>ntrC</i> in pET16b	diese Arbeit
pET-LuxO/NtrC	Amp ^R	<i>luxO</i> - <i>ntrC</i> -Fusion in pET16b	diese Arbeit

(Fortsetzung Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide und Cosmide)

Plasmid	Resistenz	Charakterisierung	Referenz
pET-NtrC/LuxO	Amp ^R	<i>ntrC-luxO</i> -Fusion in pET16b	diese Arbeit
pQE30	Amp ^R	Expressionsvektor	Qiagen
pQE-LuxO	Amp ^R	<i>luxO</i> in pQE30	diese Arbeit
pQE-LuxOU	Amp ^R	<i>luxOU</i> in pQE30	diese Arbeit
pQE-LuxU	Amp ^R	<i>luxU</i> in pQE30	Timmen, 2005
pGEX-LuxP	Amp ^R	<i>luxP</i> in pGEX	Neiditch et al., 2005
pT7-5	Amp ^R	Expressionsvektor	Tabor und Richardson, 1985
pT-LuxO	Amp ^R	<i>luxO</i> in pT7-5 (LuxO ohne His-Tag)	diese Arbeit
pT-LuxO-1	Amp ^R	<i>luxO</i> in pT7-5 (LuxO mit C-terminalem His6-Tag)	diese Arbeit
pT-LuxO-2	Amp ^R	<i>luxO</i> in pT7-5 (LuxO mit C-terminalem His12-Tag)	diese Arbeit
pT-LuxO-3	Amp ^R	<i>luxO</i> in pT7-5 (LuxO mit N-terminalem His6-Tag)	diese Arbeit
pT-LuxOU	Amp ^R	<i>luxO</i> in pT7-5 (LuxU mit N-, LuxO mit C-terminalem His6-Tag)	diese Arbeit
pRK-CBC1	Tet ^R	<i>puCBAC</i> in pRK415	Jones et al., 1992a
pRKO	Tet ^R	<i>luxO</i> in pRK415	diese Arbeit
Cosmid OU	Tet ^R	<i>luxOU</i> in pLAFR2	Bonnie Bassler, persönliche Gabe

2.2.3 Verwendete Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in folgender Tabelle aufgelistet. Zahlen im Namen der Oligonukleotide beziehen sich auf die entsprechende AS-Position im Wildtyp-Protein der jeweiligen Proteine. Eine Ausnahme stellt Oligonukleotid pKK176 sense dar, hier bezieht sich die Zahl auf die Nukleotid-Position im Expressionsvektor pKK223-3.

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
LuxQ KpnI sense	5'-A ATG GGT ACC ACA ACA ACG CGA TCA AAC ATT AAA-3'
LuxQ HindIII antisense	5'-ATT AAA GCT TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG GGT TCT TTC TAC CAA GAA ACG TTG-3'
LuxQ D785N sense	5'-ATG AAT AAC CAG CTG CCC CAC CTT GGT GGT ATT G-3'
LuxQ D785N antisense	5'-GGG CAG CTG GTT ATT CAT GAG GAT CAG ATC G-3'
LuxQ H492Q sense	5'-CTA AAA TGA GCC AAG AAA TTC G-3'
LuxQ H492Q antisense	5'-CGA ATT TCT TGG CTC ATT TTA G-3'
LuxQ SpeI antisense	5'-C ACT AGT AGC ACT TTT AAA CTT TCA TCA AAC AAG G-3'
LuxQ(299) KpnI sense	5'-GAT TGG TAC CGC CTT AAT GAG TAG GGA ATG G-3'
LuxQ(475) KpnI sense	5'-G ATT GGT ACC GAA GCA GAA AAA TCC GCG C-3'
LuxQ(733) KpnI sense	5'-G ATT GGT ACC GAA AGT TTA AAA GTG CTA CTG G-3'
LuxQ 2400 sense	5'-GGG ACA ACA TTT GTT ATA AC-3'
LuxN 10His HindIII antisense	5'-ACA GAA GCT TAG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TG-3'
LuxN(454) KpnI sense	5'-T TAA GGT ACC GAA GCC GAT CGC CGT ATC-3'
LuxN(719) KpnI sense	5'-C TAA GGT ACC CAA TCT CCA ACA GTG CTC-3'
LuxN KpnI sense	5'-AAT GGG TAC CTT TGA TTT TAG TCT AGA GGC TAT CG-3'
LuxO NdeI sense	5'-TAT CTA CAT ATG GTT GAA GAC ACC GCA TCC-3'
LuxO BamHI antisense	5'-ATA CGT GGA TCC TCA TAC GTT TTG TTT TTC GTC-3'
LuxO(111) NdeI sense	5'-TAT CTA CAT ATG GCG ATT CGT AAA GCT ACC-3'
LuxO(110) BamHI antisense	5'-ATA TGC GGA TCC TCA ATT GTT CAC CGT GAC ACG-3'

(Fortsetzung Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide)

Oligonukleotid	Sequenz
LuxO(191) NdeI sense	5'-TAT CTA CAT ATG GCA GCA ATC CCG AAA GAC C-3'
LuxO(190) BamHI antisense	5'-ATA CGT GGA TCC TCA GCA GTT GAT AGC GAT AAA CGG-3'
LuxO(265) NdeI Sall sense	5'-TAT CTA CAT ATG GTC GAC GTG CGG TTT GTG TGT C-3'
LuxO(264) BamHI antisense	5'-ATA CGT GGA TCC TCA GCT TTT CAT TTT AGA AGA ACC G-3'
LuxO K167A antisense	5'-CAC TTC TGC ACC GGT ACC ACT TTC ACC-3'
LuxO K167A sense	5'-AGT GGT ACC GGT GCA GAA GTG TGT GC-3'
LuxO KpnI pRK sense	5'-TTT TGG TAC CAG TTG GGA GAC GAC ACA ATG GTT GAA GAC ACT GCA TCC-3'
LuxO HindIII pRK antisense	5'-AAT TCG GTA CCT TAG TGG TGG TGG TGG TGG TGT ACG TTT TGT TTT TCG TCC-3'
LuxO BamHI sense	5'-GC ACT GGA TCC ATG GTA GAA GAC ACC GCA TC- 3'
LuxO Sall antisense	5'-GCC GAC GTC GAC TCA TAC GTT TTG TTT TTC GTC CT-3'
LuxO PstI antisense	5'-TTT TCT GCA GTA CGT TTT GTT TTT CGT CCT TGC-3'
LuxO PstI 12His antisense	5'-TTT TCT GCA GTA CGT TTT GTT TTT CGT CCT TGC-3'
LuxO BamHI Start 6His sense	5'-TTC AGA GGA TCC ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GTA GAA GAC ACC GCA TCC GTT GC-3'
LuxO PstI Stop Linker sense	5'-G TAA TAG TGA GGA TCG AGC TGC A-3'
LuxO PstI Stop Linker antisense	5'-AC GTC ATT ATC ACT CCT AGC TCG-3'
LuxU 6His Stop PstI antisense	5'-TAA TTA CTG CAG TTA ATG ATG ATG ATG ATG GTT TGT CCA AGA ACG GTA GGC-3'
LuxU PstI antisense	5'-TTA TTA CTG CAG GTT TGT CCA AGA ACG GTA GGC GTC ACG-3'
NtrC NdeI sense	5'-GCT GAA CAT ATG CAA CGA GGT ATA GTC TG-3'

(Fortsetzung Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide)

Oligonukleotid	Sequenz
NtrC BamHI antisense	5'-ATT TTG GAT CCT TAC TCC ATC CCC AGC TC-3'
LuxO/NtrC sense	5'-CGA TGC AAC AAG TTT TCC GTA TTA TCG-3'
LuxO/NtrC antisense	5'-CGA TAA TAC GGA AAA CTT GTT GCA TCG-3'
NtrC/LuxO sense	5'-CCA TGC AAG ACG TAT ACC GCA CCA TTG-3'
NtrC/LuxO antisense	5'-CAA TGG TGC GGT ATA CGT CTT GCA TGG-3'
KdpD120 antisense	5'-GTT TGG GAT GTC ATC ATC AAC GGG AAC CTG GCG CAT TAC-3'
pKK176 sense	5'-AAA TCA CTG CAT AAT TCG TGT CGC-3'
pPV5-1 KpnI antisense	5'-CGT AAG GGT TCG GTA CCC ATC AAG TTT AT-3'
pPV5-1 KpnI sense	5'-ATA AAC TTG ATG GGT ACC GAA CCC TTA CG-3'

2.3 Kultivierung

Die optische Dichte (OD_{600}) der Zellsuspensionen wurde bei 600 nm in einem Biophotometer (Eppendorf) bestimmt.

2.3.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, aerob bei 37°C in speziellen Vollmedien. *E. coli* JM109, Origami B/pLysS und BL21 (DE3)/pLysS wurden je nach Anwendung in Luria-Bertani (LB)-Medium [1 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt] oder KML-Medium [1 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) KCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt] kultiviert. Gegebenenfalls wurde die Produktion der Lux-Proteine bei einer $OD_{600} \sim 0,5-0,9$ durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. *E. coli* TKR2000 wurde ausschließlich in KML-Medium kultiviert. Festmedien der entsprechenden Kulturmedien wurden durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar hergestellt. Antibiotika wurden in Konzentrationen von 100 $\mu\text{g/ml}$ (Ampicillin, Kanamycin, Carbenicillin) oder 34 $\mu\text{g/ml}$ (Chloramphenicol) zugegeben.

2.3.2 Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides*

Die Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides* DD13-Zellen erfolgte im Dunkeln unter semi-aeroben Bedingungen bei 170 rpm und 28°C. Hierzu wurden die Kulturkolben mit der Hälfte des maximalen Volumens mit M22+-Medium (Hunter und Turner, 1988) gefüllt. Antibiotikum wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml (Tetrazyklin) zugegeben. Ausgehend von einer 10 ml Kultur wurde jeweils nach 24h Inkubation die Kultur in frisches Medium (1:5) überführt, bis genügend Zellmaterial vorhanden war.

2.3.3 Kultivierung von *Vibrio harveyi*

Die Kultivierung von *V. harveyi*-Zellen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, aerob bei 30°C in Luria-Marine (LM)-Vollmedium [1 % (w/v) Trypton; 2 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt] oder AB-Minimalmedium nach Greenberg et al. (1979) [1,75 % (w/v) NaCl; 1,23 % (w/v) MgSO₄; 0,2 % (w/v) Caseinhydrolysat; pH 7,5 (KOH); nach Sterilisation wurden 1 % (v/v) Glycerol, 1 mM L-Arginin und 10 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0 zugegeben]. Festmedien wurden durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar zu LM-Medium hergestellt. Antibiotikum wurde in Konzentrationen von 10 µg/ml (Chloramphenicol) zugegeben.

2.3.4 Kompetente Zellen und Transformation

Für die Aufnahme eines Plasmids werden die Zellen mit CaCl₂ und RbCl behandelt (Promega, 1994). Frisches KML-Medium wurde mit Zellen einer Übernachtskultur 1:100 beimpft. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ≈ 0,3 - 0,5) wurden die Zellen bei 4°C für 5 min abzentrifugiert (4.000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 5 ml Lösung A (10 mM MOPS, pH7,0; 10 mM RbCl) auf Eis resuspendiert und abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 5 ml Lösung B (10 mM MOPS, pH 6,5; 50 mM CaCl₂; 10 mM RbCl) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Lösung B resuspendiert und weiterverwendet. 200 µl kompetente Zellen wurden mit 1 µl Plasmid-DNA, bzw. mit dem gesamten Ligationsansatz vermischt, 1h auf Eis inkubiert und dann einem Hitzeschock (90s bei 42°C) ausgesetzt. Die Zellsuspension wurde mit 1 ml KML-Medium versetzt und zur Regeneration für 1h bei 37°C geschüttelt. 200 µl dieser Suspension (bei Ligationstransformation der gesamte Ansatz) wurden auf KML-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert

und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Plasmidisolierung

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Übernachtskulturen mittels des „QIAprep-Spin-Miniprep“-Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA wurde in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.4.2 Isolierung von chromosomaler DNA

Chromosomale DNA wurde aus 1 ml Übernachtskultur von *Vibrio harveyi* BB120 bzw. *Escherichia coli* MG1655 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) und Ausubel et al. (1987) durchgeführt. Die *in vitro*-Veränderungen von DNA-Molekülen wie Restriktionen und Ligationen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Gegebenenfalls wurden linearisierte Vektoren zur Verhinderung einer Religation 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 0,7-1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer [40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA] verwendet, die mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Vor dem Lauf wurden zu den Proben 10 x DNA-Probenpuffer [50% (v/v) Glycerol; 0,1 M EDTA; 1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) Bromphenolblau] gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen diente 2Log-Leiter-Standard oder 1 kb-Leiter-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 und die Dokumentation der Gele mit der Gel-Dokumentationsanlage (Peqlab, Erlangen).

2.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels des „QIAquick-Gel-Extraction“-Kit nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen extrahiert.

2.4.6 „In Gel“-Ligation und Transformation

Die analytische und präparative Auftrennung von großen DNA-Fragmenten (> 5 kb) erfolgte mittels „low melting“ Plaque *GP*-Agarose (Biozym, Oldendorf). Es wurden Gele mit 1% (w/v) Plaque *GP*-Agarose in TAE-Puffer [40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA] verwendet, die mit $0,2 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid versetzt waren. Die Gelelektrophorese erfolgte wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben. Die durch einen UV-Transilluminator detektierte DNA wurde ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 70°C geschmolzen. Die DNA wurde entweder direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

Der Ligationsansatz bestehend aus geschnittenem Vektor und Fragment sowie Ligationspuffer wurde erneut bei 70°C geschmolzen. Nach kurzer Abkühlung (30 sec bei Raumtemperatur) wurde Ligase (NEB, Frankfurt) zugegeben und der Ansatz sofort auf Eis gestellt. Die Ligation erfolgte für 4 h bei Raumtemperatur oder ÜN bei 16°C . Für die Transformation wurde der Ligationsansatz erneut bei 70°C geschmolzen und das vierfache Volumen Puffer [0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; autoklaviert] zugegeben. Die Transformation erfolgte wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben.

2.4.7 Konstruktion der Plasmide

In den folgenden Tabellen sind die Angaben zur Konstruktion aller im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide aufgelistet.

Tabelle 2.6 auf Seite 27 beinhaltet die Informationen der Konstruktion von Plasmiden, die mittels einstufiger-PCR hergestellt wurden; neben der Ursprungs-DNA, den Oligonukleotiden und Zielvektor sind ebenfalls die Restriktionsenzyme und die Größe des umgesetzten Fragments aufgelistet. Tabelle 2.8 auf Seite 29 beinhaltet die Informationen der Konstruktion von Plasmiden, die mittels zweistufiger-PCR hergestellt wurden. Die Fragmente der ersten PCR-Stufe wurden mit den angegebenen Oligonukleotiden anhand der Ursprungs-DNA amplifiziert. Die Fragmente der zweiten PCR-Stufe wurden jeweils mit dem sense Oligonukleotid von Fragment 1 und dem antisense Oligonukleotid von Fragment 2 amplifiziert, als

Ursprungs-DNA dienten Fragmente 1 und 2 der ersten Stufe (Ho et al., 1989). Das Fragment der zweiten Stufe wurde mit den angegebenen Schnittstellen in den Zielvektor umgesetzt.

Um das Plasmid pT-LuxO zu konstruieren, wurden die sense und antisense Oligonukleotide PstI-Stop-Linker phosphoryliert und aneinandergelagert. Zur Phosphorylierung der Oligonukleotide wurden 4,5 pmol in einem Endvolumen von 10 μ l zusammen mit Ligase-Puffer und 10 U T4-Polynukleotidkinase für 30 min inkubiert (dieser Schritt wurde für beide Oligonukleotide getrennt durchgeführt). Danach wurden die beiden Ansätze zuerst getrennt für 5 min bei 95°C im Wasserbad erhitzt, danach wurden die Ansätze gemischt und erneut für 5 min bei 96°C erhitzt. Durch langsames Abkühlen im Wasserbad auf Raumtemperatur wurde die Anlagerung der komplementären Bereiche ermöglicht. Die Doppelstrang-DNA, die einen PstI-Überhang besaß, wurde mit dem mit PstI-restringierten Vektor pT-LuxO-1 ligiert.

Die kodierenden Bereiche für die LuxO-Varianten wurden von der Firma Sloning Biotechnology mit Hilfe der *Slonomics*TM Technologie synthetisiert (www.sloning.com). Diese Technologie erlaubt die vollautomatisierte Herstellung synthetischer Gene sowie die parallele Herstellung von Genvarianten. Die Plasmide pET-LuxO_C_Var1-7 wurden durch Umsetzung des kodierenden Bereichs mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI konstruiert.

2.4.8 DNA-Sequenzanalyse

Alle Fragmente, die durch PCR amplifiziert wurden, wurden zur Kontrolle sequenziert. Die Sequenzierreaktion erfolgte nach dem Protokoll des Sequenzierungsservices der LMU München, Department Biologie I.

Tabelle 2.5: Konstruktion der Plasmide mittels einstufiger PCR

Plasmid	Ursprungs-DNA	sense Primer	antisense Primer	Schnittstellen	bp	Zielvektor
pNKQ	pT-LuxQ	LuxQ KpnI	LuxQ HindIII	KpnI/HindIII	2596	pPV5-10
pNKQ(299-859)	pNKQ	LuxQ(299) KpnI	LuxQ HindIII	KpnI/HindIII	1714	pNKQ
pNKQ(475-859)	pNKQ	LuxQ(475) KpnI	LuxQ HindIII	KpnI/HindIII	1186	pNKQ
pNKQ(733-859)	pNKQ	LuxQ(733) KpnI	LuxQ HindIII	KpnI/HindIII	412	pNKQ
pNKN	pT-LuxNb	LuxN KpnI	LuxN 10His HindIII	KpnI/HindIII	2571	pPV5-10
pNKN(454-849)	pNKN	LuxN(454) KpnI	LuxN 10His HindIII	KpnI/HindIII	1212	pNKN
pNKN(719-849)	pNKN	LuxN(719) KpnI	LuxN 10His HindIII	KpnI/HindIII	417	pNKN
pET-NtrC	<i>E. coli</i> genom. DNA	NtrC NdeI	NtrC BamHI	NdeI/BamHI	1412	pET16 LuxO
pET-LuxO(1-110)	pET16 LuxO	LuxO NdeI	LuxO(110) BamHI	NdeI/BamHI	335	pET16 NtrC
pET-LuxO(1-190)	pET16 LuxO	LuxO NdeI	LuxO(190) BamHI	NdeI/BamHI	575	pET16 NtrC
pET-LuxO(1-264)	pET16 LuxO	LuxO NdeI	LuxO(264) BamHI	NdeI/BamHI	797	pET16 NtrC
pET-LuxO(111-190)	pET-LuxO	LuxO(111) NdeI	LuxO(190) BamHI	NdeI/BamHI	242	pET-NtrC
pET-LuxO(111-264)	pET-LuxO	LuxO(111) NdeI	LuxO(264) BamHI	NdeI/BamHI	470	pET-NtrC
pET-LuxO(111-453)	pET-LuxO	LuxO(111) NdeI	LuxO BamHI	NdeI/BamHI	1037	pET-NtrC
pET-LuxO(191-264)	pET-LuxO	LuxO(191) NdeI	LuxO(264) BamHI	NdeI/BamHI	227	pET-NtrC
pET-LuxO(191-453)	pET-LuxO	LuxO(191) NdeI	LuxO BamHI	NdeI/BamHI	797	pET-NtrC
pET-LuxO(265-453)	pET16 LuxO	LuxO(265) NdeI	LuxO BamHI	NdeI/BamHI	575	pET-NtrC
pT-LuxO-1	pET-LuxO	LuxO BamHI	LuxO PstI	BamHI/PstI	1361	pT7-5
pT-LuxO-2	pT-LuxO	LuxO BamHI	LuxO PstI 12His	BamHI/PstI	1379	pT-LuxO
pT-LuxO-3	pT-LuxO	LuxO BamHI Start 6His	LuxO PstI	BamHI/PstI	1387	pT-LuxO-1

(Fortsetzung: Konstruktion der Plasmide mittels einstufiger PCR)

Plasmid	Ursprungs-DNA	sense Primer	antisense Primer	Schnittstellen	bp	Zielvektor
pT-LuxOU	Cosmid OU	LuxO BamHI Start 6His	LuxU PstI	BamHI/PstI	1728	pT-LuxO-1
pQE-LuxO	pET-LuxO	LuxO BamHI	LuxO PstI	BamHI/PstI	1361	pQE30
pQE-LuxOU	Cosmid OU	LuxO BamHI Start 6His	LuxU PstI	BamHI/PstI	1728	pQE30
pRKO	pET16 LuxO	LuxO KpnI pRK	LuxO HindIII pRK	KpnI/HindIII	1406	pRK-CBC

Tabelle 2.7: Konstruktion der Plasmide mittels zweistufiger PCR

Plasmid	Ursprungs-DNA	Fragmente der ersten PCR-Stufe			Gesamtfragment		Zielvektor	
		Bez.	sense	antisense	bp	Schnittstellen		bp
pPV5-10	pPV5-1	F1	pKK176	pPV5-1 KpnI	383	PstI/XhoI	396	pPV5-1
		F2	pPV5-1 KpnI	KdpD120	360			
pNKQ-H492Q	pNKQ	F1	LuxQ KpnI	LuxQ-H492Q	1476	EcoRV/StuI	807	pNKQ
		F2	LuxQ-H492Q	LuxQ SpeI	736			
pNKQ-D785N	pNKQ	F1	LuxQ 2400	LuxQ-D785N	256	StuI/HindIII	447	pNKQ
		F2	LuxQ-D785N	LuxQ HindIII	250			
pET32-LuxO-K167A	pET-LuxO	F1	LuxO BamHI	LuxO K167A	489	BamHI/SalI	1368	pET32-LuxO
		F2	LuxO K167A	LuxO SalI	880			
pET-LuxO/NtrC	pET-LuxO	F1	LuxO NdeI	NtrC/LuxO	432	NdeI/BamHI	1392	pET-LuxO
		F2	LuxO/NtrC	NtrC BamHI	960			
pET-NtrC/LuxO	pET-NtrC	F1	NtrC NdeI	LuxO/NtrC	450	NdeI/BamHI	1383	pET-LuxO
		F2	NtrC/LuxO	LuxO BamHI	933			

2.5 Biochemische und Analytische Methoden

2.5.1 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden in Abwandlung des Protokolls von Lowry et al. (Lowry et al., 1951; Peterson, 1977) durchgeführt. Als Standardprotein für die Herstellung von Eichgeraden wurde BSA verwendet.

2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Dazu wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 7 x 10 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 4,9%. Im Trenngel variierte die Konzentration je nach gewünschter Auftrennung der Proteine zwischen 10 und 15%. Die SDS-Gele wurden mit Hilfe von Protogel-Fertiglösung [30% (v/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid] hergestellt. Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit SDS-Probenpuffer versetzt, so dass eine Endkonzentration von 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,9), 10% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,005% (w/v) Bromphenolblau erzielt wurde. Der Gellauf wurde in einer Gellaufanlage (Modell 45-1010-I, Peqlab) bei 200 V durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Serva Blau G-250 (Coomassie-Blau) gefärbt (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 und 7,5% (v/v) Essigsäure. Zur Konservierung wurden die Gele anschließend bei 80°C in einem Geltrockner GD-4534 (Scie-Plas, UK) getrocknet.

2.5.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)

Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden das SDS-Gel, eine Nitrozellulosemembran (0,2 μm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel) sowie Filterpapier in Blotpuffer [25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol, p.a.] equilibriert. Mit Hilfe einer Nass-Blot Anlage (Scie-Plas, UK) wurden die aufgetrennten Proteine bei 300 mA innerhalb von 1h auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1h mit 3% (w/v) BSA in TBS-Puffer [10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl] gesättigt. Anschließend erfolgte der immunologische Nachweis mit Hilfe von Antikörpern. Der primäre Antikörper wurde zugegeben und 1h bei RT wippend 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. Abschließend wurde der sekundäre Antikörper zugegeben. Nach 1h Inkubation bei RT und erneutem Waschen mit TBS + Tween/Triton wurde die Membran mit

Puffer A [0,9% (w/v) NaCl; 50 mM Tris/HCl, pH 7,5] equilibriert. Als Substrat wurde BCIP (5 mg/ml) gelöst in 50 mM Na₂CO₃-Puffer (pH 9,5) und 0,1% (v/v) NBT zugegeben und bei 37°C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Membran zwischen Filterpapier getrocknet. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen zum Nachweis von Proteinen mit His-Tag bzw. zum Nachweis von LuxO sind in folgender Tabelle wiedergegeben:

Tabelle 2.9: Verwendete Antikörper zum immunologischen Nachweis von Proteinen.

	primärer Antikörper		sekundärer Antikörper	
	Antikörper	Verdünnung	Antikörper	Verdünnung
			alkal. Phosphatase conj.	
His-Tag	Penta-His-AK	1 : 2.500	Anti-Maus-IgG	1 : 5.000
LuxO	LuxO-AK	1 : 1.000	Anti-Kaninchen-IgG	1 : 5.000

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 5.0 (GE Healthcare) importiert. Die Menge der Lux-Proteine mit His-Tag wurde durch den Vergleich mit gereinigtem KdpD-6His quantifiziert.

2.5.5 Präparation von zellfreiem Kulturüberstand

Für die Gewinnung von zellfreiem Kulturüberstand (KÜ) wurden *V. harveyi*-Zellen in AB-Medium aerob bei 30°C kultiviert. Das Zellwachstum wurde durch Messen der Optischen Dichte bei 600 nm kontrolliert. Dabei wurde auch die Emission von Biolumineszenz mittels eines β -Counters verfolgt. Erreichte die Kultur eine OD₆₀₀ von ungefähr 1 und konnte eine deutliche Biolumineszenz festgestellt werden, wurden die Zellen pelletiert (5.000 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand der Kultur wurde von den restlichen Zellen durch Sterilfiltration (50 ml Sterilfilter (Millipore), Porengröße 0,22 μ m) befreit und bei -80°C gelagert (Bassler et al., 1993).

2.5.6 Lokalisationsstudien von Proteinen

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen für Lokalisationsstudien von Proteinen erfolgte in einem Maßstab von 50 ml. Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben kultiviert und gegebenenfalls die Produktion der Lux-Proteine induziert. Zur Fraktionierung wurden die Zellen pelletiert, in Aufschlusspuffer [50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10% (v/v) Glycerol; 0,5 mM PMFS] resuspendiert (0,1 ml/ml Kultur OD=1) und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach niedertouriger Zentrifugation (5.000 rpm, 15 min, 4°C) wurde der Überstand einer hohtourigen Zentrifugation unterzogen (45.000 rpm, 30 min, 4°C). Die Pellets der niedertourigen und hohtourigen Zentrifugation wurden im gleichen Volumen wie der Überstand aufgenommen und entsprechend gleiche Volumina der einzelnen Fraktionen (Zellsuspension, Pellet der niedertourigen Zentrifugation, Cytoplasmafraktion und Membranfraktion) durch SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben.

2.5.7 Präparation von Zellfraktionen zur Gewinnung der Lux-Proteine

Geeignete Expressionsstämme wurden mit Plasmiden transformiert, die für das gewünschte *lux*-Gen codierten. pT- und pET16-Derivate wurden in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pLysS, pKK-Derivate in dem *E. coli*-Stamm TKR2000 und pET32-Derivate in dem *E. coli*-Stamm OrigamiB/pLysS exprimiert. Die Zellen wurden in LB- bzw. KML-Medium bei 37°C aerob bis zu einer OD₆₀₀ 0,5 - 0,8 kultiviert.

Zellaufschluss und Fraktionierung erfolgten nach den Angaben von Timmen et al. (2006). Die Expression erfolgte durch Induktion der Zellen mit 0,1 - 0,5 mM IPTG für 2-3 bzw. 24 Stunden. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer Sorval RC5C-Zentrifuge für 20 min bei 7.000 \times g pelletiert und in Waschpuffer [50 mM Tris, pH 8,0; 10% (v/v) Glycerol] resuspendiert und erneut pelletiert. Das Zellpellet wurde in Aufschlusspuffer [50 mM Tris, 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 Feuchtgewicht/ml) und nach Homogenisierung mit Hilfe eines Hochdruck-Zellaufschlussgeräts (Constant Systems, UK) aufgeschlossen. Kleine Mengen Zellsuspensionen (bis 10 ml) wurden mittels Ultraschallbehandlung (3 \times 30 sec in Eiswasser mit jeweils 1 min Pause, Branson-Sonifier) aufgeschlossen. In diesem Fall wurde das Zellpellet zu einer optischen Dichte von 10 resuspendiert. Nicht aufgeschlossene Zellen und Einschlusskörper wurden durch niedertourige Zentrifugation für 10 min bei 11.200 \times g entfernt. Die

Cytoplasmamembranen wurden als invertierte Membranvesikel bei 130.000 \times g in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter Optima L-90K Ultracentrifuge; Sorvall Ti-1250 Rotor) in 45 min 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, pH 8,0; 10 % (v/v) Glycerol] aufgenommen. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -20°C.

2.5.8 Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Für die Anreicherung cytosolischer Proteine wurde die nach Angaben des Herstellers vorbereitete Ni²⁺-NTA (Thiazetonitril)-Agarose dreimal mit dem zehnfachen Volumen Reinigungspuffer [50 mM Tris/HCl, pH7,5; 10% (v/v) Glycerol; 200 mM NaCl; 10 mM Imidazol und 2 mM 2-Mercaptoethanol] equilibriert. 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 wurde angenommen, dass sie \sim 10% der löslichen Proteine ausmachen. Zur Bindung der His-getaggten Proteine wurde Proteinrohextrakt zu equilibrierter 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 Reinigungspuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte zweimal mit Elutionspuffer [Reinigungspuffer mit zusätzlich 250 mM Imidazol] in 1/20 des Ausgangsvolumens. Das Eluat wurde für 4h gegen kalten TG-Puffer (pH 8,0) dialysiert, um das Imidazol zu entfernen.

2.5.9 Proteolyse mit Thrombin

Die Proteolyse mit Thrombin (Novagen) erfolgte mit dem „Biotinylated Thrombin Capture“-Kit. Trx-LuxO wurde mit 1 U Thrombin/mg Protein bei 20°C für 3 h inkubiert. Danach wurde das biotinylierte Thrombin nach Angaben des Herstellers mittels Streptavidin-Agarose entfernt.

2.5.10 Heterologe Überproduktion und Reinigung von LuxU

LuxU wurde wie von Timmen (2005) beschrieben in dem *E. coli*-Stamm JM109, transformiert mit dem Plasmid pQE-LuxU, heterolog produziert. Bei einer $OD_{600} \sim 0,5$ wurde die Expression mit 0,1 mM IPTG induziert und die Zellen nach 3h pelletiert, aufgeschlossen und fraktioniert. LuxU wurde aus der cytosolischen Fraktion gereinigt (Kapitel 2.5.8). Die Konzentration des gereinigten Proteins wurde nach Petersen (Kapitel 2.5.1) bestimmt und die Reinheit durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft. Die Reinigungsfractionen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.5.11 Heterologe Überproduktion und Reinigung von LuxP

Die heterologe Überproduktion erfolgte in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pLysS bzw. MDAI2, jeweils transformiert mit dem Plasmid pGEX-LuxP. Die Zellen wurden aerob in LB-Medium, ergänzt mit zusätzlich 1 mM Borsäure, bis zu einer $OD_{600} \sim 0,3$ bei 37°C , ab dann bei RT kultiviert. Bei einer $OD_{600} \sim 0,9$ wurde die Expression mit 0,1 mM IPTG induziert und die Zellen nach 6h pelletiert, aufgeschlossen und fraktioniert (Kapitel 2.5.7).

Die Reinigung erfolgte wie in Neiditch et al. (2005) beschrieben. 1,5 ml Glutathion-Sephrose/L Kultur wurden in sterilen und gekühlten Gefäßen zwei mal mit dem 10-fachen Volumen Equilibrierungspuffer [20 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl] equilibriert. LuxP-GST-haltiges Cytosol wurde zugegeben und 30 min bei 4°C wippend inkubiert. Die Sepharose wurde zwei mal mit dem 10fachen Volumen mit Equilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution von LuxP erfolgte durch proteolytische Abspaltung des GST-Tags mit Thrombin. Hierzu wurden 1 ml Equilibrierungspuffer/L Kultur sowie 0,5 Units biotinyliertes Thrombin (Novagen) pro L Kultur zugegeben und $\ddot{U}\text{N}$ bei 4°C wippend inkubiert. Nach Absetzen der Sepharose wurde der LuxP-haltige Überstand mit dem „Biotinylated Thrombin Capture“-Kit (Novagen) nach Angaben des Herstellers von Thrombin befreit.

2.5.12 *In vitro*-Phosphorylierung der Lux-Proteine

Alle Phosphorylierungsreaktionen enthielten die zu charakterisierenden Proteine und wurden in Phosphorylierungspuffer [50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10% (v/v) Glycerol; 0,5 M KCl und 2 mM DTT] bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Die Reaktion wurde (wenn nicht anders angegeben) durch Zugabe von $100 \mu\text{M}$ [γ - ^{32}P]ATP (spezifische Radioaktivi-

tät = 0,94 Ci/mmol) und 110 μM MgCl_2 gestartet (Timmen et al., 2006). Zu bestimmten Zeitpunkten wurden dem Ansatz Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (Kapitel 2.5.2) gestoppt. 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 : 5.000 verdünnt) aufgetragen. Die Gele wurden bei 80°C in einem Geltrockner 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 5.0“ anhand des ATP-Standards quantifiziert.

Bestimmung der Kinaseaktivität Die Bestimmung der Kinaseaktivität der Hybridsensorkinasen LuxQ und LuxN erfolgte wie von Timmen et al. (2006) beschrieben. Für die *in vitro*-Phosphorylierung von LuxQ bzw. LuxN und den Phosphotransfer auf das Phosphotransferprotein LuxU wurden LuxQ- bzw. LuxN-haltige invertierte Membranvesikel des *E. coli*-Stamms TKR2000 in einer Konzentration von 7,5 mg/ml (LuxQ) bzw. 5 mg/ml (LuxN) und gereinigtes LuxU in einer Konzentration von 0,1 mg/ml im Reaktionsansatz verwendet. Das molare Verhältnis von Sensorkinase zu LuxU betrug etwa 1 : 30.

Bestimmung der Phosphataseaktivität Die *in vitro*-Dephosphorylierung von LuxU durch die Hybridsensorkinasen LuxN bzw. LuxQ erfolgte nach den Angaben von Timmen et al. (2006). LuxU (0,2 mg/ml im Reaktionsansatz) wurde *in vitro* durch LuxN-haltige Membranvesikel (15 mg/ml) phosphoryliert. Nach 10 min Inkubation wurden die Membranproteine durch Ultrazentrifugation (45.000 rpm, 15 min, 4°C) entfernt. Anschließend wurde der LuxU~P-haltige Überstand durch Gelfiltration über „Sephadex G25-NAP5“-Säulen (GE Healthcare), equilibriert mit Phosphorylierungspuffer, von freien Nukleotiden gereinigt. Der Elutionsfraktion von LuxU~P ($\sim 0,1$ mg/ml) wurde 110 μM MgCl_2 zugegeben. Sofern nicht anders angegeben wurde der Reaktionsansatz mit 2,5 mg/ml LuxN- bzw. 3,75 mg/ml LuxQ-haltigen Membranvesikeln inkubiert, so dass das molare Verhältnis von Sensorkinase zu LuxU wie bei der Bestimmung der Kinaseaktivität ungefähr 1 : 30 betrug.

Bestimmung des Einflusses von LuxP Zur Bestimmung des Einflusses des periplasmatischen Bindeproteins LuxP und Autoinduktor-2 auf die *in vitro*-Phosphorylierungsaktivitäten von LuxQ wurden LuxQ-haltige Membranvesikel mit gereinigtem LuxP (molares Verhältnis von LuxQ zu LuxP 1 : 30) gemischt. Der Ansatz wurde drei mal in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Membranen aufzubrechen und so eine Interaktion von LuxQ und LuxP zu ermöglichen.

***In vitro*-Phosphorylierung mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und anschließender Dünnschichtchromatographie** Für den Nachweis des durch die ATP-Hydrolyse bei der Autophosphorylierung der Hybridsensorkinasen entstandenen ADPs wurden LuxN- oder LuxQ-haltige Membranvesikel bzw. Kontrollvesikel (12 mg/ml in einem Gesamtvolumen von 50 μl) mit 100 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (spezifische Radioaktivität = 0,2 Ci/mmol) und 110 μM MgCl_2 inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50% (v/v) EtOH gestoppt. Membranproteine wurden durch Ultrazentrifugation (45.000 rpm, 15 min, 4°C) entfernt. Jeweils 5 μl des Reaktionsansatzes wurden auf eine PEI-Cellulose F TLC-Platte aufgetragen. Das Laufmittel bestand aus 2 M Ameisensäure und 0,5 M LiCl (Seifert et al., 2001). $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ wurden nach Exponierung auf einem „Storage Phospho Screen“ (Molecular Dynamics) mittels „PhosphoImager Storm 820“ (Molecular Dynamics) detektiert.

***In vitro*-Phosphorylierung von LuxO-haltigem Cytosol** Für die *in vitro*-Phosphorylierung von LuxO-haltigem Cytosol wurde wie in Kapitel 2.5.12 beschrieben phosphoryliertes LuxU hergestellt. Membranproteine wurden durch Ultrazentrifugation (45.000 rpm, 15 min, 4°C) entfernt und der LuxU~P-haltige Überstand durch Gelfiltration über „Sephadex G25-NAP5“-Säulen (GE Healthcare), equilibriert mit Phosphorylierungspuffer, von freien Nucleotiden gereinigt. Der Elutionsfraktion von LuxU~P (~0,1 mg/ml) wurde 110 μM MgCl_2 zugegeben.

LuxO-haltiges Cytosol (enthielt 200 mM KCl) wurde mit LuxU~P gemischt, so dass der Phosphorylierungsansatz (Gesamtvolumen 90 μl) 60 μl Cytosol und 30 μl Elutionsfraktion enthielt. LuxO-haltiges Cytosol wurde für 30 min mit phosphoryliertem LuxU inkubiert.

***In vitro*-Phosphorylierung mit ^{32}P Acetylphosphat** Für die Phosphorylierung von LuxO mit Acetylphosphat wurde ^{32}P 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]Orthophosphat (1 mCi) auf Eis unter Rühren inkubiert. 22 μl 98%iges Essigsäureanhydrid wurden langsam zugegeben und insgesamt 6 min auf Eis inkubiert. Mit 4 N LiOH wurde der pH-Wert neutralisiert und das gebildete [^{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 [^{32}P]Acetylphosphat in TEGD-Puffer [50 mM Tris/HCl, pH7,5; 5% (v/v) Glycerol; 0,1 mM EDTA und 1 mM DTT] wurde die Konzentration nach Lipman und Tuttle (1945) bestimmt. Die Ausbeute lag bei ca. 80-95%, die spezifische Radioaktivität des [^{32}P]Acetylphosphat betrug 10-13 mCi/mmol. Für die *in vitro*-Phosphorylierung wurden 40-80 mM [^{32}P]Acetylphosphat eingesetzt und die Inkubation der Proteine erfolgte bei 25°C im Thermoblock für bis zu 30 min.

2.5.13 AI-2 Bioassay

Die Biolumineszenz von *V. harveyi* Zellen wurde nach der Methode von Surette und Bassler (1998) bestimmt: Als Reporterstamm wurde *V. harveyi* MM77 verwendet. Der Stamm wurde ÜN in AB-Medium bei 30°C aerob kultiviert und danach 1:100 in frischem AB-Medium verdünnt. 90 μl der verdünnten Zellen und 10 μl zellfreier Kulturüberstand bzw. der zu untersuchenden Probe wurden in Mikrotiterplatten gegeben. Die Mikrotiterplatten wurden mit 175 rpm bei 30°C inkubiert (Mikrotiterplatteninkubator, Eppendorf). Die Lichtproduktion wurde in einem Luminometer (Centro LB 960, Berthold Technologies) gemessen.

2.5.14 ATPase-Aktivitätsmessung

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität von LuxO bzw. LuxO-K167A wurden nach dem Protokoll von Henkel et al. (1988) durchgeführt. Verschiedene Proteinkonzentrationen (0,5 - 2 μg in einem Endvolumen von 10 μl) wurden zusammen mit 10 μl 4fach ATPase-Puffer [200 mM Tris/HCl, pH 7,5, 40% (v/v) Glycerol, 10 mM MgCl_2] und 5 μl bidest in Mikrotiterplatten gemischt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 25 μl 2 mM ATP-Lösung wurde die Reaktion gestartet und nach 5 min Inkubation bei 37°C mit 200 μl Stoppreagenz [1 Teil Ammoniummolybdatlösung (5,72% (w/v) Ammoniumheptamolybdat in 6 N HCL), 1 Teil Polyvinylalkohollösung [2,32% (v/v) Polyvinylalkohol in $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$], 2 Teile Malachitgrünlö-

sung [0,0812% (w/v) Malachitgrün in $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$, 2 Teile $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$] gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze bei 37°C inkubiert bis eine Grünfärbung eintrat und die Absorption bei 620 nm (Referenzfilter 450nm) photometrisch (Sunrise Tecan) bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung des entstandenen Phosphats wurde eine Eichgerade mit 0 - 140 μM K_2HPO_4 erstellt.

2.6 Mathematische Modellierung des Lux-Systems

Sämtliche Gleichungen des mathematischen Modells des Lux-Systems wurden von Prof. Dr. Johannes Müller vom Zentrum Mathematik der Technischen Universität München, Dr. Christina Kuttler und Dr. Burkhard A. Hense vom Institut für Biomathematik und Biometrie der GSF erstellt. Vorgehensweise sowie Gleichungen sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

3 Ergebnisse

Viele Studien beschäftigten sich mit Prozessen, die Quorum sensing-gesteuert sind. Durch Ausschalten einzelner Gene wurden die an der Signaltransduktion beteiligten Gene identifiziert und mit Hilfe von Sequenzhomologie-Vergleichen Vermutungen zur Funktion der Genprodukte und entsprechende Modelle aufgestellt. Die biochemische Charakterisierung der Signaltransduktionsketten stand dabei nicht im Mittelpunkt. So beruhen nahezu alle Informationen über das Quorum sensing-System in *V. harveyi* auf genetischen Studien.

Biochemisch konnten bisher die Hybridsensorkinase LuxN und das Phosphotransferprotein LuxU charakterisiert (Timmen et al. 2006) werden. Des Weiteren wurde die Topologie von LuxN von Jung et al. (2007) aufgeklärt. Ebenfalls wurden die Hybridsensorkinase LuxQ und der Antwortregulator LuxO in unterschiedlichen Expressionssystemen heterolog überproduziert, aber noch nicht weiter charakterisiert (Timmen, 2005).

Ziel dieser Arbeit war die Vervollständigung der *in vitro*-Rekonstruktion der komplexen Signaltransduktionskaskade des Quorum sensing-Systems in *V. harveyi*. Anhand der biochemischen Charakterisierung insbesondere von der Hybridsensorkinase LuxPQ und dem Antwortregulator LuxO sollte untersucht werden, wie die Reize auf molekularer Ebene integriert werden.

3.1 Biochemische Untersuchungen der Hybridsensorkinase LuxQ

Für LuxQ wurde anhand genetischer Untersuchungen postuliert, dass die konservierten Reste Histidin 492 und Aspartat 785 eine essentielle Rolle bei der Autophosphorylierung sowie beim Phosphotransfer einnehmen.

LuxQ sollte heterolog in *E. coli* überproduziert und invertierte Membranvesikel präpariert werden. Durch *in vitro*-Phosphorylierungen sollten die enzymatischen Aktivitäten von LuxQ charakterisiert und die postulierten phosphatakzeptierenden Reste Histidin 492 und Aspartat 785 bestätigt werden.

3.1.1 Heterologe Expression von LuxQ

Auf Grundlage der Gen-Sequenz wurde LuxQ von *V. harveyi* mit verschiedenen Internet-Analyse-Programmen des Expasy-Servers in Hinblick auf die vermutliche Masse und die

Lokalisation in der Zelle analysiert. LuxQ hatte demnach mit 867 AS eine relative Molekülmasse von 97,8 kDa. Zur Verankerung in der Cytoplasmamembran der Zelle enthielt LuxQ nach Sekundärstrukturanalyse zwei hydrophobe Bereiche, die eine große periplasmatische Schleife mit zwei PAS-Domänen einschließen, an welche das periplasmatische Bindeprotein LuxP konstitutiv gebunden ist (Neiditch et al., 2005).

Bisher konnten nur geringere Mengen von LuxQ heterolog in *E. coli* produziert werden als von der Hybridsensorkinase LuxN. Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit, die Überproduktion von LuxQ in *E. coli* zu optimieren. Mit dem Expressionssystem TKR2000/pPV5-1 (Walderhaug et al., 1992), in dem die Expression von *kdpD* unter der Kontrolle des *tac* Promotors steht, konnte die Sensorkinase KdpD des Zwei-Komponentensystems KdpD-KdpE von *E. coli* mit sehr guter Ausbeute als Membran-integriertes Protein überproduziert werden. Bei dem Vektor pPV5-1 handelte es sich um ein pKK223-3-Derivat, das neben der codierenden Sequenz von KdpD ca. 100 bp des stromaufwärts gelegenen Bereiches des *kdpD*-Gens enthielt.

Da dieser Bereich die Expression und die Lokalisation von KdpD in der Membranfraktion zu begünstigen schien, wurden Plasmide konstruiert, die neben den Genen der Hybridsensorkinase LuxQ den stromaufwärts von *kdpD* gelegenen Bereich enthielten. Hierfür wurde zuerst eine KpnI-Schnittstelle in dem Vektor pPV5-1 vor das Start-Kodon von KdpD eingefügt, der resultierende Vektor wurde als pPV5-10 bezeichnet. Das *kdpD*-Gen wurde durch *luxQ* bzw. *luxN* ersetzt, bei der Klonierung wurden den Genen C-terminal sechs bzw. zehn Kodons für Histidin angehängt, die bei der Produktion einen sogenannten „His-Tag“ bildeten. Die Vektoren wurden als pNKQ (LuxQ) bzw. pNKN (LuxN) bezeichnet. Um die konservierten Histidin- und Aspartatreste von LuxQ auf ihre Funktionalität beim Phosphotransfer zu untersuchen, wurden die entsprechenden Kodons mutiert (*luxQ-D785N* (pNKQ-D785N), *luxQ-H492Q* (pNKQ-H492Q)).

Die heterologe Überproduktion fand in dem *E. coli*-Stamm TKR2000 statt, der sich aufgrund der ATPase-Deletion besonders für *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente mit Membranproteinen eignete. Die Immunodetektion des His-Tags zeigte eine deutliche Überproduktion von LuxQ und LuxN (Daten nicht gezeigt), allerdings wurde LuxQ auch mit diesem Expressionssystem in geringeren Mengen produziert als LuxN.

3.1.2 Lokalisation von LuxQ und Präparation von Membranvesikeln

Zur Expression in dem Stamm TKR2000, transformiert mit den Plasmiden pNKQ, pNKQ-H492Q, pNKQ-D785N bzw. pNKN, wurden die Zellen bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von ca. 1 kultiviert, pelletiert und fraktioniert (vergl. Kapitel 2.5.7). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, LuxQ bzw. LuxN wurden immunologisch mit dem monoklonalen Antikörper gegen den His-Tag im Westernblot detektiert.

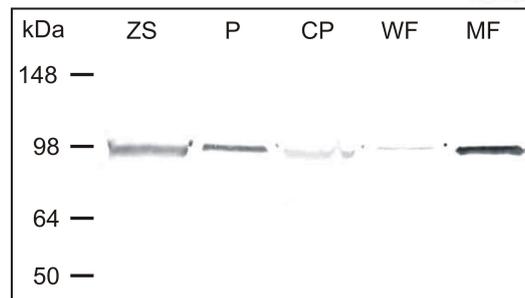


Abbildung 3.1: Lokalisation der Hybridsensorkinase LuxQ. Gezeigt ist die immunologische Detektion von LuxQ-6His (97,8 kDa) in den verschiedenen Zellfraktionen von *E. coli* TKR2000/pNKQ nach 10%iger SDS-PAGE. *ZS* Zellsuspension. *P* Pellet der niedertourigen Zentrifugation. *CP* Cytoplasma. *WF* Überstand nach Waschen mit niederionigem Puffer. *MF* Membranfraktion.

Abbildung 3.1 zeigt die Lokalisation von LuxQ in den verschiedenen Zellfraktionen. Ein geringer Teil der Hybridsensorkinase LuxQ war im Pellet der niedertourigen Zentrifugation zu finden, der größte Teil jedoch war wie erwartet in der Membranfraktion lokalisiert. Das nachgewiesene LuxQ im Pellet der niedertourigen Zentrifugation war vermutlich auf nicht aufgeschlossene Zellen zurückzuführen. Die Lokalisation der Sensorkinase LuxQ ist hier stellvertretend für die Lokalisation von LuxQ-H492Q, LuxQ-D785N und LuxN dargestellt, die ebenfalls nahezu vollständig in der Membranfraktion vorlagen.

3.1.3 Autokinaseaktivität von LuxQ

Die Autophosphorylierung von LuxQ sollte analog zu der von LuxN (Timmen et al., 2006) nachgewiesen werden, und die Rolle des konservierten Histidinrests 492 untersucht werden. Hierzu wurden Phosphorylierungsexperimente durchgeführt (vergl. Kapitel 2.5.12). Der Phosphorylierungsansatz enthielt 1,6 μM LuxQ, LuxQ-H492Q bzw. LuxQ-D785N. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μM [γ - ^{32}P]ATP und 110 μM MgCl_2 gestartet. Proben

wurden nach 0,16 / 0,5 / 1 / 2 / 5 und 15 min genommen, die Proteine wurden durch 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt (32 pmol pro Spur). Es konnte kein phosphoryliertes Protein im Autoradiogramm detektiert werden, das entsprechend der relativen Molekülmasse LuxQ zuzuordnen war und nicht in dem Ansatz mit LuxQ-H492Q zu finden war. Auch die alkali-stabilere Phosphoamidatbindung (His~P) von LuxQ-D785N-haltigen Membranvesikeln konnte nicht detektiert werden. Die Zugabe von äquimolaren Mengen (0,5 M) anderer Salze (NaCl, CaCl₂) oder kompatibler Solute (Trehalose, Betain, Glutamat, Prolin, Citrat) führte zu keiner sichtbaren Autophosphorylierung (Daten nicht gezeigt).

Die Autophosphorylierung konnte somit nicht direkt nachgewiesen werden. Um eine Autophosphorylierung von LuxQ indirekt durch die Menge des durch ATP-Hydrolyse entstehenden ADPs nachzuweisen, wurden LuxQ- und LuxQ-H492Q-haltige Membranvesikel sowie Kontrollvesikel (Membranvesikel ohne überproduzierte Sensorkinase) als Kontrolle wie in Seifert et al. (2001) beschrieben mit [α -³²P]ATP inkubiert (vergl. Kapitel 2.5.12). Der Ansatz enthielt 12 mg/ml Membranvesikel in einem Gesamtvolumen von 50 μ l. Die Reaktion wurde nach 0,16 / 0,5 / 1 / 2 und 5 min durch Zugabe von 50% Ethanol gestoppt. Anschließend wurden die Membranproteine durch Ultrazentrifugation entfernt und die Proben durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Radioaktiv markiertes [α -³²P]ATP und [α -³²P]ADP konnten detektiert werden, die Rf-Werte (0,07 für ATP und 0,64 für ADP) stimmten mit den von Catz et al. (2001) beschriebenen Werten überein (0,08 für ATP und 0,60 für ADP). Es konnte jedoch keine LuxQ-spezifische ADP-Produktion bzw. kein LuxQ-spezifischer ATP-Verbrauch nachgewiesen werden, da auch die Kontrollvesikel einen hohen Umsatz an ATP zeigten (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 LuxQ-spezifische Phosphorylierung von LuxU

Analog zu der sehr schwachen Autophosphorylierung von LuxN (Timmen et al., 2006) und der stabilen Phosphorylierung des HPt-Proteins LuxU wurde die Autophosphorylierung indirekt durch den Phosphotransfer auf LuxU nachgewiesen. Der Phosphorylierungsansatz für die Kinaseaktivität enthielt 0,8 μ M LuxQ und 25 μ M gereinigtes LuxU, die beiden Proteine wurden somit in einem molaren Verhältnis von 1 : 30 eingesetzt, was dem typischen Verhältnis von membranständigen Histidinkinasen und deren löslichen Partnern entsprach (Kremling et al., 2004). Das Verhältnis der beiden Proteine zueinander wurde durch quan-

titativen Westernblot bestätigt. Die Reaktion wurde mit $100 \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ gestartet, zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen.

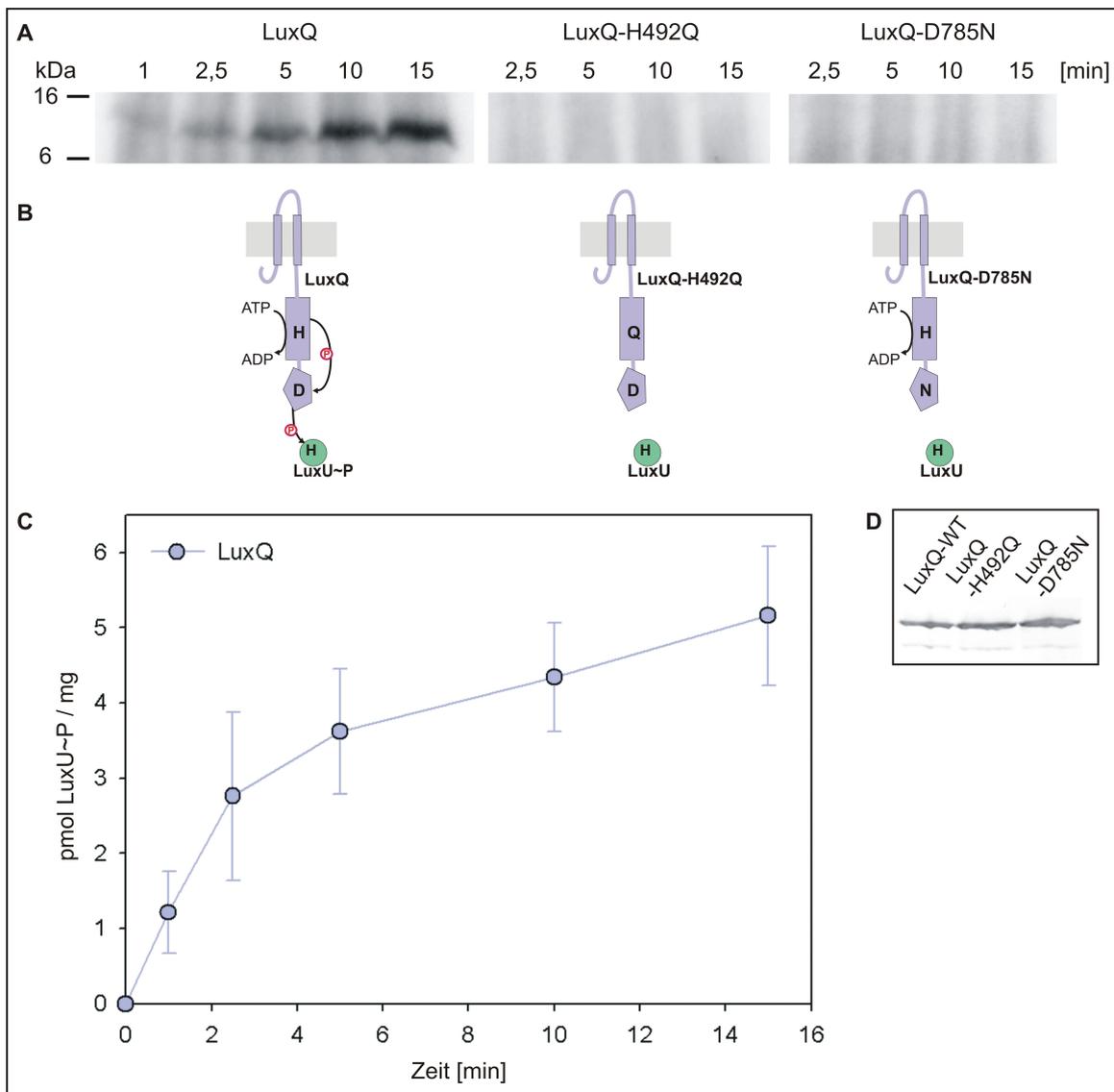


Abbildung 3.2: LuxQ-abhängige Phosphorylierung von LuxU. LuxQ-, LuxQ-H492Q bzw. LuxQ-D785N-haltige Membranvesikel wurden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert (vergl. Kapitel 2.5.12). Pro Spur wurden 16 pmol Sensorkinase und 500 pmol gereinigtes LuxU eingesetzt. **A** Autoradiogramm. **B** Modell der Kinaseaktivität. **C** Quantifizierung von phosphoryliertem LuxU. **D** Westernblot.

Das Autoradiogramm in Abbildung 3.2A zeigt die LuxQ-spezifische Akkumulation von phosphoryliertem LuxU. Nach 10 minütiger Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ lagen 0,1% LuxU phosphoryliert vor. Die Quantifizierung ist in Abb. 3.2C graphisch dargestellt. Die aufgrund der Initialgeschwindigkeit der LuxU-Phosphorylierung berechnete spezifische Kinaseaktivität von LuxQ betrug $0,27 \text{ pmol}/\text{min} \times \text{mg}$ Membranprotein.

Wie auch schon für LuxN beschrieben (Timmen, 2005) war die Kinaseaktivität von LuxQ Kalium-abhängig. Es wurde weniger LuxU phosphoryliert, wenn niedrigere KCl-Konzentrationen (20 - 200 mM) eingesetzt wurden. Wurde Kaliumchlorid durch Natriumchlorid ersetzt, wurde LuxU ebenfalls mit einer deutlich niedrigeren Rate phosphoryliert (Daten nicht gezeigt).

Um zu zeigen, dass die konservierten Reste Histidin 492 und Aspartat 785 am Phosphotransfer von LuxQ auf LuxU beteiligt sind, wurden ebenfalls LuxQ-H492Q- und LuxQ-D785N-haltige Membranvesikel mit gereinigtem LuxU inkubiert. Da geringere Mengen LuxQ-D785N in die Membranvesikel eingebaut wurden, wurde dementsprechend die Menge Membranprotein im Phosphorylierungsansatz angepasst. Durch Immunodetektion wurde nachgewiesen, dass äquimolare Mengen LuxQ, LuxQ-H492Q und LuxQ-D785N eingesetzt wurden (Abb. 3.2D). Der Phosphotransfer von LuxQ auf LuxU war nur mit Wildtyp-LuxQ nachweisbar. Dadurch konnte bestätigt werden, dass die vorhergesagten Phosphat-akzeptierenden Reste von LuxQ für den Phosphotransfer essentiell sind, was zu dem in Abb. 3.2B dargestellten Modell führte: wurde der konservierte Histidinrest gegen Glutamin ausgetauscht, konnte keine Autophosphorylierung und somit keine Phosphotransfer auf LuxU stattfinden. Wurde der konservierte Aspartatrest gegen Asparagin ausgetauscht, konnte ebenfalls kein Phosphotransfer zu LuxU stattfinden. Vermutlich fand eine Autophosphorylierung an dem konservierten Histidinrest statt, diese konnte aber experimentell nicht nachgewiesen werden.

3.1.5 Phosphataseaktivität von LuxQ

Für LuxN konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus von LuxU auch von der Phosphataseaktivität der Hybridsensorkinase LuxN abhängt (Timmen et al., 2006). Entsprechend sollte die Phosphataseaktivität von LuxQ charakterisiert werden. Dazu wurde LuxU, wie in Kapitel 2.5.12 beschrieben, mit LuxN-haltigen Membranvesikeln phosphoryliert und von Membranproteinen und freien Nukleotiden gereinigt. Phosphoryliertes LuxU wurde anschließend mit Membranvesikeln, welche LuxQ-Derivate enthielten, inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Menge an phosphoryliertem LuxU nach SDS-PAGE im Autoradiogramm bestimmt. Der Testansatz enthielt 12,5 μ M LuxU und 0,4 μ M LuxQ, was einem Verhältnis von etwa 1 : 30 entsprach. Es konnte gezeigt werden, dass LuxQ neben der Kinaseaktivität eine Phosphataseaktivität besaß (Abb. 3.3). Die Menge an

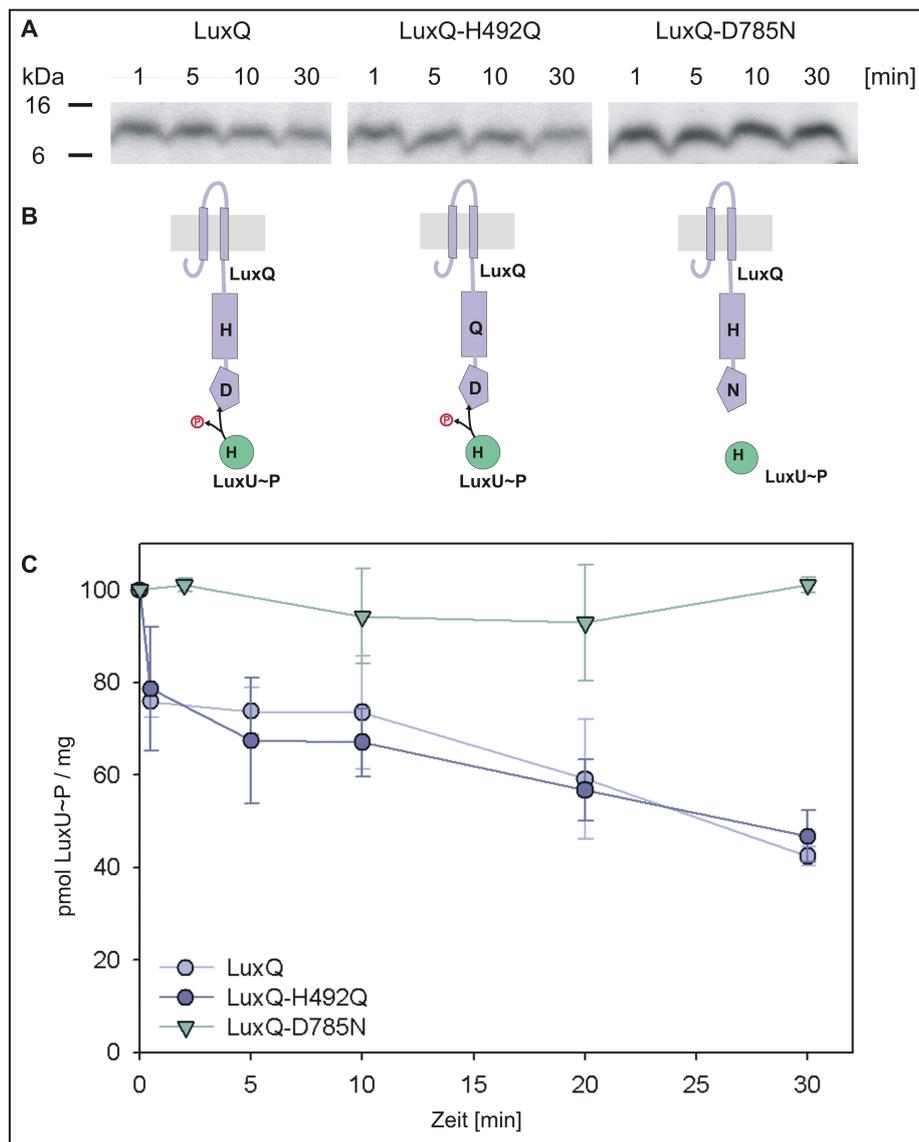


Abbildung 3.3: LuxQ-abhängige Dephosphorylierung von LuxU. Phosphoryliertes LuxU wurde wie in Kapitel 2.5.12 beschrieben hergestellt. Durch Zugabe der Hybridsensorkinasen LuxQ, LuxQ-H492Q bzw. LuxQ-D785N wurde die Dephosphorylierung gestartet und nach den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Pro Spur wurden 8 pmol Sensorkinase und 250 pmol LuxU~P eingesetzt. **A** Autoradiogramm. **B** Modell der Dephosphorylierung durch LuxQ. **C** Quantifizierung von phosphoryliertem LuxU, der Mittelwert der Menge an mit LuxQ-D785N inkubiertem LuxU~P wurde gleich 100% gesetzt.

phosphoryliertem LuxU nahm in Gegenwart von LuxQ zeitabhängig ab (Abb. 3.3A). Hierbei kam es zu einer schnellen Dephosphorylierung innerhalb der ersten Minute, nach dieser Zeit lagen nur noch ~80% LuxU im Vergleich zum Anfangswert phosphoryliert vor (Abb. 3.3C). Nach der schnellen Initialrate innerhalb der ersten Minute lief die Dephosphorylierung von LuxU langsamer ab. Es konnte anhand der schnellen Initialgeschwindigkeit eine spezifische Dephosphorylierungsrate von 0,1 pmol/min \times mg bestimmt werden.

Die Inkubation von phosphoryliertem LuxU mit LuxQ-H492Q-haltigen Membranvesikeln führte zu einer mit dem Wildtyp-LuxQ vergleichbaren Dephosphorylierung (Abb. 3.3C). Das konservierte Histidin, das eine entscheidende Rolle bei der Kinaseaktivität von LuxQ spielt, ist für die Phosphataseaktivität demnach nicht essentiell. Wurde aber phosphoryliertes LuxU mit LuxQ-D785N-haltigen Membranvesikeln inkubiert, blieb die Menge an phosphoryliertem LuxU konstant (Abb. 3.3C). Durch den Austausch des konservierten Aspartats in LuxQ verfügt das Protein somit über keine Phosphataseaktivität. Dies zeigte, dass Aspartat 785 sowohl für die Phosphorylierung als auch für die Dephosphorylierung von LuxU wichtig ist (Abb. 3.3B). Zusätzlich konnte hiermit gezeigt werden, dass es sich bei der Dephosphorylierung von LuxU um eine LuxQ-spezifische Reaktion handelte.

3.2 Einfluss des periplasmatischen Bindeproteins LuxP und AI-2 auf LuxQ

Der Autoinduktor-2 wird nicht direkt von der membranständigen Hybridsensorkinase LuxQ detektiert. Die Wahrnehmung findet indirekt durch das periplasmatische Bindeprotein LuxP statt. LuxP ist unabhängig von AI-2 konstitutiv an LuxQ gebunden (LuxPQ), durch die Bindung von AI-2 an LuxP wird eine assymetrische Dimerisierung der periplasmatischen Domänen verursacht ($[\text{LuxPQ}_p]_2$). Diese Konformationsänderung wird auf die cytoplasmatische Domäne des Dimers übertragen, was die *trans* Autophosphorylierung verhindert (Neiditch et al., 2006).

Um den Einfluss von AI-2 auf die enzymatischen Aktivitäten von LuxQ *in vitro* zu untersuchen, mussten daher sowohl AI-2 als auch LuxP dem Phosphorylierungsansätzen zugegeben werden.

3.2.1 Heterologe Überproduktion und Reinigung von LuxP

Es konnte gezeigt werden, dass *V. harveyi*-LuxP heterolog in *E. coli* produziert und gemeinsam mit gebundenem *E. coli*-Autoinduktor-2 gereinigt und kristallisiert werden konnte (Chen et al., 2002). Diese Tatsache wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um sowohl AI-2-haltiges LuxP (LuxP/AI-2) als auch AI-2-freies LuxP (LuxP) heterolog überzuproduzieren und zu reinigen. Die Expression von *luxP* erfolgte heterolog in dem *luxS*-positiven *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pLysS bzw. in dem *luxS*-negativen *E. coli*-Stamm MDAI2, je-

weils transformiert mit dem Plasmid pGEX-LuxP. Die Kultivierung erfolgte unter Zusatz von 1 mM Borsäure, um die Bildung des Bor-haltigem AI-2 zu erhöhen. Die Reinigung von LuxP/AI-2 bzw. LuxP erfolgte nach dem Protokoll von Neiditch et al. (2005) (vergl. Kapitel 2.5.11).

Um zu zeigen, dass AI-2 an LuxP gebunden war, wurden jeweils 3,5 nmol LuxP/AI-2 (kultiviert mit bzw. ohne die Zugabe von 1 mM Borsäure) und LuxP für 10 min bei 50°C denaturiert und ultrafiltriert (Gesamtvolumen von 100 μ l). Mit den Filtraten wurde ein Lux-Assay durchgeführt und die Zunahme der Biolumineszenz gemessen (vergl. Kapitel 2.5.13). Als Reporterstamm wurde der *V. harveyi*-Stamm MM77 verwendet. Bei diesem Stamm führt die Zugabe von HAI-1 oder AI-2 zu einer Induktion der Biolumineszenz. Als Positivkontrolle wurde die Induktion der Biolumineszenz durch Zugabe von Zell-freiem Kulturüberstand von *V. harveyi* BB120 (Wildtyp) beobachtet, als Negativkontrolle wurde AB-Medium zugegeben.

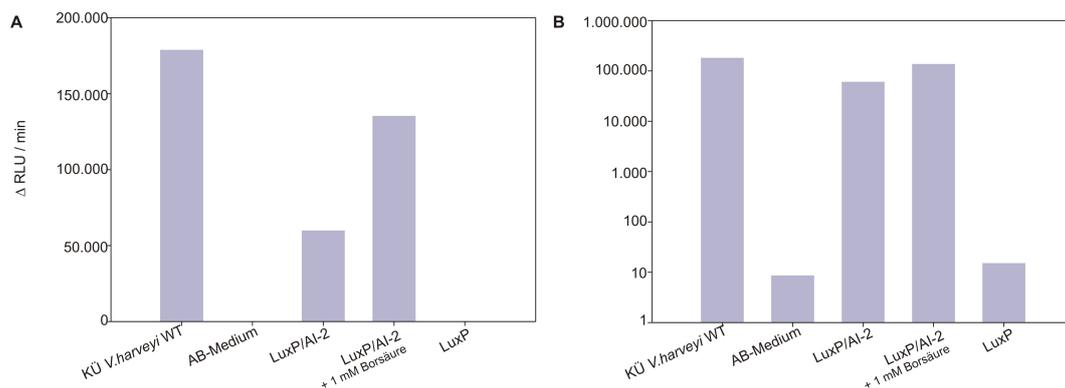


Abbildung 3.4: AI-2 Aktivitätsassay. 3,5 nmol LuxP/AI-2 bzw. AI-2-freies LuxP wurden 10 min bei 50°C denaturiert und ultrafiltriert. Mit den Filtraten, Kulturüberstand von *V. harveyi* WT sowie AB-Medium wurde wie in Kapitel 2.5.13 beschrieben ein AI-2-Aktivitätsassay durchgeführt. Die Induktion der Biolumineszenz in Δ RLU/min ist graphisch **A** linear und **B** logarithmisch dargestellt. *RLU* Relative Lichteinheiten.

Die zeitabhängige Zunahme der Biolumineszenz ist in Abbildung 3.4A und B wiedergegeben (Δ RLU/min). Es konnte gezeigt werden, dass das Filtrat von LuxP, überproduziert in dem *luxS*-positiven Stamm BL21(DE3)/pLysS, die Biolumineszenz induzierte (135.181 Δ RLU/min), während das Filtrat von LuxP, überproduziert in dem *luxS*-negativen Stamm MDAI2, keine Biolumineszenz induzierte. Die sehr geringe Zunahme der Biolumineszenz durch das Filtrat von LuxP, überproduziert in dem Stamm MDAI2, entsprach der

Zunahme der Biolumineszenz in der Negativkontrolle und ist auf den CAI-1-abhängige Signalweg zurückzuführen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der AI-2-Gehalt von LuxP, überproduziert in dem *luxS*-positiven Stamm BL21(DE3)/pLysS, durch die Zugabe von 1 mM Borsäure während der Kultivierung erhöht werden konnte. Äquimolare Mengen LuxP/AI-2 zeigten eine 2,3 fach höhere Induktion der Biolumineszenz, wenn dem Medium Borsäure zugegeben wurde. Borsäure schien unter den normalen Kultivierungsbedingungen der limitierende Faktor in der AI-2-Synthese zu sein. Das Wachstum der *E. coli*-Zellen wurde durch die Zugabe nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Einfluss von LuxP und AI-2 auf die Kinaseaktivität von LuxQ

Um den Einfluss von LuxP/AI-2 auf die LuxQ Kinaseaktivität zu untersuchen, wurden Phosphorylierungsexperimente durchgeführt. Die Ansätze enthielten neben LuxQ-haltigen Membranvesikeln und gereinigtem LuxU zusätzlich 25 μM gereinigtes LuxP/AI-2, so dass LuxQ, LuxU und LuxP in einem molaren Verhältnis von 1 : 30 : 30 vorlagen. Die Ansätze wurden mehrmals schockgefroren und aufgetaut, um die invertierten Membranvesikel aufzubrechen und so eine Bindung von LuxP an die periplasmatische PAS-Domäne von LuxQ zu ermöglichen. Um auszuschließen, dass ein Einfluss von LuxP auf LuxQ durch die zusätzliche Menge an Protein verursacht wurde, wurde parallel der Einfluss von 25 μM LuxP, überproduziert in dem *luxS*-negativen *E. coli*-Stamm MDAI2, auf die Kinaseaktivität von LuxQ untersucht. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 100 μM [γ - ^{32}P]ATP gestartet.

Abbildung 3.5A zeigt das Autoradiogramm des Phosphotransfers von LuxQ auf LuxU in Anwesenheit von 25 μM LuxP/AI-2 sowie 25 μM LuxP. Es konnte gezeigt werden, dass deutlich weniger phosphoryliertes LuxU vorlag, wenn AI-2-haltiges LuxP zu dem Phosphorylierungsansatz zugegeben wurde. Dies ist in dem Modell in Abbildung 3.5B durch die Pfeilstärke und Größe von LuxU~P dargestellt. Die Kinaseaktivität wurde auf diese Weise um ca. 40% reduziert. Wurde aber AI-2-freies LuxP zugegeben, wurde LuxU mit einer gleichen Rate phosphoryliert, wie wenn LuxQ ohne LuxP vorlag. Des Weiteren konnte kein Einfluss von LuxP/AI-2 auf die Kinaseaktivität von LuxN gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass es sich bei der beobachteten Inhibition der Phosphorylierungsrate von LuxQ auf LuxU um eine spezifische Inhibition durch den an

LuxP gebundenen AI-2 handelte. Abb. 3.5B zeigt das Modell der LuxQ-Kinaseaktivität in Anwesenheit von LuxP/AI-2 bzw. LuxP.

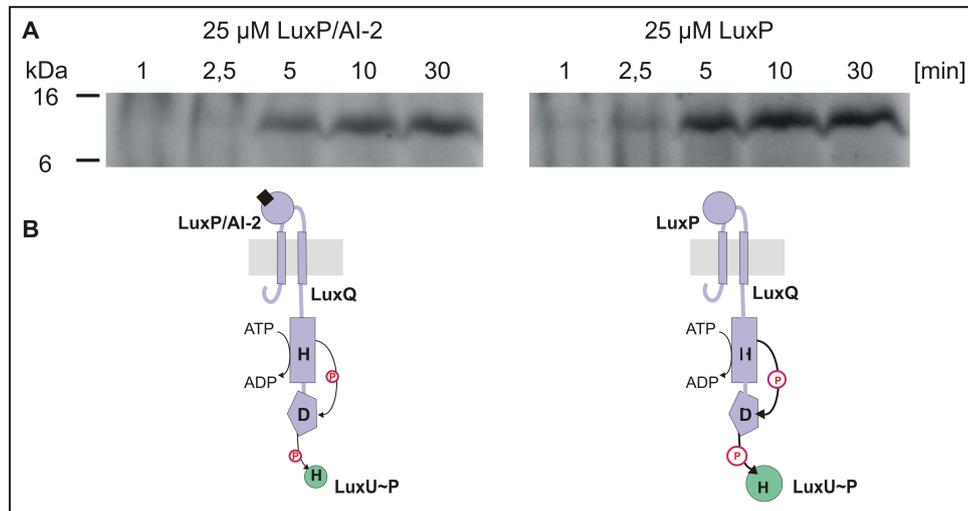


Abbildung 3.5: Kinaseaktivität von LuxQ in Anwesenheit von LuxP/AI-2 und LuxP. LuxQ-haltige Membranvesikel wurden zusammen mit gereinigtem LuxU und 25 μ M LuxP/AI-2 bzw. AI-2 freiem LuxP gemischt, mehrmals schockgefroren und aufgetaut. Der Ansatz wurde mit 100 μ M [γ - 32 P]ATP inkubiert und nach den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen. Pro Spur wurden 16 pmol LuxQ, 500 pmol LuxU und 500 pmol LuxP/AI-2 bzw. AI-2 freies LuxP eingesetzt. **A** Autoradiogramm. **B** Modell des Phosphotransfers.

Um den Einfluss des Signalmoleküls AI-2 auf die enzymatische Aktivität von LuxQ genauer zu untersuchen, wurden LuxQ-haltige Membranvesikel zusammen mit variierenden Konzentrationen gereinigtem LuxP/AI-2, überproduziert in dem *luxS*-positiven Stamm BL21(DE3)/pLysS, inkubiert. Anhand der Quantifizierung von phosphoryliertem LuxU konnte die spezifische Phosphorylierungsrate (pmol/ min \times mg Protein) für die unterschiedlichen Konzentrationen LuxP/AI-2 bestimmt werden. In Abbildung 3.6 sind die Initialgeschwindigkeiten (Angaben in Prozent bezogen auf die Geschwindigkeit in Abwesenheit von LuxP/AI-2) der Phosphorylierung von LuxU durch LuxQ in Abhängigkeit der LuxP/AI-2-Konzentration aufgetragen. Es war eine Abnahme der Phosphorylierungsrate mit steigender LuxP/AI-2-Konzentration zu erkennen. Dabei sank die Geschwindigkeit durch Zugabe von 25 μ M LuxP/AI-2 auf ein Minimum von ca. 60 %. Eine halbmaximale Inhibition wurde durch die Zugabe von ca. 5 μ M LuxP/AI-2 erreicht.

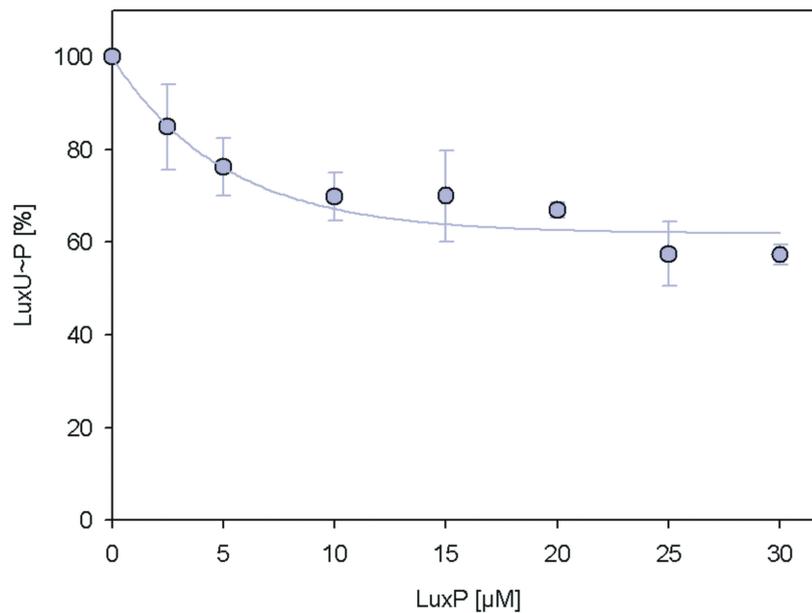


Abbildung 3.6: Einfluss von LuxP/AI-2 auf die LuxQ-abhängige Phosphorylierung von LuxU. LuxQ-haltige Membranvesikel wurden zusammen mit gereinigtem LuxU und unterschiedlichen Konzentrationen LuxP/AI-2 gemischt, mehrmals schockgefroren und aufgetaut. Die Ansätze wurden mit $100 \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert und die Initialgeschwindigkeiten bestimmt. Die Initialgeschwindigkeiten der Phosphorylierung von LuxU durch LuxQ sind gegen die LuxP/AI-2-Konzentration aufgetragen. Die Initialgeschwindigkeit in Abwesenheit von LuxP/AI-2 wurde gleich 100% gesetzt.

3.2.3 Einfluss von LuxP und AI-2 auf die Phosphataseaktivität von LuxQ

Eine weitere Möglichkeit, die Menge an phosphoryliertem LuxU zu regulieren, wäre ein Einfluss des Autoinduktors auf die Phosphataseaktivität der Hybridsensorkinasen. Um dies zu untersuchen, wurde die LuxQ-Phosphataseaktivität in Gegenwart von AI-2-haltigem und AI-2-freiem LuxP bestimmt. LuxU wurde wie in Kapitel 2.5.12 beschrieben phosphoryliert und von Membranproteinen und freien Nukleotiden gereinigt. Phosphoryliertes LuxU wurde mit LuxQ-haltigen Membranvesikeln, die vorher mit bzw. ohne LuxP/AI-2 oder LuxP gemischt und mehrmals schockgefroren wurden, bei 25°C inkubiert. Die drei Testansätze enthielten jeweils $13 \mu\text{M}$ LuxU, $0,8 \mu\text{M}$ LuxQ und gegebenenfalls $13 \mu\text{M}$ LuxP bzw. LuxP/AI-2. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Menge an phosphoryliertem LuxU bestimmt.

Abbildung 3.7 zeigt die zeitabhängige Abnahme an phosphoryliertem LuxU. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphataseaktivität von LuxQ nicht durch die Anwesenheit von LuxP und AI-2 beeinflusst wurde. Alle Versuchsansätze führten zu einer für LuxQ typischen Dephosphorylierungsrate von LuxU ($0,1 \text{ pmol}/\text{min}$ x mg Membranprotein).

LuxP ohne gebundenen Autoinduktor-2 hatte somit weder einen Einfluss auf die Kinase- noch auf die Phosphataseaktivität. Nur wenn LuxP in Komplex mit AI-2 vorlag, war eine Beeinflussung der LuxQ-Aktivität zu beobachten. Die AI-2-abhängige Regulation von LuxQ fand über eine Reduktion der Kinaseaktivität statt, während die Phosphataseaktivität von LuxQ unabhängig von der Anwesenheit von LuxP/AI-2 war.

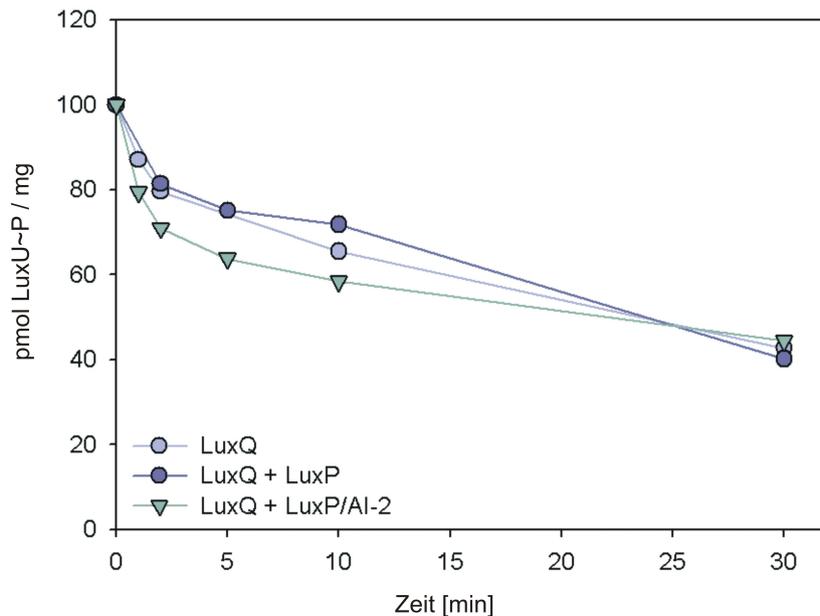


Abbildung 3.7: Einfluss von LuxP bzw. LuxP/AI-2 auf die Phosphataseaktivität von LuxQ. Phosphoryliertes LuxU wurde wie in Kapitel 2.5.12 beschrieben hergestellt. LuxQ-haltige Membranvesikel und ggf. LuxP/AI-2 bzw. AI-2-freies LuxP wurden gemischt, mehrmals schockgefroren und aufgetaut. Die Dephosphorylierungen wurden durch Zugabe von LuxQ, LuxQ und LuxP/AI-2 bzw. LuxQ und LuxP gestartet. Die Mengen an LuxU~P wurden zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

3.3 Biochemischer Vergleich der Hybridsensorkinasen LuxQ und LuxN

Um die Kinaseaktivitäten und die Phosphataseaktivitäten von LuxQ und LuxN zu vergleichen, wurde mittels quantitativem Westernblot gleiche Mengen der Sensorkinasen eingestellt. Da unterschiedliche Mengen Membranprotein den Ansätzen zugefügt werden mussten, um äquimolare Mengen LuxQ und LuxN zu erhalten, wurde die Proteinkonzentration beim Vergleich der Aktivitäten nicht berücksichtigt. Die Einheit der Enzymaktivitäten ist daher in *pmol/min* angegeben.

Ebenfalls wurde der Einfluss der Autoinduktoren auf die entsprechenden Sensorkinasen miteinander verglichen. Neben Aussagen über das jeweilige Kinase-zu-Phosphatase-Verhältnis der Hybridsensorkinasen sollte die Signalstärke von HAI-1 und AI-2 verglichen werden.

3.3.1 Vergleich der Kinaseaktivitäten

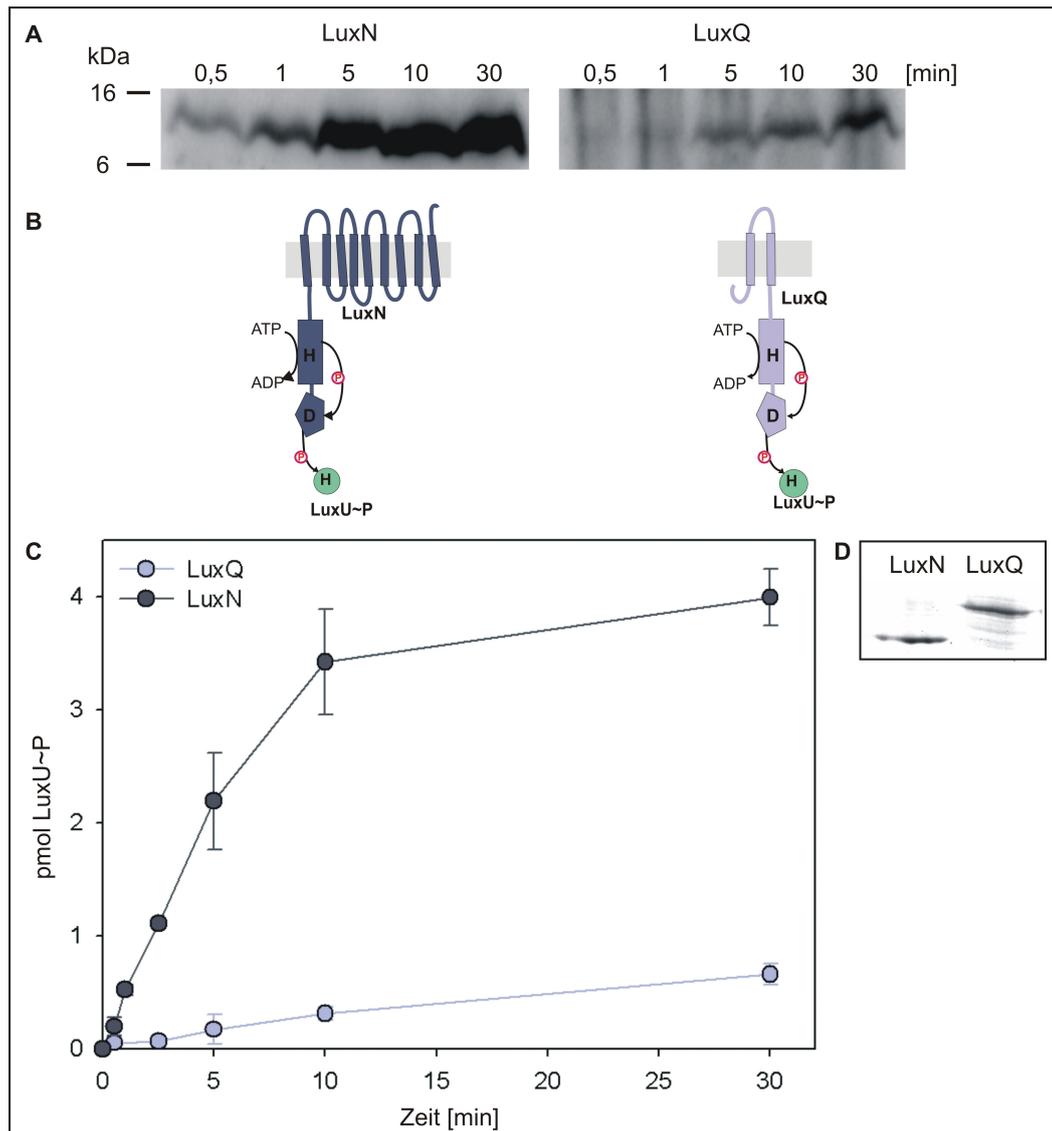


Abbildung 3.8: Vergleich der LuxQ- und LuxN-abhängigen Phosphorylierung von LuxU. Gleiche molare Mengen LuxQ bzw. LuxN (16 pmol/Spur) und gereinigtes LuxU (500 pmol/Spur) wurden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert (vergl. Kapitel 2.5.12). **A** Autoradiogramm. **B** Modell der Kinaseaktivität. **C** Quantifizierung von phosphoryliertem LuxU. **D** Westernblot.

Die LuxN- und LuxQ-spezifische Phosphorylierung von LuxU (Abb. 3.8B) wurde *in vitro* untersucht, die Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 gezeigt. Das Autoradiogramm der Phos-

phorylierungsexperimente (Abb. 3.8A) zeigt, dass mehr LuxU phosphoryliert vorlag, wenn LuxN anwesend war. Dies konnte durch Quantifizierung der Menge an phosphoryliertem LuxU und der graphischen Darstellung bestätigt werden (Abb. 3.8C). Die Kinaseaktivität von LuxN (0,44 pmol/min) war um ein zehnfaches höher als die von LuxQ (0,04 pmol/min). LuxN besitzt somit einen größeren Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von LuxU als LuxQ. Im Westernblot ist zu sehen, dass äquimolare Mengen LuxN und LuxQ eingesetzt wurden (Abb. 3.8D). Abb. 3.8B zeigt das Modell der LuxQ- und LuxN-Kinaseaktivität.

Des Weiteren sollte der K_m -Wert für ATP von LuxQ bestimmt werden. Für die Autokinaseaktivität von LuxN wurde ein K_m -Wert für ATP von 555 μM bestimmt (Timmen et al. 2006). Da bisher keine Autophosphorylierung von LuxQ gezeigt werden konnte, sollte der K_m -Wert für ATP anhand des Phosphotransfers von LuxQ auf LuxU bestimmt werden. Um die Werte mit LuxN zu vergleichen, wurde durch entsprechende Phosphorylierungsexperimente ebenfalls der K_m -Wert für ATP von LuxN anhand der LuxU-Phosphorylierungsrate bestimmt.

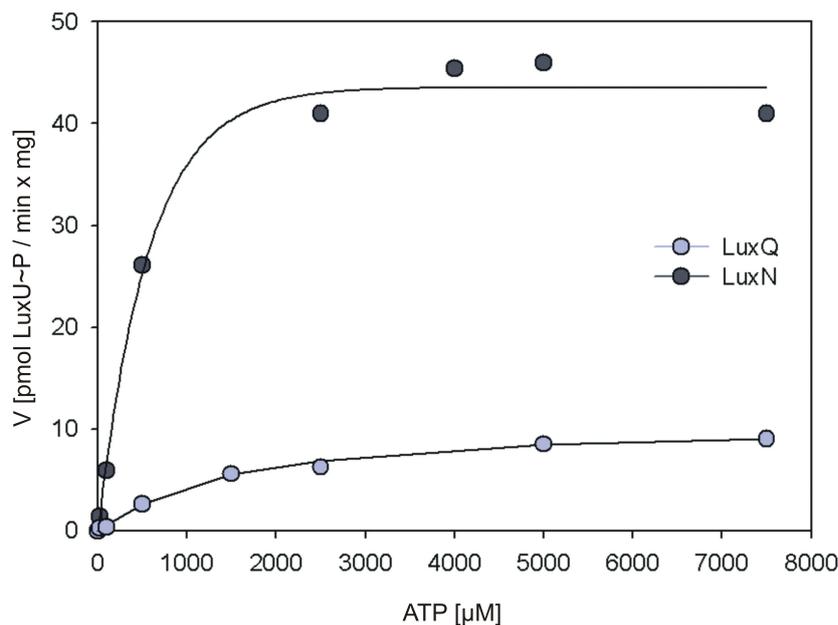


Abbildung 3.9: ATP-Abhängigkeit der LuxQ- und LuxN-Kinaseaktivität. Die Bestimmung der LuxQ- bzw. LuxN-Kinaseaktivität in Gegenwart von 20 bis 7.500 μM [γ - ^{32}P]ATP (spezifische Radioaktivitäten zw. 0,03 und 2,38 Ci/mmol) wurde wie in Kapitel 2.5.12 beschrieben durchgeführt. Dargestellt sind die Phosphorylierungsraten (V [pmol LuxU~P/min x mg]) in Abhängigkeit der ATP-Konzentration.

Zur Bestimmung des K_m -Werts für ATP wurden LuxQ- bzw. LuxN-haltige Mem-

branvesikel und gereinigtes LuxU in Gegenwart von folgenden ATP-Konzentrationen inkubiert: 20 μM (spezifische Radioaktivität 2,38 Ci/mmol), 100 μM (0,48 Ci/mmol), 500 μM (0,21 Ci/mmol), 1.500 μM (0,13 Ci/mmol), 2.500 μM (0,10 Ci/mmol), 4.000 μM (0,06 Ci/mmol), 5.000 μM (0,05 Ci/mmol), 7.500 μM (0,03 Ci/mmol). Die Menge an phosphoryliertem LuxU wurde nach 1 / 2,5 / 5 und 10 min quantifiziert und die Initialgeschwindigkeiten bestimmt.

In Abbildung 3.9 sind die Initialgeschwindigkeiten der Kinaseaktivität von LuxQ bzw. LuxN in Abhängigkeit der ATP-Konzentration graphisch dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Initialgeschwindigkeit sowohl von LuxQ als auch von LuxN mit steigender ATP-Konzentration zunahm. Ab einer Konzentration von 4.000 μM ATP befand sich die LuxN-abhängige Phosphorylierung von LuxU in der Sättigung, eine weitere Erhöhung der ATP-Konzentration führte zu keiner erhöhten Initialgeschwindigkeit. Die LuxQ-abhängige Phosphorylierung von LuxU befand sich ab einer Konzentration von 5.000 μM ATP in der Sättigung.

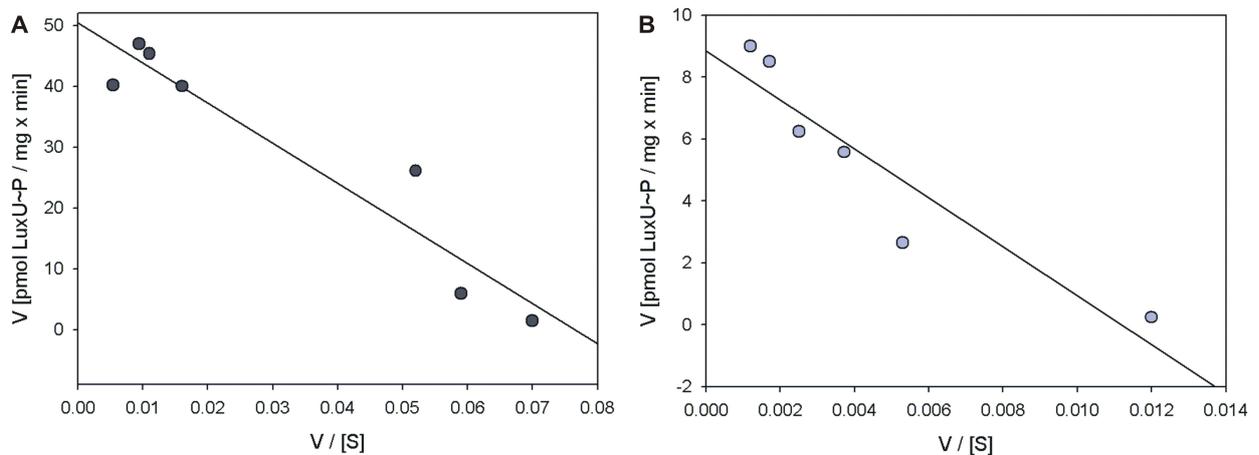


Abbildung 3.10: Bestimmung des K_m -Werts für ATP mittels Eadie-Hofstee-Diagramm. Aufgetragen ist die Reaktionsgeschwindigkeit (V [pmol/min \times mg]) gegen den Quotienten aus Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration (V/S [μM]). **A** LuxQ, **B** LuxN.

Zur Bestimmung des K_m -Werts und der maximalen Phosphorylierungsrate (V_{max}) wurde ein Eadie-Hofstee-Diagramm erstellt (Abbildung 3.10). Aufgetragen wurden die Reaktionsgeschwindigkeit (V [pmol/min \times mg]) gegen den Quotienten aus Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration (V / S [μM]). Die maximale Phosphorylierungsrate V_{max} ergab sich jeweils aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse, während die Steigung den negativen K_m -Wert darstellte.

Für LuxQ wurde ein K_m -Wert von $790 \mu\text{M}$ und für LuxN ein Wert von $658 \mu\text{M}$ bestimmt. Der berechnete K_m -Wert des Phosphotransfers von LuxN auf LuxU stimmt mit dem K_m -Wert der Autophosphorylierung ($555 \mu\text{M}$) weitgehend überein. Der K_m -Wert für ATP von LuxQ lag in der gleichen Größenordnung wie der von LuxN, allerdings zeigte LuxN eine maximale Initialgeschwindigkeit von $50,4 \text{ pmol/min } x \text{ mg}$, die deutlich höher war als die von LuxQ ($8,9 \text{ pmol/min } x \text{ mg}$).

3.3.2 Vergleich der Phosphataseaktivitäten

Neben der Kinaseaktivität wurde auch die Phosphataseaktivität der beiden Hybridsensor-kinasen verglichen. Die Ansätze enthielten äquimolare Mengen LuxN und LuxQ. Da die beiden Kinasen in unterschiedlichen Mengen in der Membran vorhanden waren, wurden unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt. Daher wurden Aktivitäten in der Einheit pmol/min verglichen und die eingesetzte Proteinmenge vernachlässigt. Das molare Verhältnis von Hybridsensorkinase zu LuxU war 1 : 30.

Abbildung 3.11A zeigt das Autoradiogramm der LuxQ-, LuxN- und LuxQ-D785N-spezifischen Dephosphorylierung von LuxU sowie die Quantifizierung der Menge an phosphoryliertem LuxU zu den angegebenen Zeitpunkten. Das Autoradiogramm zeigt eine deutliche Dephosphorylierung von LuxU durch LuxQ und LuxN, während die Menge an phosphoryliertem LuxU in Anwesenheit von LuxQ-D785N gleich blieb. Für die Quantifizierung (Abb. 3.11C) wurde der Mittelwert der Menge an mit LuxQ-D785N inkubiertem LuxU~P gleich 100% gesetzt.

LuxN wies eine Initialgeschwindigkeit von $0,032 \text{ pmol LuxU~P/min}$ auf, was mit der von Timmen et al. (2006) bestimmten LuxN-abhängigen Dephosphorylierungsrate übereinstimmte. Die Initialgeschwindigkeit der LuxQ-abhängigen Dephosphorylierung von LuxU~P lag bei $0,0078 \text{ pmol/min}$. Somit zeigte LuxN nicht nur eine zehnfach höhere Kinaseaktivität, sondern auch eine vierfach höhere Phosphataseaktivität als LuxQ. Abbildung 3.11B zeigt das Modell der Phosphataseaktivität von LuxQ, LuxN und LuxQ-D785N.

3.3.3 Vergleich des Einflusses der Autoinduktoren HAI-1 und AI-2

Sowohl für LuxQ als auch für LuxN konnte ein Einfluss des jeweiligen Autoinduktors auf die Kinaseaktivität gezeigt werden (diese Arbeit, Timmen et al., 2006). In Anwesenheit der

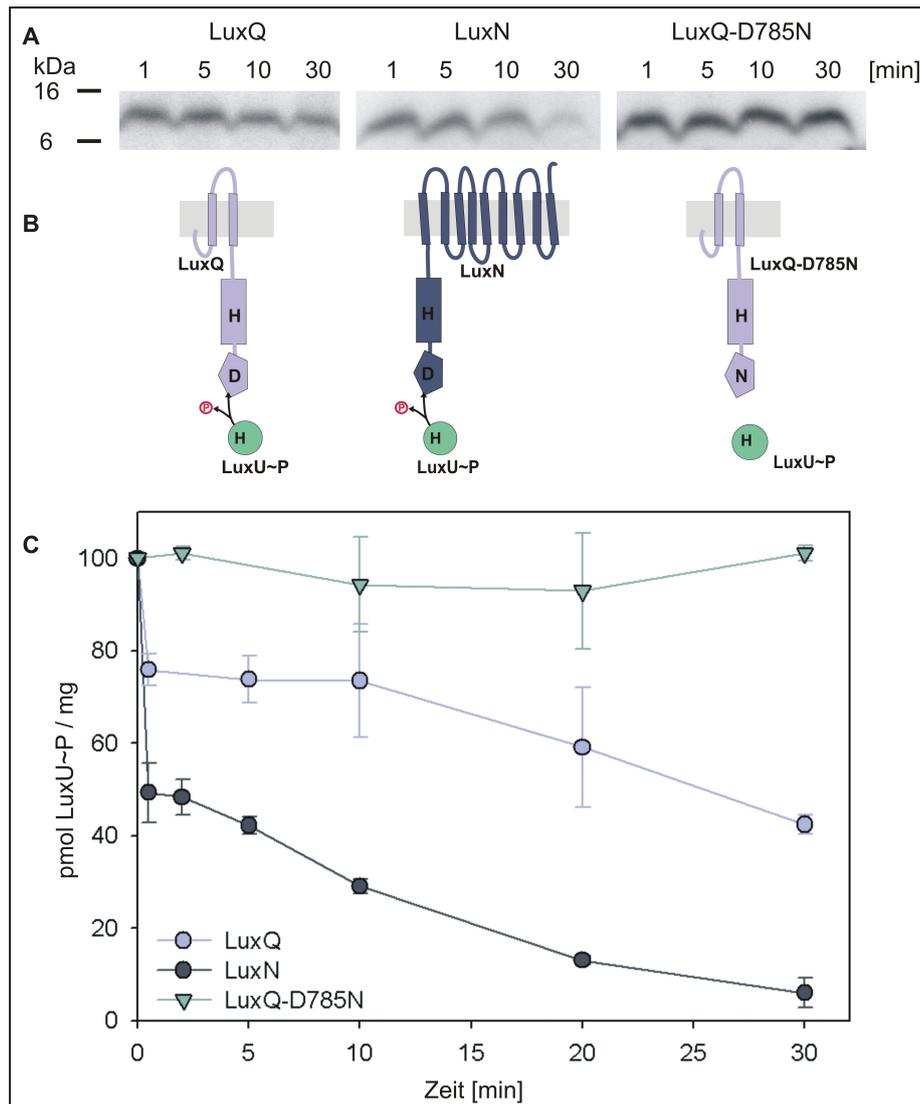


Abbildung 3.11: LuxQ- und LuxN-abhängige Dephosphorylierung von LuxU. Phosphoryliertes LuxU wurde wie in Kapitel 2.5.12 beschrieben hergestellt. Durch Zugabe der Hybridsensorkinasen LuxQ, LuxN bzw. LuxQ-D785N wurde die Dephosphorylierung gestartet und nach den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Pro Spur wurden 8 pmol Sensorkinase und 250 pmol LuxU~P eingesetzt. **A** Autoradiogramm. **B** Modell der Dephosphorylierung durch LuxQ und LuxN. **C** Quantifizierung von phosphoryliertem LuxU, der Mittelwert der Menge an mit LuxQ-D785N inkubiertem LuxU~P wurde gleich 100% gesetzt.

maximal inhibierenden Konzentrationen des entsprechenden Autoinduktors (20 μ M HAI-1, 25 μ M AI-2) wurden die Kinaseaktivitäten von LuxQ bzw. LuxN deutlich reduziert. Die Phosphataseaktivität war in beiden Fällen unabhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit des Autoinduktors. In beiden Fällen wird somit die Zelldichte-abhängige Genregulation über die Aktivität der Kinase geregelt.

Unterschiede ergaben sich aber in der Restaktivität bei maximal inhibierenden Konzen-

trationen. Während HAI-1 die Kinaseaktivität von LuxN um 70% auf eine Restaktivität von 30% reduzierte, wurde die Kinaseaktivität von LuxQ durch die Anwesenheit von LuxP/AI-2 lediglich um 40% auf 60% reduziert. Es konnte somit gezeigt werden, dass der Autoinduktor HAI-1 eine größere Signalstärke aufwies als AI-2.

3.3.4 Kinase-zu-Phosphatase-Verhältnis von LuxQ und LuxN

Für LuxQ und LuxN wurden die Kinase- und Phosphataseaktivitäten jeweils in An- und Abwesenheit des jeweiligen Autoinduktors bestimmt. In Abwesenheit der Autoinduktoren besaß LuxN ein Kinase-zu-Phosphatase-Verhältnis von 14 : 1, während das von LuxQ nur 5 : 1 betrug. Dies war vor allem auf die zehnfach höhere Kinaseaktivität von LuxN zurückzuführen. Bei niedriger Zelldichte (in Abwesenheit von HAI-1 und AI-2) hatte LuxN demnach ein deutlich höheres Kinase-zu-Phosphatase-Verhältnis als LuxQ. Dies entsprach der in der Literatur postulierten Annahme, dass das Kinase-zu-Phosphatase-Verhältnis in folgender Reihenfolge abnimmt: $\text{LuxN} > \text{LuxQ} > \text{CqsS}$ (Henke und Bassler, 2004a).

Bei einer maximal reduzierenden Konzentration der Autoinduktoren (was einer hohen Zelldichte entspricht) näherten sich die Kinase-zu-Phosphatase-Verhältnisse jedoch an. In Anwesenheit von HAI-1 wies LuxN ein Verhältnis von 4 : 1 auf, in Anwesenheit von LuxP/AI-2 wies LuxQ ein Verhältnis von 5 : 1 auf. Dies war durch den unterschiedlichen Einfluss der Autoinduktoren auf die entsprechende Kinaseaktivität zu erklären. Während HAI-1 die LuxN-Kinaseaktivität um 70% reduzierte, reduzierte LuxP/AI-2 die LuxQ-Kinaseaktivität lediglich um 40%.

3.4 Mathematisches Modell des kombinierten LuxN- und LuxQ-Signalwegs

Neben der biochemischen Charakterisierung der AI-2-abhängigen Hybridsensorkinase LuxQ war die Integration der biochemischen Daten des AI-2-abhängigen Signalwegs und des HAI-1-abhängigen Signalwegs zu einem gemeinsamen Modell von Interesse. Da die enzymatischen Parameter für LuxQ und LuxN experimentell bestimmt werden konnten, sollten diese Daten mathematisch modelliert werden. Ziel des Modells war es, die Menge an phosphoryliertem LuxU in Abhängigkeit der HAI-1- und AI-2-Konzentrationen, die bisher einzeln für beide Signalwege experimentell gemessen wurde, in einem kombinierten Modell zu berechnen. Die

Modellierung erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Johannes Müller vom Zentrum Mathematik der Technischen Universität München, Dr. Christina Kuttler und Dr. Burkhard A. Hense vom Institut für Biomathematik und Biometrie der GSF.

Um ein Modell der kombinierten LuxN- und LuxQ-Signalwege zu entwickeln, wurden folgende Vereinfachungen angenommen:

1. ATP stellt keinen limitierenden Faktor dar.
2. LuxN und LuxQ können in vier verschiedenen Zuständen vorliegen (phosphoryliert bzw. unphosphoryliert und als Komplex mit dem entsprechenden Autoinduktor bzw. ohne Autoinduktor).
3. Die Bindung von Autoinduktor beeinflusst nur die Autophosphorylierung der Hybridsensorkinasen und nicht den Phosphotransfer zu LuxU.
4. Die Komplexbildung der Hybridsensorkinasen mit dem Autoinduktor ist schnell im Gegensatz zur Autophosphorylierung.

Des Weiteren wurde ein Quasi-Steady-State für alle Reaktionen (ausgenommen der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von LuxU) angenommen, um das Modell weiter zu vereinfachen.

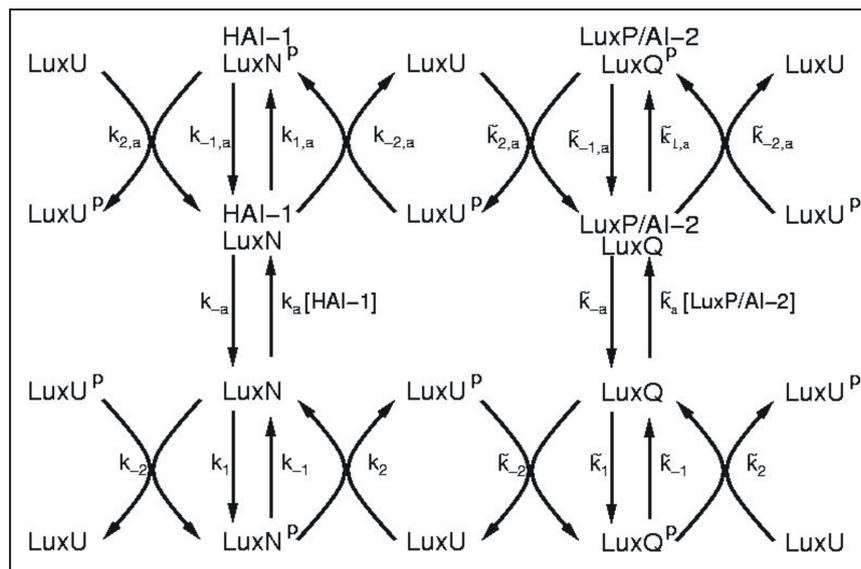


Abbildung 3.12: Schema der Reaktionen.

Alle möglichen Reaktionen, die hierbei berücksichtigt wurden, sind in Abb. 3.12 dargestellt (Komplexbildung mit AI, Autophosphorylierung/Phosphorylierung von LuxU/Dephosphorylierung von LuxU jeweils für Sensor kinase mit oder ohne gebundenem AI).

Zunächst wurden die einzelnen Reaktionen des LuxN-abhängigen Signalweges modelliert, das Modell bestand aus den folgenden Reaktionen: Autophosphorylierung von LuxN in Abwesenheit von HAI-1 (k_1), Phosphotransfer auf LuxU (k_2) und Dephosphorylierung von LuxU (k_{-2}), sowie den gleichen Reaktionen in Anwesenheit von HAI-1 (entsprechend $k_{1,a}$, $k_{2,a}$, $k_{-2,a}$, wobei a die Anwesenheit des Autoinduktors darstellt). Die Gleichungen und deren Herleitung sind im Anhang wiedergegeben. Zur Validierung wurde das Submodell mit den experimentell bestimmten Daten verglichen. Durch das Modell konnten die biochemischen Ergebnisse sehr gut dargestellt und wiedergegeben werden (Daten nicht gezeigt).

Aufbauend auf dem Submodell konnten die Daten von LuxQ mit entsprechend niedrigeren Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsraten dem Modell hinzugefügt werden. Die dem LuxN-Submodell zugefügten Reaktionen sind in Abb. 3.12 mit \tilde{k} bezeichnet.

Auf diese Weise konnte der LuxU~P-Output in Abwesenheit der Autoinduktoren sowie in jeder möglichen Kombination an AI-Konzentrationen bestimmt werden. Als Input wurden die Autoinduktor-Konzentrationen betrachtet, die zu einem Output an phosphoryliertem LuxU führten. Die Menge an phosphoryliertem LuxU wurde durch folgende Gleichung berechnet:

$$r = \tau \left(1 + \frac{[\text{HAI-1}]}{[\text{HAI-1}]^* + [\text{HAI-1}]} (r^N - 1) \right) + (1 - \tau) \left(1 + \frac{[\text{AI-2}]}{[\text{AI-2}]^* + [\text{AI-2}]} (r^Q - 1) \right) \quad (1)$$

Der Wert r ($0 < r < 1$) gibt die relative Menge an phosphoryliertem LuxU wider. In Tabelle 3.1 sind alle verwendeten Parameter aufgeführt, die zur Berechnung dieses Werts notwendig sind. Der Wert r^N stellt die relative Menge durch LuxN phosphoryliertes LuxU in Abwesenheit von LuxQ dar unter der Annahme, dass die HAI-1-Konzentration zu einer maximalen Reduktion der LuxN-Kinaseaktivität führt. Entsprechend stellt der Wert r^Q die relative Menge durch LuxQ phosphoryliertes LuxU in Abwesenheit von LuxN dar, bei einer die Kinaseaktivität maximal reduzierenden LuxP/AI-2-Konzentration. Aufgrund der Tatsache, dass die LuxN-Kinaseaktivität durch HAI-1 auf 30% reduziert werden konnte, wurde $r^N = 0,3$ gesetzt. Die Anwesenheit von einer ausreichend hohen AI-2-Konzentration führte zu einer Reduktion der LuxQ-Kinaseaktivität auf 60%, daher wurde $r^Q = 0,6$ gesetzt. Des

Tabelle 3.1: Namen und Werte der Parameter der mathematischen Modellierung.

Name	Bedeutung	Wert	Quelle
r^N	Relative Menge LuxU~P in Gegenwart von LuxN und HAI-1	0,3	experimentell
r^Q	Relative Menge LuxU~P in Gegenwart von LuxQ und LuxP/AI-2	0,6	experimentell
$[HAI-1]^*$	halb-maximale inhibitorische HAI-1-Konzentration	$5 \mu\text{M}$	experimentell
$[AI-2]^*$	halb-maximale inhibitorische LuxP/AI-2-Konzentration	$5 \mu\text{M}$	experimentell
τ	Relative Stärke der beiden Signalwege	0,7	angenommen

Weiteren wurde jeweils die halbmaximal inhibitorische Konzentration der Autoinduktoren HAI-1 und AI-2 verwendet ($[HAI-1]^*$ und $[AI-2]^*$), die für beide Autoinduktoren experimentell bestimmt werden konnte und jeweils $5 \mu\text{M}$ betrug.

Die Konstante τ ($0 < \tau < 1$) stellte die relative Stärke der beiden Signalwege dar. Hätte der LuxN-abhängige Signalweg keinen Einfluss auf die Menge an phosphoryliertem LuxU, wäre $\tau = 0$, entsprechend wäre $\tau = 1$, wenn der LuxQ abhängige Signalweg keinen Einfluss hätte. Die Konstante τ konnte bisher nicht experimentell bestimmt werden. Daher wurde die Menge an phosphoryliertem LuxU für die Werte $\tau = 0,2$, $\tau = 0,7$ und $\tau = 0,9$ berechnet. Durch diese τ -Werte konnte simuliert werden, wie sich die Menge an phosphoryliertem LuxU in Gegenwart von HAI-1, AI-2 oder beiden Autoinduktoren verhielt. Die Ergebnisse für alle drei τ -Werte sind in Abbildung 3.13A-C dargestellt. Durch die Berechnung der relativen Menge an phosphoryliertem LuxU mit den Werten $\tau = 0,2$, $\tau = 0,7$ und $\tau = 0,9$ konnte gezeigt werden, dass die Tendenzen unabhängig von dem wahren Wert τ waren. Der Wert τ beeinflusste lediglich die relative Signalstärke beider Autoinduktoren im kombinierten LuxN/LuxPQ/LuxU-System.

Der biochemische Vergleich der beiden Kinasen LuxN und LuxQ zeigte, dass sowohl HAI-1 einen stärkeren Effekt verursachte als AI-2, als auch LuxN höhere Kinase- und Phosphataseaktivitäten aufwies. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Konstante $\tau > 0,5$ sein musste. Es wurde der Wert $\tau = 0,7$ angenommen. Die Menge an LuxU~P nimmt mit steigender AI-Konzentration ab, wobei der reduzierende Einfluss von HAI-1 grö-

ber ist als der Einfluss von AI-2. Die Menge an phosphoryliertem LuxU konnte noch weiter reduziert werden, wenn beide Autoinduktoren vorhanden sind.

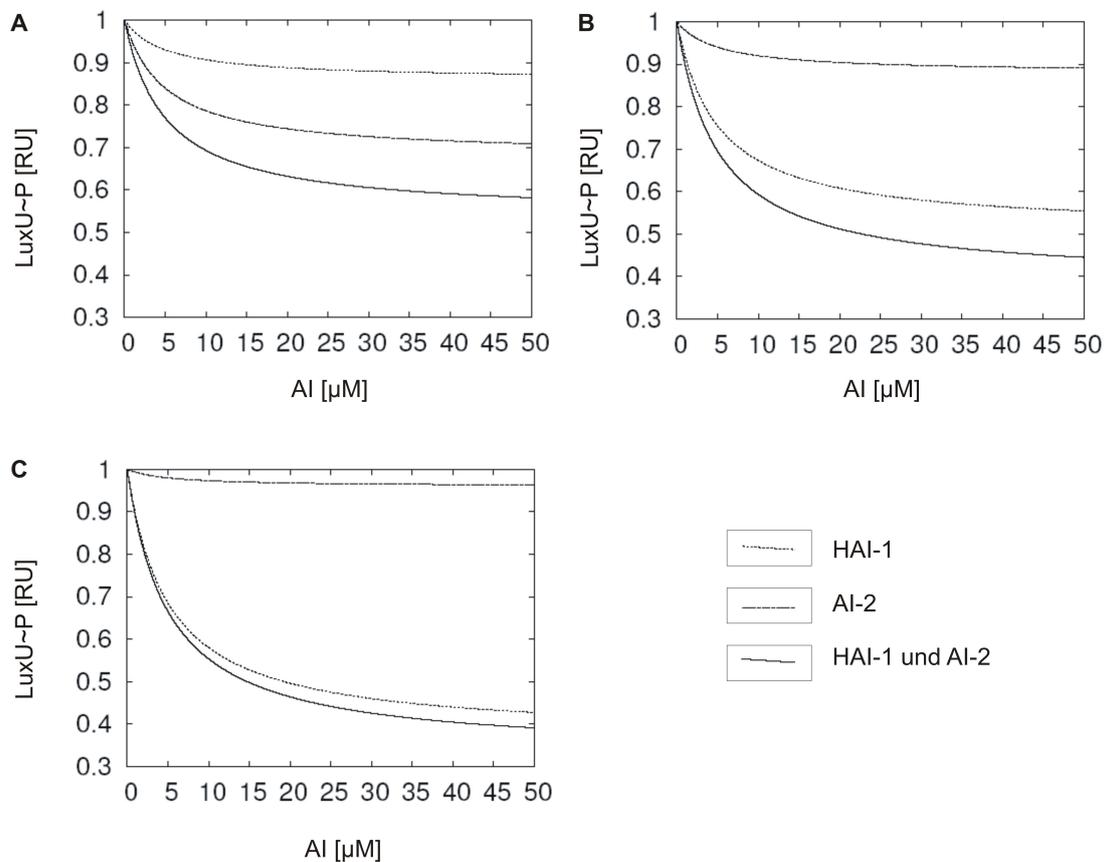


Abbildung 3.13: Einfluss der Autoinduktor-Konzentration auf den LuxU~P Output. Darstellung des kombinierten Einflusses der HAI-1 und AI-2 Konzentration auf den LuxU~P Output. Für die relative Stärke der HAI-1- und AI-2-abhängigen Signalwege wurden Werte zwischen $\tau = 0,2$ und $0,9$ angenommen. **A** $\tau = 0,2$. **B** $\tau = 0,7$. **C** $\tau = 0,9$. *RU* Relative Einheit.

Durch das mathematische Modell, welches auf biochemischen Daten der einzeln untersuchten Hybridsensorkinasen beruht, konnte die Menge an phosphoryliertem LuxU nie auf 0% reduziert werden. Auch wenn beide Autoinduktoren in Konzentrationen vorlagen, welche experimentell zu einer maximalen Inhibition der Kinaseaktivitäten führten, lagen 45% LuxU phosphoryliert vor. Waters und Bassler (2006) zeigten, dass LuxR in Abhängigkeit der Autoinduktoren graduell produziert wird. Dies würde für das Ergebnis des mathematischen Modells bedeuten, dass die Induktion nicht vollständig ist, obwohl beide Autoinduktoren vorliegen.

Aufgrund der Ergebnisse der mathematischen Modellierung der kombinierten LuxN- und LuxQ-Signalwege muss angenommen werden, dass es einen weiteren regulatorischen Effekt gibt, der bisher nicht berücksichtigt wurde.

3.5 Das Zusammenspiel der Hybridsensorkinasen LuxQ und LuxN

Wenn beide Hybridsensorkinasen getrennt experimentell untersucht wurden, konnte der Output an phosphoryliertem LuxU weder durch die Zugabe von HAI-1 noch durch die Zugabe von LuxP/AI-2 auf Null reduziert werden. Ebenfalls durch das erstellte mathematische Modell der kombinierten LuxN- und LuxQ-Signalwege konnte die Menge an phosphoryliertem LuxU nicht auf 0% (bezogen auf die maximal phosphorylierte Menge an LuxU) gesenkt werden. Da aber bei einem voll induziertem *lux*-Operon die Menge an phosphoryliertem LuxO (und somit die mit LuxO~P in einem Gleichgewicht stehende Menge an phosphoryliertem LuxU) sehr gering sein muss, ist es vorstellbar, dass der Output durch einen weiteren Faktor beeinflusst und reduziert werden kann. Unter anderem ist es denkbar, dass sich die beiden Signalwege gegenseitig beeinflussen.

Aus diesem Grund wurden *in vitro*-Experimente durchgeführt, in denen beide Hybridsensorkinasen im Phosphorylierungsansatz vorhanden waren, und die Menge an phosphoryliertem LuxU quantifiziert und verglichen. Bei einer gemeinsamen Inkubation von LuxN- und LuxQ-haltigen Membranvesikeln mit gereinigtem LuxU und ATP, war zu erwarten, dass sich die Aktivitäten der beiden Sensorkinase addierten. Somit müsste eine höhere Menge LuxU in phosphoryliertem Zustand vorliegen, als wenn die jeweiligen Sensorkinasen alleine mit LuxU und ATP inkubiert werden. Sollten die Sensorkinasen aber wechselwirken, wäre entweder ein zusätzlicher stimulierender Effekt oder ein inhibitorischer Effekt zu erwarten.

3.5.1 Beeinflussung der LuxN-Kinaseaktivität durch LuxQ

Um eine mögliche Wechselwirkung der Hybridsensorkinasen zu untersuchen, wurden LuxN-haltige Membranvesikel in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen LuxQ zusammen mit gereinigtem LuxU und ATP inkubiert, und die Menge an phosphoryliertem LuxU wurde quantifiziert. Abbildung 3.14 zeigt das Autoradiogramm (A) und die Quantifizierung (C) der Menge an phosphoryliertem LuxU. Es ist deutlich zu sehen, dass die Menge an phosphoryliertem LuxU abnahm, wenn LuxQ-haltige Membranvesikel dem Testansatz zugegeben wurden. Außerdem war die Reduktion der LuxN-Kinaseaktivität konzentrationsabhängig. Wenn Kontrollvesikel des Stamms *E. coli* TKR2000 zugegeben wurden, kam es zu keiner reduzierenden Wirkung (Daten nicht gezeigt). Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Beeinflussung der LuxN-Kinaseaktivität LuxQ-spezifisch war.

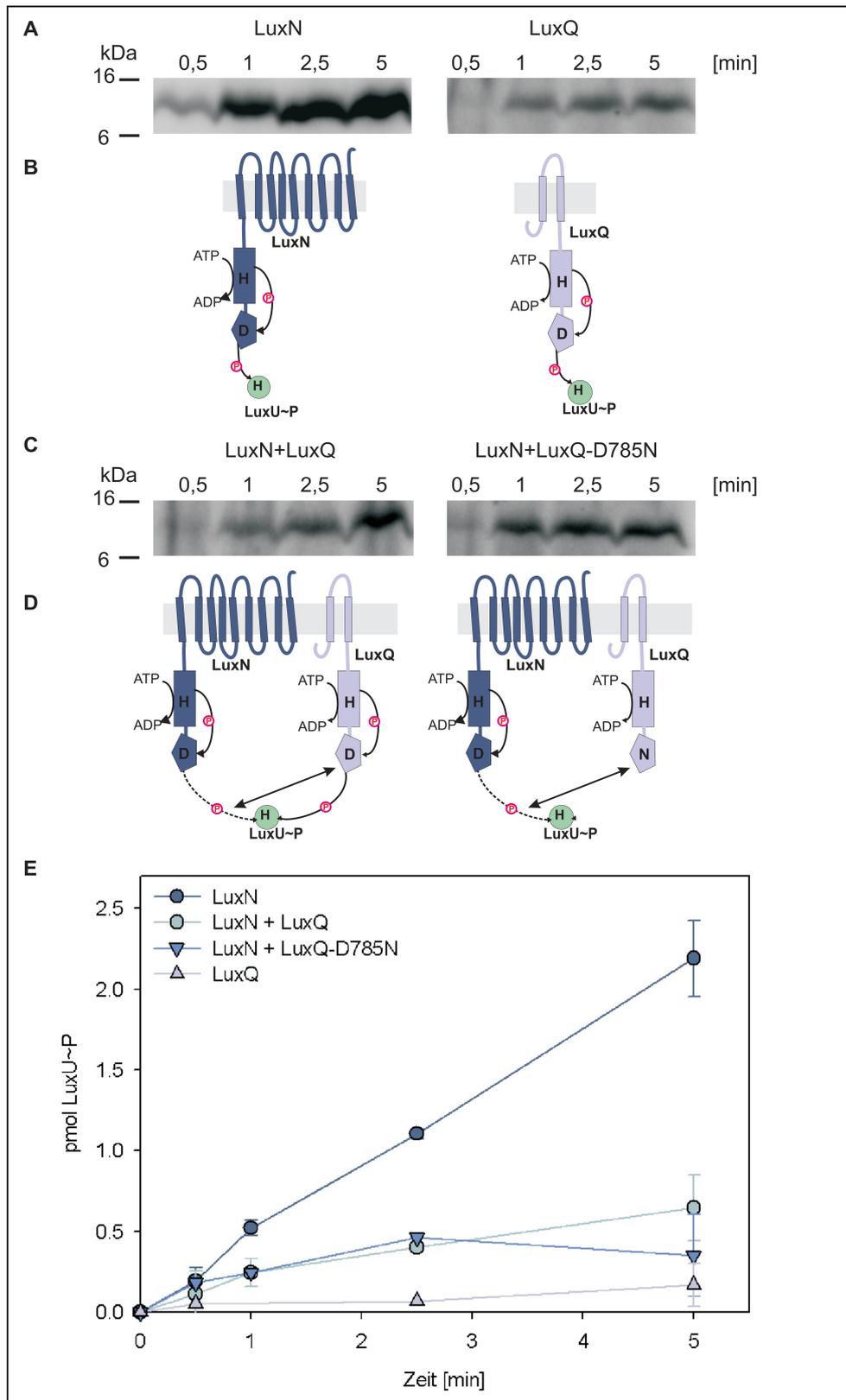


Abbildung 3.14: Zusammenspiel der Hybridsensorkinasen LuxN und LuxQ. LuxN- und LuxQ-haltige Membranvesikel sowie eine Mischung aus LuxN- und LuxQ-haltigen Membranvesikeln (molares Verhältnis der Hybridsensorkinasen 1 : 1) wurden mit gereinigtem LuxU und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert (vergl. Kapitel 2.5.12). **A** Autoradiogramm. **B** Modell der Kinaseaktivität. **C** Quantifizierung von phosphoryliertem LuxU.

Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf die Phosphataseaktivität von LuxQ zurückzuführen war, wurde das gleiche Experiment mit LuxQ-D785N-haltigen Membranvesikeln durchgeführt. Auch LuxQ-D785N reduzierte die Kinaseaktivität von LuxN in gleicher Weise wie Wildtyp-LuxQ. Es konnte somit gezeigt werden, dass die deutlich niedrigere Menge an phosphoryliertem LuxU nicht auf die Phosphataseaktivität von LuxQ zurückzuführen war. Es ist denkbar, dass sich die beiden Hybridsensorkinasen in einer Konkurrenz um das Substrat LuxU befinden oder sich gegenseitig inhibieren, was in Abbildung 3.14B schematisch dargestellt ist. Die Tatsache, dass LuxQ die Aktivität von LuxN beeinflusst, würde eine Möglichkeit der Regulation bieten.

Des Weiteren wurde der Konzentrations-abhängige Einfluss von LuxQ-H492Q auf die Kinaseaktivität von LuxN untersucht. Hierzu wurden entsprechend LuxN-Membranvesikel mit LuxQ-H492Q-haltigen Membranvesikeln gemischt und mit gereinigtem LuxU und ATP inkubiert. Anhand des Autoradiogramms wurden die Initialgeschwindigkeiten der LuxN-Kinaseaktivität bestimmt. Die Phosphorylierungsrate in Abwesenheit von LuxQ-H492Q-haltigen Membranvesikeln wurde gleich 100% gesetzt.

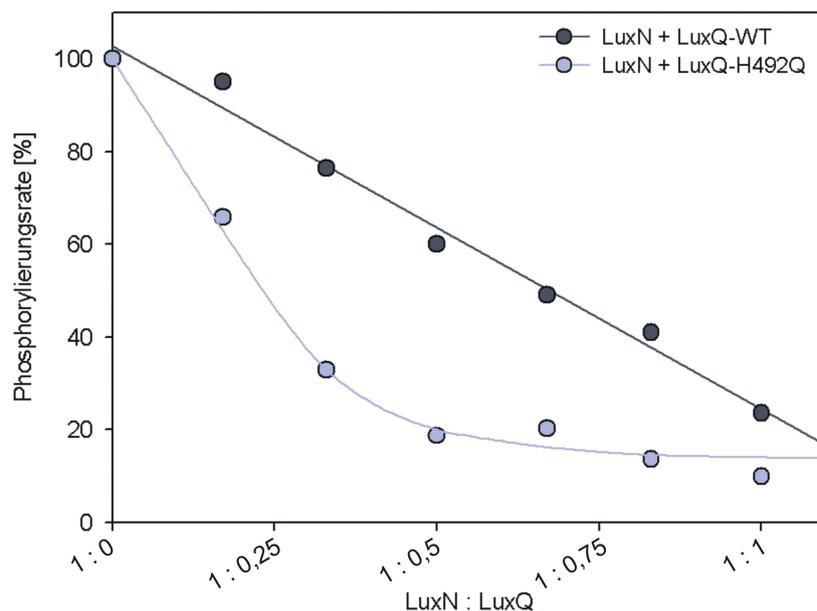


Abbildung 3.15: Beeinflussung der Phosphorylierungsrate von LuxN durch LuxQ bzw. LuxQ-H492Q-haltige Membranvesikel. LuxN-haltige Membranvesikel wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit LuxQ- bzw. LuxQ-H492Q-haltigen Membranvesikeln sowie gereinigtem LuxU und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Die Menge an phosphoryliertem LuxU wurde quantifiziert und die Initialgeschwindigkeit der LuxN-Kinaseaktivität bestimmt. Die Initialgeschwindigkeit in Abwesenheit von LuxQ wurde gleich 100% gesetzt.

In Abbildung 3.15 sind die Phosphorylierungsraten [%] von LuxN in Abhängigkeit von LuxQ-WT bzw. LuxQ-H492Q graphisch dargestellt. Beide LuxQ-Derivate führten zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der LuxN-Kinaseaktivität. Bei einem Verhältnis von 1 : 1 reduzierten beide LuxQ-Derivate die LuxN-Kinaseaktivität auf ca. 20%. Im Gegensatz zu LuxQ-WT führten gleiche Mengen LuxQ-H492Q insbesondere bei niedrigen Konzentrationen zu einer stärkeren Reduktion der LuxN-Kinaseaktivität. Wurden LuxN und LuxQ in einem molaren Verhältnis von 1 : 0,04 eingesetzt, führte dies zu einer Reduktion um ca. 25%, bei einem Verhältnis von 1 : 0,08 war eine Reduktion um ca. 70%, bei einem Verhältnis von 1 : 0,17 um ca. 80%, was der maximalen Reduktion entsprach. Die maximale Reduktion von LuxN konnte durch das LuxQ-WT-Derivat erst bei einem molaren Verhältnis von 1 : 1 beobachtet werden. Die Anwesenheit von LuxQ-H492Q reduzierte die Menge an phosphoryliertem LuxU in einem stärkeren Maße als LuxQ-WT. Die fehlende Kinaseaktivität und vorhandene Phosphataseaktivität von LuxQ-H492Q sind hierfür eine Erklärung.

3.5.2 Beeinflussung der LuxQ-Kinaseaktivität durch LuxN

Im Rahmen der Diplomarbeit von Carolin Schön (2007), die von mir experimentell betreut wurde, wurde der Einfluss von LuxN auf die Kinaseaktivität von LuxQ untersucht. Da LuxN eine deutlich höhere Kinaseaktivität zeigte als LuxQ, wurden LuxN-D771N-haltige Membranvesikel verwendet, um ausschließlich den LuxQ-spezifischen Phosphotransfer auf LuxU zu beobachten.

Hierzu wurden 0,8 μM LuxQ und 25 μM LuxU mit unterschiedlichen Konzentrationen LuxN-D771N (0,27 - 0,8 μM) gemischt und die Menge an phosphoryliertem LuxU nach 5 minütiger Inkubation mit 100 μM [γ - ^{32}P]ATP bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass ebenfalls die LuxQ-spezifische Phosphorylierung von LuxU durch die Anwesenheit von LuxN konzentrationsabhängig reduziert wurde (Abb. 3.16). Bei zunehmender Menge an LuxN-D771N-haltigen Membranvesikeln nahm die Menge von durch LuxQ phosphoryliertem LuxU ab. Wurden LuxQ und LuxN-D771 in äquimolaren Mengen eingesetzt, wurden die Menge an phosphoryliertem LuxU auf knapp 30% reduziert.

3.5.3 Einfluss von HAI-1 auf das Zusammenspiel von LuxN und LuxQ

Timmen et al. (2006) konnten zeigen, dass HAI-1 die Kinaseaktivität von LuxN um 70%

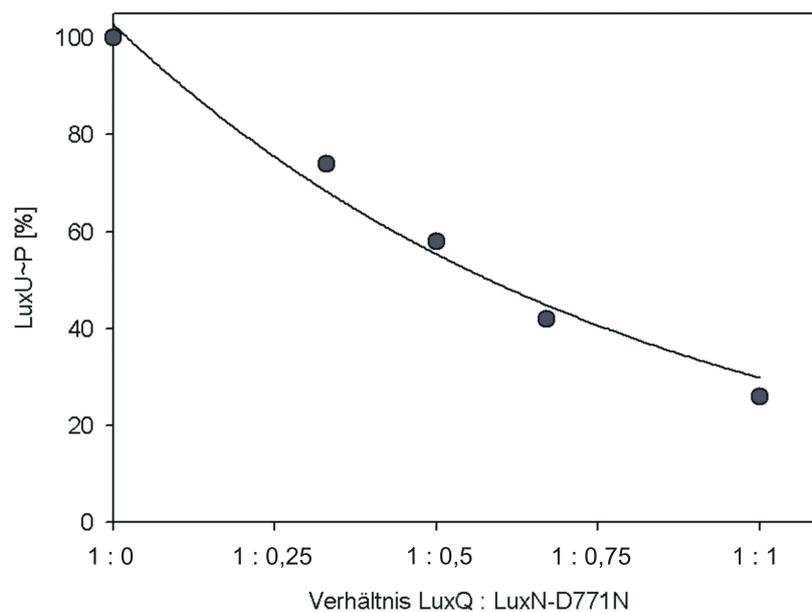


Abbildung 3.16: Einfluss von LuxN-D771N auf die LuxQ-Kinaseaktivität. LuxQ-haltige Membranvesikeln wurden mit LuxN-D771N-haltigen Membranvesikel in den molaren Verhältnissen 1 : 0,33 bis 1 : 1 gemischt und mit gereinigtem LuxU und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Die Menge an phosphoryliertem LuxU nach 5 min wurde quantifiziert (vergl. Kapitel 2.5.12) und in Abhängigkeit des LuxQ-zu-LuxN-D771N-Verhältnisses aufgetragen. Die Menge an phosphoryliertem LuxU nach 5 minütiger Inkubation in Abwesenheit von LuxN-D771N wurde gleich 100% gesetzt.

reduzierte. Die Kinaseaktivität konnte in biochemischen Experimenten allerdings nicht vollständig reduziert werden. Durch das Zusammenspiel von LuxN und LuxQ wurde ein weiterer Mechanismus gefunden, die LuxN-abhängige Phosphorylierung von LuxU zu reduzieren.

Der kombinierte Einfluss von HAI-1 und LuxQ auf die LuxN-Kinaseaktivität wurde im Rahmen der von mir experimentell betreuten Diplomarbeit von Carolin Schön (2007) untersucht. Eine Mischung der beiden Kinasen LuxN und LuxQ (im Verhältnis 1 : 0,3) wurde mit frisch hergestelltem zellfreiem Kulturüberstand von *Vibrio harveyi* BB120 inkubiert und die Phosphorylierung des Hpt-Proteins LuxU gemessen. Der Überstand enthielt sowohl HAI-1 als auch AI-2. Da jedoch das periplasmatische Bindeprotein LuxP dem Ansatz nicht zugegeben wurde, konnte ein Effekt lediglich auf HAI-1 zurückgeführt werden. Die Konzentration des Kulturüberstands wurde der *in vivo*-Situation nachempfunden. Der Kulturüberstand wurde gefriergetrocknet und AB-Medium aufgenommen (in einem Zehntel des Ausgangsvolumens). Dem Testansatz bestand zu einem Zehntel aus Kulturüberstand, so dass eine Endkonzentration von 100% erreicht wurde.

Abbildung 3.17 zeigt die Initialgeschwindigkeiten verschiedener Kombinationen von LuxN, LuxQ, HAI-1 und LuxP/AI-2 aus drei unabhängigen Experimenten. Die Phosphorylierungs-

rate von LuxN wurde gleich 100 Prozent gesetzt. Die Aktivität von LuxN wurde durch Anwesenheit von LuxQ bzw. HAI-1 deutlich reduziert. In Gegenwart beider Komponenten (LuxQ und HAI-1) wurde die LuxN-Kinaseaktivität nahezu vollständig inhibiert.

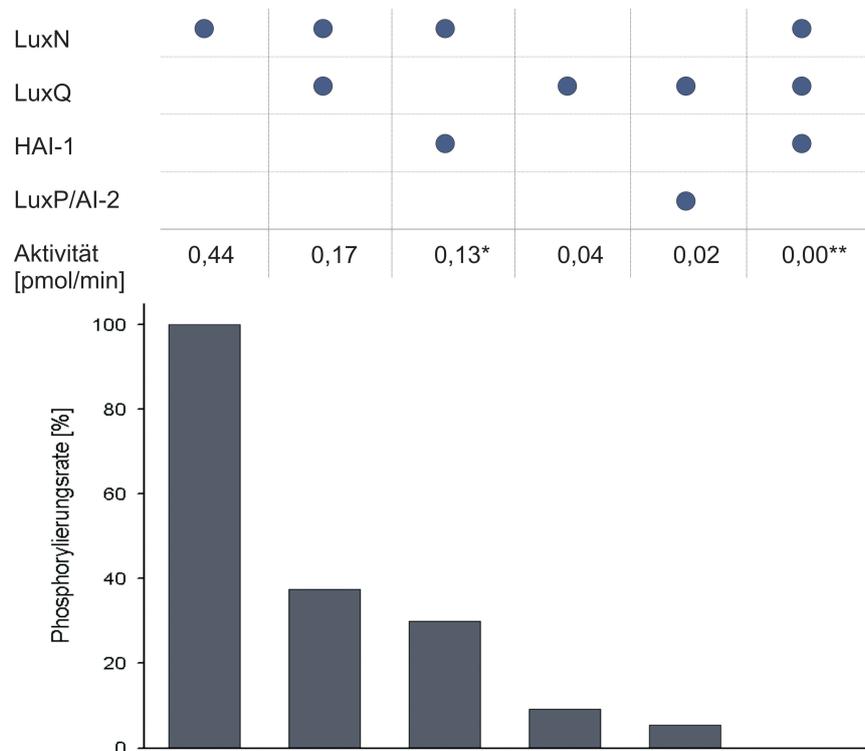


Abbildung 3.17: Phosphorylierungsraten verschiedener Kombination von LuxN, LuxQ, HAI-1 und LuxP/AI-2. LuxU wurde in Gegenwart verschiedener Kombinationen LuxN, LuxQ, HAI-1 und LuxP/AI-2 phosphoryliert. Die Menge an phosphoryliertem LuxU wurde quantifiziert. Dargestellt sind die Aktivitäten [pmol/min] und Phosphorylierungsraten [%]. Die Phosphorylierungsrate von LuxN wurde gleich 100% gesetzt. * Timmen et al., 2006. ** Schön, 2007.

3.5.4 Dephosphorylierung von LuxU in Anwesenheit von LuxQ und LuxN

Beide Hybridsensorkinasen besitzen neben der Kinase- auch eine Phosphataseaktivität. Das Zusammenspiel der Hybridsensorkinasen bei der Dephosphorylierung von LuxU wurde untersucht. Phosphoryliertes LuxU wurde mit LuxN- und LuxQ-haltigen Membranvesikeln bzw. mit einem 1 : 1 Gemisch aus LuxN- und LuxQ-haltigen Membranvesikeln bei 25°C inkubiert und die Abnahme der Menge an phosphoryliertem LuxU beobachtet. In Gegenwart beider Hybridsensorkinasen nahm die Menge an phosphoryliertem LuxU schneller ab, als wenn jeweils nur eine Hybridsensorkinase anwesend war (Schön, 2007). Ob es sich hierbei um einen rein additiven oder sogar um einen stimulierenden Effekt handelte, konnte nicht eindeutig

geklärt werden. Es konnte aber die Aussage getroffen werden, dass bei der Dephosphorylierung von LuxU keine inhibierenden Wechselwirkungen der Hybridsensorkinasen vorzuliegen schien.

3.6 LuxQ/LuxN-Chimäre

Um zu zeigen, welche Domäne für die Wechselwirkungen zwischen den beiden Hybridsensorkinasen LuxN und LuxQ und die Beeinflussung der Kinaseaktivitäten verantwortlich ist, wurden Chimärproteine hergestellt, in denen die einzelnen Domänen (Transmembran-, Histidinkinase- und Empfängerdomäne) zwischen den beiden Proteinen ausgetauscht wurden. Im Rahmen der Diplomarbeit von Carolin Schön (2007) konnten sechs Plasmide konstruiert werden (pNKQ-1-NQN, pNKN-1-QNN, pNKQ-1-QQN, pNKN-1-QNQ, pNKQ-1-NQQ, pNKN-1-NNQ), die für die LuxQ/LuxN-Chimäre (LuxNQN, LuxQNN, LuxQQN, LuxQNO, LuxNQQ und LuxNNQ) kodierten.

Carolin Schön (2007) konnte zeigen, dass die LuxQ/LuxN-Chimäre keine Kinaseaktivität besaßen, aber phosphataseaktiv waren. Dies ließ darauf schließen, dass sowohl die zur Autophosphorylierung führenden Signalweiterleitung von Transmembrandomäne zu Histidinkinasedomäne, als auch der intramolekulare Phosphotransfer vom konservierten Histidin der Histidinkinasedomäne zum konservierten Aspartat der Empfängerdomäne eines Antwortregulators sehr spezifisch waren.

Die LuxN-Kinaseaktivität wurde in Gegenwart von LuxQ-haltigen Membranvesikeln bzw. in Gegenwart von Membranvesikeln bestimmt, welche die überproduzierten LuxQ/LuxN-Chimäre enthielten. LuxQ bzw. LuxQ/LuxN-Chimäre wurden in den einzelnen Phosphorylierungsexperimenten in äquimolaren Mengen eingesetzt (überprüft durch quantitative Westernblot-Analyse, Daten nicht gezeigt). Das molare Verhältnis von LuxN zu LuxQ bzw. den LuxQ/LuxN-Chimären war 1 : 0,3. Die Initialrate der LuxN-Kinaseaktivität in Abwesenheit von LuxQ oder den Chimären wurde gleich 100% gesetzt. Das Chimär LuxQNO konnte nicht eingesetzt werden, da die produzierten Mengen zu gering waren.

Die Initialraten der Kinaseaktivität [%] von LuxN in Gegenwart von LuxQ und der verschiedenen LuxQ/LuxN-Chimäre sind in Abbildung 3.18 graphisch dargestellt. Die beiden Chimäre LuxNNQ und LuxNQQ, welche die Empfängerdomäne eines Antwortregulators von LuxQ besaßen, zeigten einen reduzierenden Effekt auf die LuxN-Kinaseaktivität. Die

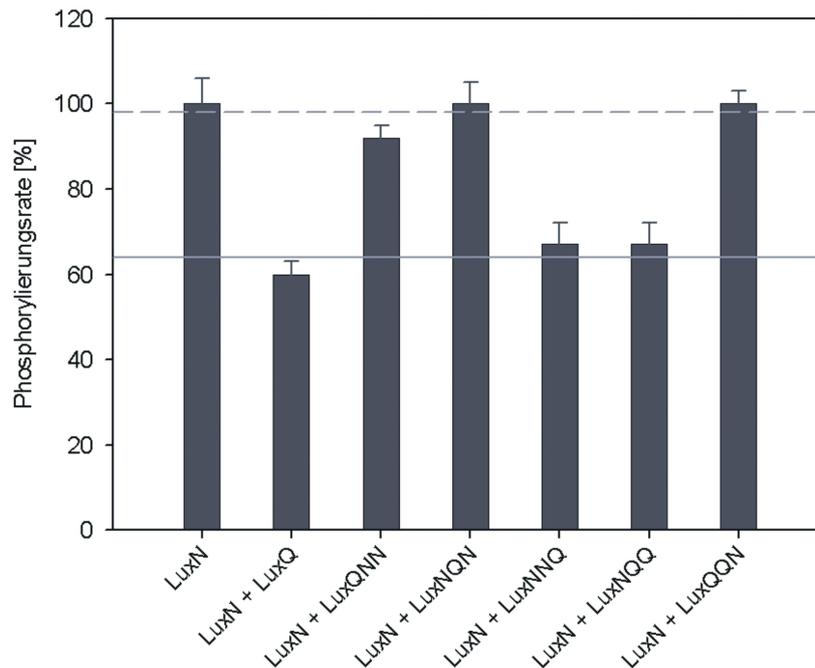


Abbildung 3.18: Effekt der LuxQ-Domänen auf die LuxN-Phosphorylierungsrate. Dargestellt sind die Initialgeschwindigkeiten [%], die Initialgeschwindigkeit von LuxN in Abwesenheit von LuxQ und der LuxQ/LuxN-Chimäre wurde gleich 100% gesetzt. Die gestrichelte Linie entspricht dem Mittelwert der Phosphorylierungsraten von LuxN, LuxN + LuxQNN/LuxNQN und LuxQQN; die durchgezogene Linie entspricht dem Mittelwert der Phosphorylierungsraten von LuxN + LuxQ/LuxNNQ und LuxNQQ. Die Daten wurden der Diplomarbeit Schön (2007) entnommen.

LuxN-Kinaseaktivität wurde wie in Gegenwart von LuxQ auf ca. 65% reduziert. Alle anderen Chimäre (LuxQQN, LuxQNN, LuxNQN) hatten keinerlei Auswirkungen auf die LuxN-Kinaseaktivität. Der reduzierende Effekt kann aufgrund dieser Ergebnisse eindeutig auf die Empfängerdomäne von LuxQ zurückgeführt werden. Effekte durch die Histidinkinase- und Transmembrandomäne von LuxQ können ausgeschlossen werden.

3.7 Verkürzte LuxQ- und LuxN-Derivate

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Antwortregulator-Empfängerdomäne von LuxQ einen reduzierenden Effekt auf die LuxN-Kinaseaktivität ausübt. Das von Schön (2007) diskutierte Konkurrenzmodell zwischen LuxQ und LuxN um das gemeinsame Substrat LuxU wäre eine Erklärung für diesen Effekt. Hierbei wird eine direkte Interaktion der beiden Hybridsensor-kinasen ausgeschlossen. Es wird postuliert, dass LuxQ eine höhere Affinität zu dem HPT Protein LuxU besitzt und daher LuxU bindet. Da LuxQ aber eine geringere Phosphorylie-

rungsrate aufweist als LuxN, findet der Phosphotransfer auf LuxU langsamer statt. Durch die Bindung und den langsamen Phosphotransfer von LuxQ auf LuxU wird das Substrat LuxU der schnelleren Kinase LuxN entzogen und die Menge an phosphoryliertem LuxU reduziert.

Mittels Pull-Down-Experimente konnten keine spezifischen Interaktionen zwischen LuxU und den Hybridsensorkinasen LuxQ und LuxN gezeigt werden (Schön, 2007). Um Interaktionen mittels Surface Plasmon Resonance (SPR) oder Fluoreszenzpolarisation nachzuweisen, sollten alle Komponenten in gereinigter Form vorliegen. LuxN und auch LuxQ konnten bisher gereinigt und in Proteoliposomen rekonstituiert werden, allerdings lagen sie in inaktiver Form vor. Es konnte kein Phosphotransfer auf LuxU gezeigt werden Timmen (2005). Aus diesem Grund sollten lösliche Derivate von LuxQ und LuxN heterolog in *E. coli* überproduziert und aus der löslichen Fraktion gereinigt werden.

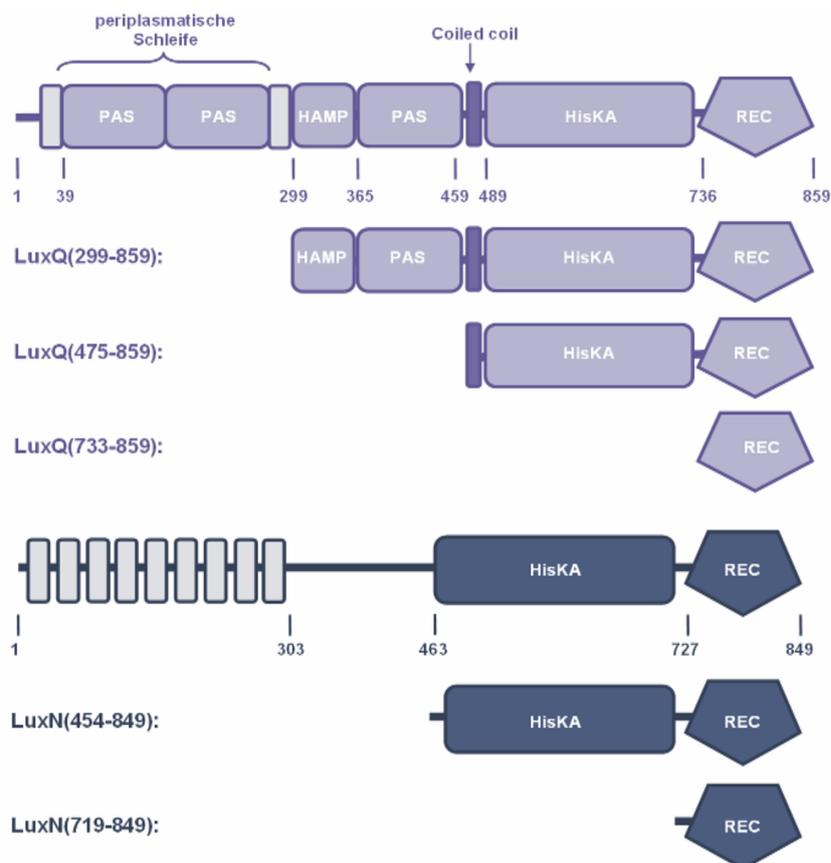


Abbildung 3.19: Schematische Darstellung der verkürzten LuxQ- und LuxN-Derivate.

Die vorhergesagte Domänenstruktur von LuxQ (Neiditch et al., 2005) enthält zwei Transmembranbereiche (AS Positionen 1-38 und 281-298), die eine periplasmatische Schleife, bestehend aus zwei PAS-Domänen (AS 39-280), flankieren. An diesen PAS-Domänen ist das

periplasmatische Bindeprotein LuxP konstitutiv gebunden. Des Weiteren enthält LuxQ die cytoplasmatischen HAMP- (AS 299-350) und PAS-Domänen (AS 365-459), einen coiled-coil-Bereich (AS 462-491) sowie die Histidinkinase-Domäne (AS 489-711) und die Empfängerdomäne eines Antwortregulators (AS 736-851). Der Transmembranbereich von LuxN mit neun transmembranen Helices (Jung et al., 2007) umfasst die Aminosäuren 1-303, des Weiteren enthält LuxN eine Histidinkinasedomäne (463-685, ProDom Domäne PDAOK485) und die Empfängerdomäne eines Antwortregulators (727-840, ProDom Domäne PD000039).

Anhand dieser Domänenstruktur der Hybridsensorkinasen wurden verkürzte LuxQ- und LuxN-Derivate hergestellt. Diese Derivate sind in Abbildung 3.19 schematisch dargestellt. LuxQ(299-859) besteht aus HAMP- und PAS-Domäne, dem Coiled-coil-Bereich sowie der Histidinkinase- und Empfängerdomäne, LuxQ(475-859) besteht aus Coiled-coil-Bereich, Histidinkinase- und Empfängerdomäne, während LuxQ(733-859) nur die Empfängerdomäne eines Antwortregulators besitzt. Entsprechend bestehen LuxN(454-849) aus Histidinkinase- und Empfängerdomäne und LuxN(719-849) lediglich aus der Empfängerdomäne eines Antwortregulators. Die Aminosäurepositionen beziehen sich jeweils auf das Wildtyp-Protein von LuxQ und LuxN.

3.7.1 Heterologe Überproduktion der verkürzten Derivate

Die verkürzten LuxQ- und LuxN-Derivate wurden in dem *E. coli*-Stamm TKR2000, transformiert mit den Plasmiden pNKQ(299-859), pNKQ(475-859), pNKQ(733-859), pNKN(454-849) bzw. pNKN(719-849), heterolog überproduziert. Durch immunologischen Nachweis des His-Tags der Proteine wurde die Produktion und Lokalisation überprüft. Lediglich LuxQ(475-859) mit einem relativen Molekulargewicht von 44,4 kDa wurde in ausreichenden Mengen produziert und lag nahezu vollständig in der löslichen Fraktion vor (Abbildung 3.20A). Die anderen verkürzten Proteine wurden entweder nicht produziert oder unterlagen einem starken proteolytischen Abbau. Dies war auch schon für weitere verkürzte LuxN-Derivate beschrieben worden (Timmen, 2005).

LuxQ(475-859) konnte aus dem Cytosol mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie angereichert werden. In Abbildung 3.20B ist das erste Eluat der Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gezeigt. Ungefähr 70% der Proteine im ersten Eluat können LuxQ(475-859) zugeordnet werden. Die verkürzte Form von LuxQ zeigte in *in vitro*-Experimenten keinen Phosphotransfer auf LuxU (Daten nicht gezeigt). Das verkürzte LuxQ-Derivat schien daher

in einer inaktiven Form vorzuliegen.

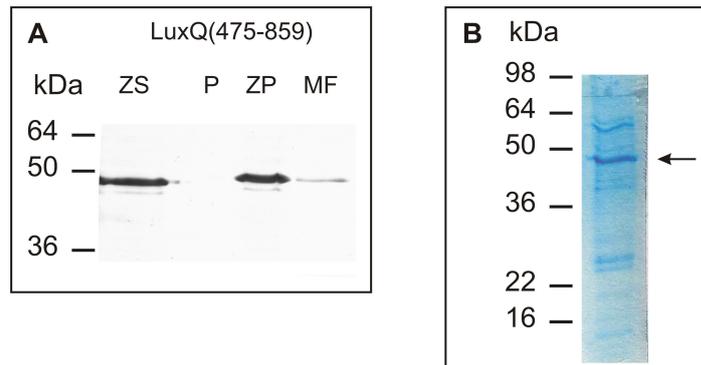


Abbildung 3.20: Lokalisation des verkürzten Derivats LuxQ(475-859). Gezeigt sind die **A** immunologische Detektion von LuxQ(475-859) in den verschiedenen Zellfraktionen von *E. coli* TKR2000 (*ZS* Zellsuspension, *P* Pellet der niedertourigen Zentrifugation, *CP* Cytoplasma und *MF* Membranfraktion) sowie **B** das erste Eluat nach Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie nach 10%iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

3.7.2 Einfluss von LuxQ(475-859) auf die LuxN-Kinaseaktivität

Das angereicherte LuxQ(475-859) wurde für *in vitro*-Experimente mit der Hybridsensor-kinase LuxN eingesetzt. Hierfür wurde LuxN mit LuxQ(475-859) in verschiedenen molaren Verhältnissen bis zu 1 : 1 gemischt und zusammen mit gereinigtem LuxU und 100 μ M [γ -³²P]ATP inkubiert. Die Proben wurden durch 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt und phosphoryliertes Protein wurde im Autoradiogramm detektiert. Die Menge an phosphoryliertem LuxU nahm mit zunehmender Menge von LuxQ(475-859) ab, was auf einen ebenfalls inhibitorischen Effekt des verkürzten LuxQ-Derivats auf die Kinaseaktivität von LuxN schließen lässt. Die Menge an phosphoryliertem LuxU wurde quantifiziert, um die Phosphorylierungsrate von LuxN in Abhängigkeit der Menge an zugegebenem LuxQ(475-859) zu bestimmen. Hierbei wurde die Phosphorylierungsrate von LuxN in Abwesenheit von LuxQ(475-859) gleich 100% gesetzt. Die graphische Darstellung ist in Abbildung 3.21 gezeigt.

Man kann sehen, dass ebenfalls das verkürzte LuxQ-Derivat, das nur aus der Antwortregulatordomäne von LuxQ besteht, eine reduzierende Wirkung auf die LuxN-abhängige Phosphorylierung von LuxU hatte. Wurden die Proteine LuxN und LuxQ(475-859) in einem molaren Verhältnis von 1 : 1 eingesetzt, lag die Phosphorylierungsrate bei ungefähr 35%. Dies bestätigt die auf Versuchen mit LuxQ/LuxN-Chimären beruhende Hypothese, dass nur die Antwortregulatordomäne von LuxQ zur Reduktion der LuxN-Aktivität benötigt wird (Schön, 2007).

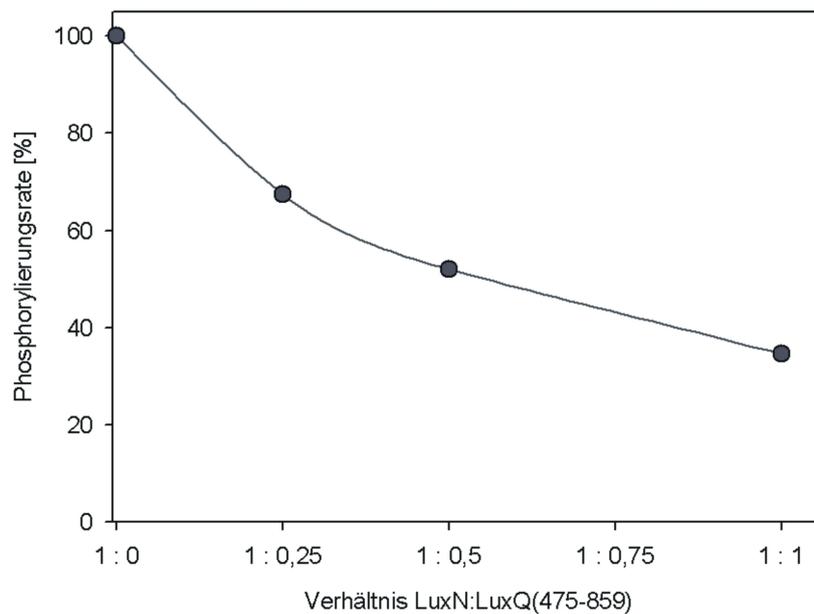


Abbildung 3.21: Einfluss von LuxQ(475-859) auf die LuxN-Kinaseaktivität. LuxN-haltige Membranvesikel wurden mit verschiedenen Mengen angereichertem LuxQ(475-859) sowie mit gereinigtem LuxU und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert (vergl. Kapitel 2.5.12). Gezeigt sind die Phosphorylierungsraten von LuxU durch LuxN in Abhängigkeit der zugegebenen Menge LuxQ(475-859). Die Phosphorylierungsrate in Abwesenheit von LuxQ(475-859) wurde gleich 100% gesetzt.

3.7.3 Überproduktion und Untersuchung von verkürzten LuxN- und LuxQ-Derivaten als Trx-Hybridprotein

Da die verkürzten LuxN- und LuxQ-Derivate außer dem Derivat LuxQ(475-859) nicht stabil in *E. coli* überproduziert werden konnten, wurde die Antwortregulatordomäne von LuxN und LuxQ als Trx-Hybridprotein überproduziert. Die Proteine Trx-LuxN(719-849) und Trx-LuxQ(733-859) konnten auf diese Weise in stabiler Form überproduziert und aus dem Cytoplasma mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie angereichert werden. Die angereicherten Derivate wurden analog zu dem Derivat LuxQ(475-859) für Phosphorylierungsexperimente eingesetzt. Erste Versuche zeigten, dass sowohl Trx-LuxN(719-849) einen reduzierenden Einfluss auf die Kinaseaktivität von LuxQ aufwies, als auch Trx-LuxQ(733-859) auf die Kinaseaktivität von LuxN (Daten nicht gezeigt). In Anwesenheit der Antwortregulatordomäne der jeweils anderen Hybridsensorkinase scheint die Kinaseaktivität zu reduzieren.

Um diese Aussage zu bestätigen, sollte die Empfängerdomäne eines Antwortregulators, der nicht an dem Quorum sensing-System beteiligt ist, als Negativkontrolle eingesetzt werden. Der Antwortregulator KdpE des KdpD-KdpE-Systems von *E. coli* würde sich hierfür eignen.

3.8 Heterologe Überproduktion von LuxO in *E. coli*

Neben der Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Hybridsensorkinase LuxQ und dem Vergleich mit der Hybridsensorkinase LuxN waren die heterologe Überproduktion und biochemische Untersuchung des σ^{54} -abhängigen Antwortregulators LuxO Ziel dieser Arbeit. Melanie Timmen (2005) konnte LuxO bisher nicht in löslicher Form heterolog in *E. coli* bzw. homolog in *V. harveyi* überproduzieren. Der Phosphotransfer von LuxU auf LuxO konnte daher nicht *in vitro* bewiesen werden.

Um die Löslichkeit sowie Aktivität von LuxO zu erhöhen, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit unterschiedliche Ansätze getestet. Diese sind im Folgenden kurz beschrieben:

- Durch veränderte Aufschlussbedingungen sollte die Bildung von Einschlusskörpern verringert werden.
- Die Überproduktion von LuxO als Hybridprotein mit einem extrem löslichen Protein wie z.B. Thioredoxin (Trx) sollte zur Erhöhung der Löslichkeit von LuxO führen.
- Die Kultivierungsbedingungen sollten verändert werden, hierbei wurden die Kultivierungstemperatur und die IPTG-Konzentration zur Induktion erniedrigt.
- Die Überproduktion einzelner LuxO-Bereiche als LuxO/NtrC-Chimärprotein sollte getestet werden.
- Durch den Ansatz des „Rational Engineerings“ mit gezieltem Austausch einzelner Aminosäuren von LuxO sollte die intrinsische Löslichkeit von LuxO erhöht werden.

Einige dieser Ansätze führten zu einer erhöhten Löslichkeit von LuxO. Jedoch führten weder konventionelle Methoden wie veränderte Kultivierungs- und Aufschlussbedingungen oder Überproduktion als Hybridprotein, noch Methoden wie „Rational Engineering“ oder die Produktion von LuxO/NtrC-Chimärproteinen zu einem löslichen *und* aktiven Protein. Daher war es nicht möglich, die Signaltransduktionskaskade LuxN/LuxPQ-LuxU-LuxO *in vitro* zu rekonstruieren.

Im Folgenden sind Herangehensweise und Ergebnisse aller angewandten Methoden beschrieben.

3.8.1 Heterologe Überproduktion und Lokalisation von LuxO

LuxO wurde bisher immer in unlöslicher Form in sogenannten Einschlusskörpern produziert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass LuxO in den *E. coli*-Zellen toxisch ist. Aus diesem Grund wurde die Produktion von LuxO in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pLysS, transformiert mit pT-LuxO-1, untersucht, in dem die Expression unter Kontrolle des T7 Promotors steht. Der Stamm BL21 eignet sich besonders für die heterologe Überproduktion, da er keine Lon-Protease und keine OmpT-Protease besitzt, die Proteine während des Aufschlusses und der Reinigung degradieren könnte. Somit weisen einige überproduzierte Proteine eine höhere Stabilität auf als in anderen Überproduktions-Stämmen. Des Weiteren führt die Insertion des DNA-Fragments des Bakteriophagen DE3 (ein λ -Derivat, welches das *lacI*-Gen, den *lacUV5*-Promotor, den Anfang des *lacZ*-Gens und das Gen für die T7 RNA Polymerase trägt) dazu, dass der einzige Promotor für die Transkription der T7 RNA-Polymerase der durch IPTG induzierbare *lacUV5*-Promotor ist. Das basale Level der T7 RNA-Polymerase in den Zellen kann durch T7-Lysozym, ein natürlicher Inhibitor der T7 RNA-Polymerase, reduziert werden. Auf diese Weise können Plasmide, die den kodierenden Bereich eines für die Zelle toxischen Proteins enthalten, stabilisiert werden.

Die Kultivierung erfolgte aerob bei 37°C, die Expression von *luxO* wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert.

3.8.1.1 Aufschlussbedingungen Häufig werden Einschlusskörper erst beim Aufschließen der Zellen gebildet. Um dies zu verhindern, wurden die Zellen in Puffern resuspendiert, die verschiedene Konzentrationen NaCl bzw. KCl enthielten, und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellen wurden fraktioniert (vergl. Kapitel 2.5.6), die Menge an LuxO wurde in den einzelnen Fraktionen immunologisch nachgewiesen und quantifiziert (vergl. Kapitel 2.5.4).

Die graphische Darstellung in Abb. 3.22 zeigt die prozentuale Verteilung von LuxO im Pellet nach niedertouriger Zentrifugation, im Cytoplasma, sowie im Pellet nach hochtouriger Zentrifugation. Man kann eine deutliche Korrelation zwischen der NaCl-Konzentrationen im Aufschlusspuffer und der Löslichkeit von LuxO erkennen (Abb. 3.22A). Die Löslichkeit nahm mit steigender NaCl-Konzentration zu und erreichte ihr Maximum bei 0,2 M NaCl. Über 70% des LuxO lagen im Cytoplasma vor. Bei noch höheren Konzentrationen war jedoch eine Abnahme der Löslichkeit zu erkennen.

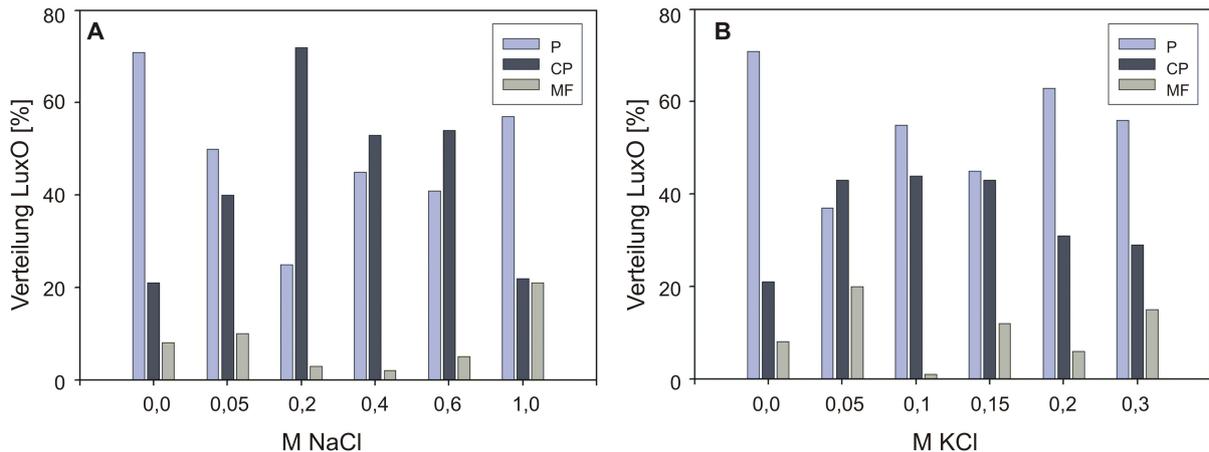


Abbildung 3.22: Prozentuale Verteilung von LuxO in den Fraktionen bei Aufschluss in Gegenwart von Salz. *E. coli* BL21(DE3)/pLysS, transformiert mit pT-LuxO-1, wurde wie in Kapitel 2.5.6 beschrieben kultiviert und fraktioniert. Der Aufschlusspuffer enthielt die angegebenen Konzentrationen an **A** NaCl bzw. **B** KCl. LuxO wurde in den einzelnen Fraktionen quantifiziert (Kapitel 2.5.4). *P* Pellet nach niedertouriger Zentrifugaion. *CP* Cytoplasmafraktion. *MF* Membranfraktion.

Es besteht ebenfalls eine Abhängigkeit der LuxO-Löslichkeit von der KCl-Konzentration im Aufschlusspuffer (Abb. 3.22B). Die Löslichkeit ist bei einer KCl-Konzentration von 0,05 bis 0,15 M am höchsten (ca. 40% liegen löslich vor), allerdings führte KCl im Vergleich zu NaCl lediglich zu einer geringen Erhöhung der Löslichkeit. Im Gegensatz zu der Abhängigkeit der Löslichkeit von der NaCl- und KCl-Konzentration im Aufschlusspuffer zeigte die Gegenwart von CaCl_2 im Aufschlusspuffer keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt).

3.8.1.2 Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie Da LuxO löslich produziert werden konnte, sollte das Protein mit C-terminalem His-Tag mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie aus dem Cytosol angereichert werden. Die Zellen wurden in Gegenwart von 0,2 M NaCl oder KCl im Aufschlusspuffer aufgeschlossen. Die Affinitätschromatographie wurde wie in Kapitel 2.5.8 beschrieben durchgeführt. Es konnte auch unter sehr unspezifischen Bedingungen (ohne Salz und Imidazol im Äquilibrierungs- und Waschpuffer) kein LuxO angereichert werden (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde der His₆-Tag (LuxO-6His) gegen einen His₁₂-Tag (LuxO-12His) ausgetauscht. Hierzu wurden in dem Plasmid sechs weitere Kodons für Histidin eingefügt, so dass während der Translation nun zwölf Histidine C-terminal angehängt wurden (pT-LuxO-2). Auch eine Verlängerung des His-Tags führte nicht zu einer Anreicherung von LuxO (Daten nicht gezeigt). Der His-Tag schien nicht zugänglich zu sein.

Aus diesem Grund wurde ein His-Tag am N-Terminus des Proteins (Plasmid pT-LuxO-2) angebracht und das Protein im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pLysS überproduziert. Befindet sich ein His-Tag am N-Terminus, konnte das LuxO nicht durch Immunodetektion nachgewiesen werden. Es scheint, dass in diesem Fall das Protein nicht produziert oder proteolytisch abgebaut wurde.

3.8.1.3 Anionenaustauschchromatographie Da LuxO weder mit C- noch mit N-terminalem His-Tag mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie angereichert werden konnte, wurde in Erwägung gezogen, LuxO mittels Anionenaustauschchromatographie anzureichern. Bei der Anionenaustauschchromatographie wird gebundenes Protein mittels eines Salz-Gradienten vom Säulenmaterial eluiert. Für diese Art der Anreicherung war der His-Tag nicht notwendig. Aus diesem Grund wurde LuxO ohne zusätzliche C-terminale Histidine überproduziert (entsprechendes Plasmid: pT-LuxO).

Da LuxO aber nur in der löslichen Fraktion vorlag, wenn der Aufschlusspuffer Salz enthielt, wurde erst ein Vorversuch durchgeführt, um zu sehen, ob unter diesen Bedingungen ausreichend Protein an das Säulenmaterial bindete. Als Material wurde Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) verwendet. Zehn verschiedene Ansätze mit jeweils 150 μ l Sepharose wurden in Eppendorfgläser gegeben und mit Puffer [10 mM Tris pH 7,5; 10% Glycerol und 2 mM DTT] mit variierenden KCl-Konzentrationen (0 bis 0,45 M KCl) equilibriert. Zu jedem Ansatz wurde 1 ml Cytosol (9,5 mg Protein/ml, 50 mM KCl) zugegeben, gemischt und 10 min inkubiert. Nachdem sich das Gel abgesetzt hat, wurde der Überstand (Durchfluss) abgenommen und durch 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Der immunologische Nachweis von LuxO erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper gegen 10His-LuxO (Timmen, 2005). Auch bei der geringsten KCl-Konzentration wurde LuxO nicht an die Sepharose gebunden. Aus diesem Grund wurde die Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie nicht weiter verfolgt.

3.8.1.4 Phosphorylierung des Cytosols LuxO konnte zwar löslich in ausreichenden Mengen überproduziert werden, es war aber bisher nicht möglich, das Protein anzureichern. Aus diesem Grund wurde Cytosol des *E. coli*-Stamms BL21(DE3)/pLysS mit überproduziertem LuxO-6His für den Phosphotransfer von LuxU auf LuxO verwendet. Cytosol von *E. coli* BL21(DE3)/pLysS, transformiert mit dem Leervektor pT7-5, diente in den Phospho-

rylierungsexperimenten als Negativkontrolle.

Die Phosphorylierung von LuxO-haltigem Cytosol erfolgte wie in Kapitel 2.5.12 beschrieben. Der Phosphorylierungsansatz enthielt phosphoryliertes und durch Ultrazentrifugation von Membranproteinen und durch Gelfiltration von freien Nukleotiden gereinigtes LuxU. Cytosol mit bzw. ohne überproduziertem LuxO wurde dem Phosphorylierungsansatz zugegeben (60 μ l in einem Endvolumen von 90 μ l). Durch die Zugabe von LuxO-haltigem Cytosol konnte kein phosphoryliertes Protein detektiert werden, das nicht ebenfalls bei der Zugabe von LuxO-freiem Cytosol in phosphoryliertem Zustand vorlag (Abb. 3.23A). Der Phosphotransfer von dem Hpt-Protein LuxU auf den Antwortregulator LuxO konnte daher nicht gezeigt und der in Abb. 3.23B dargestellte Phosphotransfer auf LuxO nicht geklärt werden. Entweder lag LuxO nicht in aktiver Form vor oder die Menge an LuxO war so gering, dass die Phosphorylierung unter der Nachweisgrenze lag und nicht detektiert werden konnte.

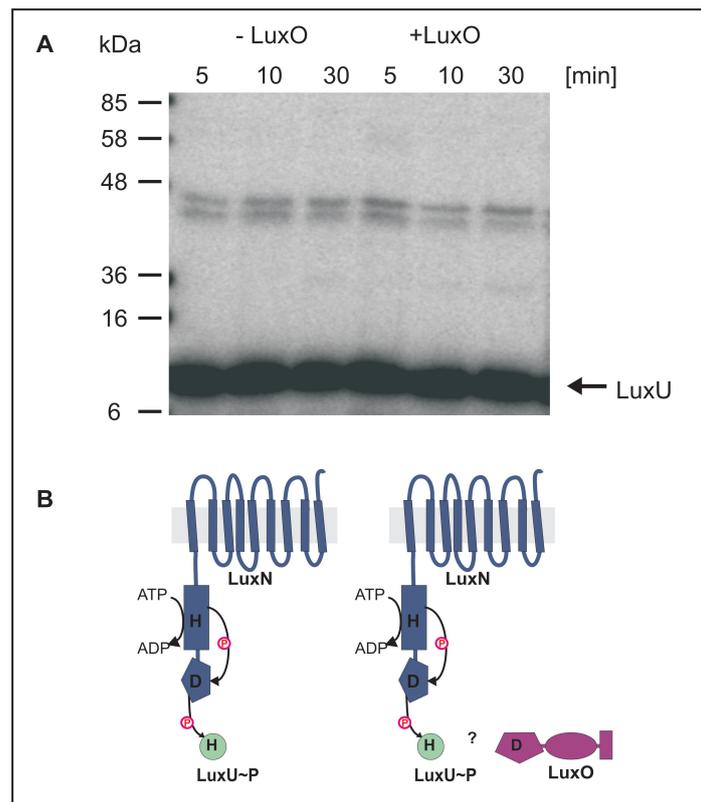


Abbildung 3.23: Phosphorylierung von LuxO-haltigem Cytosol. *E. coli* BL21(DE3)/pLysS, transformiert mit pT-LuxO-1, wurde wie in Kapitel 2.5.6 beschrieben kultiviert und fraktioniert (der Aufschlusspuffer enthielt 200 mM KCl). LuxU wurde wie in Kapitel 2.5.12 beschrieben phosphoryliert und gereinigt. Phosphoryliertes LuxU wurde mit LuxO-haltigem und LuxO-freiem Cytosol gemischt und inkubiert. **A** Autoradiogramm. **B** Modell des Phosphotransfers.

3.8.2 Heterologe Überproduktion und Reinigung von Trx-LuxO

LuxO besitzt sechs Cysteine, die möglicherweise an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind. Unter den reduzierenden Bedingungen im Cytoplasma von *E. coli* könnte es daher zu einer fehlerhaften Konformation des Proteins kommen (Makrides, 1996). In dem *E. coli*-Stamm Origami B erlauben die Deletionen des *trxB*-Gens, das für die Thioredoxin-Reduktase kodiert, und des *gor*-Gens, welches für die Glutathion-Reduktase kodiert, die Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma. Auf diese Weise können Disulfidbrückenenthaltende Proteine korrekt gefaltet und in löslicher Form heterolog überproduziert werden. Des Weiteren kann die Löslichkeit von Proteinen durch einen Thioredoxin-Tag erhöht werden (LaVallie et al., 1993). Thioredoxin (Trx) ist ein sehr kleines Protein, das sich durch eine sehr hohe Löslichkeit und Stabilität im Cytoplasma auszeichnet.

Melanie Timmen (2005) konnte *luxO* in den Vektor pET32a klonieren und LuxO als Hybridprotein mit Thioredoxin und His-Tag heterolog in *E. coli* Origami B überproduzieren. Doch auch mit diesem Expressionssystem, gekoppelt an besondere Wachstumsbedingungen (25°C, KML-Medium mit 2,5 mM Betain, Induktion mit 0,25 mM IPTG bei gleichzeitigem Osmostress mit 0,4 M Saccharose), wurde Trx-LuxO lediglich in sehr geringen Mengen löslich produziert und ließ sich nicht anreichern.

3.8.2.1 Kultivierungsbedingungen Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kultivierung bei niedrigen Temperaturen durchgeführt (18 - 25°C), um die korrekte Faltung der Proteine bei einer langsamen Produktion zu ermöglichen und somit lösliches LuxO zu erhalten. Ebenfalls wurde die Konzentration an IPTG zur Induktion noch weiter reduziert. Die Zellen wurden aerob in LB-Medium kultiviert, aufgeschlossen und fraktioniert (Kapitel 2.5.6). Anschließend wurde Trx-LuxO mittels Immunodetektion des His-Tags in den einzelnen Fraktionen nachgewiesen und quantifiziert.

Die heterologe Überproduktion von Trx-LuxO wurde bei Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 mM IPTG durchgeführt. Während bei einer Konzentration von 0,1 bis 0,2 mM IPTG eine deutliche geringere Proteinmenge nachweisbar war, war die LuxO-Produktion ab einer Konzentration von 0,25 mM maximal (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden alle folgenden Überproduktionen von Trx-LuxO bei 0,25 mM IPTG durchgeführt.

Wie schon von Melanie Timmen (2005) gezeigt, war bei Standard-Kultivierungsbedingungen (37°C) sowie bei Erniedrigung der Temperatur auf 25°C nahezu kein lösliches

Trx-LuxO vorhanden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass der Anteil an löslichem Trx-LuxO erst bei einer Temperatur von 18°C deutlich erhöht war. Bei dieser Temperatur zeigten die Zellen ein sehr langsames Wachstum mit einer Verdopplungszeit von mehr als 4h während der exponentiellen Phase. Nach Induktion mit 0,25 mM IPTG für 20h und anschließender Fraktionierung wurde der His-Tag von Trx-LuxO (68 kDa) mittels Immunoblot nachgewiesen. Wie man in Abbildung 3.24 sehen kann, lagen ca. 60% von Trx-LuxO in der löslichen Fraktion vor.

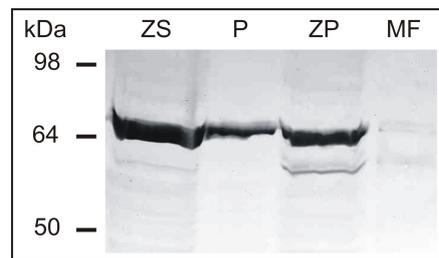


Abbildung 3.24: Lokalisation von Thioredoxin-LuxO bei Kultivierung bei 18°C. Gezeigt ist die Immunodetektion von Thioredoxin-LuxO nach 12,5%iger SDS-PAGE. *ZS* Zellsuspension. *P* Pellet nach niedertouriger Zentrifugation. *CP* Cytoplasmafraktion. *MF* Membranfraktion.

In der Cytoplasmafraktion ist ein weiteres Protein mittels Penta-His-AK nachweisbar, welches in den anderen Fraktionen nicht vorhanden ist. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein Abbauprodukt von Trx-LuxO.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Zellen bei einer Temperatur von 18°C kultiviert und die Expression mit 0,25 mM IPTG induziert. Der Aufschlusspuffer enthielt PMSF als Proteaseinhibitor. Auf die Zugabe von Salz beim Aufschluss wurde verzichtet, da dadurch die Löslichkeit von Trx-LuxO verringert wurde (Daten nicht gezeigt).

3.8.2.2 Anreicherung von Trx-LuxO aus dem Cytoplasma Das lösliche Trx-LuxO wurde aus dem Cytosol mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie angereichert (vergl. Kapitel 2.5.8) und gegen Dialysepuffer [50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 % Glycerol; 200 mM KCl; 2 mM DTT] dialysiert. In Abbildung 3.25 ist die Anreicherung von Trx-LuxO mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gezeigt. Das Hybridprotein Trx-LuxO konnte angereichert werden, allerdings waren deutliche Verunreinigungen durch andere Proteine zu sehen, die auf unspezifische Bindungen zurückzuführen sind. Aufgrund dieser Verunreinigungen kön-

nen lediglich ca. 50% des Gesamtproteins in der ersten Elutionsfraktion LuxO zugeordnet werden.

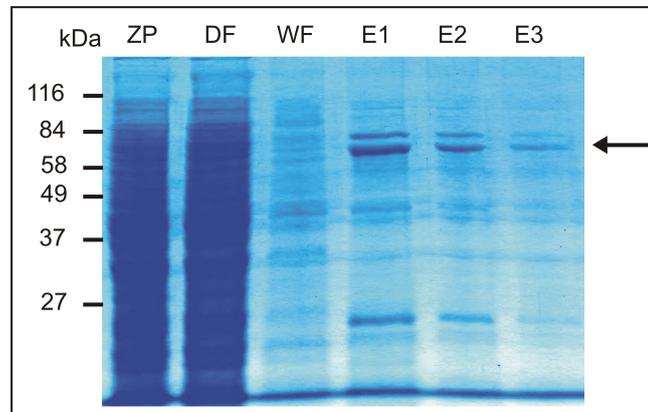


Abbildung 3.25: Reinigung von Thioredoxin-LuxO. Gezeigt ist ein Coomassie-gefärbtes Gel nach 12,5%iger SDS-PAGE. *MF* Membranfraktion. *CP* Cytoplasmafraktion. *DF* Durchfluss. *WF1+WF2* Waschfraktionen 1 und 2. *E1-E3* Elutionsfraktionen 1-3. Der Pfeil markiert Trx-LuxO.

3.8.2.3 Proteolytische Abspaltung von Thioredoxin Zwischen Thioredoxin und dem N-Terminus von LuxO befand sich ein Linker, der neben einem His-Tag Erkennungssequenzen für die Proteasen Thrombin und Enterokinase enthielt. Vorversuche zeigten, dass die Proteolyse mit Enterokinase den unspezifischen Abbau des Proteins zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation mit Thrombin jedoch führte zu einer spezifischen Abspaltung des Trx-Tags von dem 68 kDa großen Hybridprotein Trx-LuxO. Neben dem Trx-Tag wird ebenfalls der His-Tag abgespalten, so dass die Immunodetektion mit dem Penta-His-AK ein 8 kDa großes Fragment nachweist, bestehend aus Trx- und His-Tag. Abb. 3.26 zeigt die Immunodetektion bzw. Coomassiefärbung nach 15%iger SDS-PAGE von mit Thrombin inkubiertem LuxO, aufgetragen wurden jeweils 4 μg Trx-LuxO pro Spur. Die Inkubation mit Thrombin war bei 20°C mit 5 U/mg Protein nach 1h, mit 1 U/mg Protein nach 3h vollständig. Trx-LuxO war ohne Zugabe von Thrombin bei Inkubation für mindestens 7,5h bei 20°C stabil (Abb. 3.26 Spur 1).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Protein mit 1 U Thrombin/mg Protein für 3 h bei 20°C inkubiert und danach mit dem „Biotinylated Thrombin Capture“-Kit von Thrombin befreit.

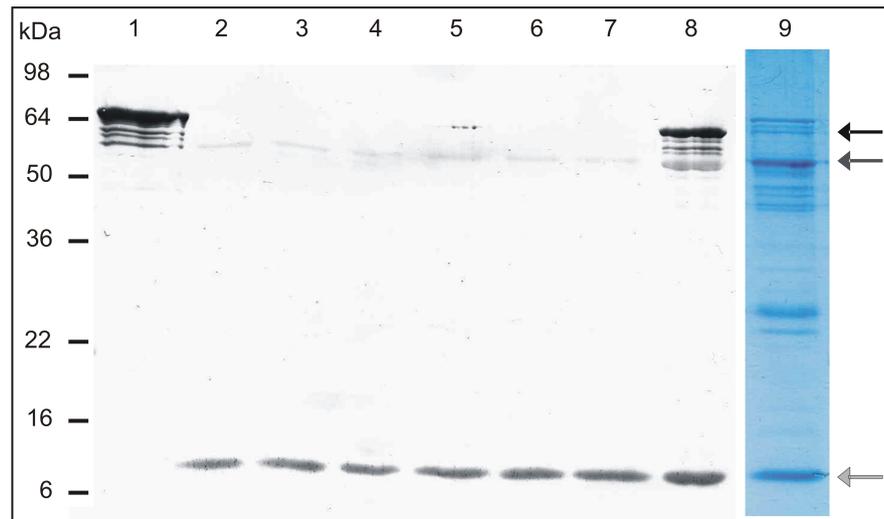


Abbildung 3.26: Thrombinbehandlung von Thioredoxin-LuxO. Gezeigt ist die Immunodetektion bzw. Coomassiefärbung von Thrombin-behandeltem Trx-LuxO ($4 \mu\text{g}/\text{Spur}$) nach 15%iger SDS-PAGE. Die Inkubation wurde bei 20°C durchgeführt. **Spur 1** Inkubation für 7,5h ohne Thrombin. **Spur 2-4** Inkubation für 1/3/7,5h mit $0,05 \text{ U Thrombin}/10 \mu\text{g Protein}$. **Spur 5-7** Inkubation für 1/3/7,5h mit $0,01 \text{ U Thrombin}/10 \mu\text{g Protein}$. **Spur 8** Inkubation für 7,5h mit $0,005 \text{ U Thrombin}/10 \mu\text{g Protein}$. **Spur 9** Inkubation für 7,5h mit $0,01 \text{ U Thrombin}/10 \mu\text{g Protein}$, Coomassiefärbung. Die Pfeile markieren Trx-LuxO (Schwarz), LuxO (Grau) bzw. Trx mit His-Tag und Linker (Hellgrau).

3.8.2.4 ATPase Assay In Kapitel 1.6 sind die aufgrund von Sequenzanalysen vorhergesagten Domänen erläutert. Neben der Empfängerdomäne mit einem konservierten Aspartatrest und der DNA-Bindedomäne besitzt LuxO eine AAA^+ -ATPase Domäne (vergl. Kapitel 1.6.2). Charakteristisch für diese Domänen ist die ATP-Bindung und -Hydrolyse. Um festzustellen, ob LuxO in aktiver Form vorlag, wurde die enzymatische ATPase-Aktivität der AAA^+ -ATPase Domäne von LuxO getestet.

Um eine Negativkontrolle mitzuführen, sollte der für die ATPase-Aktivität essentielle Rest von LuxO ausgetauscht werden. Für die ATP-abhängige Protease FtsH von *E. coli* wurde gezeigt, dass das konservierte Lysin des Walker A-Motivs für die ATP-Bindung und somit für die ATP-Hydrolyse essentiell ist. Wird das konservierte Lysin gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht, ist keine ATPase-Aktivität mehr zu detektieren (Karata et al., 1999). Aufgrund von Sequenzvergleichen des sehr homologen AAA^+ -Moduls konnte das konservierte Lysin des Walker A-Motivs Aminosäure K167 in *V. harveyi* LuxO zugeordnet werden. Dieses Lysin wurde gegen Alanin ausgetauscht. LuxO-K167A wurde wie WT-LuxO in *E. coli* Origami B/pLysS als Trx-Hybridprotein überproduziert, mittels Affinitätschromatographie angereichert und mit Thrombin inkubiert. Unterschiedliche Mengen LuxO und

LuxO-K167A (0,5 - 2 μg) wurden mit 1 mM ATP inkubiert und anschließend die Menge an freiem Phosphat bestimmt (vergl. Kapitel 2.5.14).

Mit dem ATPase-Assay nach Henkel et al. (1988) wurde eine spezifische ATPase-Aktivität von 628 (+/-194) $\text{nmol/mg} \times \text{min}$ bestimmt. Die hohe Standardabweichung ist auf die sehr unterschiedlichen Proteinpräparationen zurückzuführen. Die spezifische Aktivität der ATP-Hydrolyse lag in der gleichen Größenordnung wie die für andere AAA⁺ ATPasen beschriebenen Aktivitäten (FtsH in *E. coli*: 459 $\text{nmol/mg} \times \text{min}$, Karata et al., 1999).

Angereichertes LuxO-K167A wies jedoch die gleiche ATPase-Aktivität auf wie WT-LuxO, was darauf schließen ließ, dass die gemessene ATP-Hydrolyse auf eine Verunreinigung durch ein anderes Protein mit ATPase-Aktivität zurückzuführen war. Wie man an Abb. 3.25 sehen kann, lag LuxO in den Elutionsfraktionen nicht in gereinigter Form vor, lediglich ca. 50% der Gesamtproteinmenge konnten LuxO zugeordnet werden.

Aufgrund des ATPase Assays konnte nicht nachgewiesen werden, ob LuxO in aktiver Form vorlag. Dies konnte aber auch nicht ausgeschlossen werden. Es ist denkbar, dass LuxO eine so geringe ATPase-Aktivität aufwies, dass sie aufgrund der Verunreinigungen, unter denen sich ein Protein mit sehr starker ATPase-Aktivität befinden könnte, so dass die Aktivität von LuxO nicht detektierbar war.

3.8.2.5 Phosphorylierung Angereichertes Trx-LuxO sowie LuxO nach Thrombinbehandlung wurden für Phosphorylierungsexperimente eingesetzt. Hierzu wurde LuxU wie in Kapitel 2.5.12 beschrieben phosphoryliert und angereichertes Trx-LuxO bzw. LuxO (0,67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugegeben. Zu Zeitpunkten zwischen 0,5 und 60 min wurden Proben entnommen und die Reaktion mit SDS-Ladepuffer abgestoppt. Die Proteine (16 μg LuxO pro Spur) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele wurden getrocknet und für mindestens 24h exponiert.

Es konnte kein phosphoryliertes Protein nachgewiesen werden, dass eindeutig LuxO zuzuordnen war (Daten nicht gezeigt). Alle phosphorylierten Proteine wurden in den Kontrollen ohne LuxO ebenfalls detektiert. Es wäre denkbar, dass phosphoryliertes LuxO zwar vorlag, das Signal aber aufgrund des alkali-labilen Anhydrids (Asp~P) unter der Nachweisgrenze lag. In diesem Falle wäre eine Abnahme der Menge an phosphoryliertem LuxU zu erwarten gewesen. Da dies nicht der Fall war, konnte davon ausgegangen werden, dass kein Phosphotransfer von LuxU auf LuxO stattfand.

Es ist bekannt, dass Antwortregulatoren durch einige Phosphodonoren geringen molekularen Gewichts wie z.B. Acetylphosphat phosphoryliert werden können (Lukat et al., 1992). Auch die direkte Phosphorylierung von gereinigtem LuxO durch [^{32}P]-Acetylphosphat, das vorher aus [^{32}P]-Orthophosphat hergestellt wurde (vergl. Kapitel 2.5.12), führte zu keiner nachweisbaren Phosphorylierung von LuxO (Daten nicht gezeigt).

Es war weder eine ATPase-Aktivität noch eine Phosphorylierung von LuxO nachweisbar. Es ist möglich, dass ein für die LuxO-Aktivität nötiger Co-Faktor nicht vorhanden war. Ein weiterer Grund ist, dass LuxO unter den beschriebenen Bedingungen nicht in aktiver Form zu produzieren und zu reinigen war. Es ist denkbar, dass die Kultivierungstemperatur von 18°C die korrekte Faltung von LuxO verhinderte, so dass das Protein zwar löslich, aber nicht aktiv war. Ebenfalls könnte einer der nachfolgenden Behandlungsschritte (Zellaufschluss, Affinitätschromatographie, Thrombinbehandlung) zu einem Aktivitätsverlust geführt haben.

3.8.3 Weitere Expressionssysteme zur Überproduktion von LuxO

Da mit den in den Kapiteln 3.8.1 und 3.8.2 beschriebenen Expressionssystemen LuxO nicht in löslicher und aktiver Form überproduziert und angereichert werden konnte, wurden weitere Expressionssysteme getestet.

Die Überproduktion in dem *E. coli*-Stamm JM109, transformiert mit dem Plasmid pQE-LuxO, führte bei einer Kultivierungstemperatur von 37 bzw. 30°C zu komplett unlöslichem LuxO. Wurden die Zellen bei einer Temperatur von 18°C kultiviert, waren ca. 5% von LuxO löslich, das restliche Protein war im Pellet der niedertourigen bzw. der hochtourigen Zentrifugation nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Das Expressionssystem JM109/pQE-LuxO war somit nicht für die Überproduktion von löslichem LuxO geeignet.

Da die Gene *luxO* und *luxU* beide in einem Operon mit der Überlappung eines Kodons liegen, sollten die Proteine LuxO und LuxU gemeinsam produziert werden. Hierzu wurden die kodierenden Bereiche des Operons *luxOU* in die Plasmide pQE30 bzw. pT7-5 kloniert. Im Falle des Expressionssystems BL21(DE3)/pLysS/pT-LuxOU war weder LuxO (N-terminaler His-Tag) noch LuxU (C-terminaler His-Tag) im Immunoblot nachweisbar. Wurden die Proteine mit dem Expressionssystem JM109/pQE-LuxOU überproduziert, konnte nur LuxO (N-terminaler His-Tag) mittels Immunodetektion nachgewiesen werden. Durch die gemeinsame Überproduktion mit LuxU wurde die Löslichkeit von LuxO allerdings nicht erhöht.

3.9 Überproduktion und Lokalisation von LuxO/NtrC-Chimären

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Löslichkeit von LuxO durch verschiedene Expressionssysteme und Kultivierungsbedingungen deutlich erhöht werden. Allerdings konnte durch keine der beschriebenen Methoden lösliches und aktives LuxO erhalten werden, das sich *in vitro* phosphorylieren ließ.

Anhand von Sequenzvergleichen konnte eine hohe Homologie zwischen LuxO und Proteinen der NtrC-Familie festgestellt werden. Mitglieder der NtrC-Familie besitzen wie LuxO eine Antwortregulator-Empfängerdomäne, eine AAA⁺ ATPase-Domäne sowie eine DNA-Bindedomäne. Es sollten LuxO/NtrC-Chimäre hergestellt werden, welche die Antwortregulator-domäne von LuxO sowie die AAA⁺ ATPase-Domäne und DNA-Bindedomäne von NtrC enthielten und *vice versa*. Ziel war es, im idealen Fall lösliche Chimäre zu produzieren, die für den *in vitro*-Phosphotransfer von LuxU auf LuxO eingesetzt werden können. Außerdem könnte das NtrC/LuxO-Chimär für DNA-Bindestudien eingesetzt werden.

3.9.1 Konstruktion der LuxO/NtrC-Chimäre

Die Domänen des *V. harveyi luxO*-Gens und des *E. coli ntrC*-Gens wurden durch Primerfusionen während der PCR an sehr homologen und konservierten Bereichen ausgetauscht. Hierzu wurde ein Alignment der beiden Proteinsequenzen von LuxO aus *V. harveyi* und NtrC aus *E. coli* erstellt (siehe Anhang, Abb. 5.1 auf Seite 136).

Die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine wiesen eine Identität von 36,9% auf. Vergleich man die einzelnen Domänen miteinander, zeigte sich, dass die beiden Proteine eine konservierte AAA⁺ ATPase Domäne (LuxO: AA 114-393, NtrC: AA 121-400) mit 45,5% Identität und eine etwas schwächer konservierte Antwortregulator-domäne (LuxO: AA 1-113, NtrC: AA 1-120) mit 32,5% Identität besitzen. Kaum konserviert ist hingegen die C-terminale DNA-Bindedomäne (LuxO: AA 394-453, NtrC: AA 401-469), die lediglich 8,7% Identität aufweist. Als Fusionspunkt wurde ein stark konservierter Bereich zwischen Antwortregulator- und AAA⁺ ATPase-Domäne gewählt, dieser Bereich umfasst die AA 140-147 in LuxO und AA 147-154 in NtrC. Zusätzlich wurde eine Vorhersage der Sekundärstruktur von LuxO und NtrC bzw. der LuxO/NtrC-Chimäre mit dem Programm Psipred durchgeführt, um zu prüfen, dass durch den Austausch der Domänen keine Veränderungen in der Sekundärstruktur verursacht wurden (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>, McGuffin et al., 2000).

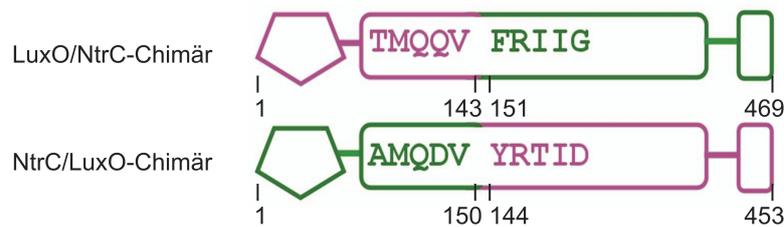


Abbildung 3.27: LuxO/NtrC-Chimäre. Die Abbildung zeigt die Fusionspunkte der LuxO(lila)/NtrC(grün)-Chimäre. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen in den Wildtyp-Proteinen.

Das Chimär LuxO/NtrC besaß somit die 143 N-terminalen Aminosäuren von LuxO und die Aminosäuren 151-469 von NtrC, entsprechend besaß das Chimär NtrC/LuxO die 150 N-terminalen Aminosäuren von NtrC und die Aminosäuren 144-453 von LuxO. Die LuxO/NtrC-Chimäre sind in Abbildung 3.27 schematisch dargestellt. Die kodierenden Bereiche wurden in das Plasmid pET-NtrC kloniert, die daraus resultierenden Plasmide wurden als pET-LuxO/NtrC und pET-NtrC/LuxO bezeichnet.

3.9.2 Lokalisation der LuxO/NtrC-Chimäre

Die Chimäre LuxO/NtrC, NtrC/LuxO sowie die WT-Proteine LuxO und NtrC wurden in *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS überproduziert (vergl. Kapitel 2.3.1). Die Zellsuspension wurde durch Zentrifugation in lösliche und unlösliche Fraktionen sowie in die Membranfraktion unterteilt (vergl. Kapitel 2.5.6) und das Hybrid- bzw. Wildtypprotein durch Immunodetektion des N-terminalen His-Tags lokalisiert.

Die Lokalisation der Chimäre und Wildtypproteine zeigte, dass die Chimäre sowie LuxO-WT unlöslich und im Pellet der niedertourigen Zentrifugation lokalisiert waren (Abb. 3.28). Im Gegensatz dazu war das NtrC-WT-Protein zu 100% in der löslichen Fraktion zu finden. Die Löslichkeit von LuxO konnte weder durch den Austausch der ersten 150 Aminosäuren gegen die von NtrC noch durch den Austausch der letzten 300 Aminosäuren erhöht werden. Somit konnte keine Aussage bezüglich des Einflusses einzelner Domänen auf die Löslichkeit des Gesamtproteins gemacht werden. Die Eigenschaft, LuxO in Form von Einschlusskörpern zu bilden, ist nicht nur auf einen einzelnen Bereich des Proteins zurückzuführen.

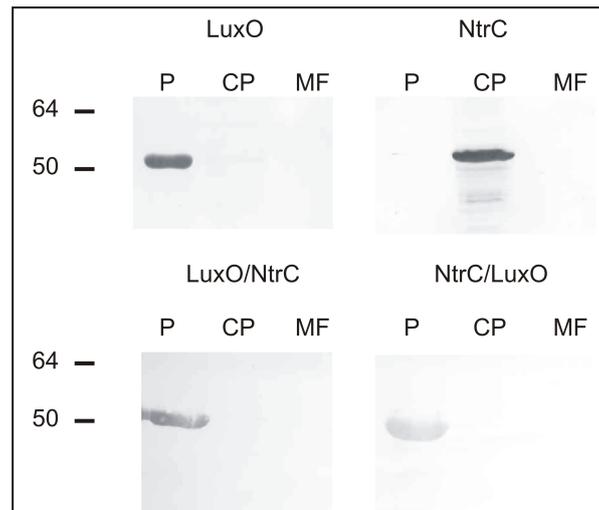


Abbildung 3.28: Lokalisation von LuxO, NtrC und der Chimäre LuxO/NtrC und NtrC/LuxO Gezeigt ist die immunologische Detektion von LuxO, NtrC und den LuxO/NtrC-Chimären in den verschiedenen Zellfraktionen von *E. coli* BL21(DE3)/pLysS nach 12,5%iger SDS-PAGE. *P* Pellet der niedertourigen Zentrifugation. *CP* Cytoplasma. *MF* Membranfraktion.

3.10 Bestimmung der Löslichkeit von verkürzten LuxO-Derivaten

Mit Hilfe der LuxO/NtrC-Chimäre konnte kein Bereich innerhalb von LuxO bestimmt werden, der für die Unlöslichkeit von LuxO verantwortlich war. Um aber einen Bereich zu detektieren, den man gezielt zur Erhöhung der Löslichkeit verändern kann, wurden bioinformatische Analysen durchgeführt.

3.10.1 Bioinformatische Untersuchungen

Um die theoretische Löslichkeit des Antwortregulators LuxO bei einer Überproduktion in *E. coli* zu berechnen, wurden zwei Software-Programme genutzt, die mit unterschiedlichen Algorithmen arbeiten.

- **Recombinant Protein Solubility Prediction, Universität Oklahoma**

Das Software-Tool Recombinant Protein Solubility Prediction von der Universität Oklahoma (Wilkinson und Harrison, 1991) berücksichtigt als Parameter die durchschnittliche Ladung des Proteins und den Anteil an Cystein, Prolin und der „Turnforming“ Reste. Außerdem wird die Hydrophobizität und die Gesamtgröße des Proteins berücksichtigt (Server: <http://www.biotech.ou.edu/>).

- **PROSO, TU München**

Das Programm PROSO wurde in dem Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München entwickelt (Smialowski et al., 2006). Die Häufigkeit aller Mono- und Dipeptide von Proteinen mit bekannter Löslichkeit in *E. coli* wurde bestimmt. Es wurde eine Korrelation zwischen der Löslichkeit und dem Auftreten bestimmter Mono- und Dipeptide erstellt, nach diesen Mono- und Dipeptiden werden Proteine untersucht (Server: <http://webclu.bio.wzw.tum.de:8080/proso/>).

Mit Hilfe des Programms der Universität Oklahoma wurde die theoretische Löslichkeit von LuxO berechnet. Die Sequenz von LuxO wurde in kleine Fragmente von 20 bzw. 40 Aminosäuren unterteilt, um auf diese Weise lösliche und unlösliche Bereiche genauer zu lokalisieren. Nach der Bestimmung der theoretischen Löslichkeit wurden die Bereiche wieder sukzessive vergrößert, bis schließlich zwei Bereiche (Aminosäuren 111-190 und Aminosäuren 291-453) als unlöslich bestimmt werden konnten. Anhand dieser Vorhersage wurde die Sequenz von LuxO in vier Bereiche (AA 1-110, 111-190, 191-290 und 291-453), sowie in die verschiedenen Kombinationen dieser Bereiche (AA 1-190, 1-290, 111-290, 111-453 und 191-452) unterteilt und mit beiden Software-Tools untersucht.

Die theoretischen Löslichkeiten für die einzelnen LuxO-Fragmente, die mit den beiden unterschiedlichen Algorithmen berechnet wurden, sind in Tabelle 3.2 wiedergegeben. Die berechneten Löslichkeiten der beiden Programme stimmen teilweise überein. Es kommen aber auch deutliche Abweichungen in den Vorhersagen vor, da beide Programme auf unterschiedliche Algorithmen zurückgreifen.

3.10.2 Konstruktion und Lokalisation verkürzter LuxO-Derivate

Aufgrund der bioinformatischen Studien mit den Programmen der Universität Oklahoma und Weihenstephan sollten die verkürzten Fragmente LuxO(1-110) und LuxO(191-264), überproduziert in *E. coli*, in der löslichen Fraktion zu finden sein. Für die beiden anderen Fragmente, bestehend aus den Aminosäuren 111-190 bzw. 265-453, wurden unterschiedliche Vorhersagen getroffen, was auf die unterschiedlichen Algorithmen, mit denen die beiden Programme arbeiten, zurückzuführen ist. Um diese Vorhersagen zu verifizieren und zu beurteilen, wurden verkürzte LuxO-Derivate in dem Expressionssystem *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS überproduziert. Neben den vier Derivaten, welche jeweils die vier Bereiche mit unterschiedlicher Löslichkeit beinhalten, wurden ebenfalls alle in Tabelle 3.2 angegebenen Kombinationen der

Tabelle 3.2: Vorhersagen zur Löslichkeit der LuxO-Fragmente. Die Vorhersagen beziehen sich auf LuxO von *V. harveyi* mit N-terminalem His₁₀-Tag und einer Linkerregion von 9 Aminosäuren.

Fragmente	PROSO		Recombinant Protein Solubility Prediction	
	löslich	Wahrsch.	löslich	Wahrsch.
LuxO-WT(1-453)	nein	0,650	nein	0,586
LuxO(1-110)	ja	0,597	ja	0,632
LuxO(111-190)	ja	0,569	nein	0,926
LuxO(191-264)	ja	0,600	ja	0,614
LuxO(265-453)	ja	0,612	nein	0,618
LuxO(1-190)	ja	0,650	nein	0,669
LuxO(1-264)	nein	0,686	nein	0,572
LuxO(111-264)	ja	0,663	nein	0,730
LuxO(111-453)	nein	0,766	nein	0,665
LuxO(191-453)	nein	0,768	nein	0,546

Derivate hergestellt.

Die Löslichkeit wurde durch Fraktionierung der Zellsuspension im Pellet nach niedertouriger Zentrifugation, sowie in Überstand und Pellet nach hochtouriger Zentrifugation bestimmt. Die Pellets wurden jeweils im gleichen Volumen des Überstands resuspendiert. Der Nachweis von LuxO erfolgte durch Immunodetektion des His-Tags.

Die Derivate LuxO(1-264), LuxO(1-190), LuxO(111-264), LuxO(265-453), LuxO(111-453) und LuxO(191-453) wurden in ausreichenden Mengen produziert und unterlagen keinem proteolytischen Abbau. Die Derivate mit einem geringen Molekulargewicht (LuxO(1-110), LuxO(111-190) und LuxO(191-264)) waren in den einzelnen Fraktionen schlecht nachzuweisen. Die Proteine wurden entweder in sehr geringen Mengen produziert oder unterlagen einem proteolytischen Abbau. Die Menge der verkürzten Proteine in den einzelnen Fraktionen wurde mittels ImageQuant quantifiziert, die prozentuale Verteilung der verkürzten LuxO-Derivate in den einzelnen Zellfraktionen ist in Abbildung 3.29 wiedergegeben.

Vergleicht man die theoretisch bestimmte Löslichkeit der verkürzten Derivate mit der experimentell bestimmten Löslichkeit, sieht man, dass es kaum Übereinstimmungen gab. Lediglich die Vorhersagen beider Software-Tools bezüglich des unverkürzten WT-LuxO(1-

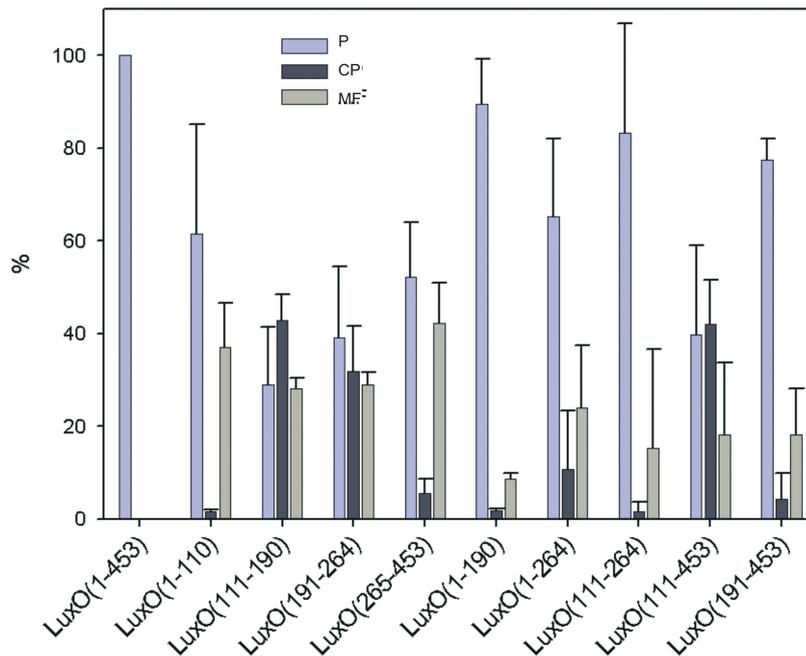


Abbildung 3.29: Lokalisation der verkürzten LuxO-Derivate.

Die verkürzten LuxO-Derivate wurden in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pLysS überproduziert und lokalisiert (Kapitel 2.5.6). Gezeigt ist die prozentuale Verteilung von LuxO im *P* Pellet der niedertourigen Zentrifugation, *CP* Cytoplasma und *MF* Membranfraktion.

453) stimmen mit den experimentellen Ergebnissen überein.

Wie in Tabelle 3.2 zu sehen ist, sollten das N-terminale Fragment LuxO(1-110) und das Fragment LuxO(191-264) löslich sein. Das Programm PROSO wiederum berechnete für alle kurzen Fragmente (ebenso für die Fragmente LuxO(1-190) und LuxO(111-264)) eine theoretische Löslichkeit. Die experimentell bestimmte Löslichkeit der vier verkürzten Derivate LuxO(1-110), LuxO(111-190), LuxO(191-264) und LuxO(265-453) zeigte jedoch eine völlig andere Situation. Vor allem das als löslich vorhergesagte N-terminale Fragment war komplett unlöslich, während die Derivate LuxO(111-190) und LuxO(191-264) zu über 30% im Cytoplasma lokalisiert waren. Das C-terminale Fragment wiederum war unlöslich. Betrachtet man die kombinierten Derivate, die den N-terminalen Teil von LuxO beinhalten (LuxO(1-190) und LuxO(1-264)), scheinen die ersten 110 Aminosäuren von LuxO die alleine produzierten Bereiche AA 111-190 und AA 191-164 wieder unlöslich zu machen. Ebenfalls ist das Gesamtprotein unlöslich.

Die Aminosäuren 1-110 von LuxO scheinen demnach für die Unlöslichkeit des Gesamtproteins verantwortlich zu sein. Überraschend ist die Löslichkeit des Derivats LuxO(111-453),

das aus den löslichen Fragmenten LuxO(111-190) und LuxO(191-264) sowie aus dem unlöslichen Fragment LuxO(265-453) besteht. Hier scheinen die beiden löslichen Fragmente die Unlöslichkeit des C-terminalen Fragments wieder aufzuheben. Verwunderlich ist aber, warum das kombinierte Derivat LuxO(111-264), das nur aus den löslichen Fragmenten LuxO(111-190) und LuxO(191-264) besteht, komplett unlöslich war.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Löslichkeit der einzelnen Fragmente nicht theoretisch vorherzusagen ist. Die Löslichkeit scheint sehr komplexen Regeln zu folgen, die die Berechnung unmöglich machen. Außerdem können zwei lösliche Fragmente nicht zu einem größeren löslichen Fragment zusammengefügt werden. Anhand der experimentellen Ergebnisse der vier einzelnen Fragmente LuxO(1-110), LuxO(111-190), LuxO(191-264) und LuxO(265-453) kann man sich aber auf zwei Bereiche konzentrieren, die man mit dem Ziel der erhöhten Löslichkeit verändern sollte. Dabei handelt es sich um die 110 N-terminalen und die 190 C-terminalen Aminosäuren.

3.11 „Rational Engineering“ von LuxO zur Erhöhung der Löslichkeit in Kooperation mit der Firma Sloning BioTechnology

Um LuxO hinsichtlich der Löslichkeit zu optimieren, wurde der Ansatz des Rational Engineerings gewählt. In Kooperation mit der Firma Sloning BioTechnology sollten mit Hilfe der *Slonomics*TM Technologie verschiedene Varianten der verkürzten LuxO-Derivate hergestellt und charakterisiert werden. Christendat et al. (2000) zeigten für *M. thermoautotrophikum*, dass unlösliche Proteine hydrophobe Cluster mit mehr als 20 AA, einen niedrigen Glutamingehalt ($Q < 4\%$), wenige negativ geladene Reste ($DE < 17\%$) und einen hohen Anteil an aromatischen Aminosäuren ($TYW > 7,5\%$) aufweisen.

Es wurden gezielt Aminosäuren substituiert, um diese für unlösliche Proteine bekannten Merkmale in LuxO zu verändern. Ein Alignment der LuxO-Proteinsequenz mit der *E. coli* NtrC-Sequenz gab Auskunft über die Konservierung der einzelnen Aminosäuren (siehe Anhang, Abb. 5.1 auf Seite 136). Nur nicht-konservierte Aminosäuren sollten ausgetauscht werden.

Um sicher zu gehen, dass sich die ausgewählten Aminosäuren an der Oberfläche von LuxO befanden und somit für die Unlöslichkeit von LuxO verantwortlich sein konnten, wurde die Struktur von LuxO durch Homologiemodellierung mit Hilfe von bekannten Strukturen

homologer Proteine modelliert. Hierzu wurde die Aminosäuresequenz von LuxO mit den vorhandenen Sequenzen kristallisierter Proteine verglichen. Dieser Vergleich erfolgte durch das 3D PSSM Programm SwissProt (<http://swissmodel.expasy.org/>). NtrC1 aus *Aquifex aeolicus* (Doupleff et al., 2005; Lee et al., 2003) wurde als Protein mit der höchsten Homologie ausgegeben (43% Identität). Wie bei LuxO handelt es sich um einen σ^{54} -abhängigen Transkriptionsaktivator mit AAA⁺-ATPase Domäne der NtrC-Familie. Dadurch war es möglich, den Aminosäure Bereich 1-369 anhand der Struktur von NtrC1 aus *Aquifex aeolicus* zu modellieren. Da aber die ausgewählten Reste, die im C-terminalen Bereich ausgetauscht werden sollten, nicht vollständig durch dieses Modell dargestellt werden konnten, wurde außerdem das Homologiemodell anhand von ZraR aus *Salmonella typhimurium* (Sallai und Tucker, 2005) verwendet, bei dem es sich ebenfalls um einen σ^{54} -abhängigen Transkriptionsaktivator handelt (41% Identität). Auf diese Weise konnte ein Bereich der Aminosäuren 134-441 modelliert werden. Das erstellte Modell von LuxO ist in Abbildung 3.30 gezeigt, alle ausgetauschten Reste sind farblich markiert. Man kann sehen, dass sich die ausgewählten Aminosäuren außer Phenylalanin 330 an der Oberfläche befinden. Die Aminosäure F330 wurde dennoch substituiert.

Es wurden verschiedene Varianten des C-terminalen Bereichs von LuxO hergestellt (Bezeichnung der Varianten: LuxO_C_Var1-7). Die in den einzelnen Varianten ausgetauschten Aminosäuren sind in Tabelle 3.3 wiedergegeben. Zwei Varianten enthalten Austausche an allen acht ausgewählten Positionen (LuxO_C_V6 und 7), die anderen Varianten enthalten jeweils nur einige Austausche. Abbildung 3.31 zeigt das Modell von LuxO_C_V6 anhand NtrC (Abb. 3.31A+B) und ZraR (Abb. 3.31C+D). Vergleicht man die Modelle vor und nach dem Austausch aller acht Aminosäuren, kann man sehen, dass die vorhergesagte Proteinfaltung durch den Austausch nicht verändert wurde.

Die sieben verschiedenen Varianten von LuxO(265-453), von denen eine dem Wildtyp-LuxO(265-453) entsprach (LuxO_C_V2), wurden in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pLysS überproduziert (vergl. Kapitel 2.3.1). Die Proteine wurden wie in Kapitel 2.5.6 beschrieben in lösliche und unlösliche Proteine getrennt und durch Immunodetektion des His-Tags lokalisiert. Alle Varianten waren vollständig im Pellet der niedertourigen Zentrifugation zu finden (Daten nicht gezeigt). Die Austausche im C-terminalen Bereich von LuxO führten zu keiner Verbesserung der Löslichkeit des verkürzten Derivats.

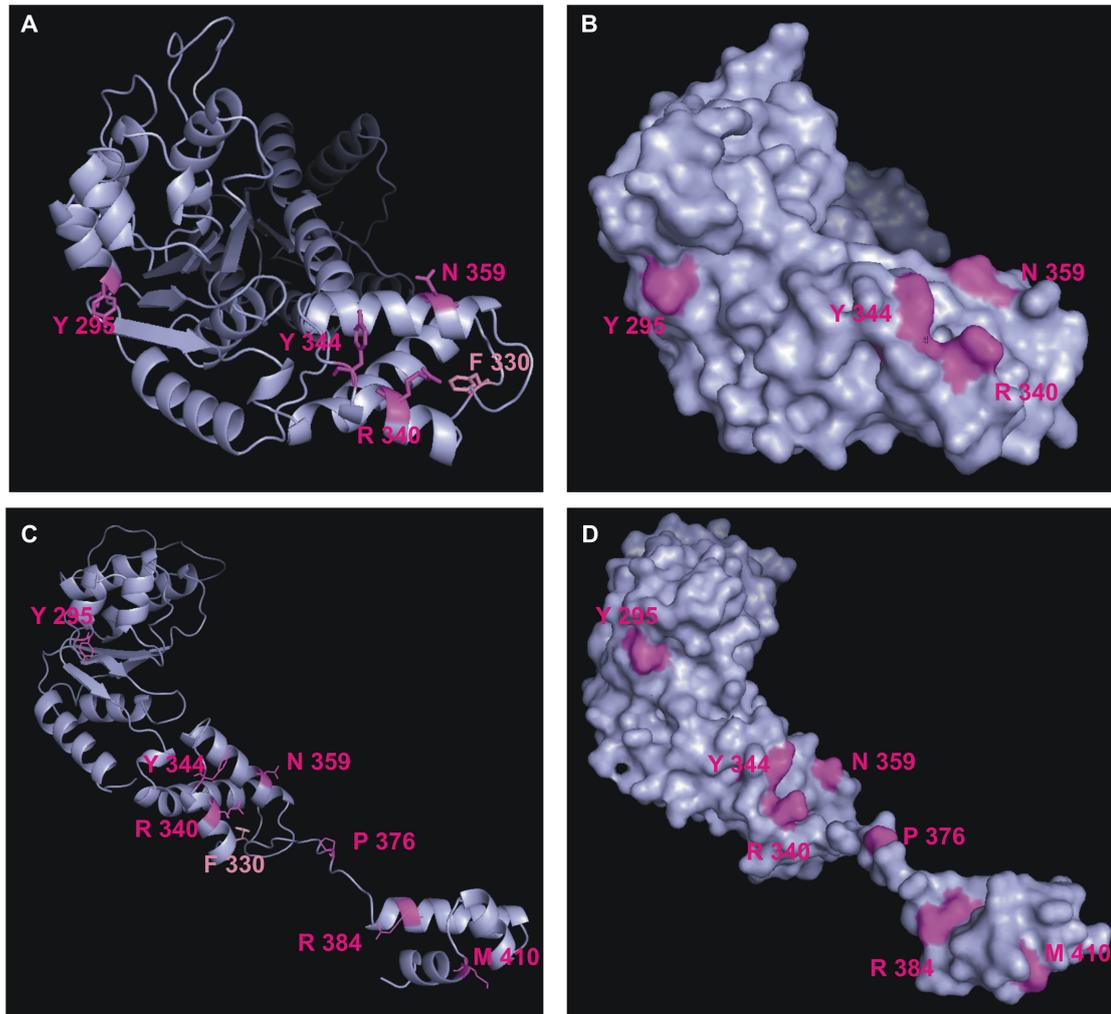


Abbildung 3.30: 3D Modell von LuxO. Die 3D Strukturen von LuxO wurden durch Homologiemodellierung (SwissProt) anhand der bekannten Struktur von NtrC1 aus *Aquifex aeolicus* (LuxO1-369) und ZraR aus *Salmonella typhimurium* (LuxO134-441) erstellt. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Pymol. **A** Cartoon-Darstellung von LuxO(1-369). **B** Darstellung der Oberfläche von LuxO(1-369). **C** Cartoon-Darstellung von LuxO(134-441). **D** Darstellung der Oberfläche von LuxO(134-441). Aminosäuren im C-terminalen Bereich, die ausgetauscht werden sollten, sind farblich markiert.

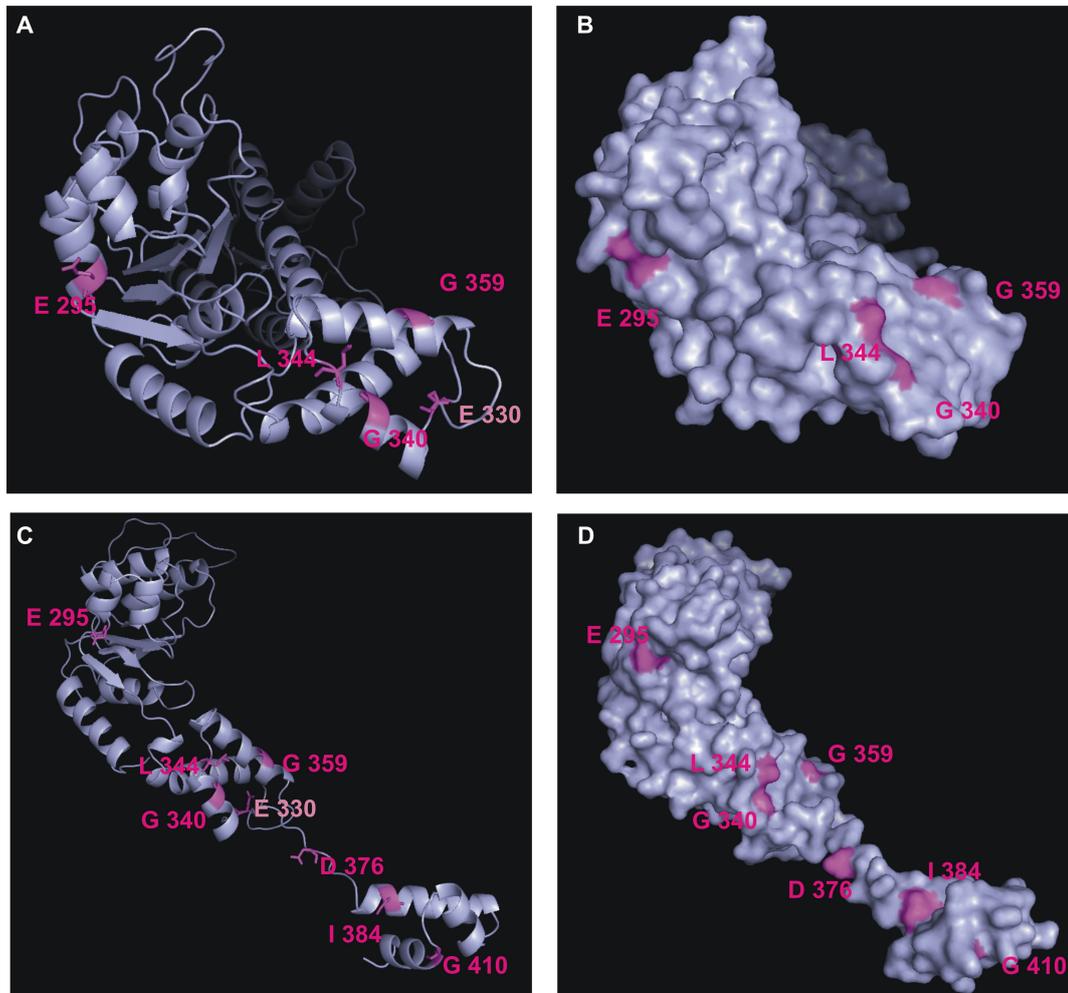


Abbildung 3.31: 3D Modell der LuxO_C_Variante6. Die 3D Strukturen von LuxO_C_Variante6 wurden durch Homologiemodellierung (SwissProt) anhand der bekannten Struktur von NtrC1 aus *Aquifex aeolicus* (LuxO1-369) und ZraR aus *Salmonella typhimurium* (LuxO134-441) erstellt. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Pymol. **A** Cartoon-Darstellung von LuxO(1-369). **B** Darstellung der Oberfläche von LuxO(1-369). **C** Cartoon-Darstellung von LuxO(134-441). **D** von LuxO(134-441). Die ausgetauschten Aminosäuren im C-terminalen Bereich sind farblich markiert.

3.12 Heterologe Überproduktion der Lux-Proteine in *R. sphaeroides*

Bisher wurden die *V. harveyi*-Proteine in unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen heterolog überproduziert. LuxU und LuxP konnten in ausreichenden Mengen produziert und gereinigt werden. Im Gegensatz dazu konnte LuxO nicht in löslicher und aktiver Form in *E. coli* überproduziert werden. Die Überproduktion der Hybridsensorkinasen LuxN und LuxQ führte lediglich zu sehr geringen Mengen Protein im Vergleich zu der Überproduktion von *E. coli*-KdpD, obwohl das gleiche Expressionssystem verwendet wurde.

Da *V. harveyi* ein mariner Organismus ist und die Proteine an eine hohe intrazelluläre Salzkonzentrationen angepasst sein sollten, war es denkbar, dass die Überproduktion in einem nicht-marinen Organismus keine optimale Bedingung darstellte. Für die Überproduktion kam daher *Rhodobacter sphaeroides*, ein fakultativ photosynthetisches α -Proteobakterium, in Frage. *R. sphaeroides* ist ein marines Bakterium, das bei Kultivierung unter semi-aeroben Bedingungen im Dunkeln die Produktion der Intracytoplasmamembran und der Proteine des LH1 und LH2 Komplexes (Light Harvesting-Komplex) und Reaktionszentrums induziert. Unter diesen Kultivierungsbedingungen wird die Oberfläche der Cytoplasmamembran durch Einstülpung vergrößert. Somit eignet es sich besonders zur Überproduktion von Membranproteinen. Neben den beiden membranständigen Hybridsensorkinasen LuxN und LuxQ sollte ebenfalls das cytosolische Protein LuxO in *R. sphaeroides* überproduziert werden. Hierzu wurde *R. sphaeroides* DD13 verwendet, in dem die Gene für die α - und β -Untereinheit des LH1-Komplexes und die L- und M-Untereinheit des Reaktionszentrums (*pufBALMX*) sowie die Gene für die α - und β -Untereinheit des LH2-Komplexes (*pucBA*) deletiert und gegen eine Kanamycin- bzw. Streptomycin-Kassette ausgetauscht sind (Jones et al., 1992a).

Zur Überproduktion in *R. sphaeroides* wurde das Plasmid pRK-CBC1 verwendet, ein pRK415-Derivat (Keen et al., 1988) mit *pucBA*-Genen sowie entsprechender Promotorregion. In diesem Plasmid sollten die *pucBA*-Gene durch *luxO* (pRKO), *luxQ* (pRKQ) bzw. *luxN* (pRKN) ersetzt werden, so dass deren Expression bei semi-aerober Kultivierung im Dunkeln induziert werden kann. Die Lux-Proteine besaßen einen C-terminalen His-Tag, um deren Produktion durch Immunodetektion mit dem His-AK nachweisen zu können. Lediglich die Konstruktion des Plasmids pRKO (pRK-CBC1 mit *luxO*-Gen) war erfolgreich. *R. sphaeroides* DD13 wurde mit dem *E. coli*-Stamm S17-1, transformiert mit dem Plasmid pRKO,

konjugiert und wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben kultiviert. Die erfolgreiche Konjugation wurde durch PCR mit spezifischen Primern der *lux*-Gene bestätigt. LuxO-6His konnte in der Zellsuspension von *R. sphaeroides* durch Immunodetektion des His-Tags nicht nachgewiesen werden. LuxO wurde ebenfalls mit dem LuxO-AK versucht nachzuweisen, da eine C-terminale Prozessierung während der Kultivierung möglich war. Doch auch der Nachweis von LuxO durch den LuxO-AK war nicht erfolgreich.

Demnach scheint das Expressionssystem nicht für die heterologe Überproduktion von cytosolischen Proteinen geeignet zu sein. Ob die membranständigen Proteine LuxQ und LuxN in *R. sphaeroides* erfolgreich überproduziert werden können, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

4 Diskussion

Die Zelldichte-abhängige Genregulation wurde in den letzten Jahren zu einem wichtigen Thema für das Verständnis von bakteriellem „Verhalten“ innerhalb einer Population. Von besonderem Interesse ist das marine Bakterium *Vibrio harveyi*, da es ein sehr komplexes Quorum sensing-System aufweist. Die Besonderheit dieses Quorum sensing-Systems liegt in der Kombination der Merkmale Gram-positiver *und* Gram-negativer Organismen (Miller et al., 2002; Mok und Bassler, 2003). Als Signalmoleküle werden ein Homoserinlaktone (HAI-1), ein Furanosyl-Borat-Diester (AI-2) sowie ein (S)-3-Hydroxytridekan-4-on (CAI-1) verwendet. Die Reizwahrnehmung und Signalweiterleitung erfolgt über ein Signaltransduktionssystem nach dem Prinzip der bakteriellen Zweikomponenten-Systeme (Kofoid und Parkinson, 1988; Parkinson und Kofoid, 1992).

Im Vordergrund standen hierbei stets genetische Untersuchungen. Nur wenige biochemische Charakterisierungen, welche Details der Signalaufnahme und -weiterleitung beinhalten, liegen bisher vor. Die Hybridsensorkinase LuxN konnte biochemisch charakterisiert werden (Timmen et al., 2006). Ebenfalls konnte die Topologie von LuxN aufgeklärt werden (Jung et al., 2007). Der Antwortregulator LuxO konnte bisher lediglich in Form von Einschlusskörpern heterolog in *E. coli* überproduziert werden (Timmen, 2005), eine biochemische Charakterisierung und somit vollständige Rekonstruktion der Signalkaskade war daher nicht möglich. Ebenfalls wurde die Hybridsensorkinase LuxQ heterolog überproduziert aber noch nicht weiter charakterisiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die enzymatischen Aktivitäten der AI-2-abhängigen Hybridsensorkinase LuxQ *in vitro* zu charakterisieren und mit denen von LuxN zu vergleichen. Insbesondere sollten Veränderungen der Aktivitäten unter Einfluss des Autoinduktors untersucht werden. Des Weiteren war die Überproduktion, Reinigung und Charakterisierung des Antwortregulators LuxO Ziel dieser Arbeit.

4.1 Biochemische Untersuchungen der Hybridsensorkinase LuxQ

LuxQ von *V. harveyi* gehört zu der Familie der Hybridsensorkinasen und weist neben der Ähnlichkeit zu LuxN Ähnlichkeit zu anderen Hybridsensorkinasen auf, wie z.B. Sln1p von *Saccharomyces cerevisiae* (Lu et al., 2004) und CbbSR von *Rhodospseudomonas palustris* (Romagnoli und Tabita, 2007). Alle diese Proteine besitzen neben der Histidinkinasedomä-

ne eine Empfängerdomäne eines Antwortregulators, somit kommt es nach der Autophosphorylierung zu einem intramolekularen Phosphotransfer. Sequenzalignments (LALIGN, www.ch.embnet.org) ergaben zwei konservierte Phosphorylierungsstellen: Histidin 492 und Aspartat 785. Für die Hybridsensorkinase LuxQ werden drei verschiedene Aktivitäten vorhergesagt:

1. Hydrolyse von ATP und Autophosphorylierung an einem konservierten Histidinrest der Histidinkinasedomäne;
2. *intramolekularer* Phosphotransfer zu einem konservierten Aspartatrest der Empfängerdomäne eines Antwortregulators und *intermolekularer* Phosphotransfer zu dem HPT-Protein LuxU;
3. Dephosphorylierung von LuxU.

Diese drei Aktivitäten konnten für die Hybridsensorkinase LuxN biochemisch gezeigt werden (Timmen et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die enzymatischen Aktivitäten von LuxQ *in vitro* charakterisiert und mit denen von LuxN verglichen. Dazu wurde das *luxQ* Gen mittels PCR amplifiziert und in einen geeigneten Expressionsvektor für *E. coli* kloniert. LuxQ wurde C-terminal ein „His-Tag“ zur Detektion im Immunoblot angefügt. Das so hergestellte Plasmid wurde in den *E. coli*-Stamm TKR2000 transformiert und die Zellen kultiviert. Nach Aufschluss und Fraktionierung wurde die Expression und Lokalisation von LuxQ mittels SDS-PAGE und Westernblot-Analysen überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die Sensorkinase LuxQ mit einer relativen Molekülmasse von 98 kDa in der Membranfraktion zu finden war. Der Anteil an LuxQ war jedoch sehr gering. Im Vergleich mit LuxN war der Anteil an LuxQ in den Membranvesikeln noch geringer. Weniger als 1% der Membranproteine konnte LuxQ zugeordnet werden.

4.1.1 Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten von LuxQ

Für *in vitro*-Phosphorylierungen wurden invertierte LuxQ-haltige Membranvesikel mit radioaktivem ATP inkubiert. Bisher konnte kein phosphoryliertes LuxQ im Autoradiogramm detektiert werden. Auch für LuxN konnte lediglich eine sehr schwache Autophosphorylierung sichtbar gemacht werden (Timmen et al., 2006). Da die LuxQ-Kinaseaktivität aber geringer als die von LuxN ist, lag die Menge an phosphoryliertem LuxQ vermutlich unter der

Nachweisgrenze. Auch durch Inkubation mit [α - ^{32}P]ATP und anschließender Dünnschichtchromatographie konnte keine LuxQ-spezifische ATP-Hydrolyse nachgewiesen werden. Die Inkubation von Membranvesikeln, die keine überproduzierte Sensorkinase enthielten, zeigte die gleiche ATP-Hydrolyse wie LuxQ- oder LuxN-haltige Membranvesikel. Ursache für die unspezifische ATP-Hydrolyse sind andere in den Membranvesikeln enthaltene Proteine mit entsprechender enzymatischer Aktivität.

Die Inkubation von LuxQ-haltigen Membranvesikeln und LuxU in Gegenwart von [γ - ^{32}P]ATP führte zu einer deutlichen Akkumulation von phosphoryliertem LuxU. Auf diese Weise konnte indirekt gezeigt werden, dass LuxQ eine Autophosphataseaktivität besitzt. LuxU~P konnte im Autoradiogramm detektiert und die Kinaseaktivität von LuxQ bestimmt werden. LuxQ wies innerhalb der ersten 2,5 min einen schnellen Phosphotransfer zu LuxU auf, danach wurde LuxU mit einer geringeren Geschwindigkeit phosphoryliert. Für die Initialrate konnte eine Geschwindigkeit von 0,27 pmol/min x mg Protein bestimmt werden. Insgesamt konnten lediglich 0,1% der eingesetzten Menge LuxU phosphoryliert im Autoradiogramm nachgewiesen werden. Die *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente zeigten, dass kein phosphoryliertes LuxU zu detektieren ist, wenn LuxQ-H492Q oder LuxQ-D785N eingesetzt werden. Hierdurch konnten die beiden postulierten Phosphorylierungsstellen von LuxQ biochemisch bestätigt werden. Zusammen mit den Experimenten zu LuxU-H58Q von Melanie Timmen (2005) konnte der Phosphotransfer nach dem Schema H1-D1-H2 für die LuxQ-LuxU-Signaltransduktion bewiesen werden.

Untersuchungen des BvgSA-Systems aus *B. pertussis* und des ArcBA-Systems aus *E. coli* bestätigen einen ebensolchen Transfers des Phosphorylrestes nach dem Schema H1-D1-H2-D2 (Uhl und Miller, 1996a). Für diese *in vitro*-Studien wurden die Komponenten des Phosphotransfers in ihre einzelnen Domänen zerlegt und auf ihre enzymatischen Aktivitäten untersucht. Dabei konnte bestätigt werden, dass kein Transfer von Histidin H1 zu Histidin H2 erfolgt, wie es in PTS-Systemen beobachtet werden konnte (Saier, 1989). Auch *in vivo* war die D1-Domäne für die Signaltransduktion essentiell (Uhl und Miller, 1994).

Neben der Kinaseaktivität von LuxQ konnte ebenfalls die Phosphataseaktivität *in vitro* nachgewiesen werden. Wie LuxN zeigte LuxQ eine zeitabhängige Dephosphorylierung von LuxU. Innerhalb von einer Minute wurden ca. 80% von LuxU in einer LuxQ-spezifischen Reaktion dephosphoryliert. Danach nahm die Dephosphorylierungsgeschwindigkeit ab. An-

hand der schnellen Initialrate konnte eine spezifische Aktivität von 0,1 pmol/min x mg bestimmt werden. Für Asp785 konnte eine essentielle Rolle in der Dephosphorylierung von LuxU gezeigt werden. Das Derivat LuxQ-D785N zeigte keinerlei Phosphataseaktivität in *in vitro* Experimenten. Diese Rolle wurde auch schon für LuxN (Timmen et al., 2006) und für die Hybridsensorkinasen ArcB und EvgS in *E. coli* (Uhl und Miller, 1996a,b; Schuster et al., 2001) gezeigt. Während beide phosphatakzeptierenden Aminosäuren His492 und Asp785 essentiell für die Kinaseaktivität von LuxQ waren, zeigte das Derivat LuxQ-H492Q die gleiche Dephosphorylierungsrate wie WT-LuxQ. Hieraus kann man schließen, dass es nach der Dephosphorylierung von LuxU durch den konservierten Aspartatrest zu keinem intramolekularen Phosphotransfer auf den konservierten Histidinrest kommt.

Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, ob die Phosphorylgruppe nach der Dephosphorylierung direkt freigesetzt oder erst an Asp785 gebunden wird. Eine schnelle Bindung der Phosphorylgruppe an Asp785 der Empfängerdomäne von LuxQ mit einer langsameren Freilassung würde den biphasischen Verlauf der Dephosphorylierung erklären.

Die rückwärtsgerichtete Dephosphorylierung bietet eine zusätzliche Regulationsmöglichkeit, die auch bei vielen Histidinkinasen zu finden ist. Diese sind in der Lage ihren zugehörigen Antwortregulator zu dephosphorylieren (Keener und Kustu, 1988; Aiba et al., 1989; Lois et al., 1993). Bifunktionale Histidin- oder Hybridhistidinkinasen sind häufig in Signaltransduktionssystemen zu finden, die schnell ausgeschaltet werden müssen. So führt zum Beispiel der Wechsel von anoxygenen zu oxygenen Bedingungen zu einer schnellen Dephosphorylierung von ArcB und ArcA in *E. coli* (Pena-Sandoval et al., 2005). Während die Phosphorylierung von ArcB recht labil ist, ist die Phosphorylierung des Antwortregulators ArcA stabil und hat eine Halbwertszeit von mehr als einer Stunde (Georgellis et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die ArcA-Dephosphorylierung durch die HPt- und die RR-Domäne von ArcB katalysiert wird (Pena-Sandoval et al., 2005).

Die Regulation kann ebenfalls auf der Ebene der Antwortregulatoren geschehen. Acylphosphate werden sowohl in azider als auch in alkalischer Umgebung schnell hydrolysiert, während die Bindung unter neutralen Bedingungen über mehrere Stunden stabil bleibt (DiSabato und Jencks, 1961). Für Antwortregulatoren sind sehr unterschiedliche Halbwertszeiten zwischen Sekunden und mehreren Stunden bekannt (Weiss und Magasanik, 1988; Igo et al., 1989; Makino et al., 1989; Wright et al., 1993).

Zusätzliche Stabilisierung der Asp~P-Bindung durch den Antwortregulator kann wie für den Antwortregulator Ssk1 in *S. cerevisiae* beschrieben zu einer Halbwertszeit von ungefähr 2 Tagen führen (Janiak-Spens et al., 1999). Ebenfalls scheinen Acylphosphate in thermophilen Proteinen im Gegensatz zu deren mesophilen Counterparts stabilisiert zu sein, was sich ebenfalls durch eine längere Halbwertszeit bemerkbar macht (Swanson et al., 1996; Goudreau et al., 1998).

Bisher liegen noch keine biochemischen Daten über die Phosphorylierung von LuxO vor. Für das Quorum sensing-System von *V. harveyi* ist bisher noch nichts über eine Autophosphataseaktivität oder eine intrinsische Stabilisierung von LuxO bekannt. Daher liefert die Phosphataseaktivität von LuxN und LuxQ die einzige bekannte Möglichkeit, das Gleichgewicht aktiv in die unphosphorylierte Form der Proteinkomponenten zu bringen.

4.1.2 Einfluss von LuxP und Autoinduktor-2 auf LuxQ

Chen et al. (2002) kristallisierten heterolog in *E. coli* überproduziertes LuxP von *V. harveyi* zusammen mit dem Autoinduktor AI-2 von *E. coli*. Ausgehend von der Tatsache, dass LuxP zusammen mit AI-2 gereinigt werden konnte, wurde LuxP in den Stämmen *E. coli* BL21(DE3)/pLysS (*luxS*⁺) und *E. coli* MDAI-2 (*luxS*⁻) überproduziert und gereinigt. Durch einen AI-2-Biolumineszenz-Assay konnte nachgewiesen werden, dass LuxP in dem *luxS*-positiven Stamm als Komplex mit AI-2 (LuxP/AI-2) und in dem *luxS*-negativen Stamm AI-2-frei (LuxP) produziert und gereinigt werden konnte. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Supplementierung des Kultivierungsmediums mit 1 mM Borsäure zu einer verstärkten Bildung des borhaltigen Autoinduktors führt.

Um den Einfluss von LuxP und AI-2 auf die LuxQ-Aktivitäten zu zeigen, wurden Phosphorylierungen *in vitro* durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten LuxQ-haltige Membranvesikel, gereinigtes LuxU und verschiedene Konzentrationen gereinigtes LuxP bzw. LuxP/AI-2. Die Initialgeschwindigkeit der LuxQ-Kinaseaktivität wurde nicht durch AI-2-freies LuxP beeinflusst, sie nahm aber mit steigender LuxP/AI-2-Konzentration ab. Dies stimmte mit früheren *in vivo* Ergebnissen überein, dass die Bindung von LuxP keinen Einfluss auf LuxQ hat. Erst die Bindung von AI-2 hat einen Einfluss auf die Kontaktfläche von LuxQ::LuxP, was zu einer Änderung der enzymatischen Aktivitäten führt (Neiditch et al., 2006). Die Initialgeschwindigkeit der LuxQ-Kinaseaktivität konnte durch eine LuxP/AI-2-

Konzentration von $25 \mu\text{M}$ um maximal 40% reduziert werden, eine halbmaximale Reduktion war bei ungefähr $5 \mu\text{M}$ zu sehen.

Während die Kinaseaktivität von LuxQ signifikant durch die Anwesenheit von AI-2 reduziert wurde, hatte die Zugabe von LuxP und LuxP/AI-2 keinen Einfluss auf die Phosphataseaktivität von LuxQ. Dadurch kommt es zu einem unterschiedlichen Kinase-zu-Phosphataseverhältnis in Abhängigkeit der Zelldichte. Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivitäten von der Zelldichte ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt. Eine HAI-Unabhängigkeit der Phosphataseaktivität konnte auch schon für LuxN gezeigt werden (Timmen et al., 2006).

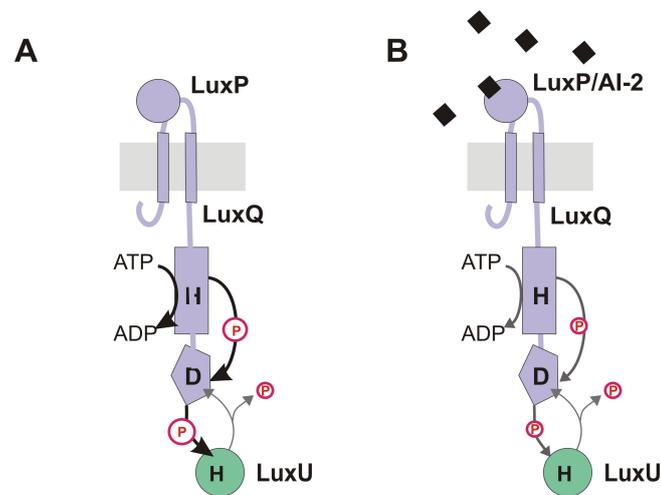


Abbildung 4.1: Modell der enzymatischen Aktivitäten von LuxQ in Abhängigkeit der Zelldichte. Gezeigt ist die schematische Darstellung der Kinase- und Phosphataseaktivität von LuxQ bei **A** niedriger Zelldichte und **B** hoher Zelldichte. Die Stärke der Pfeile spiegelt die Stärke der jeweiligen Aktivitäten wider.

4.1.3 Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von LuxQ und LuxN

Die enzymatischen Aktivitäten von LuxQ wurden mit denen von LuxN verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität von LuxN mit $0,44 \text{ pmol/min}$ ungefähr 10 mal so hoch war wie die Kinaseaktivität von LuxQ. Nach 15 min Inkubation wurde die 8-fache Menge an phosphoryliertem LuxU detektiert. Ebenfalls unterschied sich die berechnete maximale Geschwindigkeit stark zwischen den beiden Proteinen. Der bestimmte K_m -Wert für ATP von $609 \mu\text{M}$ (LuxN) bzw. $984 \mu\text{M}$ (LuxQ) lag jedoch im gleichen Bereich. Außerdem lag der K_m -Wert für ATP in der gleichen Größenordnung wie die der CheA-Histidinkinasen von *Escherichia coli* ($770 \mu\text{M}$) und *Rhodobacter sphaeroides* ($250 \mu\text{M}$ für CheA1 und $610 \mu\text{M}$ für CheA2) (Porter und Armitage, 2002).

Unterschiede waren ebenfalls in der Dephosphorylierung von LuxU zu sehen. Die beiden Hybridsensorkinasen zeigten unterschiedliche Dephosphorylierungsraten während der ersten Minuten. Danach zeigten beide Proteine eine nahezu identische Geschwindigkeit der Dephosphorylierung von LuxU~P. Betrachtet man die Initialraten der LuxU-Dephosphorylierung, zeigte LuxN eine 4-fach höhere Phosphataseaktivität. Vergleicht man die Initialgeschwindigkeiten der Kinase- und Phosphataseaktivitäten, zeigt sich ein Kinase-zu-Phosphatase-Verhältnis von 14:1 für LuxN und ein Verhältnis von 4:1 für LuxQ. Diese Ergebnisse geben den ersten biochemischen Anhaltspunkt, dass das Kinase-zu-Phosphatase-Verhältnis für LuxN größer als das für LuxQ ist. Der durch LuxQ vermittelte Phosphorylierungsgrad von LuxU ist daher geringer als der durch LuxN vermittelte.

Neben dem Kinase-zu-Phosphatase-Verhältnis der beiden Hybridsensorkinasen war die Signalstärke des jeweiligen Autoinduktors von Interesse. Aufgrund der Biolumineszenz von *luxM*-, *luxS*- und *cqsA*-Mutanten wurde postuliert, dass der Einfluss der Autoinduktoren in der Reihenfolge HAI-1 > AI-2 > CAI-1 abnimmt (Henke und Bassler, 2004a). Für HAI-1 und AI-2 konnte eine Beeinflussung und Reduktion der Kinaseaktivitäten gezeigt werden. Die Konzentration der Autoinduktoren, bei der eine halbmaximale Reduktion der Aktivität vorlag, wurde mit 5 μ M bestimmt. Im Gegensatz zu einer etwa 40%igen Reduktion der Kinaseaktivität von LuxQ durch AI-2 konnte für HAI-1 allerdings eine Reduktion der LuxN-Kinaseaktivität um 70% gezeigt werden (Timmen et al., 2006). Diese biochemischen Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass der Einfluss von HAI-1 größer als der von AI-2 ist.

HAI-1 stellt ein Signal für die artspezifische Kommunikation von *V. harveyi* dar, während AI-2 von einer Reihe Organismen produziert wird. Das artspezifische Quorum sensing scheint gegenüber dem interspezifischen Quorum sensing eine übergeordnete Rolle zu spielen. Dies wird durch die größere Signalstärke von HAI-1 und die höheren Aktivitäten von LuxN deutlich. Nach wie vor ist ungeklärt, warum *V. harveyi* die Zelldichte der artfremden Organismen wahrnimmt und wie dieses Signal integriert wird.

4.2 Mathematische Modellierung des HAI-1- und LuxP/AI-2-abhängigen Signalwegs

Die Hybridsensorkinasen LuxN und LuxQ wurden getrennt voneinander biochemisch charakterisiert. Die gemeinsame Betrachtung sollte Aufschluss über das Zusammenspiel der Signalwege und die Integration von Signalen geben. Durch die Erstellung eines mathematischen Modells mit Hilfe von Differentialgleichungen konnte die relative Menge an phosphoryliertem LuxU in Abhängigkeit der HAI-1- und AI-2-Konzentrationen errechnet werden. Für das Modell wurden keine direkten Interaktionen zwischen den LuxN- und LuxQ-abhängigen Signalwegen angenommen. Eine Kommunikation zwischen den Signalwegen wurde nur durch die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von LuxU angenommen.

Die Menge an phosphoryliertem LuxU stellt einen gewichteten Mittelwert zwischen den Signalen der einzeln betrachteten Signalwege dar. Die Gewichtung bzw. die relative Stärke der beiden Signalwege wird durch die Konstante τ ($0 < \tau < 1$) dargestellt. Jeder Autoinduktor reduziert die Kinaseaktivität der entsprechenden Hybridsensorkinase um einen gewissen Wert. Die maximale Reduktion konnte erst durch die Kombination der beiden Autoinduktoren erreicht werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit *in vivo*-Experimenten, in denen gezeigt werden konnte, dass die Expression bestimmter Gene nur in Anwesenheit beider Autoinduktoren maximal ist (Mok et al., 2003).

Abbildung 4.2 zeigt das dreidimensionale Modell des Einflusses der Autoinduktoren auf den LuxU~P-Output für $\tau = 0,7$. Die präsentierten Tendenzen waren unabhängig von dem wahren Wert τ , der lediglich die relative Signalstärke beider Autoinduktoren im kombinierten LuxN/LuxPQ/LuxU-System beeinflussen würde.

Durch das Modell konnte die Menge an phosphoryliertem LuxU bei einer Konstante $\tau=0,7$ nicht unter 45% gesenkt werden. Da HAI-1 die Kinaseaktivität auf ca. 30% reduziert, wäre zu erwarten gewesen, dass die Menge an phosphoryliertem LuxU in Anwesenheit von LuxN und HAI-1 sowie LuxPQ und AI-2 noch weiter reduziert wird. Dies war im mathematischen Modell nicht der Fall. Für diese subadditive Reduktion sind zwei Erklärungen möglich: entweder wird durch den biochemischen Downstream-Prozess ein scharfer Schwellenwert geschaffen, sodass eine geringe Reduktion der Menge an phosphoryliertem LuxU durch Zugabe des zweiten Autoinduktors bestimmte Gene vollständig exprimiert werden können. Ein solcher Schwellenwert kann durch das Equilibrium einer enzymatischen Um-

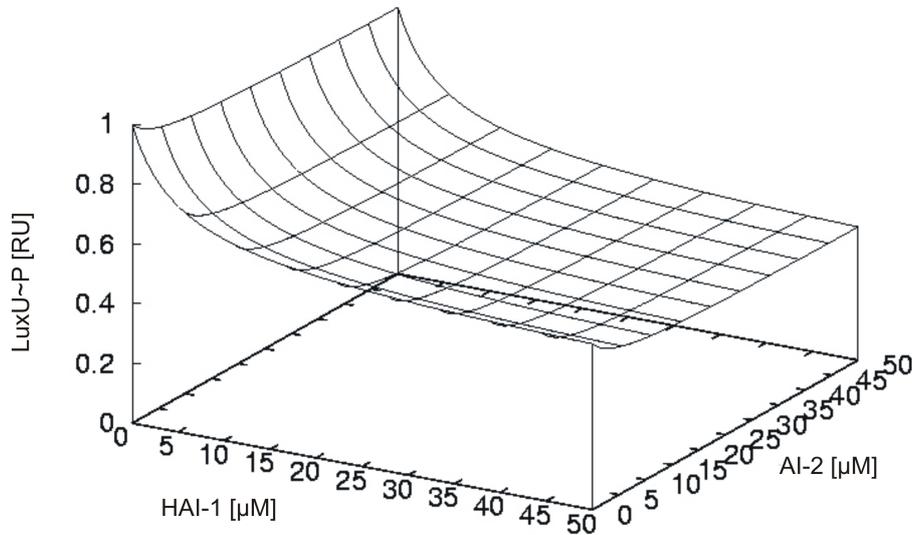


Abbildung 4.2: Dreidimensionale Darstellung des Einflusses der Autoinduktor-Konzentration auf den LuxU~P Output. Dreidimensionale Darstellung des kombinierten Einflusses der HAI-1 und AI-2 Konzentration auf den LuxU~P Output. $\tau = 0,7$

wandlung eines Moleküls zwischen zwei unterschiedlichen Formen wie z.B. phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Zustand erreicht werden (Goldbeter und Koshland, 1981).

Eine weitere Möglichkeit ist die Interaktion zwischen LuxN und LuxQ, die in diesem Modell nicht berücksichtigt wurde. Diese Interaktion könnte direkt oder indirekt über das Substrat LuxU stattfinden. Auch die Anwesenheit einer bisher unbekanntem zusätzlichen Proteinkomponente könnte zu einer vollständigen Dephosphorylierung von LuxU führen. LuxU besitzt neben dem Histidinrest 58 einen zweiten Histidinrest, H103 (Ulrich et al., 2005). Dieser weitere Histidinrest ist nicht am Phosphotransfer beteiligt, könnte aber eine wichtige Rolle bei einer strukturellen Veränderung von LuxU durch Kontakt mit der Empfängerdomäne von LuxN oder LuxQ spielen.

Der Einfluss der Autoinduktoren auf die Menge der sRNA-Transkripte wurde noch nicht berücksichtigt. Waters und Bassler (2006) zeigten, dass in Abhängigkeit der Autoinduktoren eine differentielle Antwort auf dem Level der *qrr*-Transkripte hervorgerufen wird. In Folge dessen liegen je nach Menge der einzelnen sRNAs unterschiedliche Mengen des Regulators LuxR vor. Der LuxR-Gradient wiederum führt zu einer differentiellen Induktion der regulierten Operons.

4.3 Wechselwirkungen der Hybridsensorkinasen LuxQ und LuxN

Da das mathematische Modell für den kombinierten LuxN- und LuxQ-Signalweg auf einen zusätzlichen, bisher noch nicht berücksichtigten Effekt hinwies, wurden die beiden Sensorkinasen gemeinsam *in vitro* untersucht. Die Reaktionsansätze enthielten LuxN- und LuxQ-haltige invertierte Membranvesikel, gereinigtes LuxU sowie radioaktiv-markiertes ATP. Überraschender Weise wurde auf diese Weise weniger LuxU phosphoryliert, als wenn LuxN alleine eingesetzt wurde. Die Anwesenheit von LuxQ schien also die Kinaseaktivität von LuxN negativ zu beeinflussen. Die Reduktion der LuxN-Kinaseaktivität nahm mit zunehmender Menge an LuxQ zu, der Einfluss war also konzentrationsabhängig. Es konnte eine Reduktion der LuxN-Kinaseaktivität um 80% beobachtet werden, wenn die Hybridsensorkinasen in einem äquimolaren Verhältnis eingesetzt wurden.

Da die Inkubation von LuxN mit Membranen, die kein LuxQ enthielten, keinen negativen Effekt zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass nicht die zusätzliche Proteinmenge die inhibitorische Komponente darstellt. Es handelt sich um einen LuxQ-spezifischen Effekt.

Um auszuschließen, dass die Reduktion der Kinaseaktivität auf die Phosphataseaktivität der zugegebenen Sensorkinase zurückzuführen ist, wurde der Einfluss von LuxQ-D785N auf LuxN untersucht. Bei der Inkubation mit radioaktiv markiertem ATP konnte der gleiche Einfluss auf die Kinaseaktivität gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Beeinflussung der LuxN-Kinaseaktivität nicht von der LuxQ-Autophosphorylierung abhängig war. Es wurden *in vitro*-Experimente durchgeführt, bei denen LuxN zusammen mit LuxQ-H492Q sowie LuxU und ATP inkubiert wurde. Das LuxQ-Derivat H492Q, das aufgrund des ausgetauschten konservierten Histidins keine Autophosphorylierungsaktivität besitzt, zeigte eine negative Wirkung auf die Kinaseaktivität von LuxN. Wurden jeweils gleiche molare Mengen LuxQ bzw. LuxQ-H492Q zum Phosphorylierungsansatz zugegeben, war die Menge an phosphoryliertem LuxU geringer, wenn LuxQ-H492Q zugegeben wurde. Dieses Phänomen kann auf die fehlende Kinaseaktivität bei gleichzeitig vollständiger Phosphataseaktivität zurückgeführt werden. Carolin Schön (2007) konnte ebenfalls zeigen, dass LuxN-D771N einen negativen Effekt auf die Kinaseaktivität von LuxQ hatte. In Anwesenheit von äquimolaren Mengen LuxQ und LuxN-D771 wurde die LuxQ-Kinaseaktivität auf ca. 25% reduziert.

Die Phosphataseaktivität wurde durch das Zusammenspiel der beiden Sensorkinasen nicht

beeinflusst. Die Anwesenheit einer zweiten Hybridsensorkinase schien keine Auswirkung auf die Phosphataseaktivität zu haben (Schön, 2007). Es kam zumindest zu einer Addition der beiden Phosphataseaktivitäten, ob es sogar zu einer gegenseitigen Verstärkung kam, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Durch die biochemische Untersuchung des Zusammenspiels der Hybridsensorkinasen konnte eine Heterodimerbildung zwischen LuxN und LuxQ ausgeschlossen werden. Die Proteine lagen in Form von invertierten Membranvesikeln vor, die getrennt hergestellt wurden, eine Heterodimerbildung war daher nicht möglich. Die Verhinderung der gegenseitigen Phosphorylierung und somit Reduktion der Kinaseaktivität kann nicht zur Erklärung des beobachteten Effekts herangezogen werden.

4.3.1 Einfluss der LuxN/LuxQ-Chimäre auf die LuxN-Kinaseaktivität

Um die LuxN-beeinflussende Domäne von LuxQ zu bestimmen, wurde der Einfluss von sechs verschiedenen LuxN/LuxQ-Chimären, die aus verschiedenen Kombinationen der Transmembran-, Histidinkinase- und Antwortregulatordomäne von LuxN und LuxQ bestehen, auf die LuxN-Kinaseaktivität untersucht. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass nur die Empfängerdomäne eines Antwortregulators von LuxQ die Kinaseaktivität von LuxN beeinflusst (Schön, 2007). Die Antwortregulatordomäne der Hybridsensorkinase stellt den Teil des Proteins dar, der mit dem HPt-Protein LuxU direkt interagiert. Somit scheint das Zusammenspiel zwischen den Signalwegen durch Interaktionen der Hybridsensorkinasen mit LuxU abzulaufen.

Diese Hypothese wird durch entsprechende *in vivo*-Ergebnisse bestätigt. Neiditch et al. (2006) produzierten ein verkürztes LuxQ-Derivat, das lediglich aus der Empfängerdomäne bestand, in dem *Vibrio harveyi* Stamm BB886 (LuxN⁺, LuxPQ⁻). Die entsprechenden Zellen produzierten eine um einen Faktor 2 erhöhte Biolumineszenz. Die erhöhte Biolumineszenz war durch eine Reduktion der Menge an phosphoryliertem LuxU zu erklären. Die *in vivo*-Experimente untermauern die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass die Empfängerdomäne einer Hybridsensorkinase die Aktivität der jeweils anderen Hybridsensorkinase beeinflusst.

Die durch *in vitro*-Experimente erlangten Daten gehen aber noch einen Schritt weiter. Während Neiditch und Koautoren die Reduktion an phosphoryliertem LuxU auf die Phos-

phataseaktivität der LuxQ-Antwortregulatordomäne zurückführen, konnte diese Erklärung im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Ebenfalls LuxQ-D785N, das Phosphatase-inaktive LuxQ-Derivat, zeigte eine negative Auswirkung auf die Kinaseaktivität von LuxN. Somit muss es einen anderen Effekt im Zusammenspiel der Hybridsensorkinasen geben, der jeweils durch die Empfängerdomäne eines Antwortregulators verursacht wird.

4.3.2 Verkürzte LuxQ- und LuxN-Derivate

Um zu bestätigen, dass die Empfängerdomäne einer Hybridsensorkinase die Aktivität der anderen beeinflussen kann, und die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen genauer zu definieren, sollten Interaktionsstudien durchgeführt werden. Es wurden verkürzte LuxQ und LuxN-Derivate hergestellt, mit denen der Einfluss auf die Kinaseaktivität bestätigt werden sollte, und die für Proteininteraktionsstudien eingesetzt werden konnten. Für die Hybridsensorkinase ArcB von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die drei enzymatischen Domänen (HisKA, RR, HPt) ohne kovalente Bindung zu den anderen Domänen in der Lage sind, sich korrekt zu falten und katalytisch aktive Einheiten zu bilden (Georgellis et al., 1997). Ebenfalls konnte Neiditch et al. (2006) zeigen, dass die alleine produzierte Empfängerdomäne von LuxQ aktiv ist. Daher wurde angenommen, dass auch einzelnen Domänen von LuxQ und LuxN, wenn sie einzeln produziert werden, korrekt gefaltet vorliegen und Wildtypverhalten in biochemischen Experimenten zeigen.

Es wurden verkürzte LuxQ-Derivate hergestellt, die aus HAMP-, PAS-, Histidinkinase- und Empfängerdomäne (LuxQ(299-859)), Histidinkinase- und Empfängerdomäne (LuxQ(475-859)) bzw. nur aus der Empfängerdomäne (LuxQ(733-859)) bestanden. Von LuxN wurden Derivate bestehend aus Histidinkinase- und Empfängerdomäne (LuxN(454-849)) bzw. nur aus der Empfängerdomäne (LuxN(719-849)) hergestellt. Da diese verkürzten Derivate keine Transmembranhelices aufwiesen, sollten sie löslich im Cytoplasma vorliegen.

Das Protein LuxQ(475-859) konnte in ausreichender Menge heterolog produziert und aus der cytosolischen Fraktion von *E. coli* gereinigt und für Phosphorylierungsexperimente eingesetzt werden. Es zeigte jedoch keine Kinaseaktivität, weder konnte die Autophosphorylierung direkt noch indirekt durch den Phosphotransfer auf LuxU im Autoradiogramm gezeigt werden. Die Annahme, dass einzelne Domänen enzymatische Aktivität aufweisen,

wie das für ArcB gezeigt werden konnte, bestätigte sich nicht. Das verkürzte LuxQ-Derivat hatte die gleiche hemmende Wirkung auf die LuxN-Kinaseaktivität.

Die *in vitro*-Phosphorylierung zeigte auch für das verkürzte LuxQ-Derivat eine deutliche und konzentrationsabhängige Reduktion der LuxN-Kinaseaktivität. Die anderen verkürzten Proteine (LuxQ(733-859), LuxN(454-849) und LuxN(719-849)) unterlagen vermutlich einem proteolytischen Abbau während der Kultivierung der Zellen.

Aus diesem Grund wurden die verkürzten Derivate als Trx-Hybridproteine (Trx-LuxQ(733-859) und Trx-LuxN(719-849)) produziert. Als Trx-Hybridprotein waren die verkürzten Derivate stabil und konnten gereinigt werden. Beide Derivate zeigten in *in vitro*-Phosphorylierungsexperimenten eine konzentrationsabhängige Reduktion der LuxN-Kinaseaktivität. Durch diese Experimente konnte bestätigt werden, dass lediglich die Antwortregulatordomänen der Hybridsensorkinasen für den konkurrierenden Effekt verantwortlich sind.

Anhand der experimentell gewonnenen Daten konnte das von Carolin Schön (2007) erstellte Modell der sich gegenseitig in ihrer Aktivität reduzierenden Hybridsensorkinasen erweitert werden. Das Modell ist in Abb. 4.3 dargestellt.

Es wird postuliert, dass das Protein LuxQ das Substrat LuxU bindet, um es zu phosphorylieren und somit verhindert, dass LuxN mit einer höheren Phosphorylierungsrate LuxU phosphorylieren kann. Da LuxQ eine zehnfach geringere Kinaseaktivität aufweist als LuxN, wird LuxU vermutlich länger an LuxQ gebunden. Auf diese Weise entsteht eine Konkurrenz um LuxU, das durch die Bindung an LuxQ der Phosphorylierung durch LuxN entzogen wird.

Eine Konkurrenz zwischen den Hybridsensorkinasen um ihr Substrat LuxU stellt eine Möglichkeit dar, den LuxU~P-Output zu reduzieren. In Abbildung 4.3A ist der beobachtete reduzierende Effekt von LuxQ auf die Kinaseaktivität von LuxN graphisch dargestellt. Abbildung 4.3B+C zeigt den Einfluss der Chimäre LuxNQQ und LuxNNQ, der auf die Antwortregulatordomäne von LuxQ zurückzuführen ist. Der Einfluss von dem verkürzten Derivat LuxQ(475-859) unterstützt diese Hypothese (Abb. 4.3D). Die Menge an phosphoryliertem LuxU konnte jedoch nur durch die zusätzliche Zugabe von HAI-1 auf nahezu Null reduziert werden (Abb. 4.3E).

Neben der Konkurrenz um das Substrat LuxU stellt eine mögliche Kooperativität von LuxU eine weitere Erklärung des beobachteten Phänomens dar. LuxU könnte zwischen der

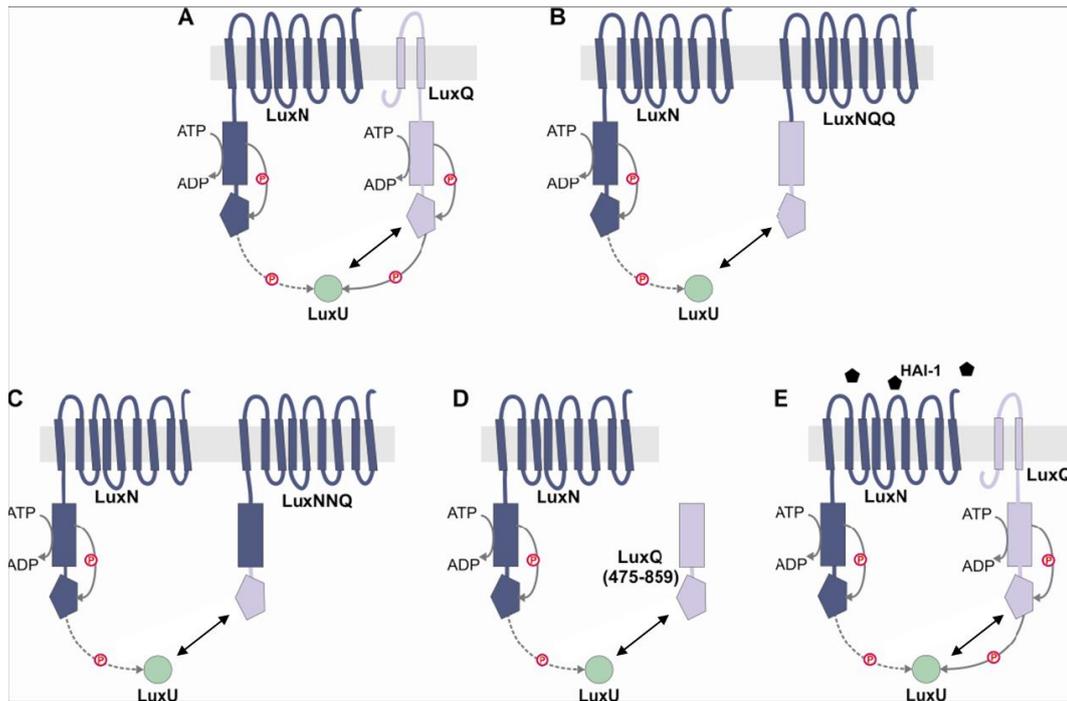


Abbildung 4.3: Wechselwirkungen der Hybridsensorkinasen LuxN und LuxQ. Gezeigt ist die schematische Darstellung des hemmenden Effekts der LuxN-Kinaseaktivität durch **A** LuxQ, **B** LuxNQQ, **C** LuxNNQ, **D** LuxQ(475-859) sowie **E** HAI-1 und LuxQ. Das Modell wurde der Diplomarbeit von Carolin Schön (2007) entnommen und erweitert. Wechselwirkungen zwischen der LuxQ-Empfängerdomäne eines Antwortregulators und LuxU führen zu einem geringeren Phosphotransfer von LuxN auf LuxU (gestrichelter Pfeil).

Interaktion mit LuxN und der Interaktion mit LuxQ differenzieren. Dies könnte auf struktureller Ebene geschehen. Eine Rolle bei der Kooperativität von LuxU könnte das zweite Histidin His103 spielen, das nicht an der Phosphorylierung von LuxU beteiligt ist, aber eine Affinität für anorganisches Phosphat aufweist (Ulrich et al., 2005).

Um diese Hypothese zu bestätigen, wäre es sinnvoll, strukturelle Veränderungen von LuxU in der Anwesenheit der Proteine LuxN und LuxQ zu untersuchen. Sind strukturelle Unterschiede vorhanden, würde dies für eine Kooperativität von LuxU sprechen und die beobachteten Effekte der Antwortregulordomänen der Hybridsensorkinasen könnten erklärt werden.

4.4 Heterologe Überproduktion von LuxO in *Escherichia coli*

Bisher konnte LuxO nur in Form von Einschlusskörpern heterolog in *E. coli* überproduziert werden. Um Phosphorylierungsexperimente *in vitro* durchführen und die Rekonstruktion der Signaltransduktionskaskade des Quorum sensing-Systems in *V. harveyi* vervollständigen zu können, sollte LuxO in löslicher und gereinigter Form vorliegen. Die lösliche und stabile Überproduktion von cytosolischen Proteinen stellt häufig den schwierigen Schritt in der biotechnologischen Synthese von Proteinen dar (Berthold et al., 2003). Um die Löslichkeit von Proteinen, die aufgrund von Proteinaggregationen in Einschlusskörpern zu finden sind, zu erhöhen, gibt es viele Ansätze.

Zu den konventionellen Methoden gehören die Veränderung der Kultivierungs- und Expressionsbedingungen sowie unterschiedliche Medien (Makrides, 1996; Braun und LaBaer, 2003; Pearlberg und LaBaer, 2004). Ebenfalls die Produktion der Targetproteine als Hybridproteine mit besonders löslichen Proteinen wie Thioredoxin und dem Maltosebindeprotein gehören zu diesen konventionellen Methoden (Berthold et al., 2003). Diese Methoden zu einer Erhöhung der Löslichkeit von Proteinen führen, allerdings werden dadurch nicht die intrinsischen Eigenschaften der Proteine verändert. Daher kann es oft zu inaktiven Proteinen oder zur Proteinaggregation während der Reinigung kommen.

Eine Alternative zu diesen Methoden stellt die gezielte Veränderung der Proteine dar, was als Rational Engineering bezeichnet wird (Eijsink et al., 2004). Des Weiteren ermöglicht die ungerichtete Mutagenese und das Screening nach einem bestimmten Phänotyp, Proteine mit verbesserten Eigenschaften zu finden. Dies wird als Directed Evolution bezeichnet (Roodveldt et al., 2005). Es gibt eine Reihe von Proteinen, die durch die Einführung kleiner kumulativer Effekte stabilisiert werden konnten (Wintrode et al., 2000; Lehmann et al., 2002; Dámico et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden konventionelle Methoden sowie das Rational Engineering von Proteinen angewendet, um die Löslichkeit von LuxO zu erhöhen. Die angewendeten Ansätze führten nicht zu löslichem *und* aktivem LuxO. Die Phosphorylierungskaskade konnte daher nicht vollständig rekonstruiert werden. Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse diskutiert.

4.4.1 Veränderte Kultivierungs- und Induktionsbedingungen

Um LuxO als lösliches Protein in *E. coli* heterolog überzuproduzieren, wurden die Kultivierungs- und Induktionsbedingungen verändert. Die Überproduktion von Proteinen stellt eine unnatürliche Situation für die Wirtszelle dar, da hier eine sehr große Menge eines Proteins produziert wird. Aus diesem Grund ist es denkbar, dass sich die Zelle während der Produktion gegen die Anhäufung dieses Proteins wehrt. Dies kann durch Proteolyse oder durch Aggregation des fremden Proteins in Einschlusskörpern geschehen.

Durch eine geringere Produktion des Targetproteins kann dem entgegengewirkt werden. Hierfür stehen Vektoren zur Verfügung, wie zum Beispiel der Vektor pT7-5. Doch auch durch die reduzierte Produktion von LuxO konnte dessen Löslichkeit nur gering erhöht werden.

Einschlusskörper mit den Targetproteinen können auch erst während des Zellaufschlusses entstehen. Um die Bildung der Einschlusskörper während des Zellaufschlusses zu vermeiden, können Aufschlusspuffer durch Zugabe von Salz verändert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Salz, insbesondere von NaCl, im Aufschlusspuffer zu einer deutlich erhöhten Löslichkeit von LuxO führte. In Abhängigkeit der Salzkonzentration nahm der Anteil an löslichem LuxO zu, die maximale Menge war bei einer NaCl-Konzentration von 0,2 M zu detektieren. Auf diese Weise wurden über 70% von LuxO im Cytoplasma lokalisiert. Bei einer noch höheren Konzentration nahm die Löslichkeit wieder ab. Die Anwesenheit von 0,05 - 0,15 M KCl erhöhte ebenfalls die Löslichkeit, maximal konnten aber nur ca. 40% in der löslichen Zellfraktion nachgewiesen werden.

Auf diese Weise konnte LuxO erstmals in der löslichen Fraktion lokalisiert werden, allerdings konnte LuxO nicht angereichert werden. Die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie führte zu keiner Anreicherung des Proteins. Es kann sein, dass der C-terminale His-Tag unter den gegebenen Bedingungen nicht zugänglich war. Lediglich sehr geringe Mengen Protein wurden bei der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie eluiert. Vermutlich handelt es sich bei dem sehr geringen Anteil LuxO um denaturiertes Protein, bei dem der His-Tag zugänglich war. Auch eine Verlängerung des His-Tags erhöhte nicht die Zugänglichkeit. Mit einem N-terminalen His-Tag konnte LuxO nicht produziert werden. Ebenfalls die Anionenaustauschchromatographie war erfolglos. Hier könnte der hohe Anteil an NaCl bzw. KCl, ohne den das Protein nicht löslich war, störend gewesen sein.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Fusion von LuxO an bestimmte Proteine dar, bei denen

bekannt ist, dass sie die Löslichkeit des Targetproteins erhöhen. Ein bekannter Proteintag stellt Thioredoxin (Trx) dar. Es handelt sich um ein sehr kleines und extrem lösliches Protein, das die Eigenschaften des Targetproteins bezüglich ihrer Löslichkeit beeinflussen kann. Melanie Timmen (2005) konnte LuxO als Hybridprotein mit Trx in dem *E. coli*-Stamm Origami B überproduzieren. Unter Standardkultivierungsbedingungen (aerob bei 37°C) war LuxO aber dennoch unlöslich.

Aus diesem Grund wurde die Kultivierungstemperatur drastisch erniedrigt. Lösliches Protein war aber erst bei einer Temperatur von 18°C vorhanden. Unter diesen Bedingungen lagen ca. 60% löslich im Cytoplasma vor. Trx-LuxO besitzt einen Linker, der neben einem His-Tag auch eine Thrombin-Schnittstelle aufweist. LuxO konnte als Trx-Hybridprotein durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie angereichert und proteolytisch von Trx getrennt werden. Das angereicherte Protein wies aber in Phosphorylierungsexperimenten keine Aktivität auf. Auch mittels Acetylphosphat konnte kein LuxO in phosphoryliertem Zustand nachgewiesen werden. Es war eine sehr geringe ATPase-Aktivität im Eluat nach der Affinitätschromatographie messbar. Die gleiche Aktivität war jedoch auch zu messen, wenn LuxO-K167A für den ATPase-Assay eingesetzt wurde. Vermutlich ist die Aktivität auf Verunreinigungen durch andere Proteine mit ATPase-Aktivität zurückzuführen.

Aufgrund der sehr niedrigen Kultivierungstemperatur lag LuxO vermutlich in einer nicht korrekt gefalteten Konformation vor und zeigte daher keinerlei enzymatische Aktivitäten.

Die Zugabe von NaCl zum Aufschlusspuffer, bzw. die Kombination von der Fusion an Trx und niedrige Kultivierungstemperatur führte zu einer erhöhten Löslichkeit. Wie aber von Roodveldt et al. (2005) behauptet, wird hierbei die intrinsische Natur des Proteins nicht verändert. Durch beide Ansätze wurde inaktives Protein erhalten.

Eine weitere Möglichkeit, um phosphorylierbares LuxO zu erhalten, stellt die Reinigung und Renaturierung von LuxO aus Einschlusskörpern dar. Im Rahmen der Doktorarbeit von Tina Odenbach (2008) wurde dieser Ansatz verfolgt. Erstmals konnte auf diese Weise LuxO durch einen Phosphodonor mit geringem molekularem Gewicht phosphoryliert werden. In Gegenwart von 0 M bis 0,5 M Harnstoff wurde Acetylphosphat an LuxO gebunden. Es könnte sich hierbei aber auch um eine unspezifische Bindung handeln, da die Bindung ebenfalls in Gegenwart von 2 M Harnstoff nachzuweisen war. Der Phosphotransfer von phosphoryliertem LuxU auf LuxO konnte nicht gezeigt werden.

4.4.2 Herstellung von LuxO/NtrC-Chimären

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit und Ähnlichkeit in der Domänenstruktur zwischen LuxO in *V. harveyi* und NtrC in *E. coli* ist die Idee entstanden, die Antwortregulatordomänen der beiden Proteine auszutauschen. Da NtrC sehr gut löslich und aktiv überproduziert und gereinigt werden kann (Foster-Hartnett et al., 1994), bestand die Hoffnung, dass durch den Austausch der Domänen ein lösliches Chimär erhalten werden kann. Es wurden zwei verschiedene Chimäre hergestellt, das eine enthielt die Antwortregulatordomäne von LuxO sowie die AAA⁺ ATPase- und DNA-Bindedomäne von NtrC (LuxO/NtrC). Dieses Chimär könnte, wenn es löslich produziert und auch gereinigt werden kann, als Antwortregulator in der LuxN,LuxQ-LuxU-Phosphorylierungskaskade dienen. Das zweite enthielt die Antwortregulatordomäne von NtrC sowie die AAA⁺ ATPase- und DNA-Bindedomäne von LuxO (NtrC/LuxO). Dieses Chimär könnte für Protein-DNA-Interaktionsstudien eingesetzt werden.

Als Fusionsstelle wurde ein hochkonservierter Bereich zwischen Antwortregulator- und ATPase-Domäne ausgewählt. Die kodierenden Bereiche der Domänen beider Proteine konnten durch eine zweistufige PCR-Reaktion fusioniert werden, ohne dass Restriktionsschnittstellen eingebaut werden mussten. Beide Proteine konnten in *E. coli* in ausreichendem Maße produziert werden. Lokalisationsstudien zeigten jedoch, dass sowohl LuxO/NtrC als auch NtrC/LuxO unlöslich in Form von Einschlusskörpern vorlagen.

Anhand dieser Ergebnisse konnte die Unlöslichkeit von LuxO nicht auf einen bestimmten Bereich eingegrenzt werden. Wäre nur eines der beiden Chimäre löslich gewesen, hätte man die unlösliche Sequenz zuordnen können. Demnach enthalten sowohl die Antwortregulatordomäne als auch die Effektoromäne, bestehen aus AAA⁺ ATPase- und DNA-Bindedomäne, unlösliche Bereiche. Der Austausch einer Domäne gegen eine konservierte Domäne eines in *E. coli* löslichen Proteins erhöht die Löslichkeit von LuxO nicht.

Als ein wichtiger Faktor bei der Proteinsynthese kann auch die Kodonabfolge betrachtet werden. So sind in allen Organismen bestimmte Kodons vorhanden, die als Pausesignale in der Translation fungieren. Irwin et al. (1995) konnten zeigen, dass bestimmte überrepräsentierte Codonpaare langsamer translatiert werden als andere Codonpaare. Diese Signale legen die Synthesegeschwindigkeit bestimmter Proteinbereiche fest und sorgen so für die Funktionalität des Proteins. Die Codons unterscheiden sich jedoch in den verschiedenen Organis-

men. Durch heterologe Proteinsynthese kann es daher zu falsch gesetzten und unnatürlichen Pausen kommen, dieses Phänomen kann mit nicht-funktionellen Proteinen in Verbindung gebracht werden.

Durch die heterologe Produktion von LuxO in *E. coli* oder auch die Fusion der beiden kodierenden Bereiche von LuxO und NtrC kann es zu einer unnatürlichen Kodonabfolge gekommen sein, die wiederum die Translation beeinträchtigen und die Löslichkeit zusätzlich verringern könnte. Ein weiterer Ansatzpunkt, der im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht verfolgt werden konnte, ist die Analyse der von *V. harveyi* verwendeten Kodons und die entsprechende Optimierung. Die „CODAs Translational Engineering™“ Technologie behandelt die Optimierung der Kodons für die Proteinsynthese (<http://www.codagenomics.com>).

4.4.3 Gezielte Veränderungen in LuxO zur Erhöhung der Löslichkeit

Der Ansatz der gezielten Veränderung der Proteinsequenz bietet eine weitere Möglichkeit, die Löslichkeit von LuxO zu erhöhen. Hierbei werden Aminosäuren ausgewählt, die die Unlöslichkeit oder Proteinaggregation verursachen könnten. Die Schwierigkeit dabei ist aber, die entsprechenden Aminosäuren, die ausgetauscht werden sollen, vorherzusagen, da die Proteinstruktur meistens noch nicht aufgeklärt ist.

Daher wurde vorerst der Bereich definiert, der verändert werden sollte. LuxO wurde anhand von bioinformatischen Vorhersageprogrammen auf die theoretische Löslichkeit untersucht und in bestimmte Bereiche unterteilt. Die zwei verwendeten Softwaretools der Universität Oklahoma und des Wissenschaftszentrums Weihenstephan berechneten für die verkürzten LuxO-Bereiche unterschiedliche Löslichkeiten. Sie zeigten wenig Übereinstimmung, da die Programme auf unterschiedlichen Algorithmen beruhen. Ohne experimentelle Daten konnte nicht entschieden werden, welcher Algorithmus für die Berechnung der Löslichkeit von LuxO besser geeignet war. Daher wurden die entsprechend verkürzten Proteinbereiche einzeln und in den möglichen Kombination hergestellt und auf ihre Löslichkeit getestet.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, welche Bereiche von LuxO, wenn sie einzeln produziert wurden, löslich waren. Der N-terminale Bereich, der die ersten 110 Aminosäuren umfasst, sowie der C-terminale Bereich, der die letzten 188 Aminosäuren umfasst, wurden unlöslich produziert. Die Tatsache, dass sowohl der C-terminale als auch der N-terminale Bereich unlöslich sind, erklärt, warum die LuxO/NtrC-Chimäre nicht löslich waren. Jedes der beiden Chimäre enthält entweder den C- oder den N-terminalen Bereich von LuxO und

somit einen unlöslichen Bereich. Der mittlere Bereich scheint in löslicher Form produziert werden zu können, wenn er in zwei Teile unterteilt war.

Die Kombination der einzelnen Bereiche zeigte jedoch, welchen komplexen Kriterien die Löslichkeit von Proteinen unterliegt. Die zwei löslichen Bereiche (AA 111-190 und AA 191-264) waren unlöslich, wenn sie gemeinsam produziert wurden. Auf der anderen Seite wurden als unlöslich vorhergesagte Bereiche durch die gemeinsame Produktion mit einem löslichen Bereich löslich LuxO(111-453).

Aufgrund dieser Ergebnisse lag der Fokus auf den unlöslichen Bereichen LuxO(1-110) und LuxO(265-453).

Um vorerst den C-terminalen Bereich von LuxO gezielt zu verändern, wurden für die Auswahl der zu substituierenden Aminosäuren verschiedene Kriterien berücksichtigt. Zum einen wurden Anhäufungen hydrophober Aminosäuren durch das Einfügen von extrem löslichen Aminosäuren unterbrochen, der Anteil an aromatischen Aminosäuren wurde reduziert und der Anteil an Glutamin erhöht. Außerdem wurden alle Aminosäuren *in silico* gegen Aspartat und Glutamat ausgetauscht und die theoretische Löslichkeit berechnet. Veränderte sich durch den Austausch die theoretische Löslichkeit, wurde die Substitution in Betracht gezogen.

Um jedoch den Austausch essentieller Aminosäuren zu vermeiden, wurde anhand eines Alignments von LuxO mit NtrC von *E. coli* überprüft, ob es sich um konservierte Aminosäuren handelte. Waren die Aminosäuren konserviert, wurden sie nicht weiter berücksichtigt. Des Weiteren wurde anhand einer dreidimensionalen Struktur von LuxO, die durch Homologiemodellierung anhand ähnlicher Proteine erstellt wurde, eine Vorhersage darüber gemacht, ob sich die Aminosäure an der Oberfläche des Proteins befindet. Aminosäuren, die anhand dieses Modells im Proteininneren waren, wurden ebenfalls nicht ausgetauscht.

Diese Kriterien führten zu einer Auswahl von 8 Aminosäuren im C-terminalen Bereich von LuxO. Diese Aminosäuren wurden in Kooperation mit der Firma Sloning BioTechnology ausgetauscht. Es wurden sieben verschiedene Varianten des C-terminalen Bereichs erstellt, die hinsichtlich ihrer Löslichkeit überprüft wurden. Die Varianten enthielten unterschiedlich viele Austausche der acht ausgewählten Aminosäuren, zwei Varianten enthielten Austausche an allen Positionen. Nach Kultivierung und Zellaufschluss sowie Fraktionierung war keine der sieben Varianten in der löslichen Fraktion lokalisiert. Aus diesem Grund wurde auf eine

Untersuchung des Gesamtproteins mit den entsprechenden Austauschen verzichtet.

Ebenfalls der N-terminale Bereich von LuxO (Aminosäuren 1-110) wurde analysiert. Zehn Aminosäuren wurden ausgewählt, deren Substitution eine Verbesserung der Löslichkeit erzielen könnte. In Abbildung 4.4 ist die dreidimensionale Modellierung von LuxO anhand des homologen Proteins NtrC1 von *Aquifex aeolicus* dargestellt. Die ausgewählten Aminosäuren sind farblich markiert. Varianten des N-terminalen Bereichs konnten im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht fertiggestellt werden.

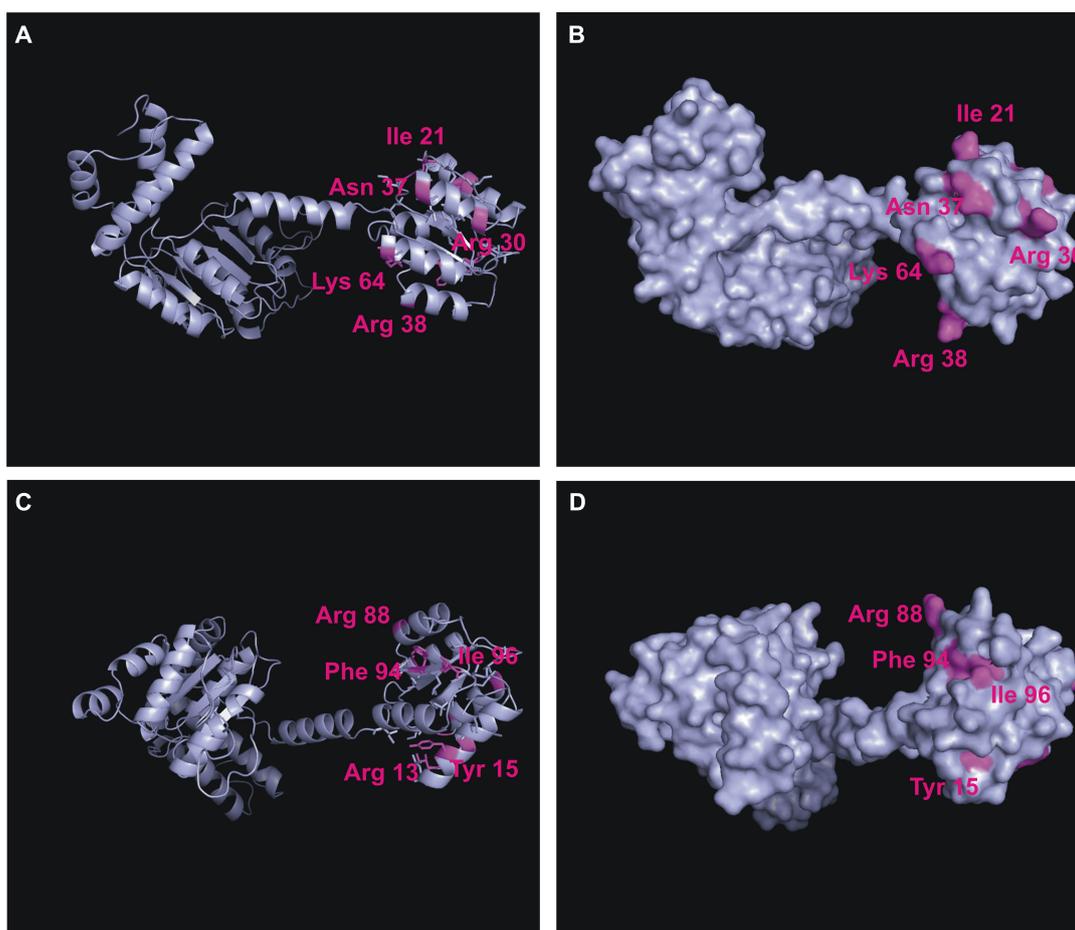


Abbildung 4.4: Auszutauschende Aminosäuren des N-terminalen Bereichs im 3D Modell von LuxO. Die 3D Strukturen von LuxO wurden durch Homologiemodellierung (SwissProt) anhand der bekannten Struktur von NtrC1 von *Aquifex aeolicus* erstellt. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Pymol. **A** Cartoon-Darstellung und **B** Darstellung der Oberfläche. **C** Cartoon-Darstellung und **D** Darstellung der Oberfläche nach Drehung um 180°. Aminosäuren, die ausgetauscht werden sollen, sind farblich markiert.

Da die Auswahl der Aminosäuren, die substituiert werden sollen, für den Ansatz des Rational Engineering von Proteinen essentiell ist, kann es sein, dass man sich aufgrund der falschen Kriterien und aufgrund eines nicht zutreffenden Homologiemodells für die falschen

Aminosäuren entschieden hat. Außerdem ist die Untersuchung jeder einzelnen Variante durch Lokalisationsstudien recht zeitintensiv.

Aus diesem Grund hat sich in den letzten Jahren ein Ansatz entwickelt, der als Directed Evolution beschrieben wird (Roodveldt et al., 2005; Tao und Cornish, 2002). Anstatt gezielte Mutationen einzuführen, werden hierbei Mutationen zufällig ausgelöst. Die Mutanten, die einen entsprechenden Phänotypen aufweisen, werden durch ein Screening ausgewählt (man spricht daher auch von einem iterativen Darwinismus). Dieser Ansatz konnte aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht weiter verfolgt werden.

4.5 Heterologe Überproduktion der Lux-Proteine in *R. sphaeroides* DD13

Die heterologe Überproduktion der Lux-Proteine in *Rhodobacter sphaeroides* DD13 konnte nur für LuxO getestet werden. LuxO konnte in *R. sphaeroides*-Zellen leider nicht detektiert werden, weder mit dem Penta-His-Antikörper noch mit einem LuxO-Antikörper konnte das Protein nachgewiesen werden. Es konnte daher nicht unterschieden werden, ob LuxO nicht produziert wurde oder proteolytisch abgebaut wurde. Es kann sein, dass der verwendete Vektor - ein pRK415-Derivat - nicht für die heterologe Überproduktion von *Vibrio harveyi*-Proteinen geeignet ist.

Generell stellt der Ansatz der Überproduktion von *V. harveyi*-Proteinen in einem marinen Organismus eine Möglichkeit dar, die Proteine in einer natürlicheren Umgebung zu produzieren, als in *E. coli*. Die vermutlich höhere Salzkonzentration in den Zellen kann nicht nur für eine erhöhte Löslichkeit sondern auch für eine korrekte Faltung der Proteine sorgen.

4.6 Ausblick

Zur Charakterisierung der Autokinaseaktivität von LuxQ sollte LuxQ gereinigt und in Proteoliposomen rekonstituiert werden. Auf diese Weise könnte man LuxQ von anderen Proteinen mit Autophosphataseaktivität befreien und in höheren Konzentrationen einsetzen.

Mit verkürzten LuxN- und LuxQ-Derivaten, die die Empfängerdomäne eines Antwortregulators beinhalten, können Interaktionsstudien hinsichtlich der Proteininteraktion mit LuxU gemacht werden. Als Negativkontrolle sollte eine Antwortregulator-domäne eines anderen Proteins wie z.B. KdpE verwendet werden. Durch Proteininteraktionsstudien könnte das diskutierte Konkurrenzmodell, das auf Phosphorylierungsexperimenten mit LuxQ und LuxN beruht, bestätigt werden. Informationen über Affinitäten zwischen den einzelnen Proteinkomponenten und über das Zusammenspiel der beiden Hybridsensorkinasen LuxN und LuxQ können in das mathematische Modell eingebaut werden, um den Phosphorylierungsgrad von LuxU zu reduzieren und somit einen induzierten Zustand des *luxCDABE*-Operons zu modellieren.

Des Weiteren ist die Überproduktion von LuxO in löslicher Form eine wichtige Zielsetzung, um die Signaltransduktionskaskade des *Vibrio harveyi* Quorum sensing-Systems vollständig zu rekonstruieren. Ansätze hierfür sind die Untersuchungen der von der Firma Sloning BioTechnology hergestellten N-terminalen Varianten.

Das Anwenden von Directed Evolution zur Optimierung von LuxO und der entsprechenden Screeningsysteme zur Untersuchung der Löslichkeit wäre ein weiterer Ansatz. Verschiedene Screeningsysteme existieren, um lösliche Proteine in Mutanten zu detektieren, ohne die Zellen aufzuschließen und zu fraktionieren. Hierzu gehören z.B. die *ibpAB*-Promotorfusion mit *lacZ* (Lesley et al., 2002; Schultz et al., 2006), das Q-Tag-Screeningsystem (Stratagene) und der „Split GFP-Assay“ (Cabantous und Waldo, 2006). Mit Hilfe dieser Screeningsysteme wäre eine weitläufigere Untersuchung von LuxO-Mutanten bezüglich der Löslichkeit möglich.

5 Zusammenfassung

Die drei Hybridsensorkinasen LuxN, LuxQ und CqsS des komplexen Quorum sensing-Systems von *Vibrio harveyi* leiten Informationen über die Zelldichte mittels eines Phosphorelays in das Zellinnere. Bei niedriger Zelldichte erfolgt die Autophosphorylierung der Sensorkinasen, die Phosphorylreste werden über das HPT-Protein LuxU auf den Antwortregulator LuxO übertragen. Phosphoryliertes LuxO unterdrückt indirekt die Zelldichte-abhängige Genexpression. Bei hoher Zelldichte hingegen wird durch Reduktion der Kinaseaktivität das Gleichgewicht in Richtung der unphosphorylierten Form verschoben. Durch biochemische Untersuchungen der Hybridsensorkinase LuxN konnten die HAI-1-abhängige Kinase- und die HAI-1-unabhängige Phosphataseaktivität gezeigt und charakterisiert werden (Timmen et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Hybridsensorkinase LuxQ biochemisch charakterisiert werden. Der Antwortregulator LuxO sollte in löslicher und aktiver Form produziert werden.

- LuxQ konnte heterolog in *E. coli* überproduziert und in der Membranfraktion detektiert werden. Das periplasmatische Bindeprotein LuxP konnte als Komplex mit AI-2 und ohne gebundenen AI-2 in *E. coli* überproduziert und gereinigt werden.
- Die Autophosphorylierungs- und Kinaseaktivität von LuxQ wurden erstmalig über eine Akkumulation von phosphoryliertem LuxU *in vitro* detektiert. Die konservierten Aminosäuren Histidin 492 und Aspartat 785 waren für den Phosphotransfer auf LuxU essentiell. Durch Zugabe von AI-2 und LuxP konnte die konzentrationsabhängige Hemmung der Kinaseaktivität gezeigt werden. Die Reduktion der Kinaseaktivität war bei einer LuxP/AI-2-Konzentration von 25 μM maximal; die halbmaximale Hemmkonzentration betrug 5 μM .
- Für LuxQ wurde eine Phosphataseaktivität für LuxU~P nachgewiesen. Die LuxQ-spezifische Dephosphorylierung von LuxU war unabhängig von dem konserviertem Histidin der Histidinkinasedomäne. Der konservierte Aspartatrest der Empfängerdomäne war für die Dephosphorylierung jedoch essentiell. LuxP/AI-2 hatten keinen Einfluss auf die Phosphataseaktivität.
- Die enzymatischen Aktivitäten der Hybridsensorkinasen LuxQ und LuxN wurden miteinander verglichen. LuxQ wies sowohl eine niedrigere Kinase- als auch Phosphataseaktivität auf. Zusätzlich hatte HAI-1 einen größeren Einfluss auf die LuxN-Kinaseaktivität

als AI-2 auf die LuxQ-Kinaseaktivität. Somit kann LuxN eine größere Signalstärke bezüglich des Phosphorylierungsgrads von LuxU zugeordnet werden.

- Es wurde ein mathematisches Modell des kombinierten LuxQ- und LuxN-Signalwegs erstellt. In Anwesenheit beider Autoinduktoren wurde der Anteil an phosphoryliertem LuxU lediglich auf 45% gesenkt. Das Modell gab somit einen Hinweis auf einen bisher noch nicht berücksichtigten Faktor.
- Ein gegenseitiger, reduzierender Effekt der LuxQ- und LuxN-Kinaseaktivitäten wurde *in vitro* festgestellt. Basierend auf diesen Ergebnissen und Carolin Schöns Experimenten mit LuxN/LuxQ-Chimärproteinen (Schön, 2007) wurde ein Konkurrenzmodell um das gemeinsame Substrat LuxU erstellt.
- Die Anwendung verschiedener Expressionssysteme und -bedingungen führte zu löslichem LuxO, das erstmals aus der löslichen Zellfraktion angereichert wurde. Die Phosphorylierung dieses Proteins konnte nicht gezeigt werden.
- Um lösliches und aktives Protein zu gewinnen, wurden Chimäre der Antwortregulatoren LuxO und NtrC aus *E. coli* hergestellt. Die beiden Chimäre LuxO/NtrC und NtrC/LuxO konnten in *E. coli* produziert werden, waren jedoch nicht löslich.
- Verschiedene verkürzte LuxO-Derivate wurden hergestellt und hinsichtlich ihrer Löslichkeit untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Peptide 1-110 sowie 265-453 unlöslich sind, während die Peptide 111-190 sowie 190-264 zu einem deutlichen Anteil in der cytosolischen Fraktion lokalisiert waren.
- Des Weiteren wurde versucht, den C-terminalen Bereich von LuxO durch gezielte Aminosäureaustausche zu optimieren. Sieben verschiedene Varianten konnten in Kooperation mit der Firma Sloning BioTechnology hergestellt werden. Die durchgeführten Veränderungen führten aber nicht zu einer erhöhten Löslichkeit des Proteins.

Literatur

- H. Aiba, T. Mizuno und S. Mizushima. Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 264:8563–8567, 1989.
- F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith und K. Struhl. *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, 1987.
- B. L. Bassler. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2:582–587, 1999.
- B. L. Bassler, M. Wright, R. E. Showalter und M. R. Silverman. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.*, 9:773–786, 1993.
- B. L. Bassler, M. Wright und M. R. Silverman. 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, 1994.
- B. L. Bassler, E. P. Greenberg und A. M. Stevens. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.*, 179:4043–4045, 1997.
- D. A. Berthold, P. Stenmark und P. Nordlund. Screening for functional expression and overexpression of a family of diiron-containing interfacial membrane proteins using the univector recombination system. *Protein Sci.*, 12:124–134, 2003.
- A. Beyer. Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.*, 6:2043–2058, 1997.
- F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. ColladoVides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau und Y. Shao. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277:1453–1474, 1997.
- P. Braun und J. LaBaer. High throughput protein production for functional proteomics. *Trends Biotechnol.*, 21:383–388, 2003.

- J. L. Brewster, T. de Valoir, . D. Dwyer, E. Winter und M. C. Gustin. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259:1760–1763, 1993.
- D. Burbulys, K. A. Trach und J. A. Hoch. Initiation of sporulation in *B. subtilis* ist controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, 64:545–552, 1991.
- S. Cabantous und F. S. Waldo. *In vivo* and *in vitro* protein solubility assays using split GFP. *Nature Methods*, 3:845–854, 2006.
- S. D. Catz, J. L. Johnson und B. M. Babior. Characterization of the nucleotide-binding capacity and the ATPase activity of the PIP₃-binding protein JFC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98:11230–11235, 2001.
- X. Chen, S. Schauder, N. Potier, A. V. Dorsselaer, I. Pelczer, B. L. Bassler und F.M. Hughson. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 415:545–549, 2002.
- Q. Cheng, E. A. Campbell, A. M. Naughton, S. Johnson und H. R. Masure. The *com* locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 23:683–692, 1997.
- K. Cho und D. R. Zusman. Sporulation timing in *Mycococcus xanthus* is controlled by the *espAB* locus. *Mol. Microbiol.*, 34:714–725, 1999.
- D. Christendat, A. Yee, A. Dharamsi, Y. Kluger, A. Savchenko, J. R. Cort, V. Booth, C. D. Mackereth, V. Saridakis, I. Ekiel, G. Kozlov, K. L. Maxwell, N. Wu, L. P. McIntosh, K. Gehring, M. A. Kennedy, A. R. Davidson, E. F. Pai, M. Gerstein, A. M. Edwards und C. H. Arrowsmith. Structural proteomics of an archaeon. *Nat. Struct. Biol.*, 7:903–909, 2000.
- F. Confalonieri und M. Duguet. A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays*, 17:639–650, 1995.
- S. Dámico, C. Gerday und G. Feller. Temperature adaptation of proteins:engineering mesophilic-like activity and stability in a cold-adapted alpha-amylase. *J. Mol. Bio.*, 332: 981–988, 2003.

- T. R. de Kievit und B. H. Iglewski. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.*, 68:4839–4849, 2000.
- M. P. DeLisa, J. J. Valdes und W. E. Bentley. Mapping stress-induced changes in autoinducer AI-2 production in chemostat-cultivated *Escherichia coli* K-12. *J. Bact.*, 183:2918–2928, 2001.
- G. DiSabato und W. P. Jencks. Mechanism and catalysis of reactions of acyl phosphates. II. Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 83:4400–4405, 1961.
- M. Doucleff, B. Chen, A. E. Maris, D. E. Wemmer, E. Kondrashkina und B. T. Nixon. Negative regulation of AAA⁺ ATPase assembly by two component receiver domains: A transcription activation mechanism that is conserved in mexophilic and extremely hyperthermophilic bacteria. *J. Mol. Biol.*, 353:242–255, 2005.
- V. G. Eijsink, A. Bjork, S. Gaseidnes, R. Sirevag, B. Synstad, B. van den Burg und G. Vriend. Rational engineering of enzyme stability. *J. Biotechnol.*, 113:105–120, 2004.
- J. Engebrecht und M. Silverman. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 81:4154–4158, 1984.
- D. Foster-Hartnett, P. J. Cullen, E. M. Monika und R. G. Kranz. A new type of NtrC transcriptional activator. *J. Bacteriol.*, 176:6175–6187, 1994.
- J. A. Freeman und B. L. Bassler. 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, 1999a.
- J. A. Freeman und B. L. Bassler. Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.*, 181:899–906, 1999b.
- J. A. Freeman, B. N. Lilley und B. L. Bassler. 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, 2000.

- C. Fuqua, S. C. Winans und E. P. Greenberg. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50:727–751, 1996.
- W. C. Fuqua, S. C. Winans und E. P. Greenberg. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 176:269–275, 1994.
- M.Y. Galperin. Structural classification of bacterial response regulators: Diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.*, 188:4169–4182, 2006.
- D. Georgellis, A. S. Lynch und E. C. Lin. *In vitro* phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 179:5429–5435, 1997.
- D. Georgellis, O. Kwon, P. De Wulf und E. C. Lin. Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J. Biol. Chem.*, 273:32864–32869, 1998.
- A. Goldbeter und D. E. Jr. Koshland. An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:6840–6844, 1981.
- P. N. Goudreau, P.-J. Lee und A. M. Stock. Stabilization of the phospho-aspartyl residue involved in a two-component signal transduction pathway in *Thermotoga maritima*. *Biochemistry*, 37:14575–14584, 1998.
- E. P. Greenberg, J. W. Hastings und S. Ulitzur. Induction of luciferase synthesis in *Beneckeia harveyi* by other marine bacteria. *Arch. Microbiol.*, 120:87–91, 1979.
- J. M. Henke und B. L. Bassler. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.*, 20:6902–6914, 2004a.
- J. M. Henke und B. L. Bassler. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.*, 186:3794–3805, 2004b.
- R. D. Henkel, J. L. Vandeberg und R. A. Walsh. A microassay for ATPase. *Analytical Biochem.*, 169:312–318, 1988.

- D. A. Higgins, M. E. Pomianek, C. M. Kraml, R. K. Taylor, M. F. Semmelhack und B. L. Bassler. Cell-cell communication in bacteria. *AMS Conference*, 2007.
- S. N. Ho, H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen und L. R. Pease. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77:51–59, 1989.
- M. Hulko, F. Berndt, M. Gruber, J. U. Linder, V. Truffault, A. Schultz, J. Martin, J. E. Schultz, A. N. Lupas und M. Coles. The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell*, 126:929–940, 2006.
- C. N. Hunter und G. Turner. Transfer of genes coding for apoproteins of reaction centre and light-harvesting LH1 complexes of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.*, 134:1471–1480, 1988.
- M. M. Igo, A. J. Ninfa und T. J. Silhavy. A bacterial environmental sensor that functions as a protein kinase and stimulates transcriptional activation. *Genes Dev.*, 3:598–605, 1989.
- B. Irwin, J. D. Heck und G. W. Hatfield. Codon pair utilization biases influence translational elongation step times. *J. Biol. Chem.*, 270:22801–22806, 1995.
- K. Ishige, S. Nagasawa, S. Tokishita und T. Mizuno. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.*, 13:5195–5202, 1994.
- F. Janiak-Spens und A. H. West. Functional roles of conserved amino acid residues surrounding the phosphorylatable histidine of the yeast phosphorelay protein YPD1. *Mol. Microbiol.*, 37:136–144, 2000.
- F. Janiak-Spens, J. M. Sparling, M. Gurfinkel und A. H. West. Differential stabilities of phosphorylated response regulator domains reflect functional roles of the yeast osmoregulatory SLN1 and SSK1 proteins. *J. Bacteriol.*, 181:411–417, 1999.
- M. R. Jones, G. J. Fowler, L. C. Gibson, G. G. Grief, J. D. Olsen, W. Crielaard und C. N. Hunter. Mutants of *Rhodobacter sphaeroides* lacking one or more pigment-protein complexes and complementation with reaction-centre, LH1, and LH2 genes. *Mol. Microbiol.*, 6:151–159, 1992a.

- M. R. Jones, R. W. Visschers, R. van Grondelle und C. N. Hunter. Construction and characterization of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* with the reaction center as the sole pigment-protein complex. *Biochemistry*, 31:4458–4465, 1992b.
- K. Jung, T. Odenbach und M. Timmen. The quorum-sensing hybrid histidine kinase LuxN of *Vibrio harveyi* contains a periplasmically located N terminus. *J. Bacteriol.*, 189:2945–2948, 2007.
- D. Kaiser. Signaling in myxobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58:75–98, 2004.
- K. Karata, T. Inagawa, A. J. Wilkinson, T. Tatsuta und T. Ogura. Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. *J. Biol. Chem.*, 274:26225–26232, 1999.
- M. Kato, T. Mizuno und T. Hakoshima. Crystallization of a complex between a novel C-terminal transmitter, HPt domain, of the anaerobic sensor kinase ArcB and the chemotaxis response regulator CheY. *Acta Cryst.*, D54:140–142, 1998.
- N. T. Keen, S. Tamaki, D. Kobayashi und D. Trollinger. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene*, 70:191–197, 1988.
- J. Keener und S. Kustu. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NtrB and NtrC of enteric bacteria: Roles of the conserved amino-terminal domain of NtrC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:4976–4980, 1988.
- M. Kleerebezem, L. E. Quadri, O. P. Kuipers und W. M. de Vos. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbio.*, 24:895–904, 1997.
- E. C. Kofoid und J. S. Parkinson. Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85:4981–4985, 1988.
- R. Kollmann und K. Altendorf. ATP-driven potassium transport in right-side-out membrane vesicles via the Kdp system of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1143:62–66, 1993.
- A. Kremling, R. Heermann, F. Centler, K. Jung und E. D. Gilles. Analysis of two-component signal transduction by mathematical modeling using the KdpD/KdpE system of *Escherichia coli*. *Biosystems*, 78:23–37, 2004.

- U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- E. R. LaVallie, E. A. DiBlasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel und J. M. McCoy. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology*, 11:187–193, 1993.
- S.-Y. Lee, A. De La Torre, D. Yan, S. Kustu, B. T. Nixon und D. E. Wemmer. Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA⁺ ATPase domains. *Genes & Dev.*, 17:2552–2563, 2003.
- M. Lehmann, C. Loch, A. Middendorf, D. Studer, S. F. Lassen, L. Pasamontes, A. P. van Loon und M. Wyss. The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Protein Eng.*, 15:403–411, 2002.
- S. A. Lesley, J. Graziano, C. Y. Cho, M. W. Knuth und H. E. Klock. Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein. *Prot. Engin.*, 15:153–160, 2002.
- B. N. Lilley und B. L. Bassler. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma54. *Mol. Microbiol.*, 36:940–954, 2000.
- F. Lipman und L. C. Tuttle. A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. *J. Biol. Chem.*, 159:21–28, 1945.
- A. F. Lois, M. Weinstein, G. S. Ditta und D. R. Helinski. Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium meliloti* are coordinately regulated by oxygen. *J. Biol. Chem.*, 268:4370–4375, 1993.
- O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265–275, 1951.
- J. M. Lu, R. J. Deschenes und J. S. Fassler. Role for the Ran binding protein, Mog1p, in *Saccharomyces cerevisiae* SLN1-SKN7 signal transduction. *Eukaryot. Cell*, 3:1544–1556, 2004.

- G. S. Lukat, W. R. McCleary, A. M. Stock und J. B. Stock. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89:718–722, 1992.
- K. Makino, H. Shinagawa, M. Amemura, T. Kawamoto, M. Yamada und A. Nakata. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J. Mol. Biol.*, 210:551–559, 1989.
- S. C. Makrides. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 60:512–538, 1996.
- L. J. McGuffin, K. Bryson und D. T. Jones. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16:404–405, 2000.
- M. B. Miller und B. L. Bassler. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbio.*, 55:165–199, 2001.
- M. B. Miller, K. Skorupski, D. H. Lenz, R. K. Taylor und B. L. Bassler. Parallel Quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*, 110:303–314, 2002.
- K. C. Mok und B. L. Bassler. *Two-Component control of Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria*. In: *Histidin Kinases in Signal Transduction*. Inouye, M., Dutta, R. (eds), Elsevier Science (USA), 2003.
- K. C. Mok, N. S. Wingree und B. L. Bassler. *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *EMBO J.*, 22:870–881, 2003.
- J. D. Murray. *Mathematical Biology I. An Introduction*. Springer, 2002.
- K. H. Nealson und J. W. Hastings. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.*, 43:496–518, 1979.
- M. B. Neiditch, M. J. Federle, S. T. Miller, B. L. Bassler und F. M. Hughson. Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol. Cell*, 18:507–518, 2005.
- M. B. Neiditch, M. J. Federle, A. J. Pompeani, R. C. Kelly, D. L. Swem, P. D. Jeffrey, B. L. Bassler und F. M. Hughson. Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell*, 126:1095–1108, 2006.

- T. Odenbach. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie, 2008.
- T. Ohnishi, T. Hishida, Y. Harada, H. Iwasaki und H. Shinagawa. Structure-function analysis of the three domains of RuvB DNA motor protein. *J. Bacteriol. Chem.*, 280:30504–30510, 2005.
- J. S. Parkinson und E. C. Kofoid. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 26:71–112, 1992.
- S. Patel und M. Latterich. The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.*, 8:65–71, 1998.
- J. Pearlberg und J. LaBaer. Protein expression clone repositories for functional proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 8:98–102, 2004.
- G. R. Pena-Sandoval, O. Kwon und D. Georgellis. Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA *in vivo*. *J. Bacteriol.*, 187:3267–3272, 2005.
- A. L. Perraud, V. Weiss und R. Gross. Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol.*, 7:115–120, 1999.
- G. L. Peterson. A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83:346–356, 1977.
- S. L. Porter und J. P. Armitage. Phosphotransfer in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J. Mol. Biol.*, 324:35–45, 2002.
- Promega. *Technical manual: Altered sites II in vitro mutagenesis systems*. 1994.
- F. A. Quioco und P. S. Ledvina. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.*, 20:17–25, 1996.
- S. Romagnoli und F. R. Tabita. A novel three-protein two-component system provides a regulatory twist on an established circuit to modulate expression of the *cbb* region of *Rhodospseudomonas palustris* CGA010. *J. Bacteriol.*, 188:2780–2798, 2006.

- S. Romagnoli und F. R. Tabita. Phosphotransfer reactions of the CbbRRS three-protein two-component system from *Rhodopseudomonas palustris* CGA010 appear to be controlled by an internal molecular switch on the sensor kinase. *J. Bacteriol.*, 189:325–335, 2007.
- C. Roodveldt, A. Aharoni und D. S. Tawfik. Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15:50–56, 2005.
- M. H. Jr. Saier. Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbiol. Rev.*, 53:109–120, 1989.
- L. Sallai und P. A. Tucker. Crystal structure of the central and C-terminal domain of the σ^{54} -activator ZraR. *J. Struct. Biol.*, 151:160–170, 2005.
- J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- T. Schultz, L. Martinez und A. de Marco. The evaluation of the factors that cause aggregation during recombinant expression in *E. coli* is simplified by the employment of an aggregation-sensitive promotor. *Microb. Cell Factories*, 5:28, 2006.
- M. Schuster, R. E. Silversmith und R. B. Bourret. Conformational coupling in the chemotaxis response regulator CheY. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:6003–6008, 2001.
- C. Schön. Das Zusammenspiel der beiden Hybridsensorkinasen LuxQ und LuxN des *Vibrio harveyi* Quorum Sensing-Systems. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie, 2007.
- C. Seifert, S. Bowien, G. Gottschalk und R. Daniel. Identification and expression of the genes purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *Eur. J. Biochem.*, 268:2369–2378, 2001.
- G. S. Shadel, J. H. Devine und T. O. Baldwin. Control of the lux regulon of *Vibrio fischeri*. *J. Biolumin. Chemilumin.*, 5:99–106, 1990.

- R. Simon, U. Preifer und A. Pühler. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology*, 1: 784–791, 1983.
- P. Smialowski, A. J. Martin-Galiano, A. Mikolajka, T. Girschick, T. A. Holak und D. Frishman. Protein solubility: sequence based prediction and experimental verification. *Bioinformatics*, 23:2536–2542, 2006.
- E. R. Stadtman. Preparation and assay of acetyl phosphate. *Methods. Enzymol.*, 3:228–231, 1957.
- A. M. Stock, V. L. Robinson und P. N. Goudreau. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 69:183–215, 2000.
- F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn und J. W. Dubendorff. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 185:60–89, 1990.
- M. H. Sturme, M. Kleerebezem, J. Nakayama, A. D. Akkermans, E. E. Vaughn und W. M. de Vos. Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81:233–243, 2002.
- J. Sun, R. Daniel, I. Wagner-Döbler und A.-P. Zeng. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evolutionary Biol.*, 4(36), 2004.
- M. G. Surette und B. L. Bassler. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *PNAS*, 95:7046–50, 1998.
- M. G. Surette, M. B. Miller und B. L. Bassler. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *PNAS*, 96:1639–1644, 1999.
- J. C. Swaffield, J. F. Bromberg und S. A. Johnston. Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature*, 357:698–700, 1992.
- R. V. Swanson, M. G. Sanna und M. I. Simon. Thermostable chemotaxis proteins from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J. Bacterio.*, 178:484–489, 1996.

- S. Tabor und C. C. Richardson. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Biotechnology*, 24:280–284, 1985.
- H. Tao und V. W. Cornish. Milestones in directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6:858–864, 2002.
- M. Timmen. *In vitro*-Rekonstruktion der Quorum sensing-Signaltransduktionskaskade zur Charakterisierung der Hybridsensorkinase LuxN aus *Vibrio harveyi*. Doktorarbeit, Fakultät für Biologie/Chemie, Universität Osnabrück, 2005.
- M. Timmen, B. L. Bassler und K. Jung. AI-1 influences the kinase activity but not the phosphatase activity of LuxN of *Vibrio harveyi*. *J. Biol. Chem.*, 281:24398–24404, 2006.
- P. Tortosa und D. Dubnau. Competence for transformation: a matter of taste. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2:588–592, 1999.
- M. A. Uhl und J. F. Miller. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91:1163–1167, 1994.
- M. A. Uhl und J. F. Miller. Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J. Biol. Chem.*, 271:33176–33180, 1996a.
- M. A. Uhl und J. F. Miller. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.*, 15:1028–1036, 1996b.
- D. L. Ulrich, D. Kojetin, B. L. Bassler, J. Cavanagh und J. P. Loria. Solution structure and dynamics of LuxU from *Vibrio harveyi*, a phosphotransferase protein involved in bacterial quorum sensing. *J. Mol. Biol.*, 347:297–307, 2005.
- M. O. Walderhaug, J. W. Polarek, P. Voelkner, J. M. Daniel, J. E. Hesse, K. Altendorf und W. Epstein. KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. *J. Bacteriol.*, 174: 2150–2159, 1992.
- J. E. Walker, M. Saraste, M. J. Runswick und N. J. Gay. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinesins and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, 1:945–951, 1982.

- C. M. Waters und B. L. Bassler. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21:319–346, 2005.
- C. M. Waters und B. L. Bassler. The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. *Genes Dev.*, 20:2754–2767, 2006.
- K. Weber und M. Osborn. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244:4406–4412, 1969.
- V. Weiss und B. Magasanik. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NR_I) of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:8919–8923, 1988.
- D. L. Wilkinson und R. G. Harrison. Prediction the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 9:443–448, 1991.
- P. L. Wintrode, K. Miyazaki und F. H. Arnold. Cold adaptation of mesophilic subtilisin-like protease by laboratory evolution. *J. Biol. Chem.*, 275:31635–31640, 2000.
- G. D. Wright, T. R. Holman und C. T. Walsh. Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: a two-component regulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry*, 32:5057–5063, 1993.
- T. Yamada-Inagawa, T. Okuno, K. Karata, K. Yamanaka und T. Orgura. Conserved pore residue in the AAA protease FtsH are important for proteolysis and its coupling to ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 278:50182–50187, 2003.
- C. Yanisch-Perron, J. Vieira und J. Messing. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33:103–119, 1985.
- A. Zakalskiy, G. Högenauer, T. Ishikawa, E. Wehrschütz-Sigl, F. Wendler, D. Teis, G. Zisser, A. D. Steven und H. Bergler. Structural and enzymatic properties of the AAA protein Drg1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277:26788–26795, 2002.

Anhang

Alignment von *V. harveyi* LuxO und *E. coli* NtrC

LuxOMVEDTASVAALYRSYLTPLGIDINIVGTGRDAI	33
NtrC	MQRGIVVWVDDSSIRWVLERALAGAGLTCTTFENGAEVL	40
Consensus	v d s l g g	
	*	
LuxO	ESLNHRIPDLILLDLRLPDMTGMDVLHAVKKSHPDVPIIF	73
NtrC	EALASKTPDVILSDIRMPGMDGLAILKQIKQRHPMLPVII	80
Consensus	sl pd l dr p m g l k hp pi	
LuxO	MTAHGSIDTAVEAMRHGSQDFLIKPCPADRLRVTVNNAIR	113
NtrC	MTAHSDLDAAVSAYQQGAFDYLKPKFLIDEAVALVERAIS	120
Consensus	mtah d av a g d l kp d v ai	
LuxO	KATKLNKNEADNPGNQNYQGFIFGSSQTMQCVYRTIDSAASS	153
NtrC	HYEQQQPRNVQINGPITDIIGEAPAMQEVYRIIGRLSRS	160
Consensus	n ig mq v r i s	
LuxO	KASIFITGESGTGKEVCAEAIHAASKRGDKPFIAINCAAI	193
NtrC	SISVLIINGESGTGKELVAHALHRHSPRKAPFIALNMAAI	200
Consensus	i gesgtgke a a h s r pfia n aai	
LuxO	PKDLIESELFVGHVKGAFAGAANDRQGAELADGGTLFLDE	233
NtrC	PKDLIESELFVGHVKGAFAGANTIRQGRFEQADGGTLFLDE	240
Consensus	pkdlieselfgh kgaftga r qg e adggtlflde	
LuxO	ICEMDLLDQTKLLRFIQGTGTFQKVGSSKMKSVDVRFVCAAT	273
NtrC	IGDMPLDVQTRLLRVLADGQFYRVGGYAPVKVDVRIIAAT	280
Consensus	m ld qt llr g f vg vdvr at	
LuxO	NRDPWKEVQEGRFREDLYYRLYVIPHLPLRERERKDVIE	313
NtrC	HQNLEQRVQEGRFREDLFHRLNVIRVHLPPLRERREDIPR	320
Consensus	vqeg fredl rl vi hlpplrer d	
LuxO	IAYSLLGYMSHEEGKSFVRFADVIERFNSYEWPGNVQRQL	353
NtrC	IARHFLOVAARELQVEAKLLHPETEAAATRLAWPGNVQRQL	360
Consensus	a l e g wpgnvrql	
LuxO	CNVLRNIVVLLNNGKETLDMLPPPINCQVVRQSVAKFIEP	393
NtrC	ENTCRWLTVMAGCEVLIQDLPGEIFESTVAESTSOMQPD	400
Consensus	n r v g e lp l v s	
LuxO	DIMTVSDIMP...LWMTEKMAIEQATCACEGNIPRAAGYL	430
NtrC	SWATLLAQWADRAIRSGHQNLLEAQQFEIERTLLTTALRH	440
Consensus	t l a e a	
LuxO	IVSPSTIYRKLQAWNSKDEKQNVIRTY..	457
NtrC	TQGHKQEAARILLGWRNTLTKLKLKELGME	469
Consensus	l w	

Abbildung 5.1: Alignment der Proteinsequenzen von LuxO und NtrC. Der konservierte Aspartatrest der Empfängerdomäne ist mit einem roten Stern gekennzeichnet.

Mathematische Modellierung des LuxN/LuxQ/LuxU-Systems

Introduction

We describe the modeling procedure for the LuxN/LuxQ signaling system and the simplification of the model. For an introduction into mathematical modeling see e.g. Murray (2002). We first consider LuxN only, in order to demonstrate the principle for a subsystem that is smaller and thus can be treated more easily, and consequently we investigate the complete LuxN/LuxQ signaling system.

For the equations in the supplement, we use a slightly simplified notation, compared to the main part of the article: Complexes of LuxN and LuxQ with the corresponding autoinducer are marked by [LuxN-HAI1] and [LuxQ-AI2], respectively; no further [] is used to indicate concentrations. Even though LuxP/AI-2 was added in the experiments, not AI-2, we just mention AI-2, in order to keep the notation as simple as possible. Let superscript p denote the phosphorylated state of LuxN, LuxQ, and LuxU (and the complexes); let A_1 and A_2 denote the concentrations of the autoinducers HAI-1 and AI-2, respectively.

The model for the LuxN pathway only

We assume mass action kinetics and, based on experimental observations, that phosphorylation of LuxN by ATP resp. reaction with the autoinducer is rather fast, while the transport from or to LuxU is rather slow. Let the time scale ratio ε be small. We obtain

$$\begin{aligned}
 \frac{d}{dt}A_1 &= (-k_a A_1 \text{LuxN} + k_{-a} [\text{LuxN-HAI1}])/\varepsilon \\
 \frac{d}{dt}\text{LuxN}^P &= (-k_{-1} \text{LuxN}^P + k_1 \text{LuxN})/\varepsilon - k_2 \text{LuxN}^P \text{LuxU} + k_{-2} \text{LuxN} \text{LuxU}^P \\
 \frac{d}{dt}\text{LuxN} &= -(k_1 + k_a A_1) \text{LuxN} + k_{-a} [\text{LuxN-HAI1}] + k_{-1} \text{LuxN}^P/\varepsilon \\
 &\quad - k_{-2} \text{LuxN} \text{LuxU}^P + k_2 \text{LuxN}^P \text{LuxU} \\
 \frac{d}{dt}[\text{LuxN-HAI1}] &= -(k_{-a} + k_{1,a}) [\text{LuxN-HAI1}] + k_a A_1 \text{LuxN} + k_{-1,a} [\text{LuxN}^P\text{-HAI1}]/\varepsilon \\
 &\quad - k_{-2,a} [\text{LuxN-HAI1}] \text{LuxU}^P + k_{2,a} [\text{LuxN}^P\text{-HAI1}] \text{LuxU} \\
 \frac{d}{dt}[\text{LuxN}^P\text{-HAI1}] &= (-k_{-1,a} [\text{LuxN}^P\text{-HAI1}] + k_{1,a} [\text{LuxN-HAI1}])/\varepsilon \\
 &\quad - k_{2,a} [\text{LuxN}^P\text{-HAI1}] \text{LuxU} + k_{-2,a} [\text{LuxN-HAI1}] \text{LuxU}^P \\
 \frac{d}{dt}\text{LuxU} &= -(k_2 \text{LuxN}^P + k_{2,a} [\text{LuxN}^P\text{-HAI1}]) \text{LuxU} \\
 &\quad + (k_{-2} \text{LuxN} + k_{-2,a} [\text{LuxN-HAI1}]) \text{LuxU}^P
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \text{LuxUP} &= (k_2 \text{LuxNP} + k_{2,a} [\text{LuxNP-HAI1}]) \text{LuxU} \\ &\quad - (k_{-2} \text{LuxN} + k_{-2,a} [\text{LuxN-HAI1}]) \text{LuxUP}. \end{aligned}$$

Time scale analysis We now assume that the fast system (binding of autoinducer) is in its quasi-equilibrium, i.e. ε is small. We multiply the equations by ε , and take the limit $\varepsilon \rightarrow 0$. The corresponding equations read

$$\begin{aligned} 0 &= -k_{-1} \text{LuxNP} + k_1 \text{LuxN} \\ 0 &= -(k_1 + k_a A_1) \text{LuxN} + k_{-a} [\text{LuxN-HAI1}] + k_{-1} \text{LuxNP} \\ 0 &= -(k_{-a} + k_{1,a}) [\text{LuxN-HAI1}] + k_a A_1 \text{LuxN} + k_{-1,a} [\text{LuxNP-HAI1}] \\ 0 &= -k_{-1,a} [\text{LuxNP-HAI1}] + k_{1,a} [\text{LuxN-HAI1}] \end{aligned}$$

Furthermore, the total amount of LuxN (C_1) does not change,

$$\text{LuxN} + \text{LuxNP} + [\text{LuxN-HAI1}] + [\text{LuxNP-HAI1}] = C_1$$

and the total amount of HAI-1 (\bar{A}_1) is also fixed,

$$A_1 + [\text{LuxN-HAI1}] + [\text{LuxNP-HAI1}] = \bar{A}_1.$$

Let us assume that we already know LuxNP. Then,

$$\begin{aligned} \text{LuxN} &= \frac{k_{-1}}{k_1} \text{LuxNP} \\ [\text{LuxN-HAI1}] &= \frac{k_a A_1}{k_{-a}} \text{LuxNP} = \frac{k_a A_1}{k_{-a}} \frac{k_{-1}}{k_1} \text{LuxNP} \\ [\text{LuxNP-HAI1}] &= \frac{k_{1,a}}{k_{-1,a}} [\text{LuxN-HAI1}] = \frac{k_{1,a}}{k_{-1,a}} \frac{k_a A_1}{k_{-a}} \frac{k_{-1}}{k_1} \text{LuxNP}. \end{aligned}$$

Now we can use the fact that the complete amount of LuxN (in any form) sums up to C_1 , and find

$$\begin{aligned} C_1 &= \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_a A_1}{k_{-a}} \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_{1,a}}{k_{-1,a}} \frac{k_a A_1}{k_{-a}} \frac{k_{-1}}{k_1} \right) \text{LuxNP} \\ \Rightarrow \text{LuxNP} &= \frac{C_1}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_a A_1}{k_{-a}} \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_{1,a}}{k_{-1,a}} \frac{k_a A_1}{k_{-a}} \frac{k_{-1}}{k_1}} \\ &= \frac{C_1 k_{-1,a} k_{-a} k_1}{k_{-1,a} k_{-a} k_1 + k_{-1,a} k_{-a} k_{-1} + k_{-1,a} A_1 k_a k_{-1} + k_{1,a} A_1 k_a k_{-1}}. \end{aligned}$$

Hence,

$$\begin{aligned} \text{LuxN} &= \frac{C_1 k_{-1,a} k_{-a} k_{-1}}{k_{-1,a} k_{-a} k_{-1} + k_{-1,a} k_{-a} k_{-1} + k_{-1,a} A_1 k_a k_{-1} + k_{1,a} A_1 k_a k_{-1}} \\ [\text{LuxN-HAI1}] &= \frac{C_1 k_{-1,a} A_1 k_a k_{-1}}{k_{-1,a} k_{-a} k_{-1} + k_{-1,a} k_{-a} k_{-1} + k_{-1,a} A_1 k_a k_{-1} + k_{1,a} A_1 k_a k_{-1}} \\ [\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] &= \frac{C_1 k_{1,a} A_1 k_a k_{-1}}{k_{-1,a} k_{-a} k_{-1} + k_{-1,a} k_{-a} k_{-1} + k_{-1,a} A_1 k_a k_{-1} + k_{1,a} A_1 k_a k_{-1}}. \end{aligned}$$

If we define

$$\alpha = k_{-1,a} k_{-a} k_{-1}, \quad \beta = k_{-1,a} k_{-a} k_{-1}, \quad \gamma = k_{-1,a} k_a k_{-1}, \quad \text{and} \quad \delta = k_{1,a} k_a k_{-1},$$

we find

$$\begin{aligned} \text{LuxN} &= C_1 \frac{\beta}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta) A_1} \\ \text{LuxN}^{\text{P}} &= C_1 \frac{\alpha}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta) A_1} \\ [\text{LuxN-HAI1}] &= C_1 \frac{\gamma A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta) A_1} \\ [\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] &= C_1 \frac{\delta A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta) A_1}. \end{aligned}$$

From this result we are able to compute A_1 in dependence on \bar{A}_1 , i.e. the amount of free HAI-1 in dependence on the total amount of HAI-1,

$$\begin{aligned} \bar{A}_1 &= A_1 + [\text{LuxN-HAI1}] + [\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] \\ &= A_1 + C_1 \frac{\gamma A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta) A_1} + C_1 \frac{\delta A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta) A_1}. \end{aligned}$$

Hence, A_1 is given as the root of the polynomial

$$(\gamma + \delta) A_1^2 + \{(\alpha + \beta) + (C_1 - \bar{A}_1)(\gamma + \delta)\} A_1 - \bar{A}_1(\alpha + \beta) = 0,$$

i.e. by

$$A_1 = \frac{1}{2} \left\{ \bar{A}_1 - C_1 - \frac{\alpha + \beta}{\gamma + \delta} \pm \sqrt{\left(\bar{A}_1 - C_1 - \frac{\alpha + \beta}{\gamma + \delta} \right)^2 + 4 \bar{A}_1 \frac{\alpha + \beta}{\gamma + \delta}} \right\}.$$

Since the feasible solution is positive, we chose the positive sign in front of the root. As in the experiments $\bar{A}_1 \gg C_1$ (the autoinducer (AI) concentrations used are μM , while the LuxN concentration is pM), we may assume $\bar{A}_1 - C_1 \approx \bar{A}_1$, and therefore

$$A_1 \approx \bar{A}_1.$$

Dynamics of LuxU Since also the total amount of LuxU (C_3) is constant,

$$\text{LuxU} + \text{LuxUP} = C_3,$$

we may only consider LuxUP and find

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}\text{LuxUP} &= (k_2\text{LuxNP} + k_{2,a}[\text{LuxNP-HAI1}])(C_3 - \text{LuxUP}) \\ &\quad - (k_{-2}\text{LuxN} + k_{-2,a}[\text{LuxN-HAI1}])\text{LuxUP} \\ &= (k_2\text{LuxNP} + k_{2,a}[\text{LuxNP-HAI1}])C_3 \\ &\quad - (k_{-2}\text{LuxN} + k_{-2,a}[\text{LuxN-HAI1}] + k_2\text{LuxNP} + k_{2,a}[\text{LuxNP-HAI1}])\text{LuxUP}, \end{aligned}$$

with initial conditions

$$\text{LuxUP}(0) = 0.$$

We may thus solve the equation explicitly,

$$\text{LuxUP}(t) = \text{LuxUP}^{\text{equil}} \left(1 - e^{-(k_{-2}\text{LuxN} + k_{-2,a}[\text{LuxN-HAI1}] + k_2\text{LuxNP} + k_{2,a}[\text{LuxNP-HAI1}])t} \right)$$

with

$$\text{LuxUP}^{\text{equil}} = C_3 \frac{k_2\text{LuxNP} + k_{2,a}[\text{LuxNP-HAI1}]}{k_{-2}\text{LuxN} + k_{-2,a}[\text{LuxN-HAI1}] + k_2\text{LuxNP} + k_{2,a}[\text{LuxNP-HAI1}]}.$$

Hence, the system always tends to an equilibrium. Now we use our results for LuxN,

$$\begin{aligned} &k_{-2}\text{LuxN} + k_{-2,a}[\text{LuxN-HAI1}] + k_2\text{LuxNP} + k_{2,a}[\text{LuxNP-HAI1}] \\ &= C_1 \frac{k_{-2}\beta + k_{-2,a}\gamma A_1 + k_2\alpha + k_{2,a}\delta A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} \\ &= C_1 \frac{k_{-2}\beta + k_2\alpha + (k_{-2,a}\gamma + k_{2,a}\delta)A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} \end{aligned}$$

and therefore

$$\text{LuxUP}^{\text{equil}} = C_3 \frac{k_2\alpha + k_{2,a}\delta A_1}{k_{-2}\beta + k_2\alpha + (k_{-2,a}\gamma + k_{2,a}\delta)A_1}.$$

The value $\text{LuxUP}^{\text{equil}}$ does not depend on the total amount LuxN in the system (i.e., on C_1). If $C_1 = 0$, then the exponent in the equation for $\text{LuxUP}(t)$ will be zero, i.e. the exponent is responsible that the amount of LuxUP will not change without LuxN. However, if at least a small amount of LuxN is present in the system, the amount of LuxUP tends to an equilibrium independent of the concentration of LuxN. The time scale at which the equilibrium is approached does depend on C_1 . One may view the situation as two basins

or reservoirs of phosphor (ATP and LuxU^P), connected by two pipes with pumps: one pipe (LuxN and [LuxN-HAI1]) pumps phosphor from LuxU^P to ATP, the other pipe (LuxN^P and [LuxN^P-HAI1]) in the reverse direction. The relative power of the two pumps determines the value of the equilibrium, the absolute power only the time needed to reach the equilibrium.

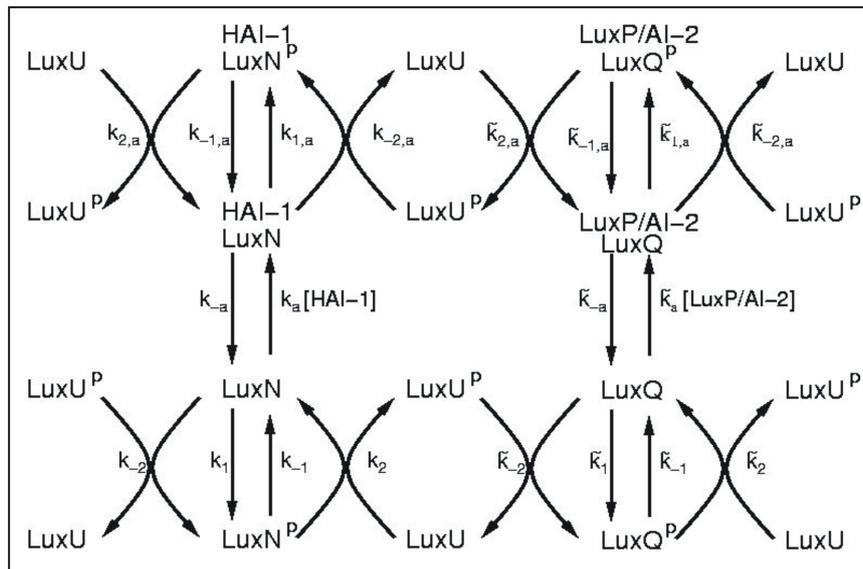
HAI-1 influences the (relative) strength of both pumps: the more LuxN is bound to HAI-1, the better is the relative strength of the pump from LuxU^P to ATP. As the concentration of HAI-1 is much higher than that of LuxN, there is no competition of LuxN for HAI-1. Hence, each LuxN molecule independently of all other LuxN molecule is bound to HAI-1 with a certain probability (that again does not depend on the total amount of LuxN C_1). In consequence, also the influence of HAI-1 on the equilibrium concentration of LuxU^P is independent of C_1 .

If we take A_1 to zero, we find the maximal “signal” (LuxU^P) which we call S_0 . For $A_1 \rightarrow \infty$, the “signal” will approach another value S_1 . We can write the equation in a more comprehensible way as

$$\text{LuxU}^{\text{P}} \text{ equil} = S_0 + (S_1 - S_0) \frac{A_1}{a_1^{1/2} + A_1}.$$

I.e., the signal LuxU^P is decreased from S_0 to S_1 by HAI-1 according to a Hill function with Hill coefficient one and half activation $a_1^{1/2}$.

The complete model (LuxN and LuxQ)



Also in this case we introduce time scales: the reactions of LuxN or LuxQ with LuxU and LuxU^P are slow in comparison with all other reactions. Taking into account the observations from the system for LuxN only, we assume the AI concentrations (for both species of autoinducer) as given and fixed (A_2 denotes the total amount of AI-2); the amount of autoinducer bound by the receptor molecules is neglected. The total amount of LuxQ (C_2) does not change. Accordingly, we find the system

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt}\text{LuxN}^{\text{P}} &= (-k_{-1}\text{LuxN}^{\text{P}} + k_1\text{LuxN})/\varepsilon - k_2\text{LuxN}^{\text{P}}\text{LuxU} + k_{-2}\text{LuxN}\text{LuxU}^{\text{P}} \\
\frac{d}{dt}\text{LuxN} &= -(k_1 + k_a A_1)\text{LuxN} + k_{-a}[\text{LuxN-HAI1}] + k_{-1}\text{LuxN}^{\text{P}}/\varepsilon \\
&\quad - k_{-2}\text{LuxN}\text{LuxU}^{\text{P}} + k_2\text{LuxN}^{\text{P}}\text{LuxU} \\
\frac{d}{dt}[\text{LuxN-HAI1}] &= -(k_{-a} + k_{1,a})[\text{LuxN-HAI1}] + k_a A_1\text{LuxN} + k_{-1,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}]/\varepsilon \\
&\quad - k_{-2,a}[\text{LuxN-HAI1}]\text{LuxU}^{\text{P}} + k_{2,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}]\text{LuxU} \\
\frac{d}{dt}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] &= (-k_{-1,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] + k_{1,a}[\text{LuxN-HAI1}])/\varepsilon \\
&\quad - k_{2,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}]\text{LuxU} + k_{-2,a}[\text{LuxN-HAI1}]\text{LuxU}^{\text{P}} \\
\frac{d}{dt}\text{LuxQ}^{\text{P}} &= (-\tilde{k}_{-1}\text{LuxQ}^{\text{P}} + \tilde{k}_1\text{LuxQ})/\varepsilon - \tilde{k}_2\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{LuxU} + \tilde{k}_{-2}\text{LuxQ}\text{LuxU}^{\text{P}} \\
\frac{d}{dt}\text{LuxQ} &= -(\tilde{k}_1 + \tilde{k}_a A_1)\text{LuxQ} + \tilde{k}_{-a}[\text{LuxQ-AI2}] + \tilde{k}_{-1}\text{LuxQ}^{\text{P}}/\varepsilon \\
&\quad - \tilde{k}_{-2}\text{LuxQ}\text{LuxU}^{\text{P}} + \tilde{k}_2\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{LuxU} \\
\frac{d}{dt}[\text{LuxQ-AI2}] &= -(\tilde{k}_{-a} + \tilde{k}_{1,a})[\text{LuxQ-AI2}] + \tilde{k}_a A_1\text{LuxQ} + \tilde{k}_{-1,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}]/\varepsilon \\
&\quad - \tilde{k}_{-2,a}[\text{LuxQ-AI2}]\text{LuxU}^{\text{P}} + \tilde{k}_{2,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}]\text{LuxU} \\
\frac{d}{dt}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}] &= (-\tilde{k}_{-1,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}] + \tilde{k}_{1,a}[\text{LuxQ-AI2}])/\varepsilon \\
&\quad - \tilde{k}_{2,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}]\text{LuxU} + \tilde{k}_{-2,a}[\text{LuxQ-AI2}]\text{LuxU}^{\text{P}} \\
\frac{d}{dt}\text{LuxU} &= -(k_2\text{LuxN}^{\text{P}} + k_{2,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}])\text{LuxU} \\
&\quad + (k_{-2}\text{LuxN} + k_{-2,a}[\text{LuxN-HAI1}])\text{LuxU}^{\text{P}} \\
&\quad - (\tilde{k}_2\text{LuxQ}^{\text{P}} + \tilde{k}_{2,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}])\text{LuxU} \\
&\quad + (\tilde{k}_{-2}\text{LuxQ} + \tilde{k}_{-2,a}[\text{LuxQ-AI2}])\text{LuxU}^{\text{P}} \\
\frac{d}{dt}\text{LuxU}^{\text{P}} &= (k_2\text{LuxN}^{\text{P}} + k_{2,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}])\text{LuxU} \\
&\quad - (k_{-2}\text{LuxN} + k_{-2,a}[\text{LuxN-HAI1}])\text{LuxU}^{\text{P}} \\
&\quad + (\tilde{k}_2\text{LuxQ}^{\text{P}} + \tilde{k}_{2,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}])\text{LuxU} \\
&\quad - (\tilde{k}_{-2}\text{LuxQ} + \tilde{k}_{-2,a}[\text{LuxQ-AI2}])\text{LuxU}^{\text{P}}.
\end{aligned}$$

Quasi-stationary state As before, we multiply all equations by ε and take ε to zero.

The system yields the set of equations

$$\begin{aligned}
0 &= -k_{-1}\text{LuxN}^{\text{P}} + k_1\text{LuxN} \\
0 &= -(k_1 + k_a A_1)\text{LuxN} + k_{-a}[\text{LuxN-HAI1}] + k_{-1}\text{LuxN}^{\text{P}} \\
0 &= -(k_{-a} + k_{1,a})[\text{LuxN-HAI1}] + k_a A_1 \text{LuxN} + k_{-1,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] \\
0 &= -k_{-1,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] + k_{1,a}[\text{LuxN-HAI1}] \\
0 &= -\tilde{k}_{-1}\text{LuxQ}^{\text{P}} + \tilde{k}_1\text{LuxQ} \\
0 &= -(\tilde{k}_1 + \tilde{k}_a A_2)\text{LuxQ} + \tilde{k}_{-a}[\text{LuxQ-AI2}] + \tilde{k}_{-1}\text{LuxQ}^{\text{P}} \\
0 &= -(\tilde{k}_{-a} + \tilde{k}_{1,a})[\text{LuxQ-AI2}] + \tilde{k}_a A_2 \text{LuxQ} + \tilde{k}_{-1,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}] \\
0 &= -\tilde{k}_{-1,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}] + \tilde{k}_{1,a}[\text{LuxQ-AI2}].
\end{aligned}$$

This set of equations can be treated similarly as the corresponding equations above. We define (again)

$$\begin{aligned}
\alpha &= k_{-1,a}k_{-a}k_1, & \beta &= k_{-1,a}k_{-a}k_{-1}, & \gamma &= k_{-1,a}k_a k_{-1}, & \text{and } \delta &= k_{1,a}k_a k_{-1}, \\
\tilde{\alpha} &= \tilde{k}_{-1,a}\tilde{k}_{-a}\tilde{k}_1, & \tilde{\beta} &= \tilde{k}_{-1,a}\tilde{k}_{-a}\tilde{k}_{-1}, & \tilde{\gamma} &= \tilde{k}_{-1,a}\tilde{k}_a\tilde{k}_{-1}, & \text{and } \tilde{\delta} &= \tilde{k}_{1,a}\tilde{k}_a\tilde{k}_{-1}
\end{aligned}$$

and find

$$\begin{aligned}
\text{LuxN} &= C_1 \frac{\beta}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} \\
\text{LuxN}^{\text{P}} &= C_1 \frac{\alpha}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} \\
[\text{LuxN-HAI1}] &= C_1 \frac{\gamma A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} \\
[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] &= C_1 \frac{\delta A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} \\
\text{LuxQ} &= C_2 \frac{\tilde{\beta}}{\tilde{\alpha} + \tilde{\beta} + (\tilde{\gamma} + \tilde{\delta})A_2} \\
\text{LuxQ}^{\text{P}} &= C_2 \frac{\tilde{\alpha}}{\tilde{\alpha} + \tilde{\beta} + (\tilde{\gamma} + \tilde{\delta})A_2} \\
[\text{LuxQ-AI2}] &= C_2 \frac{\tilde{\gamma} A_2}{\tilde{\alpha} + \tilde{\beta} + (\tilde{\gamma} + \tilde{\delta})A_2} \\
[\text{LuxQ-AI2}] &= C_2 \frac{\tilde{\delta} A_2}{\tilde{\alpha} + \tilde{\beta} + (\tilde{\gamma} + \tilde{\delta})A_2}.
\end{aligned}$$

Dynamics of LuxU Now we assume the receptor molecules to be in equilibrium. Using the fact that $\text{LuxU} + \text{LuxU}^{\text{P}}$ is constant, we find an autonomous differential equation for LuxU^{P}

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}\text{LuxU}^{\text{P}} &= (k_2\text{LuxN}^{\text{P}} + k_{2,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] + \tilde{k}_2\text{LuxQ}^{\text{P}} + \tilde{k}_{2,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}])(C_3 - \text{LuxU}^{\text{P}}) \\ &\quad - (k_{-2}\text{LuxN} + k_{-2,a}[\text{LuxN}\text{-HAI1}] + \tilde{k}_{-2}\text{LuxQ} + \tilde{k}_{-2,a}[\text{LuxQ}\text{-AI2}])\text{LuxU}^{\text{P}} \\ &= (k_2\text{LuxN}^{\text{P}} + k_{2,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] + \tilde{k}_2\text{LuxQ}^{\text{P}} + \tilde{k}_{2,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}])C_3 \\ &\quad - (k_{-2}\text{LuxN} + k_{-2,a}[\text{LuxN}\text{-HAI1}] + k_2\text{LuxN}^{\text{P}} + k_{2,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] \\ &\quad + \tilde{k}_{-2}\text{LuxQ} + \tilde{k}_{-2,a}[\text{LuxQ}\text{-AI2}] + \tilde{k}_2\text{LuxQ}^{\text{P}} + \tilde{k}_{2,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}])\text{LuxU}^{\text{P}}. \end{aligned}$$

If we start with no LuxU^{P} we obtain the solution

$$\text{LuxU}^{\text{P}}(t) = \text{LuxU}^{\text{P} \text{ equil}} (1 - e^{-\lambda t})$$

where

$$\begin{aligned} \text{LuxU}^{\text{P} \text{ equil}} &= C_3 \left(k_2\text{LuxN}^{\text{P}} + k_{2,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] + \tilde{k}_2\text{LuxQ}^{\text{P}} + \tilde{k}_{2,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}] \right) \\ &\quad \times \left(k_{-2}\text{LuxN} + k_{-2,a}[\text{LuxN}\text{-HAI1}] + k_2\text{LuxN}^{\text{P}} + k_{2,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] \right. \\ &\quad \left. + \tilde{k}_{-2}\text{LuxQ} + \tilde{k}_{-2,a}[\text{LuxQ}\text{-AI2}] + \tilde{k}_2\text{LuxQ}^{\text{P}} + \tilde{k}_{2,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}] \right)^{-1} \\ &= C_3 \frac{C_1 \frac{k_2\alpha + k_{2,a}\delta A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} + C_2 \frac{\tilde{k}_2\tilde{\alpha} + \tilde{k}_{2,a}\tilde{\delta}A_2}{\tilde{\alpha} + \tilde{\beta} + (\tilde{\gamma} + \tilde{\delta})A_2}}{C_1 \frac{k_{-2}\beta + k_{-2,a}\gamma A_1 + k_2\alpha + k_{2,a}\delta A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} + C_2 \frac{\tilde{k}_{-2}\tilde{\beta} + \tilde{k}_{-2,a}\tilde{\gamma}A_2 + \tilde{k}_2\tilde{\alpha} + \tilde{k}_{2,a}\tilde{\delta}A_2}{\tilde{\alpha} + \tilde{\beta} + (\tilde{\gamma} + \tilde{\delta})A_2}} \\ &= C_3 \frac{C_1 \frac{k_2\alpha + k_{2,a}\delta A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} + C_2 \frac{\tilde{k}_2\tilde{\alpha} + \tilde{k}_{2,a}\tilde{\delta}A_2}{\tilde{\alpha} + \tilde{\beta} + (\tilde{\gamma} + \tilde{\delta})A_2}}{C_1 \frac{k_{-2}\beta + k_2\alpha + (k_{-2,a}\gamma + k_{2,a}\delta)A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} + C_2 \frac{\tilde{k}_{-2}\tilde{\beta} + \tilde{k}_2\tilde{\alpha} + (\tilde{k}_{-2,a}\tilde{\gamma} + \tilde{k}_{2,a}\tilde{\delta})A_2}{\tilde{\alpha} + \tilde{\beta} + (\tilde{\gamma} + \tilde{\delta})A_2}} \end{aligned}$$

and

$$\begin{aligned} \lambda &= \left(k_{-2}\text{LuxN} + k_{-2,a}[\text{LuxN}\text{-HAI1}] + k_2\text{LuxN}^{\text{P}} + k_{2,a}[\text{LuxN}^{\text{P}}\text{-HAI1}] \right. \\ &\quad \left. + \tilde{k}_{-2}\text{LuxQ} + \tilde{k}_{-2,a}[\text{LuxQ}\text{-AI2}] + \tilde{k}_2\text{LuxQ}^{\text{P}} + \tilde{k}_{2,a}[\text{LuxQ}^{\text{P}}\text{-AI2}] \right) \end{aligned}$$

Simplification / simplifying assumptions for the asymptotic formula In this section we aim at a simplification of the result. The experimental findings hint that

1. the autoinducer does not influence the phosphotransfer between LuxN (LuxQ) and LuxU, but the phosphotransfer between LuxN (LuxQ) and ATP. Thus,

$$k_2 \approx k_{2,a}, \quad k_{-2} \approx k_{-2,a}, \quad \tilde{k}_2 \approx \tilde{k}_{2,a}, \quad \tilde{k}_{-2} \approx \tilde{k}_{-2,a}.$$

2. The rates of phosphotransfer from and to LuxU do not differ to a large extent. Indeed, the data in the paper Timmen et al. (2006) hint that $k_2/k_{-2} \approx 3$.
3. only a minor fraction of all LuxN (LuxQ) molecules are phosphorylated, i.e.

$$\frac{k_{-1}}{k_1} \gg 1, \quad \frac{k_{-1,a}}{k_{1,a}} \gg 1, \quad \frac{\tilde{k}_{-1}}{\tilde{k}_1} \gg 1, \quad \frac{\tilde{k}_{-1,a}}{\tilde{k}_{1,a}} \gg 1.$$

Indeed, the data in the paper Timmen et al. (2006) show that this quotient is around 100-300 for LuxN. Consequently,

$$\beta + \alpha = \beta + \frac{k_1}{k_{-1}}\beta \approx \beta$$

and, similarly,

$$\tilde{\beta} + \tilde{\alpha} = \tilde{\beta} + \frac{\tilde{k}_1}{\tilde{k}_{-1}}\tilde{\beta} \approx \tilde{\beta}$$

and thus

$$\gamma + \delta \approx \gamma, \quad k_{2,a}\delta + k_{-2,a}\gamma \approx k_{-2,a}\gamma, \quad \tilde{\gamma} + \tilde{\delta} \approx \tilde{\gamma}, \quad \tilde{k}_{2,a}\tilde{\delta} + \tilde{k}_{-2,a}\tilde{\gamma} \approx \tilde{k}_{-2,a}\tilde{\gamma}.$$

Using these approximations, we find

$$\begin{aligned} \text{LuxUP}^{\text{equil}} &= C_3 \frac{C_1 \frac{k_2\alpha + k_{2,a}\delta A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} + C_2 \frac{\tilde{k}_2\tilde{\alpha} + \tilde{k}_{2,a}\tilde{\delta}A_2}{\tilde{\alpha} + \tilde{\beta} + (\tilde{\gamma} + \tilde{\delta})A_2}}{C_1 \frac{k_{-2}\beta + k_2\alpha + (k_{-2,a}\gamma + k_{2,a}\delta)A_1}{\alpha + \beta + (\gamma + \delta)A_1} + C_2 \frac{\tilde{k}_{-2}\tilde{\beta} + \tilde{k}_2\tilde{\alpha} + (\tilde{k}_{-2,a}\tilde{\gamma} + \tilde{k}_{2,a}\tilde{\delta})A_2}{\tilde{\alpha} + \tilde{\beta} + (\tilde{\gamma} + \tilde{\delta})A_2}} \\ &\approx C_3 \frac{C_1 \frac{k_2\alpha + k_{2,a}\delta A_1}{\beta + \gamma A_1} + C_2 \frac{\tilde{k}_2\tilde{\alpha} + \tilde{k}_{2,a}\tilde{\delta}A_2}{\tilde{\beta} + \tilde{\gamma}A_2}}{C_1 \frac{k_{-2}\beta + k_{-2,a}\gamma A_1}{\beta + \gamma A_1} + C_2 \frac{\tilde{k}_{-2}\tilde{\beta} + \tilde{k}_{-2,a}\tilde{\gamma}A_2}{\tilde{\beta} + \tilde{\gamma}A_2}} \approx C_3 \frac{C_1 k_2 \frac{\alpha + \delta A_1}{\beta + \gamma A_1} + C_2 \tilde{k}_2 \frac{\tilde{\alpha} + \tilde{\delta} A_2}{\tilde{\beta} + \tilde{\gamma} A_2}}{C_1 k_{-2} \frac{\beta + \gamma A_1}{\beta + \gamma A_1} + C_2 \tilde{k}_{-2} \frac{\tilde{\beta} + \tilde{\gamma} A_2}{\tilde{\beta} + \tilde{\gamma} A_2}} \\ &= C_3 \left(\frac{C_1 k_2}{C_1 k_{-2} + C_2 \tilde{k}_{-2}} \frac{\alpha + \delta A_1}{\beta + \gamma A_1} + \frac{C_2 \tilde{k}_2}{C_1 k_{-2} + C_2 \tilde{k}_{-2}} \frac{\tilde{\alpha} + \tilde{\delta} A_2}{\tilde{\beta} + \tilde{\gamma} A_2} \right). \end{aligned}$$

Estimations from separated LuxN/LuxQ experiments Let us now assume that we have information of the LuxN system (where we did not take into account the effect of LuxQ) respectively LuxQ (where LuxN is not present). We define the following variables.

Variable	Name
Signal without any autoinducer for LuxN/LuxU (without LuxQ)	$\hat{S}_{0,1}$
Signal without any autoinducer for LuxQ/LuxU (without LuxN)	$\hat{S}_{0,2}$
Relative asymptotic Signal with (a high amount of) HAI-1 only in absence of LuxQ	r^N
Relative asymptotic Signal with (a high amount of) AI-2 only in absence of LuxN	r^Q
Concentration of HAI-1 which results in half-maximal inhibition (while $A_2 = 0$)	$a_1^{1/2} = [\text{HAI-1}]^*$
Concentration of AI-2 which results in half-maximal inhibition (while $A_1 = 0$)	$a_2^{1/2} = [\text{AI-2}]^*$

As we have seen in section 2, the response of the LuxN/LuxU system can be written as

$$\text{LuxUP}^{\text{equil}} = \hat{S}_{0,1} + (r^N - \hat{S}_{0,1}) \frac{A_1}{a_1^{1/2} + A_1}$$

and that for the LuxQ/LuxU system

$$\text{LuxUP}^{\text{equil}} = \hat{S}_{0,2} + (r^Q - \hat{S}_{0,2}) \frac{A_2}{a_2^{1/2} + A_2}.$$

Hence, the response on the combined system can be displayed by

$$\begin{aligned} \text{LuxUP}^{\text{equil}} &= \frac{C_3 C_1 k_2}{C_1 k_{-2} + C_2 \tilde{k}_{-2}} \left(\hat{S}_{0,1} + (r^N - \hat{S}_{0,1}) \frac{A_1}{a_1^{1/2} + A_1} \right) \\ &\quad + \frac{C_3 C_2 \tilde{k}_2}{C_1 k_{-2} + C_2 \tilde{k}_{-2}} \left(\hat{S}_{0,2} + (r^Q - \hat{S}_{0,2}) \frac{A_2}{a_2^{1/2} + A_2} \right) \\ &= \frac{\hat{S}_{0,1} C_3 C_1 k_2}{C_1 k_{-2} + C_2 \tilde{k}_{-2}} \left(1 + \frac{(r^N - \hat{S}_{0,1})}{\hat{S}_{0,1}} \frac{A_1}{a_1^{1/2} + A_1} \right) \\ &\quad + \frac{\hat{S}_{0,2} C_3 C_2 \tilde{k}_2}{C_1 k_{-2} + C_2 \tilde{k}_{-2}} \left(1 + \frac{(r^Q - \hat{S}_{0,2})}{\hat{S}_{0,2}} \frac{A_2}{a_2^{1/2} + A_2} \right) \end{aligned}$$

The quotient $\hat{S}_1 = (r^N - \hat{S}_{0,1})/\hat{S}_{0,1}$ denotes the maximal, relative decrease of the signal by HAI-1 in the presence of LuxN only (similarly, $\hat{S}_2 = (r^Q - \hat{S}_{0,2})/\hat{S}_{0,2}$ that for the LuxQ system). We now normalize $\text{LuxUP}^{\text{equil}}$ to one for $A_1 = A_2 = 0$. After normalizing we find

$$\text{LuxUP}^{\text{equil}} = \tau_1 \left(1 + (r^N - 1) \frac{A_1}{a_1^{1/2} + A_1} \right) + \tau_2 \left(1 + (r^Q - 1) \frac{A_2}{a_2^{1/2} + A_2} \right)$$

where

$$\tau_1 = \frac{\hat{S}_{0,1}k_2C_1}{\hat{S}_{0,1}k_2C_1 + \hat{S}_{0,2}\tilde{k}_2C_2}, \quad \tau_2 = \frac{\hat{S}_{0,2}\tilde{k}_2C_2}{\hat{S}_{0,1}k_2C_1 + \hat{S}_{0,2}\tilde{k}_2C_2} = 1 - \tau_1.$$

Let $\tau = \tau_1$. The number $\tau \in [0, 1]$ indicates the relative strength of the two signal channels.

If $0 < \tau < 1$, the maximal signal (LuxUP) in response to both autoinducers is always below the maximal response for one autoinducer only. However, the combined, maximal response always is above the best response of LuxN alone (in absence of any LuxQ). We may understand this finding again by viewing the situation as two vessels (ATP, LuxUP), connected by four pumping systems: two in the direction from ATP to LuxUP (one due to LuxN and one due to LuxQ), and also two in the reverse direction. If both pipe systems (that due to LuxN and that due to LuxQ) are active, the equilibrium will be a mixture (a linear combination) of the equilibrium of the pipe system due to LuxN alone resp. LuxQ alone. Hence, the result of the complete system is a weighted average of the subsystems and never can have more influence than these.

The model requires to determine five parameters: r^N , r^Q , $\hat{a}_1^{1/2}$, $\hat{a}_2^{1/2}$ and τ . The first four parameters are determined by the experiments presented by the present work:

$$r^N = 0.3, \quad r^Q = 0.6, \quad \hat{a}_1^{1/2} = 5 \mu\text{M}, \quad \hat{a}_2^{1/2} = 5 \mu\text{M}.$$

The only unknown is the parameter τ . In order to obtain information of this parameter, especially measurements of \tilde{k}_2 are necessary. This rate constant, however, is for technical reasons quite difficult to determine experimentally. Of course, also the other rates play a role for the value of τ , but they can be reduced to other magnitudes like the complete amounts of LuxN and LuxQ (C_1 and C_2), and the signals without any autoinducer ($\hat{S}_{0,1}$ and $\hat{S}_{0,2}$), which are known or easier to determine experimentally. Luckily enough, our predictions do not heavily depend on the special choice of τ , at least as long as the value of τ does not invert the relative strength of the two signal channels. We present the dependence of LuxUP for several choices of τ in Fig. 3.13. Varying values of the relative weight τ influences the effect strength of each autoinducer and of the combined effect. Lower values for τ result in a stronger reduction of the LuxU phosphorylation by LuxP/AI-2 and a weaker reduction by HAI-1.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kirsten Jung für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Möglichkeit am Quorum sensing-Projekt zu arbeiten. Ganz besonders möchte ich mich für die stetige Diskussionsbereitschaft und die unermüdliche und ausgezeichnete Betreuung sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ich habe immer mit viel Spaß und Freude in der Arbeitsgruppe gearbeitet.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Kirsten und Heinrich Jung für die immer vorhandene Hilfsbereitschaft, die Diskussionen und das Beantworten vieler Fragen. Insbesondere möchte ich Prof. Dr. Heinrich Jung, Dr. Ralf Heermann, Dr. Torsten Pirch und Dr. Larissa Tetsch für die vielen Anregungen und Denkansätze danken.

Den technischen Assistentinnen Korinna Burdack, Simone Holpert und Sonia Kroll, den Doktoranden Stephanie Kögl, Christiane Koller, Tobias Kraxenberger, Christoph Küper und Tina Odenbach sowie den zahlreichen Diplomanden, die während meiner Zeit unsere Arbeitsgruppe durchlaufen haben, danke ich für die angenehme Zeit in und außerhalb des Labors.

Ganz herzlich danke ich Carolin Schön für die Herstellung und Charakterisierung der LuxN/LuxQ-Chimäre sowie der verkürzten Trx-LuxN- und Trx-LuxQ-Derivate, für die Hilfe bei den Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen LuxN und LuxQ und natürlich für die freundschaftliche Atmosphäre im Keller.

Den Forschungspraktikanten Ulrike Schütz und Christoph Guggenberger danke ich für ihre praktische Unterstützung, insbesondere danke ich Melanie Pfaffendorf für die Produktion und Charakterisierung von LuxO-K167A. Dr. Melanie Timmen danke ich für die Einführung in das Lux-System und Daniel Hilger für die Einführung in Pymol.

Prof. Dr. Dirk Schüler danke ich recht herzlich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Dr. Heinz Schwer von der Firma Sloning Biotechnology danke ich für die Möglichmachung des Projekts zur Herstellung der LuxO-Varianten sowie für die Bereitstellung aller notwendigen Ressourcen. Den Mitarbeitern Dr. Jan van den Brulle und Dr. Markus Fuhrmann der Firma Sloning Biotechnology danke ich für die Unterstützung bei der Auswahl der Aminosäuren und der Herstellung der *luxO*-Varianten sowie für die hervorragende Zusammenarbeit.

Dr. Christina Kuttler, Dr. Burkard Hense und Prof. Dr. Johannes Müller von der TU München danke ich für die Erstellung des mathematischen Modells der LuxN- und LuxQ-abhängigen Signalwege und für die Beantwortung vieler Fragen.

Dr. Martina Silber vom botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Transformation und Kultivierung der *Rhodobacter sphaeroides*-Stämme.

Der größte und herzlichste Dank gilt meinen Eltern Daniela und Peter Kramer, denen ich meine Ausbildung zu verdanken habe und die mich während meines gesamten Studiums unterstützt haben, meinem Mann Fabian Stambrau, der in allen Lebenslagen für mich da war und ist, sowie meinen besten Freundinnen Tina Heitmann, Sara Kleiner, Natalija Kuštrin und Nina Wolfrum, die mir trotz räumlicher Entfernung sehr nahe sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nina Stambrau, geb. Kramer
Geburtsdatum: 19. Januar 1978
Geburtsort: Frankfurt am Main
Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung

Aug. 1984 - Aug. 1988 Besuch der Friedrich-Fröbel-Grundschule in Frankfurt am Main
Aug. 1988 - Aug. 1997 Besuch des Freiherr-vom-Stein-Gymnasiums in Frankfurt am Main

Beruflicher Werdegang

Okt. 1997 - Mär. 2002 Studium der Biologie an der Johann-Wolfgang-von-Goethe Universität in Frankfurt am Main;
Diplomarbeit im Bereich Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Achim Kröger mit dem Titel „Die membranständige Sulfid-Dehydrogenase von *Wolinella succinogenes*“
Okt. 2002 - Sep. 2004 Postgraduales Masterstudium der Bioinformatik an der Technischen Fachhochschule Berlin;
Masterarbeit mit dem Titel „Modelling and analysis of biological processes using Petri net theory“
seit Sep. 2004 Promotion an der Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kirsten Jung