

INAUGURAL – DISSERTATION

**zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen – Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg**

vorgelegt von
Diplom – Biologin Sonja Elke Schulmeister (geb. Brechtel)
geboren in Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: 2. März 2010

**Rezeptormethylierung und Stabilität
von Chemotaxisclustern in
*Escherichia coli***

Gutachter: Prof. Dr. Victor Sourjik
Prof. Dr. Bernhard Dobberstein

Meiner Familie

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen Danken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben:

Prof. Dr. Victor Sourjik für die kompetente Betreuung, das interessante, herausfordernde Thema und nicht zuletzt für die hervorragende Unterstützung in den letzten Jahren.

Prof. Dr. Bernhard Dobberstein für die Begutachtung dieser Arbeit, sowie für wertvolle und hilfreiche Ratschläge.

Silke Neumann, Anna Krembel sowie Melanie und Benjamin Lehnert für das kritische Lesen des Manuskripts und konstruktive Anregungen.

Allen ehemaligen und jetzigen Kollegen der AG Sourjik für die angenehme, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern und Schwiegereltern, die mir durch ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihre ständige Bereitschaft zur Kinderbetreuung eine unbeschreibliche Hilfe waren.

Meinen Kindern, Timon und Alexa, für ihre Liebe und Geduld. Ihr seid das größte Geschenk meines Lebens. Ich hoffe, ich kann dem gerecht werden.

Nicht zuletzt meinem Mann, Andreas Schulmeister. Du unterstützt, kritisierst, lenkst ab, liebst und erträgst. Danke, dass du immer für mich da bist.

Inhalt

Inhalt	1
Abbildungen	4
Tabellen	5
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1. Bakterielle Bewegungen	5
1.2. Chemotaxis-ein Überblick	6
1.3. Die Chemorezeptoren	9
1.3.1. Struktur und Funktion	9
1.3.2. Rezeptorcluster	12
1.4. Die Kinase CheA und das Adapterprotein CheW	14
1.5 Der Responseregulator CheY und die Phosphatase CheZ	16
1.6. Das Adaptationssystem: CheR und CheB	18
1.7. Signalprozessierung: Sensitivität und Amplifizierung	22
1.8. Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	26
2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	26
2.2. Antikörper	29
2.3. Reaktions-Kits	29
2.4. Nährmedien und Nährplatten	30
2.4.1. LB Medium	30
2.4.2. TB Medium	30

2.5. Puffer	30
2.5.1. Puffer für Agarose-Gelelektrophorese	30
2.5.2. Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.5.3. Puffer für Proteinaufreinigung	32
2.5.4. Puffer für Western Blots	33
2.5.5. Puffer für Fluoreszenzmikroskopie	34
2.6. <i>E. coli</i> - Stämme	35
2.7. Plasmide	36
2.8. Primer	36
2.9. Molekularbiologische Methoden	42
2.9.1. Polymerase-Kettenreaktion	42
2.9.2. Restriktionsverdau	43
2.9.3. Dephosphorylierung des Vektors	43
2.9.4. Ligation	43
2.9.5. Herstellung kompetenter Zellen	43
2.9.6. Transformation	44
2.9.7. Glycerinkulturen	44
2.10. Proteinbiochemische Methoden	44
2.10.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.10.2. Proteinaufreinigung zur Herstellung des α -Tar-Antikörpers	46
2.10.3. Western Blots	49
2.10.4. Markierung von Proteinen durch Antikörperfärbung	49
2.10.5. Entwicklung der Antikörperfärbung	50
2.10.6. Auswertung der Rezeptormethylierung	51
2.11. Chemotaxis-Analyse	52
2.11.1. Wachstumsbedingungen	52
2.11.2. Schwärmlatten	53
2.11.3. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)	53
2.11.4. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)	58
3. Ergebnisse	61
3.1. Proteindynamik und Chemotaxisclusterstabilität	61
3.1.1. Die Austauschdynamik von Chemotaxisproteinen am Rezeptorcluster	63
3.1.2. Aktivitäts- und Temperaturabhängiger Proteinaustausch	68
3.1.3. Proteinmobilität innerhalb eines Rezeptorclusters	70

3.2. Die Funktion der CheB-Phosphorylierung während der Chemotaxis	72
3.2.1. Effekt der CheB-Phosphorylierung auf die Rezeptordemethylierung	73
3.2.2. Die CheB-Bindung am Chemotaxiscluster	76
3.2.3. Der Effekt der CheB-Phosphorylierung auf die Sensitivität	77
3.2.4. Die Physiologische Funktion der CheB-Phosphorylierung	79
3.3. Charakterisierung der lockstoffinduzierten Rezeptor-methylierung	81
3.3.1. Der Effekt der Rezeptorcluster auf das Methylierungsverhalten	81
3.3.2. Kreuzmethylierung an Rezeptorclustern	84
4. Diskussion	90
4.1. Die Stabilität des Chemotaxisclusters	90
4.2. Rezeptormodifikation in der Chemotaxis	94
5. Fazit und Perspektiven	98
Anhang	100
Referenzen	104

Abbildungen

Abb. 1.2. Schema der chemotaktischen Signaltransduktion von <i>E. coli</i>	8
Abb. 1.3. Bakterielle Chemorezeptoren.	11
Abb. 1.4. Grundeinheiten des ternären Signalkomplexes.	13
Abb. 1.5. Struktur und Schematischer Aufbau von CheA.	15
Abb. 1.6. Der Responseregulator CheY.	16
Abb. 1.7. Die Phosphatase CheZ.....	17
Abb. 1.8. Die Methyltransferase CheR.	18
Abb. 1.9. Die Methylesterase CheB.	19
Abb. 1.10. Adaptation der Chemotaxis.	21
Abb. 1.11. Die Rezeptorkopplung.	23
Abb. 3.1. Beispiel eines FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)-Experiments.	62
Abb. 3.2. Fluoreszenzrückkehr von Chemotaxisproteinen.	65
Abb. 3.3. Temperaturabhängiger Austausch von CheA.	68
Abb. 3.4. Aktivitätsabhängiger Proteinaustausch am Rezeptorcluster.	69
Abb. 3.5. Messung der Proteinmobilität innerhalb eines Chemotaxisclusters.	70
Abb. 3.6. Fluoreszenzrückkehr innerhalb eines Clusters.	71
Abb. 3.7. Quantifizierung von CheB, CheB ^{D56E} und CheB _c	73
Abb. 3.8. CheB-Phosphorylierung und Rezeptordemethylierung.....	75
Abb. 3.9. Untersuchung der CheB-Bindung am Chemotaxiscluster.	77
Abb. 3.10. Effekt der Phosphorylierung auf die Sensitivität der chemotaktischen Antwort. ..	78
Abb. 3.11. CheB-Phosphorylierung in der Chemotaxis.	80
Abb. 3.12. Tsr-Methylierung.	83
Abb. 3.13. Tsr-Methylierung durch Serin und Tar-Methylierung durch α -Methylaspartat.....	86
Abb. 3.14. Stimulation von Tsr mit α -Methylaspartat und von Tar mit L-Serin.	87
Abb. 3.15. Kreuzmethylierung des Aspartat-Rezeptors Tar und des Serin-Rezeptors Tsr.	89
Abb. A.1. Austauschkinetiken von N-terminaler YFP-Fusionen.	101
Abb. A.2. Austauschkinetiken verschiedener CheA-Varianten.	101
Abb. A.3. Effekt nicht metabolisierbarer Serin-Analoga auf die Tsr-Methylierung.	102
Abb. A.4. Kreuzmethylierung von Tar und Tsr in Anwesenheit von CheB.	103

Tabellen

Tabelle 2.1. In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Zubehör.	26
Tabelle 2.2. In dieser Arbeit verwendete Antikörper.	29
Tabelle 2.3. In dieser Arbeit benutzte <i>E. coli</i> -Stämme.	35
Tabelle 2.4.: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.	37
Tabelle 2.5. In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.	41
Tabelle 2.6. Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele.	45
Tabelle 3.1. Diffusion und Bindeparameter aller Chemotaxisproteine und Tar.	67

Zusammenfassung

Die Chemotaxis erlaubt es Bakterien, schnell optimale Wachstumsbedingungen zu finden. Die Wahrnehmung taktischer Reize erfolgt mithilfe eines hoch konservierten Signaltransduktionswegs, der zu den für Prokaryoten typischen Zwei-Komponenten-Systemen zählt. Am besten untersucht ist das Chemotaxisystem von *Escherichia coli*, welches den Zellen ermöglicht, sich gezielt auf Lockstoffe zu und von Schreckstoffen weg zu bewegen. Effektoren werden von Transmembranrezeptoren erkannt, die in polaren und lateralen Clustern organisiert sind. Der Clusterkern besteht aus Rezeptoren, der Histidinkinase CheA und dem Adapterprotein CheW. Alle anderen Chemotaxisproteine wie der primäre Responseregulator CheY und seine Phosphatase CheZ sowie die Adaptationsproteine CheR und CheB lokalisieren entweder an Rezeptoren oder an CheA. Trotz minimaler Komplexität ist dieses System zu einer erstaunlichen Leistung fähig, die trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten nicht detailliert erklärt werden kann. Dabei fehlt es unter anderem an Daten, die die Dynamik der beteiligten Komponenten beschreiben. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war daher die systematische Analyse der intrazellulären Mobilität aller Chemotaxisproteine am Rezeptorcluster *in vivo* durch FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren sehr stabil in die Cluster eingebunden sind und zusammen mit CheA und CheW ein Grundgerüst bilden, an das die anderen Chemotaxisproteine mit geringerer Affinität binden, wobei sich die Stärke der Assoziation nach der jeweiligen Proteinfunktion richtet. Außerdem konnte beobachtet werden, dass aktive Cluster stabiler sind. Die Temperatur dagegen scheint keinen Einfluss auf die Clusterstabilität zu haben und auch eine Wanderung bivalenter Proteine innerhalb des Chemotaxisclusters wurde nicht beobachtet.

Eine Voraussetzung für das Funktionieren der Chemotaxis ist die Adaptation, welche es der Zelle ermöglicht, auf Änderungen der Effektorkonzentration zu reagieren. Die Adaptation erfolgt in *E. coli* auf Rezeptorebene mithilfe der beiden Proteine CheR und CheB, die die Aktivität der Rezeptoren durch kovalente Modifikation regulieren. Während die Methyltransferase CheR konstitutiv aktiv ist, ist die Aktivität der Methylesterase CheB über einen negativen Feedback-Mechanismus an die Histidinkinase gekoppelt. Die langjährige Annahme, dies reiche für die Adaptation aus, konnte in dieser Arbeit widerlegt werden, und

die eigentliche Funktion der CheB-Phosphorylierung wurde untersucht. Die hier durchgeführten Experimente zeigen zum einen, dass die Bindung von CheB an das Chemotaxiscluster durch Aktivierung stabilisiert wird. Zum anderen zeigen sie, dass die Phosphorylierung von CheB eine Robustheit gegenüber zellulären Schwankungen der Chemotaxisproteine vermittelt.

Die Untersuchung von Methylierungsreaktionen an Rezeptoren ergab, dass sich durch Clusterbildung die Geschwindigkeit der Modifikation um 40% beschleunigt. In heterogenen Rezeptorclustern, bestehend aus beiden Hauptrezeptoren, konnte eine Kreuzmethylierung des Aspartat-Rezeptors Tar infolge der Stimulation mit Serin, aber keine Methylierung des Serin-Rezeptors Tsr bei Stimulation mit α -Methylaspartat, festgestellt werden. Dies deutet auf eine schwache Rezeptorkopplung innerhalb eines Clusters hin, bei der vorwiegend ligandengebundene, aktive Rezeptoren durch CheR methyliert werden. Somit konnte in dieser Arbeit die Theorie eines alternativen Adaptationsmodells untermauert werden, in dem Methylierungs- und Demethylierungsreaktionen auf der Aktivität der Rezeptoren beruhen. Zusätzlich könnten die oben erwähnten aktivitätsabhängigen Proteinaustausche bei der Adaptation eine Rolle spielen. In dieser Studie wurde offenbar, dass dynamische Wechselwirkungen an Rezeptorclustern eine bisher kaum beachtete Ebene der Regulation in der Chemotaxis von *E. coli* darstellen.

Summary

Chemotaxis enables bacteria to quickly find optimum growth conditions. Sensing attractants or repellents is based on a simple two-component signaltransduction system. The chemotaxis system of *Escherichia coli* is thoroughly studied and allows cells to move towards attractants and away from repellents. Effectors are sensed by transmembrane receptors, which are organized in polar and lateral clusters. The cluster core is composed of receptors, the histidine kinase CheA and the adaptor protein CheW. All other chemotaxis proteins, like response regulator CheY and its phosphatase CheZ, as well as the adaptation proteins CheR and CheB, localize either to receptors or to CheA. Despite minimal complexity, this system demonstrates amazing performance that remains partly unaccounted for, despite decades of intensive research. Amongst others, there is a lack of data describing the temporal dynamics of involved components. Therefore a focus of this work was to systematically analyze the intracellular mobility of all chemotaxis proteins on receptor clusters *in vivo*, using FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). Here we show that receptors are very firmly integrated in clusters and together with CheA and CheW build a core structure, with which the remaining components associate with lower affinity, with the strength of the interaction being dependent on the respective protein function. We also observed that active clusters are more stable. In contrast, temperature seems to have no effect on cluster stability and we did not observe brachiation of bivalent proteins within chemotaxis clusters.

Effective chemotaxis requires adaptation, which enables bacteria to response to changes in concentrations of effectors. The Adaptation system of *E. coli* comprises two adaptation proteins, CheR and CheB, which regulate receptor activity by modification. While methyltransferase CheR is constitutively active, methylesterase CheB is activated via phosphotransfer from CheA. It was reckoned for many years that this negative feedback mechanism is sufficient for adaptation. However, in this work we could demonstrate that this is not the case. We thus accessed the real function of CheB phosphorylation. Our experiments demonstrate that activation of CheB stabilizes its binding to chemotaxis clusters and mediates robustness against cellular variations of chemotaxis proteins

We investigated methylation reactions on receptors and found that clustering accelerates modification about 40%. In heterologous receptor clusters, consisting of both major receptors,

we observed crossmethylation of aspartate receptor Tar as a result of stimulation by serine. On the other hand, α -methylaspartate did not cause crossmethylation of serine receptor Tsr. This indicates a weak receptor coupling within receptor clusters, which result in selective methylation of ligand-bound receptors by CheR. These results support a theory in which methylation and demethylation reactions rely on receptor activity. Additionally, the activity-dependent changes in cluster stability mentioned above could play a role in adaptation. This study reveals that dynamic interactions at receptor clusters represent a so far little-noticed level of regulation in chemotaxis of *E. coli*.

1. Einleitung

1.1. Bakterielle Bewegungen

Bewegliche Prokaryoten sind gut an den physikalischen und chemischen Zustand ihrer Umwelt angepasst und sind in der Lage, sich durch gerichtete Bewegungen auf verschiedenste Reize hin oder von ihnen weg zu bewegen. Um optimale Wachstumsbedingungen zu finden, können sie zum Beispiel chemische Gradienten, mechanische Reize oder Licht erkennen und verarbeiten. Die am besten untersuchte Form taktischer Reaktion bei Bakterien ist die Chemotaxis, also die Bewegung entlang oder entgegen einem chemischen Gradienten. Im Gegensatz zu größeren Organismen ist die Bakterienzelle zu klein, um einen solchen Gradienten entlang ihres Körpers wahrnehmen zu können. Sie muss daher die jetzige Zusammensetzung ihrer Umwelt mit der vergleichen, die sie vor ein paar Sekunden wahrgenommen hat. Sie reagiert somit auf einen zeitlichen Gradienten von Signalmolekülen (Berg & Brown 1972).

Die meisten mobilen Bakterien bewegen sich mit Hilfe von sich drehenden Geißeln fort. Die Rotationsenergie dafür stammt aus der protonenmotorischen Kraft, und lässt die Geißeln mehrere hundert Male in der Sekunde rotieren (Berg 2003). *E. coli* Bakterien sind peritrich begeißelt, d.h. ihre Geißeln sind an vier bis sechs Stellen rund um den Zellkörper herum angeordnet. Rotieren alle Geißeln gegen den Uhrzeigersinn (GUS), so formt sich ein Bündel, das die Bakterienzelle vorwärts treibt. Drehen sich die Geißeln dagegen im Uhrzeigersinn (US) wird das Bündel auseinandergeschoben, die Vorwärtsbewegung kommt zum Stillstand und die Zelle beginnt zu taumeln (Turner *et al.* 2000). Nach dem Taumeln wählt die Zelle die Richtung des nächsten Laufs zufällig. Somit bewegt sich der Mikroorganismus auf einer Art Zick-Zack-Kurs durch seinen Lebensraum, aber nicht wirklich in eine bestimmte Richtung (Berg & Brown 1972). Trifft er dabei auf Lockstoff- oder Schreckstoff-Moleküle, werden aus den zufälligen Bewegungen gerichtete. Je höher die Konzentration der Chemikalie, desto häufiger und länger werden die Lauf- oder Taumelbewegungen und die Zelle schwimmt auf den Lockstoff zu, oder vom Schreckstoff weg (Abb. 1.1.).

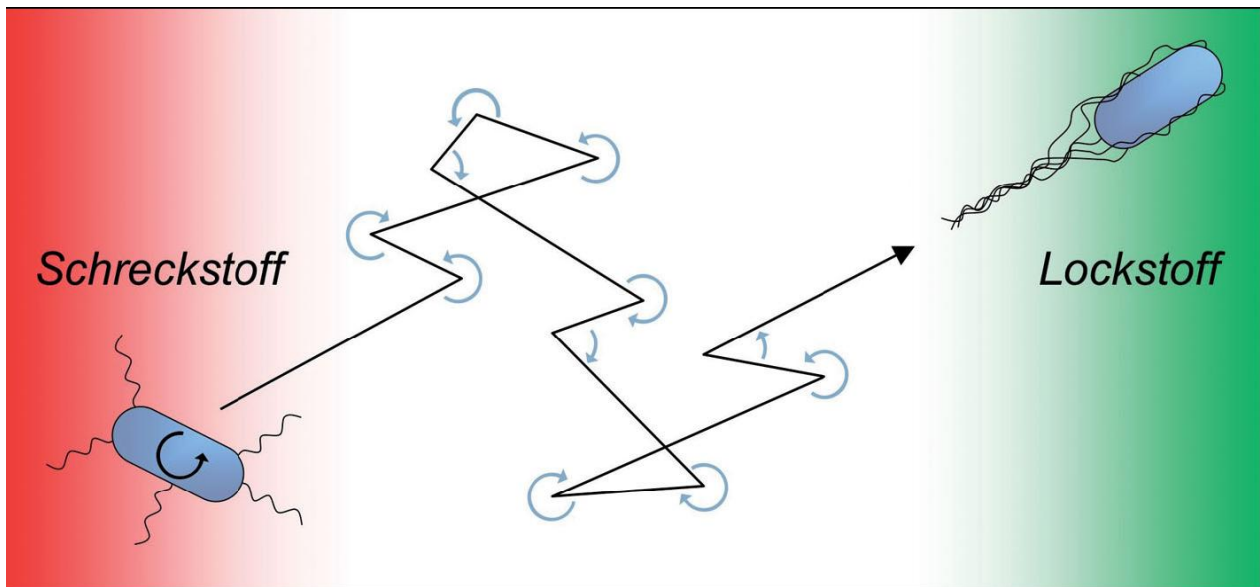


Abb. 1.1. Chemotaktische Bewegung von *E. coli*.

Escherichia coli schwimmt auf einer Art Zick-Zack-Kurs durch das umgebende Medium. Schwimmbewegungen werden durch ständige Taumelbewegungen unterbrochen, wonach zufällig eine neue Richtung eingeschlagen wird. Zunehmende Lockstoff- oder abnehmende Schreckstoffkonzentrationen stimulieren längere Schwimmpersistenzen, so dass die Zelle weiterhin in diese Richtung schwimmt (Kentner 2008).

1.2. Chemotaxis-ein Überblick

Wie übersetzen Bakterien die Information über den chemischen Gradienten der Umgebung auf den Geißelmotor, d.h. in gerichtete Bewegung? Lock- und Schreckstoffe aus der Umwelt werden durch spezifische Transmembran-Rezeptoren, die sogenannten *methylakzeptierenden chemotaktischen Proteine* (MCPs) erkannt. Diese sind zu großen Clustern organisiert und bilden vornehmlich an den Zellpolen zusammen mit Chemotaxis (Che)-Proteinen riesige sensorische Komplexe. Während sich das sensorische Spektrum und der Bewegungsapparat zwischen den Spezies unterscheiden, ist die Art der Signalübertragung unter Bakterien konserviert. Die Signaltransduktion der Chemotaxis wird über ein relativ einfaches Zweikomponenten-Regulationssystem vermittelt. Am besten untersucht ist das chemotaktische System in dem Modelorganismus *E. coli*. Zentrale Rollen spielen hier die Histidinkinase CheA (Sensorikine) und der Responseregulator CheY, der die Richtung der Geißelrotation reguliert. Werden Liganden durch die Rezeptoren gebunden, beeinflussen sie

die Autophosphorylierungsaktivität von CheA. Das kleine Adapterprotein CheW ist zusammen mit CheA an die Rezeptoren gebunden und ist für die korrekte Funktion von CheA notwendig. Schreckstoffe und abnehmende Lockstoffkonzentrationen erhöhen die Autophosphorylierungsrate von CheA. Phosphoryliertes CheA phosphoryliert daraufhin den Responseregulator CheY und bildet CheY-P. CheY-P interagiert mit dem Geißelmotor, führt zu einer Geißelrotation im Uhrzeigersinn und verursacht damit das Taumeln der Zelle. Die Phosphatase CheZ dephosphoryliert CheY und beendet auf diese Weise das Signal. Lockstoffe und eine abnehmende Schreckstoffkonzentration erniedrigen die Rate der Autophosphorylierung von CheA, und führen zu einer erhöhten Konzentration von unphosphoryliertem CheY in der Zelle. Unphosphoryliertes CheY kann nicht am Geißelmotor binden. Dieser rotiert somit gegen den Uhrzeigersinn und die Zelle bewegt sich geradlinig fort (Abb. 1.2).

Ein zweiter Bestandteil der Chemotaxis ist die Adaptation. Diese stellt sicher, dass die Zelle auf zeitliche Konzentrationsänderungen reagieren kann. Die Methylakzeptierenden Proteine (MCPs) werden kontinuierlich durch die Methyltransferase CheR, an einer oder mehreren von vier möglichen Glutamat-Resten methyliert. Methylierung erhöht die Aktivität des Rezeptor-Kinase-Komplexes. Die Methylesterase/Amidase CheB entfernt Methylgruppen von den Rezeptoren und senkt damit wiederum die Aktivitätsrate der Sensorkinase. Der ursprüngliche Signalzustand wird wieder hergestellt, obwohl die Konzentration der Chemikalie unverändert bleibt. Folglich kann die Zelle auf weitere Konzentrationsänderungen reagieren. Die Steuerung der Adaptation wird in Abschnitt 1.6. diskutiert.

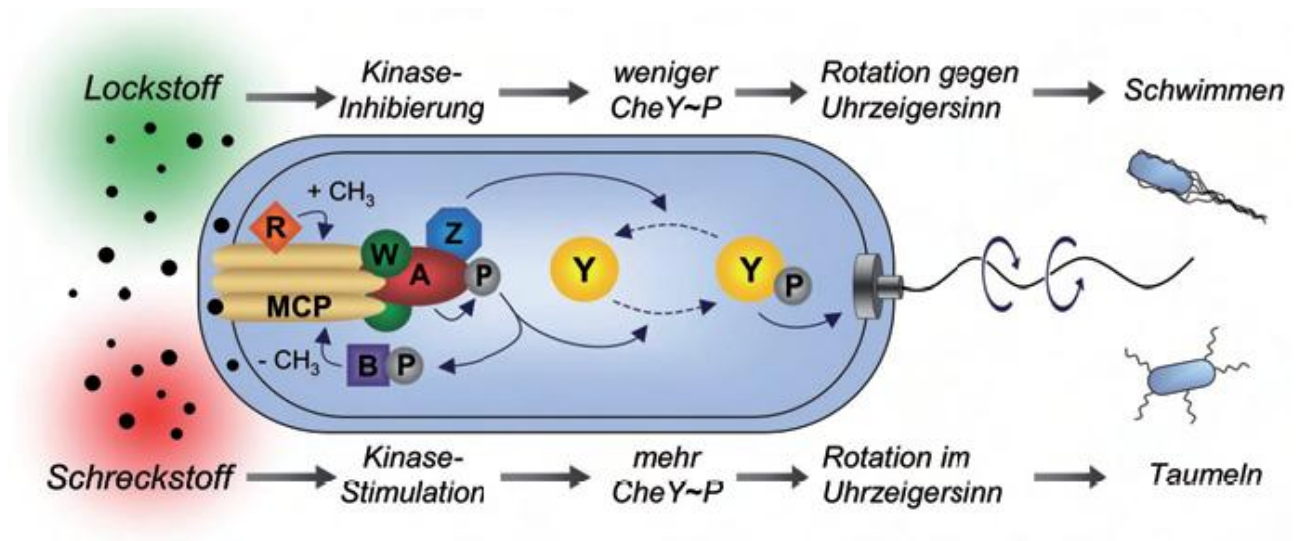


Abb. 1.2. Schema der chemotaktischen Signaltransduktion von *E. coli*.

Chemorezeptoren binden Lock- oder Schreckstoffmoleküle des umgebenden Mediums und regulieren die Aktivität der Histidinkinase CheA (A), die zusammen mit CheW (W) an das Rezeptorcluster gebunden ist. Eine aktive Kinase phosphoryliert den primären Responseregulator CheY (Y), der in diesem Zustand an den Geißelmotor bindet und dessen Rotation im Uhrzeigersinn induziert. Die Zelle taumelt. CheY wird durch die Phosphatase CheZ dephosphoryliert. Die Adaptationsproteine CheR (R) und CheB (B) kontrollieren über Methylierung und Demethylierung den Aktivitätsstatus der Rezeptoren (Kentner 2008).

1.3. Die Chemorezeptoren

1.3.1. Struktur und Funktion

Die Chemorezeptoren verankern die sensorische Komplexe in der inneren Membran und übertragen Signale aus dem Periplasma auf den zytoplasmatischen Teil des Komplexes. In *E. coli* sind fünf verschiedene Chemorezeptortypen identifiziert worden: zwei Hauptrezeptoren (Tsr und Tar), die jeweils in mehreren tausend Kopien pro Zelle vorkommen und drei Nebenrezeptoren (Trg, Tap und Aer), die jeweils nur durch einige hundert Kopien in der Zelle vertreten sind (Li & Hazelbauer 2004). Jeder Chemorezeptor kann eine Vielzahl von Verbindungen wahrnehmen. Zum Beispiel kann der Hauptrezeptor Tar die Lockstoffe Aspartat und Maltose, sowie Schreckstoffe wie die Schwermetalle Kobalt und Nickel erkennen (Madigan *et al.* 2002). Tsr signalisiert der Zelle die Anwesenheit von Serin, Trg ist der Rezeptor für Ribose und Galactose, Tap erkennt Dipeptide und Aer ermittelt den Redox-Status der Zelle. Die abhängig vom Subtyp ~60 kDa großen Monomere beinhalten zwei Transmembrandomänen aus jeweils ~20 Aminosäuren und verbinden die ~150 Aminosäuren große N-terminale periplasmatische Domäne mit der aus ~300 Aminosäuren bestehenden C-terminalen zytoplasmatischen Domäne (Milburn *et al.* 1991; Lee *et al.* 1994; Bass *et al.* 1999). Jeweils zwei Rezeptoren desselben Subtyps bilden Homodimere aus (Abb. 1.3.). Die periplasmatische, sensorische Domäne enthält die Bindestellen für die jeweiligen Liganden und macht so die Rezeptorspezifität aus. Liganden werden entweder direkt, wie im Falle von Serin oder Aspartat, oder indirekt über ein periplasmatisches Bindeprotein, wie beispielsweise Zucker oder Dipeptide, gebunden. Die sensorische Domäne besteht aus acht Helices, die pro Untereinheit zu einem symmetrischen vier-Helix-Bündel angeordnet sind (Yeh *et al.* 1993). Ein besonderer Fall ist der Nebenrezeptor Aer, dem eine periplasmatische Bindedomäne gänzlich fehlt. Dieser detektiert den Sauerstoff- und Energiestatus der Zelle mittels einer N-terminalen zytoplasmatischen Domäne (PAS), an die eine Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-Gruppe assoziiert ist (Bibikov *et al.* 1997; Taylor *et al.* 1999).

Die Transmembrandomäne wird von zwei Helices jeder Untereinheit gebildet. Über eine HAMP Linker Domäne ist die Transmembrandomäne mit der zytoplasmatischen Domäne verbunden, die in Bakterien hochkonserviert ist (Alexander & Zhulin 2007). Die

zytoplasmatische Domäne besteht pro Untereinheit aus einem dimeren vier-Helix-Bündel, also aus einem symmetrischen, antiparallelen coiled-coil-Motiv (Kim *et al.* 1999; Park *et al.* 2006). Funktionell kann man die zytoplasmatische Domäne in zwei Subdomänen unterteilen: die Signalisierungs-Subdomäne beinhaltet Bindestellen für CheA und CheW (Gegner *et al.* 1992; Schuster *et al.* 1993). Die Adaptations-Subdomäne besteht aus zwei Regionen (MH1 und MH2), die, abhängig vom Rezeptor, vier oder fünf konservierte Positionen für die kovalente Modifikation besitzen. Jede Stelle beinhaltet einen Glutamat-Rest, der durch CheR methyliert, und durch CheB demethyliert werden kann (Terwilliger *et al.* 1983). Durch diese Modifikation wird der Aktivitätszustand der Rezeptoren beeinflusst, was die Adaptation auf den jeweiligen Stimulus zur Folge hat. Der Modifikations-Status einer Rezeptorenpopulation kann mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese abgeschätzt werden. Rezeptoren hoher Modifikationszustände laufen im Gel schneller, als Rezeptoren niedriger Modifikationszustände. Die Neutralisierung negativer Ladungen durch Methylierung erhöht die SDS-Bindung. Dies führt zu einer Steigerung des Ladung-Masse-Verhältnisses relativ zu demethylierten Rezeptoren, wodurch sich die Mobilität im SDS_Gel erhöht (Boyd & Simon 1980). Neusynthetisierte Rezeptoren verfügen über zwei Glutamat- und zwei Glutamin-Reste, die funktionell methylierten Glutamat-Resten gleichen. Diese werden aber bald durch CheB zu methylakzeptierenden Glutamat-Resten hydrolysiert (Kehry *et al.* 1983). Die Bindestelle für CheR und CheB ist die Pentapeptidsequenz (NWETF) am äußersten C-terminalen Ende der Hauptrezeptoren (Wu *et al.* 1996; Djordjevic & Stock 1998a; Barnakov *et al.* 1999).

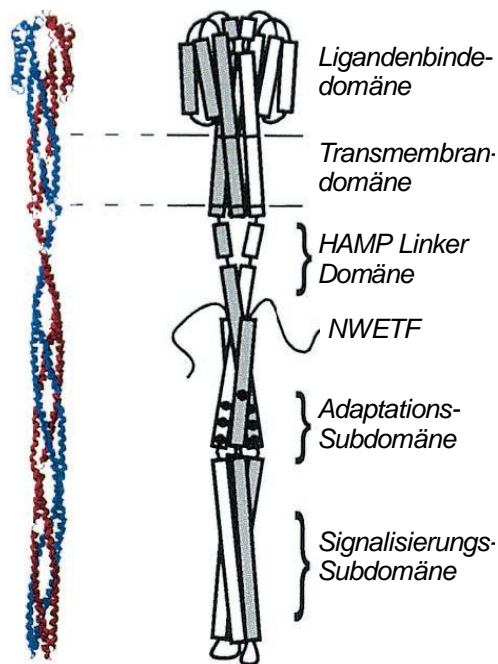


Abb. 1.3. Bakterielle Chemorezeptoren.

Links: Atomares Modell eines dimeren bakteriellen Chemorezeptors bestehend aus den Kristallstrukturen der Tar-Ligandenbindedomäne von *Salmonella* und dem cytoplasmatischen Fragment des *E. coli* Tsr-Rezeptors. Die zwei Untereinheiten des Dimers sind in blau und rot dargestellt (Kim et al. 1999). Rechts: Schematische Darstellung der strukturellen und funktionellen Regionen eines Rezeptordimers. Die zwei Untereinheiten sind in weiß und grau abgebildet. Schwarze Kreise in der Adaptations-Subdomäne markieren Methylierungsstellen. An der zytoplasmatischen Spitze der Signalisierungs-Subdomäne befinden sich Bindestellen für CheA und CheW. Die Adaptationsproteine CheR und CheB binden an der Pentapeptid (NWETF)-Sequenz (Weis et al. 2003).

Wie werden nun sensorische Signale von der periplasmatischen zur zytoplasmatischen Domäne weitergeleitet? Ligandenbindung und Methylierung verursachen kleine Konformationsänderungen der Rezeptorstruktur (Biemann & Koshland 1994; Khursigara et al. 2008). Es wird angenommen, dass sich die Konformationsänderung durch die Membran fortpflanzt und dort die Aktivität der assoziierten Kinase beeinflusst (Gegner et al. 1992; Chervitz & Falke 1996; Ottemann et al. 1999; Falke & Hazelbauer 2001; Miller & Falke 2004). Vor allem die HAMP-Linker-Domäne scheint aufgrund ihrer Flexibilität eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung zu spielen. (Alexander & Zhulin 2007; Khursigara et al. 2008).

1.3.2. Rezeptorcluster

An Zellpolen aller untersuchten chemotaktischen Bakterien und Archaea befinden sich Anhäufungen von Chemorezeptoren, die sogenannten Rezeptorcluster (Gestwicki *et al.* 2000). Alle anderen chemotaktischen Proteine lokalisieren dort und bilden zusammen große sensorische Komplexe aus (Maddock & Shapiro 1993; Sourjik & Berg 2000; Shiomi *et al.* 2002; Cantwell *et al.* 2003; Banno *et al.* 2004). Der Kern dieses Komplexes, der Ternäre Signalkomplex, wird aus Rezeptoren, der Histidinkinase CheA und dem Adapterprotein CheW gebildet. Wie sich diese Komponenten zu einem Cluster zusammenlagern, ist trotz intensiver Forschung jedoch unklar. Eine Möglichkeit der Rezeptorinteraktionen innerhalb eines Clusters wurde nach der Aufklärung der Kristallstruktur der zytoplasmatischen Tsr Domänen postuliert, nämlich dass sich jeweils drei Homodimere zusammenschließen (*trimers-of-dimers*) (Kim *et al.* 1999). *In vivo* Quervernetzungs-Versuche lieferten Hinweise darauf, dass *trimers-of-dimers*, aus Rezeptor-Homodimeren verschiedener Spezifitäten bestehen (Ames *et al.* 2002; Homma *et al.* 2004; Studdert & Parkinson 2004; Studdert & Parkinson 2005). Der gängigen Sichtweise zufolge bilden ternäre Signalkomplexe aus heterogenen *trimers-of-dimers* die Grundeinheit eines Clusters. Weiterhin wird vermutet, dass CheA und CheW für die Clusterbildung benötigt werden, da durch Immunogold-Elektronenmikroskopie (Maddock & Shapiro 1993) und Immunofluoreszenz (Sourjik & Berg 2000) gezeigt wurde, dass in Abwesenheit von CheA und CheW die Clusterbildung stark reduziert ist. Daraus entstand das Modell einer hexagonalen Clusterstruktur, in der CheA-Dimere *trimers-of-dimers* vernetzen, wobei CheA und die Rezeptoren über CheW verbunden sind. (Shimizu *et al.* 2000). Eine weitere Möglichkeit, wie sich Rezeptoren zu Clustern zusammenlagern lieferte die Aufklärung der Kristallstruktur eines ternären Signalkomplexes des Chemorezeptors MCP_{1143C} aus *Thermotoga maritima*. Dieser bestand aus langen Homodimer-Ketten mit lateralen Interaktion über die gesamte Oberfläche. In der gleichen Studie wurde die relative Anordnung von CheA und CheW untersucht und ein Modell vorgeschlagen, in dem die Rezeptor-Ketten über CheW an CheA gebunden, und durch CheA-CheA Interaktionen zu einem zweidimensionalen Netz verknüpft werden (Park *et al.* 2006). In neueren Studien konnten jedoch in einer *cheA cheW* "Knockout"-Mutante von *E. coli*, Cluster beobachtet werden, die diffuser verteilt waren, als Wildtyp-Cluster (Kentner *et al.* 2006).

CheA und CheW scheinen also nicht unerlässlich für die Clusterbildung zu sein, sondern verstärken sie nur (Skidmore *et al.* 2000; Kentner *et al.* 2006). Darüber hinaus ist CheW alleine ausreichend, wildtypähnliche Cluster wieder herzustellen. Dies legt nahe, dass die Vernetzung durch CheA nicht für die Clusterbildung benötigt wird, sondern Interrezeptor-Interaktionen alleine ausreichend sein können. Die genaue Anordnung von Rezeptoren, CheA und CheW in einem Rezeptorcluster bleibt jedoch weiterhin unklar.

Hinweise auf funktionelle Interaktionen zwischen Rezeptoren in einem Cluster führen zu der Annahme, dass die Hauptaufgabe solcher Proteinzusammenschlüsse in der Signalprozessierung liegt (Ames *et al.* 2002; Gestwicki & Kiessling 2002; Sourjik & Berg 2004; Lai *et al.* 2005). Gemischte Rezeptorcluster bilden demnach große allosterische Proteinkomplexe aus, die multiple Stimuli verarbeiten und schwächere Signale amplifizieren können (Sourjik 2004; Parkinson *et al.* 2005) (s. Abschnitt 1.7.).

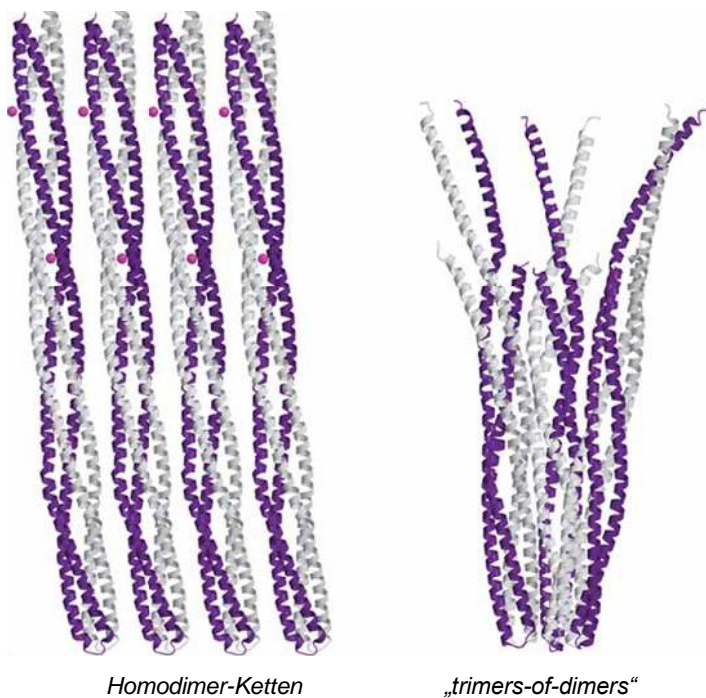


Abb. 1.4. Grundeinheiten des ternären Signalkomplexes.

Links: Homodimer-Ketten aus MCP_{1143C} von *Thermotoga maritima*. Rechts: *trimer-of-dimers* des cytoplasmatischen Fragments von Tsr (Tsr_C) aus *E. coli*.

1.4. Die Kinase CheA und das Adapterprotein CheW

Das Adapterprotein CheW ist ein kleines Protein (18 kDa), bestehend aus nur einer Domäne, die strukturell homolog zur P5 Domäne von CheA ist (Bilwes 1999; Griswold *et al.* 2002). Es bindet sowohl die P5 Domäne von CheA, als auch an die Signalisierungs-Subdomäne der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren (Gegner *et al.* 1992; Li *et al.* 2007). CheW besitzt keine bekannte katalytische Funktion, wird aber für die rezeptorvermittelte Regulation der Histidinkinase benötigt (Ames & Parkinson 1994).

Schreckstoffe und sinkende Lockstoffkonzentrationen führen zur Autophosphorylierung der Histidinkinase CheA, welche das Signal über Phosphotransfer auf die Responseregulatoren CheY und CheB überträgt. CheA ist ein dimeres Protein, dessen Monomere 73 kDa groß sind und aus fünf funktionell unterschiedlichen Domänen bestehen (Bilwes 1999): P1, die Phosphorylierungs-Domäne enthält die Autophosphorylierungsstelle His-48 (Mourey *et al.* 2001), P2 bindet die Responseregulatoren CheY und CheB (Li *et al.* 1995) und P3 ist die Dimerisierungsdomäne. P4 ist die katalytische Domäne und phosphoryliert die P1-Domäne, wobei ATP als Phospho-Donor dient. P5, die regulatorische Domäne bindet an die Rezeptoren und CheW (Bilwes 1999). In Enterobakterien, die CheZ exprimieren, ist auch eine verkürzte Form von CheA, CheA_S vorhanden (McNamara & Wolfe 1997), der die ersten 97 N-terminalen Aminosäuren, unter anderem auch die Phosphorylierungsstelle His-48 in P1 fehlt. *In vivo* beträgt das Verhältniss von Vollängen-Protein, CheA_L, zu CheA_S etwa 2:1 (Li & Hazelbauer 2004) und es wird angenommen, dass sowohl Homo- als auch Heterodimere existieren (Kott *et al.* 2004). In FRET-Messungen von YFP-Fusionen beider CheA-Varianten interagierte CheA_S mit dem Rezeptorcluster, während CheA_L nur in Anwesenheit von CheW band (Kentner *et al.* 2006). Es wird daher vermutet, dass die Rezeptor-Bindestelle in CheA_L durch andere Domänen des Proteins blockiert wird. CheW würde dann bei der CheA-Bindung am Cluster assistieren, indem es CheA-Domänen reorganisiert (Zhao & Parkinson 2006) und damit die Exposition der P5-Bindedomäne verursacht (Kentner *et al.* 2006).

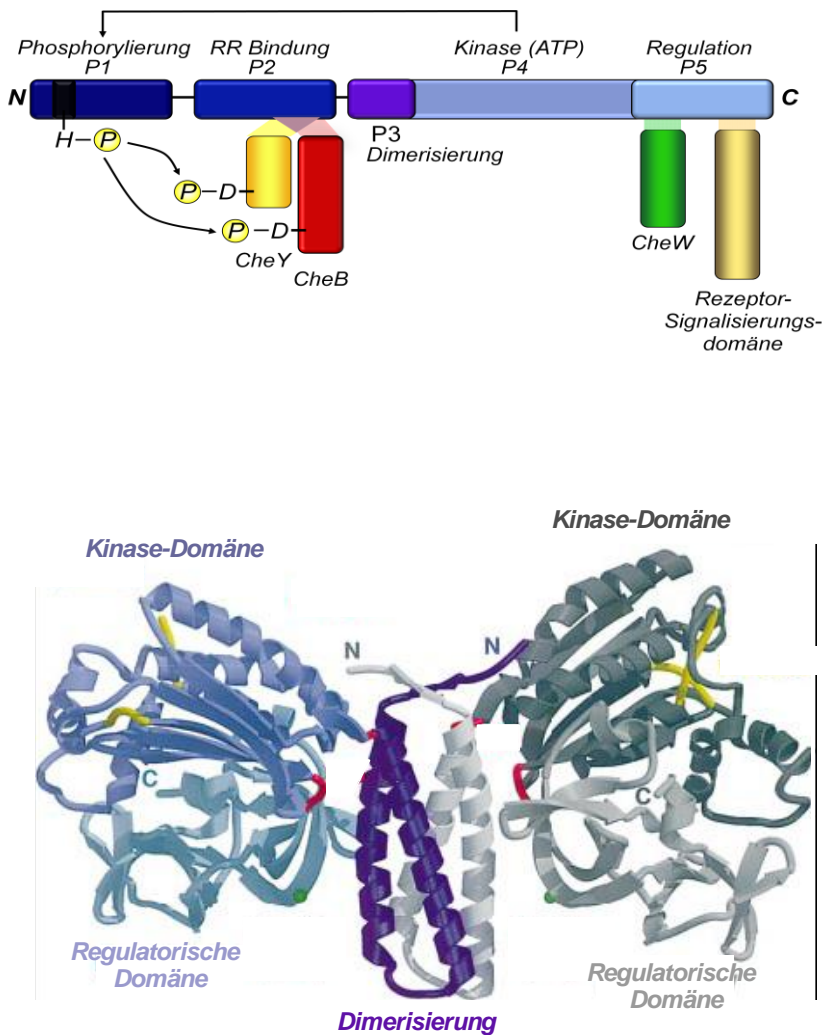


Abb. 1.5. Struktur und Schematischer Aufbau von CheA.

Oben: schematische Darstellung eines CheA Monomers. Die P1-Domäne phosphoryliert beide Responseregulatoren, CheY und CheB, die um die gleiche Bindestelle in der P2-Domäne konkurrieren. Der Partnermonomer wird über die Dimerisierungsdomäne P3 gebunden. Die katalytische Domäne P4 phosphoryliert P1 mit ATP als Phospho-Donor und die regulatorische Domäne P5 interagiert mit den Rezeptoren und CheW. CheW besteht aus einer einzelnen Domäne, welche der P5 Domäne von CheA homolog ist. Unten: Dreidimensionale Struktur eines CheA Dimers (Bilwes 1999).

1.5 Der Responseregulator CheY und die Phosphatase CheZ

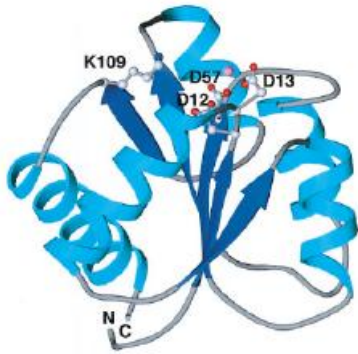


Abb. 1.6. Der Responseregulator CheY.

Kristallstruktur des globulären, cytoplasmatischen Proteins CheY. Es bindet an die P2-Domäne von CheA, welches im phosphorylierten Zustand eine Phosphatgruppe auf CheY überträgt. Die am Phosphotransfer beteiligten Aminosäurereste, unter anderem auch die Phosphorylierungsstelle Asp-57, sind markiert (Djordjevic & Stock 1998b).

CheY, ein 14 kDa großes, globuläres Protein, ist der primäre Responseregulator des Systems und beeinflusst die Rotationsrichtung des Geißel-Motors direkt (Barak & Eisenbach 1992). Die Phosphorylierung von CheY durch die P2-Domäne von CheA (Morrison & Parkinson 1994), erfolgt an einem konservierten Aspartat-Rest (Asp-57) (Sanders *et al.* 1989) und führt zu einer globalen Konformationsänderung, welche die Affinität von CheY zu den Interaktionspartnern moduliert (Lowry *et al.* 1994). Aufgrund geringerer Affinität zu CheA wird CheY-P frei (Li *et al.* 1995) und diffundiert durch das Zytoplasma zum Geißel-Motor, wo es an das Motor-Protein FliM bindet. Relativ zur unphosphorylierten Form, zeigt CheY-P eine signifikant erhöhte Affinität zu FliM und CheZ (Welch *et al.* 1994; Falke *et al.* 1997). Die Bindung von CheY-P an den Geißel-Motor erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Zelle taumelt. Im adaptierten Zustand ist die Hälfte des zellulären CheY phosphoryliert, was es dem Motor erlaubt, sowohl auf positive- als auch auf negative Stimuli zu reagieren. Um die Dynamik der chemotaktischen Antwort konstant aufrecht zu erhalten, muss CheY-P kontinuierlich dephosphoryliert werden. Dies geschieht in *E. coli* zum einen autokatalytisch, aber vor allem enzymatisch durch die Phosphatase CheZ, wodurch die Halbwertszeit von CheY-P auf 0,1 s verkürzt, und somit die chemotaktische Antwort beschleunigt wird (Segall *et al.* 1982).

CheZ ist ein Homodimer (Monomermasse: 48kDa), bestehend aus einem langen vier-Helix-Bündel d.h. aus zwei Helices pro Monomer (Abb. 1.7.) (Zhao *et al.* 2002). Die Bindestelle für CheY-P befindet sich am jeweiligen konservierten C-Terminus (Blat & Eisenbach 1996). Die Phosphatase lokalisiert über eine Bindung an CheA_S und in geringerem Maße an CheA_L am Rezeptor-Kinase-Komplex (Cantwell *et al.* 2003; Kentner & Sourjik 2009). Durch die Lokalisierung von CheZ am Rezeptorcluster, werden Phosphorylierung und Dephosphorylierung von CheY synchronisiert. Dies könnte die Verteilung von CheY-P in der Zelle beeinflussen, indem ein CheY-P-Gradient mit hoher Konzentration am Rezeptorcluster verhindert wird. (Vaknin & Berg 2004; Lipkow *et al.* 2005).

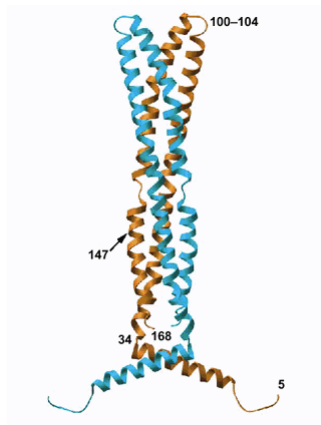


Abb. 1.7. Die Phosphatase CheZ.

CheZ liegt in der Zelle als Homodimer, bestehend aus zwei Monomeren (blau und gelb) vor. Die Aminosäuren 34-168 jedes Monomers bilden aliphatische Helices aus, die ein Bündel mit einem einzigen „hairpin-turn“ (Aminosäuren 100-104) bilden. Gln-147 interagiert mit direkt mit CheY-P und soll eine katalytische Rolle spielen (Zhao *et al.* 2002).

1.6. Das Adaptationssystem: CheR und CheB

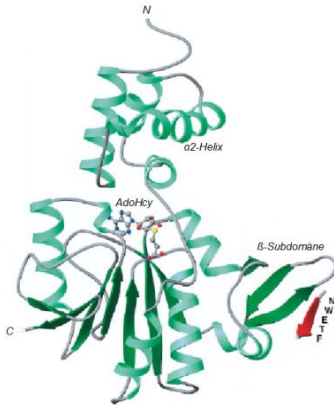


Abb. 1.8. Die Methyltransferase CheR.

CheR gebunden an S-Adenosylhomocystein (AdoHcy - ein Produkt und Inhibitor der konstitutiven Methylierungsreaktion). CheR interagiert über 2 Subdomänen mit dem Rezeptor: die β -Subdomäne bindet an das NWETF-Motiv (rot), die α 2-Helix interagiert mit den Methylierungsstellen (Djordjevic & Stock 1998b).

Um Konzentrationsänderungen von Lock- oder Schreckstoffen zu erkennen und entsprechend reagieren zu können, muss das Chemotaxissystem eine Art „Gedächtnis“ bereithalten, welches die jetzige Ligandenkonzentration mit der vergangenen vergleicht. Dies wird durch die beiden Enzyme CheR und CheB ermöglicht, die den Methylierungszustand der Chemorezeptoren so modifizieren, dass die ursprüngliche Aktivität von CheA wieder hergestellt wird, so dass die Zelle auf weitere Konzentrationsänderungen reagieren kann.

Die 33 kDa große Methyltransferase CheR, überträgt kontinuierlich Methylgruppen auf spezifische Glutamat-Reste in der Adaptations-Subdomäne der Chemorezeptoren, wobei S-Adenosinmethionin als Methyl donor verwendet wird. Durch Rezeptormethylierung wird die Aktivität der Sensor kinase erhöht. CheR besteht aus einer kleineren N-terminalen, helikalen Domäne, die über eine einfache Polypeptid-Kette mit einer größeren C-terminalen alpha/beta Domäne verbunden ist (Djordjevic & Stock 1997). Die N-terminale Domäne interagiert mit den Methylierungsstellen des Rezeptors und die C-terminale Domäne vermittelt die Bindung an den sensorischen Komplex über die Pentapeptidsequenz am C-Terminus der Hauptrezeptoren (Abb. 1.8.) (Djordjevic & Stock 1998a). Diese beiden Bindestellen und die große Nähe der Rezeptoren im Cluster zueinander, ermöglichen es CheR, einen Rezeptor zu binden, und den anderen zu methylieren (Le Moual *et al.* 1997).

Dies ist vor allem in heterogenen Rezeptorclustern wichtig, in denen neben den Hauptrezeptoren Tar und Tsr auch Nebenrezeptoren (Trg, Tap, Aer) vorhanden sind, denen die

Pentapeptidsequenz fehlt. Studien haben gezeigt, dass Nebenrezeptoren nur wenig methyliert werden, wenn nicht mindestens einer der Hauptrezeptoren vorhanden ist (Barnakov *et al.* 1998). Überdies schlagen theoretische Modelle vor, dass CheR durch abwechselnde Interaktion beider Bindestellen mit verschiedenen Rezeptoren durch das Rezeptorcluster wandern könnte (Levin *et al.* 2002).

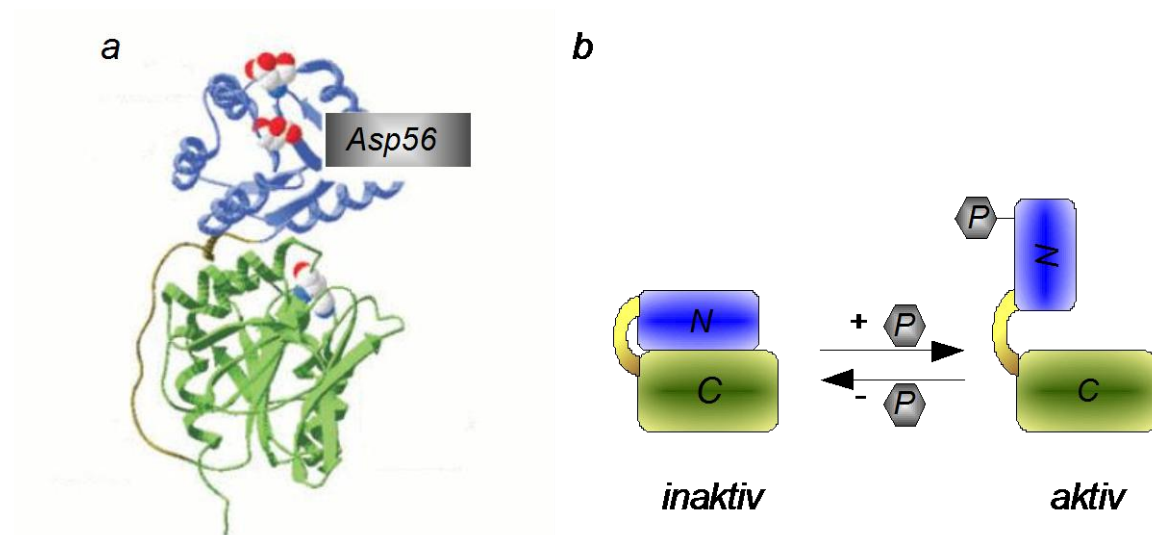


Abb. 1.9. Die Methylesterase CheB.

(a) CheB besteht aus einer N-terminalen, regulatorischen Domäne (blau), in der die Phosphorylierungsstelle Asp56 lokalisiert ist und einer C-terminalen, katalytischen Domäne (grün). Beide Domänen sind durch einen flexiblen Linker (gelb) verbunden (Banno *et al.* 2004). (b) Im inaktiven, unphosphorylierten Zustand wird die C-terminale Domäne sterisch durch die N-terminale Domäne gehemmt. Durch Phosphorylierung streben beide Domänen auseinander, so dass das aktive Zentrum exponiert wird.

Die Methylesterase/Amidase CheB ist neben CheY der zweite Responseregulator von CheA, der über Phosphotransfer aktiviert wird. CheB katalysiert die Demethylierung der Chemorezeptoren und trägt so zur Drosselung der Sensorkinaseaktivität bei. Außerdem ist CheB bei der Deamidierung neusynthetisierter Rezeptoren involviert (s. Abschnitt 1.3.) (Kehry *et al.* 1983). CheB ist 37 kDa groß und besteht aus zwei Domänen, die durch einen flexiblen Linker verbunden sind. Die N-terminale Domäne enthält die Phosphorylierungsstelle Asp-56, während die C-terminalen Domäne die katalytische Funktion beherbergt (Djordjevic *et al.* 1998). Im inaktiven Zustand hemmt die N-terminale Domäne durch Interaktion die enzymatische Aktivität der C-terminalen Domäne. Phosphorylierung

durch CheA führt zu einer Konformationsänderung, wodurch die zwei Domänen auseinander streben, so dass die katalytische Domäne exponiert wird (Anand *et al.* 1998; Anand *et al.* 2000). In der Tat konnte gezeigt werden, dass CheB im phosphorylierten Zustand 100 Mal aktiver ist (Anand & Stock 2002). Anders als bei dem primären Responseregulator CheY erfolgt die Inaktivierung, d.h. Dephosphorylierung von CheB ausschließlich autokatalytisch. CheB wird vorwiegend über eine Bindung an die P2-Domäne von CheA an den polaren sensorischen Komplex gebunden (Banno *et al.* 2004), obwohl auch eine niederaffine Bindung an die Pentapeptidsequenz der Hauptrezeptoren festgestellt wurde (Barnakov *et al.* 2001; Barnakov *et al.* 2002). Weitere mögliche Bindestellen könnten die Methylierungshelices der Chemorezeptoren sein. CheB könnte demnach mit der N-terminale Domäne an CheA binden, während die C-terminale Domäne ihre Substrate demethyliert. Analog zu CheR wäre auf diese Weise auch eine Wanderung von CheB durch den sensorischen Komplex denkbar (Banno *et al.* 2004).

Durch die CheA-vermittelte CheB-Phosphorylierung entsteht ein negativer Feedback-Mechanismus, der lange Zeit für die Regulierung der Adaptation verantwortlich gemacht wurde (Abb. 1.10.a). Es konnte aber schon theoretisch gezeigt werden, dass die CheB-Aktivierung für eine exakte Adaptation nicht notwendig ist (Alon *et al.* 1999). Diese Funktion übernimmt, einem alternativen Modell zufolge, ein anderer Feedback-Mechanismus, bei dem CheR nur inaktive Rezeptoren methyliert (d.h.: aktiviert) und CheB nur aktive Rezeptoren demethyliert (d.h.: inaktiviert) (Barkai & Leibler 1997; Alon *et al.* 1999) (Abb. 1.10.b).

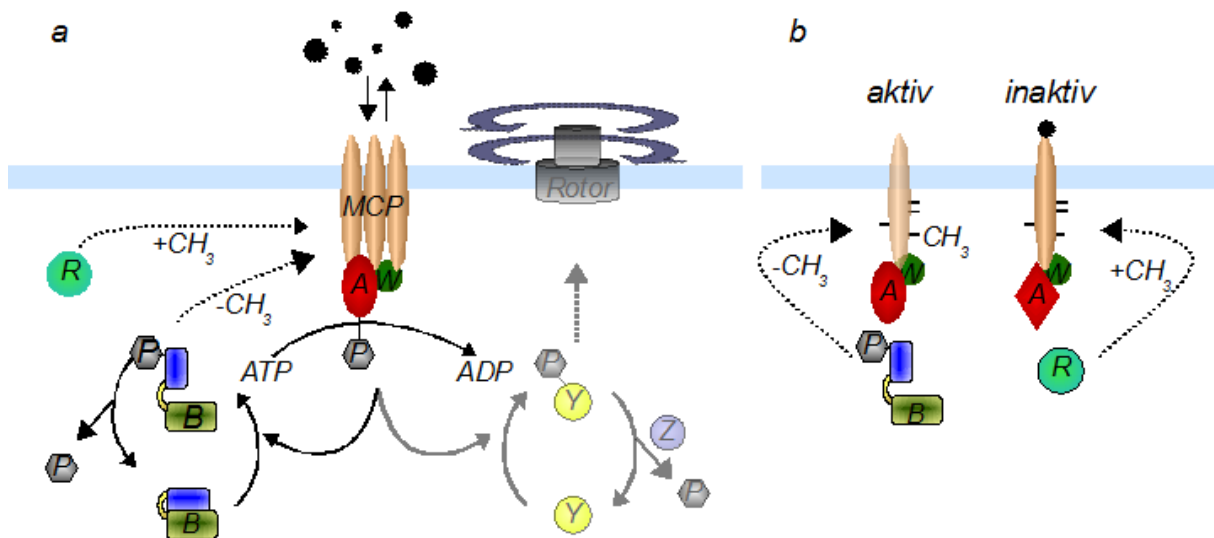


Abb. 1.10. Adaptation der Chemotaxis.

(a) Rezeptoren werden durch die Methyltransferase CheR (R) kontinuierlich methyliert, d.h. aktiviert. Aktive Rezeptoren führen zur Autophosphorylierung der Kinase CheA (A), die beide Responseregulatoren CheY (Y) und CheB (B) phosphorylieren kann. In einem negativen Feedbackmechanismus inaktiviert phosphoryliertes CheB aktive Rezeptoren durch Demethylierung. (b) CheB demethyliert nur aktive Rezeptoren, während CheR ausschließlich inaktive Rezeptoren methyliert.

1.7. Signalprozessierung: Sensitivität und Amplifizierung

Der Prozess der Chemotaxis erlaubt Bakterien, sehr empfindlich auf Stimuli zu reagieren. *E. coli* reagiert auf Konzentrationsänderungen von weniger als 10% über einen Bereich von sechs Größenordnungen. Die Sensitivität über eine solche Spannbreite erfordert eine nichtlineare Beziehung zwischen Ligandenkonzentration und Motorleistung, beispielsweise muss bei schwachen Ligandenkonzentrationen das chemotaktische Signal verstärkt werden. Grundsätzlich kann eine solche Amplifizierung auf drei Stufen der Signalübertragung erfolgen: am Rezeptorcluster, während der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von CheY im Zytoplasma und bei der Regulation der Geißelmotoren durch CheY-P (Sourjik 2004). Tatsächlich konnte an zwei Stellen eine Verstärkung des chemotaktischen Signals festgestellt werden: am Rezeptor-Kinase-Komplex (Sourjik & Berg 2002b) und am Geißelmotor (Cluzel *et al.* 2000). Diese zwei Amplifikationsschritte reichen aus, um die enorme Spannbreite der chemotaktischen Antwort zu erklären. Eine Signalverstärkung im Zytoplasma kann, wegen einer linearen Beziehung zwischen CheA-Aktivität und CheY-P Konzentration, ausgeschlossen werden.

Man stellt sich vor, dass Rezeptoren entweder in aktivem- oder in inaktivem Zustand vorkommen („Zwei-Zustände-Modell“). Bindet ein Lockstoffmolekül, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Rezeptor-Kinase-Komplex inaktiv wird. Die Methylierung während der Adaptation erhöht wiederum die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Komplex aktiv wird (Barkai & Leibler 1997). Die Amplifikation im Rezeptorcluster kann durch verschiedene Modelle beschrieben werden. Hierbei wird angenommen, dass kooperative Rezeptoreinheiten aus benachbarten Rezeptoren gemeinsam von einem Aktivitätszustand in den anderen wechseln. Ein Cluster könnte aus vielen solchen kooperierenden Einheiten bestehen, deren Rezeptoren synchron zwischen aktivem- und inaktivem Zustand wechseln („Monod-Wyman-Changeaux“- oder MWC-Modell)(Monod *et al.* 1965; Sourjik & Berg 2004; Mello & Tu 2005; Keymer *et al.* 2006). Einem anderen Modell zufolge könnten Cluster aus einem einzelnen Netzwerk miteinander verbundener Rezeptoren bestehen, die nur den Zustand ihrer direkten Nachbarrezeptoren beeinflussen können. So entstünden lokale Zustandsänderungen, ähnlich denen beschrieben durch den Ferromagnetismus („Ising-Modell“) (Duke & Bray

1999; Mello & Tu 2003). Solche kooperierenden sensorischen Einheiten erlauben nicht nur eine signifikante Signalverstärkung, sondern innerhalb eines heterogenen Rezeptorclusters ebenso die Integration verschiedener Signale durch unterschiedliche Rezeptortypen.

Es konnte gezeigt werden, dass für eine hohe Sensitivität auch das Adaptationssystem benötigt wird. Ein System mit 100-facher Amplifizierung ist ohne Adaptationssystem schon bei einprozentiger Rezeptorbesetzung gesättigt und unterscheidet sich, abgesehen von erhöhter Lockstoffaffinität, nicht von einem System ohne Amplifizierung (Kim *et al.* 2001; Sourjik & Berg 2002b). Die Rezeptormodifikation hält das Aktivitätsniveau der Rezeptor-Kinase-Komplexe moderat, so dass das System auch bei hohen oder niedrigen Ligandenkonzentrationen auf weitere Änderungen reagieren kann. Methylierung und Demethylierung der Rezeptoren spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Chemotaxis.

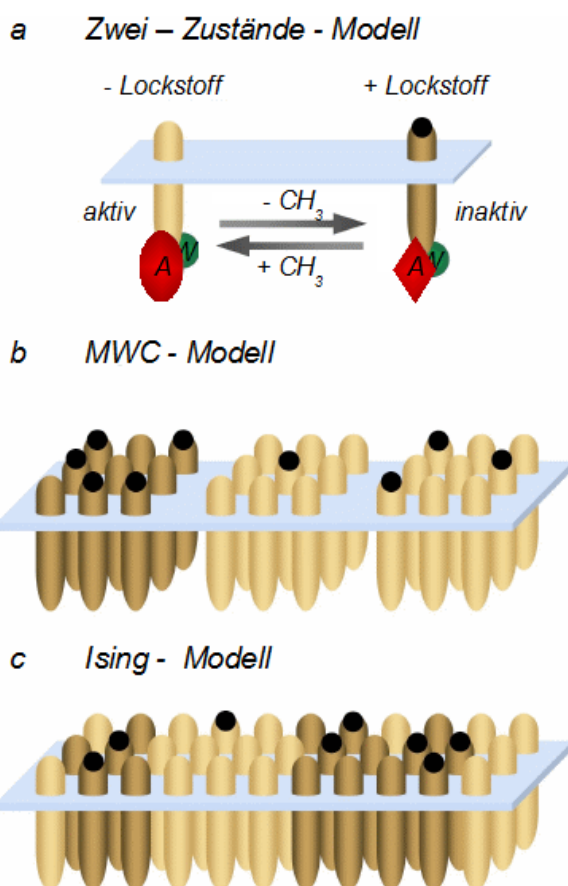


Abb. 1.11. Die Rezeptorkopplung.

(a) Im Zwei-Zustände-Modell schalten einzelne, an CheA und CheW gekoppelte Rezeptoren zwischen aktivem- und inaktivem Zustand um. Lockstoffbindung erhöht die Wahrscheinlichkeit des inaktiven Zustands, während Methylierung die Wahrscheinlichkeit des aktiven Zustands erhöht. (b) Das Monod-Wyman-Changeux (MWC)-Modell geht von gekoppelten Rezeptoreinheiten aus, die abhängig von Ligandenbindung und Methylierungsstatus synchron zwischen aktivem und inaktivem Zustand umschalten. (c) Im Ising-Modell bestehen Rezeptorcluster aus einem einzigen zusammenhängenden Netzwerk von Rezeptoren, in dem die einzelnen Rezeptoren den Zustand ihrer direkten Nachbarn beeinflussen können.

1.8. Zielsetzung

Zweikomponentensysteme sind weit verbreitet in Eubakterien, in geringerer Zahl aber auch in Archaea, Hefen, Pilzen und höheren Pflanzen (Mizuno 1998; West & Stock 2001). Die Chemotaxis in *E. coli* ist eines der am besten untersuchten Zweikomponentensysteme und ist daher ein ideales Modellsystem, um allgemeine Grundlagen der Signaltransduktion zu untersuchen (Bourret & Stock 2002; Sourjik 2004; Wadhams & Armitage 2004). So sind bereits alle Komponenten charakterisiert worden und Computer-Modelle versuchen zu erklären, wie ein relativ einfacher Signaltransduktionsweg solch komplexes Verhalten hervorrufen kann. Trotz intensiver Forschung bleiben aber grundlegende Fragen offen: Wie sind Rezeptorcluster aufgebaut und wie stabil sind die einzelnen Komponenten gebunden? Wie beeinflussen dynamische Prozesse wie Phosphorylierung und Methylierung die Komplexbildung und Signalverarbeitung? Welchen Einfluss hat die Rezeptorkopplung auf die chemotaktische Antwort? Diese Arbeit sollte sich der Beantwortung dieser Fragen in drei Teilen widmen:

Proteindynamik und Stabilität von Chemotaxisclustern

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand es, quantitative Aussagen über den Austausch der Chemotaxisproteine am Rezeptorcluster zu treffen und mittels dieser Daten auf die Clusterstabilität zu schließen. Durch FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) wurden *in vivo* systematisch Diffusions- und Bindeparameter aller Chemotaxisproteine bestimmt. Ferner wurde mit Hilfe dieser Technik die „Wanderung“ der Proteine innerhalb eines Clusters, sowie der Einfluss von Temperatur und Rezeptoraktivität auf den Proteinaustausch untersucht.

Die Rolle der CheB-Phosphorylierung

Die Bedeutung der CheB-Aktivierung, die für eine korrekte Adaptation nicht notwendig ist (Alon *et al.* 1999) ist bisher nicht geklärt. In dieser Arbeit wurde über FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) und Western Blots das Adaptations- und Demethylierungsverhalten verschiedener CheB-Mutanten untersucht. Schließlich Mittels Schwärmtests und FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) konnten mögliche alternative Funktionen der CheB-Phosphorylierung aufgezeigt

werden.

Methylierungsgeschwindigkeit und Kreuzmethylierung an Rezeptorclustern

Um dem Mechanismus der Adaptation weiter auf den Grund zu gehen, wurde die Methylierung von Chemotaxisrezeptoren genauer untersucht. Mittels SDS-PAGE und Western Blots konnten verschiedene Methylierungsniveaus von Rezeptorpopulationen aufgetrennt und analysiert werden. Unter anderem wurde in dieser Arbeit untersucht, inwiefern Methylierungsreaktionen durch die Bildung von Rezeptorclustern beschleunigt werden. Außerdem wurde die Kreuzmethylierung in heterogenen Rezeptorclustern, bestehend aus den beiden Hauptrezeptoren, Tsr und Tar, analysiert. Auf diese Weise konnten Hinweise auf die Natur der Rezeptorkopplung innerhalb eines Clusters gewonnen, und dadurch die Theorie eines alternativen Adaptationsmechanismus untermauert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1. In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Zubehör.

Chemikalie	Firma
Alkaline Phosphatase, shrimp	Roche, Mannheim
Agarose, ultra pur	Difco, Hamburg
Agar, Bacteriologie	Fluka, Neu-Ulm
Agar, Select	Difco, Hamburg
Ampicillin	Applichem, Darmstadt
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	Applichem, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Applichem, Darmstadt
Coomassie ® Brilliant Blue G-250	Applichem, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
dNTP Set	Invitrogen, Karlsruhe
1kb Plus DNA Marker Stammlösung	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure (konz.)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Applichem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Applichem, Darmstadt

Material und Methoden

Glycerin 99,5 %	Gerbu, Gaiberg
Glycin	Applichem, Darmstadt
HCl	Applichem, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Hamburg
Hybond – ECL Nitrocellulose Membran	Amersham Biosciences
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Applichem, Darmstadt
KPO ₄	Applichem, Darmstadt
Lactat	Sigma-Aldrich, München
Lysozym	Roth, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
T4 DNA Ligase Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven
MgSO ₄	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Applichem, Darmstadt
Methanol	Applichem, Darmstadt
L-Methionin	Sigma-Aldrich, München
Methylaspartat	Sigma-Aldrich, München
NaCl	Applichem, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Applichem, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Applichem, Darmstadt
NaOH	Applichem, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, München

Material und Methoden

PageRuler™ Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Applichem, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Pwo DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Roti®-Quant	Roth, Karlsruhe
SDS	Applichem, Darmstadt
L-Serin	Sigma-Aldrich, München
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Xylencyanol	Applichem, Darmstadt

2.2. Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.2. aufgelistet.

Tabelle 2.2. In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Antikörper	Quelle
Kaninchen- α -Tar _c	diese Arbeit (s. Abschnitt 2.10.2.)
Kaninchen- α -CheB	J. Hazelbauer, USA
Esel- α -Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat	Amersham Biosciences, UK
Ziege- α -Kaninchen IgG IRDye®800 Konjugat	Rockland, USA
Ziege- α -Kaninchen IgG IRDye®700DX Konjugat	Rockland, USA

2.3. Reaktions-Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit 250, Qiagen, Hilden

QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden

QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden

Protino ® Ni-IDA 2000 packed columns, Macherey-Nagel, Düren

ECL Western Blotting Reagents, Amersham Biosciences (GE Healthcare), UK

2.4. Nährmedien und Nährplatten

Alle Angaben beziehen sich auf 1,0 l H₂O_{dest.}

2.4.1. LB Medium

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

1 M NaOH (pH 7)

Für LB-Platten wurde 15 g/l Agar zugesetzt.

2.4.2. TB Medium

10 g Trypton

5 g NaCl

1 ml NaOH (pH 7)

Für Schwärmplatten wurde 0,3 g/l Agar zugesetzt.

2.5. Puffer

Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle Angaben auf 1,0 l H₂O_{dest.}

2.5.1. Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

TAE Puffer (50x)

242 g Tris

57,1 g Eisessig

100 ml 0,5M EDTA, pH 8

Gel-Ladepuffer (10x)

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanol

Glycerol in 40% H₂O

1 kb Plus DNA Marker

10 µl Marker-Stammlösung (Tabelle 2.1)

30 µl 10x Ladepuffer

60 µl H₂O

2.5.2. Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Laufpuffer (10x)

30,3 g Tris

144,1 g Glycin

10 g SDS

Lämmli-Puffer (3x)

1,8 g SDS

9 ml Glycerin

5,4 ml 1M Tris/Cl, pH 6,8

0,9 ml β-Mercaptoethanol

1 Spatelspitze Bromphenolblau

Mit H₂O_{dest.} auf 30 ml auffüllen

Trenngel-Puffer

1,5 M Tris/Cl pH 8,8

Sammelgel-Puffer

1M Tris/Cl pH 6,8

10% SDS

10% APS (Ammoniumperoxidsulfat)

Färbelösung

0,25 g	Coomassie Blau
800 ml	Ethanol (99,9%)
160 ml	Essigsäure (konz.)
800 ml	H ₂ O

2.5.3. Puffer für Proteinaufreinigung

LEW-Puffer

7,8 g NaH₂PO₄

17,5 g NaCl

Mit NaOH auf pH 8,0 einstellen

TEGDP-Puffer

8,97 g	Tris
0,19 g	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
0,07 g	Dithiothreitol (DTT)
0,02 g	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
100 ml	Glycerol

Als Niedrigsalzpuffer mit 50 mM NaCl

Als Hochsalzpuffer mit 1 M NaCl

2.5.4. Puffer für Western Blots

Transferpuffer

3,03 g	Tris
7,2 g	Glycin
200 ml	Methanol
2 g	SDS

TBS-T Puffer (10x)

12,14 g	Tris
9 g	NaCl
2 ml	Tween 20

Mit HCl auf pH 7,5 einstellen

PBS-Puffer (10x)

10,9 g Na_2HPO_4

6,4 g NaH_2PO_4

90 g NaCl

pH 7,2

2.5.5. Puffer für Fluoreszenzmikroskopie

Tethering Puffer

100 ml 0,1 M KPO_4

200 μl 0,5 M EDTA

13,4 ml 5 M NaCl

100 μl 10 mM Methionin

1 ml 10 M Lactat

Mit NaOH auf pH 7 einstellen

2.6. *E. coli* - Stämme

In Tabelle 2.3. sind die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* – Stämme zusammengestellt.

Tabelle 2.3. In dieser Arbeit benutzte *E. coli*-Stämme.

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz/ Quelle
DH5 α	<i>F</i>	(Hanahan 1983)
M15	$\Delta m15$	(Villarejo & Zabin 1974)
RP437 (HCB33)	<i>wt</i> für Chemotaxis	(Parkinson & Houts 1982)
RP2847 (HCB41)	$\Delta 2241(tap-cheB)$	Sandy Parkinson
RP2893 (HCB42)	$\Delta 2206(tap-cheZ)$	(Sourjik & Berg 2002b)
RP4972 (HCB197)	$\Delta cheB$	(Lovdok <i>et al.</i> 2007)
RP5723 (HCB268)	<i>Tsr::Tn5-1a</i>	(Sourjik & Berg 2004)
RBB1041 (HCB1262)	$\Delta(cheA-cheZ)::ZeoR$	(Sourjik & Berg 2004)
VS102	$\Delta flgM$	(Kollmann <i>et al.</i> 2005)
VS104	$\Delta(cheY-cheZ)$	(Sourjik & Berg 2002b)
VS116	$\Delta flhC$	(Kentner <i>et al.</i> 2006)
VS141	$\Delta 2206(tap-cheZ) tar(QEEE) tsr::Tn5-1a$	(Lieberman <i>et al.</i> 2004)
VS144	$\Delta 2206(tap-cheZ) tar(EEEE) tsr::Tn5-1a$	(Lieberman <i>et al.</i> 2004)
VS148	$\Delta 2206(tap-cheZ) tsr::Tn5-1a$	(Sourjik & Berg 2004)
VS164	$\Delta 2206(tap-cheZ) trg::Tn10 tsr::Tn5-1a$	Victor Sourjik
VS172	$\Delta(tar-cheZ)$	(Sourjik & Berg 2004)

VS178	$\Delta(\textit{cheY-cheZ}) \Delta\textit{tap tsr::Tn5-1a}$	Victor Sourjik
VS179	$\Delta(\textit{cheB-cheZ}) \Delta\textit{tap tsr::Tn5-1a}$	Victor Sourjik
VS181	$\Delta(\textit{cheY-cheZ}) \Delta(\textit{tsr, tar, tap, trg, aer})$	(Sourjik & Berg 2004)
VS185	$\Delta\textit{cheB tsr::Tn5-1a}$	diese Arbeit
SB1	$\Delta 2206(\textit{tap-chez}) \quad \textit{tar} \quad (QQQQ)$ $\textit{tsr::Tn5-1a}$	diese Arbeit
LL4	$\Delta(\textit{cheY-cheZ}) \Delta\textit{flgM}$	Linda Løvdoc
LL5	$\Delta(\textit{cheR-cheZ}) \Delta\textit{flgM}$	Linda Løvdoc

2.7. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.4. aufgelistet

2.8. Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech bezogen und in einer Konzentration von 100 pmol / μ l eingesetzt. Sie sind in Tabelle 2.5. aufgelistet.

Tabelle 2.4.: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

	Relevanter Genotyp	Resistenz	Referenz/Quelle
pBAD33	Expressionsvektor; pACYC ori, pBAD Promotor	Cm	(Guzman <i>et al.</i> 1995)
pTrc99a	Expressionsvektor; pBR ori, pTrc Promotor	Amp	(Amann <i>et al.</i> 1988)
pQE-60	„High copy“ Expressionsvektor; T5 Promotor; Lac Operator, C-terminale 6 x His-Tag Sequenz	Amp	Qiagen
pSB1	<i>cheB_c</i> in pQE-60	Amp	diese Arbeit
pSB2	<i>cheR</i> in pQE-60	Amp	diese Arbeit
pSB3	<i>tar_c</i> in pQE-60	Amp	diese Arbeit
pSB4	<i>cheB_c</i> in pTrc99a	Amp	diese Arbeit
pSB5	<i>cheR</i> in pTrc99a	Amp	diese Arbeit
pSB8	<i>eyfp-cheA^{Δ258}</i> in pTrc99a	Amp	(Schulmeister <i>et al.</i> 2008)
pVS18	<i>cheY-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	(Sourjik & Berg 2002b)
pVS19	<i>eyfp-cheY</i> in pTrc99a	Amp	(Kentner & Sourjik 2009)

Material und Methoden

pVS63	<i>eyfp-cheZ</i> in pTrc99a	Amp	(Kentner & Sourjik 2009)
pVS64	<i>cheZ-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	(Lieberman <i>et al.</i> 2004)
pVS88	<i>cheY-eyfp/cheZ-ecfp</i> in pTrc99a	Amp	(Sourjik & Berg 2004)
pVS91	<i>cheB</i> in pBAD33	Cm	(Lieberman <i>et al.</i> 2004)
pVS97	<i>cheB^{D56E}</i> in pBAD33	Cm	Victor Sourjik
pVS110	<i>eyfp-cheA^{Δ258}</i> in pBAD33	Cm	(Lieberman <i>et al.</i> 2004)
pVS112	<i>cheB_c</i> in pBAD33	Cm	Anette Müller
pVS113	<i>cheR</i> in pBAD33	Cm	Anette Müller
pVS138	<i>cheB-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	(Lovdok <i>et al.</i> 2007)
pVS139	<i>eyfp-cheB</i> in pTrc99a	Amp	Anette Müller
pVS143	<i>cheR/B</i> in pTrc99a	Amp	Anette Müller
pVS144	<i>cheR/B</i> in pBAD33	Cam	Anette Müller
pVS203	pREP4	Kan	Quiagen
pVS356	<i>tsr(QEEEE)</i> in pBAD33	Cam	Gabi Schwarz
pVS361	<i>tsr(QQQEE)</i> in pBAD33	Cam	Gabi Schwarz

Material und Methoden

pVS362	<i>tsr(EEEEE)</i> in pBAD33	Cam	Gabi Schwarz
pVS363	<i>tsr(QQQQE)</i> in pBAD33	Cam	Gabi Schwarz
pVS502	<i>tsr(QQQQQ)</i> in pBAD33	Cam	Gabi Schwarz
pDK4	<i>eyfp</i> in pTrc99a	Amp	(Kentner <i>et al.</i> 2006)
pDK12	<i>eyfp-cheW</i> in pTrc9a	Amp	(Kentner <i>et al.</i> 2006)
pDK19	<i>cheR-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	(Schulmeister <i>et al.</i> 2008)
pDK20	<i>eyfp-cheR</i> in pTrc99a	Amp	(Kentner <i>et al.</i> 2006)
pDK28	<i>eyfp-cheA^{I-655}</i> in pTrc99a	Amp	(Kentner <i>et al.</i> 2006)
pDK36	<i>eyfp-cheA^{short}</i> in pTrc99a	Amp	(Kentner <i>et al.</i> 2006)
pDK54	<i>cheW-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	(Schulmeister <i>et al.</i> 2008)
pDK56	<i>cheA-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	David Kentner
pDK57	<i>cheA^{short}-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	(Kentner & Sourjik 2009)
pDK58	<i>tar-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	(Kentner <i>et al.</i> 2006)
pDK116	<i>eyfp-cheR^{D154A}</i> in pTrc99a	Amp	(Kentner & Sourjik 2009)
pDK135	<i>cheB-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	David Kentner

Material und Methoden

pDK137	<i>tar(EEEE)-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	David Kentner
pDK138	<i>tar (QQQQ)-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	David Kentner
pDK159	<i>cheB^{S164C}-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	David Kentner
pDK183	<i>cheB^{D56E}-eyfp</i> in pTrc99a	Amp	David Kentner

Tabelle 2.5. In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Richtung	Restriktionsstelle	Gen	Referenz
SON1	GCGGCGGGCACCATGGATCTTTCCTCCCG	sense	NcoI	<i>tar_c</i>	diese Arbeit
SON2	GCCAATTAGGATCCATCGATGCCACGGCTC	anti	BamHI	<i>tar_c</i>	diese Arbeit
SON3	AGCCATCCATGGCACCGACAACGCTGAAGG	sense	NcoI	<i>cheB_c</i>	diese Arbeit
SON4	CACACTCCTGGATCCAATACGTATCGCCTG	anti	BamHI	<i>cheB_c</i>	diese Arbeit
SON5	GAAGGCGCCATGGCTTCATCTCTGCCCTG	sense	NcoI	<i>cheR</i>	diese Arbeit
SON6	TGCTCAGGATCCATCCTTACTTAGCGCATAC	anti	BamHI	<i>cheR</i>	diese Arbeit

2.9. Molekularbiologische Methoden

2.9.1. Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Fragmente wurden nach der PCR-Methode amplifiziert. Die dafür benötigten Primer wurden von MWG Biotech (s. Tabelle 2.4.) bezogen. Das Endvolumen des PCR-Ansatzes betrug 50 μ l und enthielt 1 μ l Ausgangs-DNA (200 ng/ μ l), 5 μ l 10x PCR-Puffer, 1 μ l dNTP-Stammlösung (10 mM), je 0,5 μ l der jeweiligen Primer, sowie 0,5 μ l Polymerase.

PCR – Programm:

1 x 5 min Denaturierung bei 95°C

25 Zyklen 30 s Denaturierung bei 95°C

 45 s Annealing bei 55°C, von der Schmelztemperatur der Primer abhängig

 1 min Elongation bei 72°C

1 x 10 min Elongation bei 72°C

Die polymerisierten DNA-Fragmente wurden durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde ein 1% Agarose-Gel, bestehend aus 0,4 g Agarose in 40 ml TAE-Puffer (s. 2.3.1.) und 1 μ l Ethidiumbromid, verwendet. Anschließend wurde das Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und über das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (s. 2.3.) aufgereinigt.

2.9.2. Restriktionsverdau

Die PCR-Produkte und der entsprechende Vektor wurden mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und BamHI (New England Biolabs oder Fermentas) geschnitten. Die Wahl der Puffer erfolgte nach den Vorgaben des jeweiligen Herstellers. In einem Reaktionsvolumen von 40 µl wurden ca 1 µg DNA mit 10 U des jeweiligen Enzyms für eine Stunde bei 37°C verdaut. Um Klone zu testen wurden analytische Verdaue in 10 – 20 µl Gesamtvolumen mit ca. 0,5 µg DNA durchgeführt. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (s. Abschnitt 2.3.) entfernt.

2.9.3. Dephosphorylierung des Vektors

Um eine Religation der Vektoren auszuschließen, wurden die überstehenden 5'-Enden des jeweiligen Vektors mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Dazu wurde ca. 1µg DNA mit 5 U SAP, 1µl 10x SAP Puffer und 4 µl H₂O für 15 min bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen wurde der Ansatz für 5 min auf 65°C gebracht.

2.9.4. Ligation

In einem Gesamtvolumen von 10-20 µl wurden 2 µl Vektor (50 ng) und 5,5 µl Insert-DNA mit 0,5 µl T4-DNA Ligase und 1 µl 10x Ligationspuffer gemischt. Der Reaktionsansatz wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gefolgt von 15 min bei 4°C, oder alternativ über Nacht bei 16°C, inkubiert. Um eine mögliche Religation des Vektors abzuschätzen, wurde in einem Kontrollansatz das Insert durch H₂O ersetzt.

2.9.5. Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden *E. coli*-Stämme in 5ml LB-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,7 angezogen. Nach Zentrifugation (4°C, 2.000 x g, 5 min) der Zellen und Aufnahme in 50 ml 0,1 M eiskalter MgCl₂-Lösung wurden die Zellen für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 1.500 x g, 5 min) wurde das Pellet in 50 ml 0,1 M eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen, unter denselben Bedingungen erneut pelletiert und in 3 ml gekühlter 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 18%

Glycerin aufgenommen. Die so erhaltenen kompetenten Zellen wurden 2 Stunden auf Eis inkubiert, bevor sie in 100 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert wurden.

2.9.6. Transformation

50 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, und mit der Hälfte des Ligationsansatzes oder 0,5 µl isolierter Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert, bevor ein Hitzeschock (30 s, 42°C) für eine bessere Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen sorgte. Der Ansatz wurde weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert, mit 950 µl LB-Medium versetzt und zur Expression des plasmidcodierten Resistenzgens für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurden die Zellen 1 Minute bei 8000 Rpm pelletiert, in ca. 100 µl des Restvolumens aufgenommen und auf LB-Platten mit den erforderlichen Antibiotika ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

2.9.7. Glycerinkulturen

Die Lagerung von *Escherichia coli* über einen längeren Zeitraum erfolgte in Form von Glycerinkulturen bei -80°C. Dazu wurden die entsprechenden Zellen über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen pelletiert und in 1 ml TB-Medium, das 20% Glycerin enthielt, aufgenommen, bevor sie bei -80°C tiefgefroren wurden.

2.10. Proteinbiochemische Methoden

2.10.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Über die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lugtenberg *et al.* 1975), wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurden große Gele (200 x 320 x 1 mm) mit Acrylamidkonzentrationen von 8% für die CheB-Quantifizierung und für die Auftrennung der Rezeptormodifikationszustände, sowie Minigele (BIO-RAD, USA) mit einer 12% Acrylamidkonzentration für die Aufreinigung des Tar_c-Fragments verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 2.6. dargestellt (alle Angaben in ml).

Tabelle 2.6. Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele.

	Sammelgel	8% Trenngel	Sammelgel	12% Trenngel
H₂O	6,8	23,2	0,68	1,7
Acrylamid ¹⁾	1,7	13,4	0,17	2,0
Puffer	1,25 ²⁾	12,5 ³⁾	0,13 ²⁾	1,3 ³⁾
SDS (10%)	0,1	0,5	0,01	0,05
APS (10%) ⁴⁾	0,1	0,5	0,01	0,05
TEMED ⁵⁾	0,01	0,05	0,001	0,002
Gesamt	10	50	1	5

¹⁾: 30% Acrylamid, 1,5% N,N-Methylenbisacrylamid in Wasser

²⁾: 1 M Tris/HCl pH 6,8

³⁾: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8

⁴⁾: APS = Ammoniumperoxidsulfat

⁵⁾: TEMED = N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

Die Stammlösungen wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert. APS wurde in 500 µl Aliquots bei -20°C und SDS-Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Unmittelbar nach dem Gießen wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, welches nach 1 Stunde durch H₂O ausgetauscht wurde. Die Polymerisation erfolgte bei Minigelen für mindestens 1 Stunde, bei großen Gelen über Nacht bei Raumtemperatur. Das Sammelgel wurde kurz vor dem Probenauftrag über das Trenngel gegossen. Die Polymerisation war nach 15 min beendet. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit vorgewärmtem Lämmli-Puffer versetzt, 10 min bei 100°C gekocht und nach dem Abkühlen kurz abzentrifugiert. Sie wurden entweder direkt auf das Gel aufgetragen oder bei -80°C für eine spätere Verwendung gelagert. Große Gele wurden zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur an eine Spannung von 100 V angeschlossen, damit die Proben in das Sammelgel einlaufen konnten. Danach lief das Gel über Nacht bei 250 V bei 4°C. Die Proteinauftrennung in Minigelen erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Spannung von 100 V.

2.10.2. Proteinaufreinigung zur Herstellung des α -Tar-Antikörpers

Hintergrund

Die C-terminalen Tar-Rezeptorfragmente (Tar_c) zur Herstellung des α -Tar-Antikörpers wurden unter Verwendung von Hexa-Histidin-Tags über Metall-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dazu wurden in dem „high copy“ Expressionsvektor pQE60 sechs konsekutive Histidin-Reste C-terminal an das aufzureinigende Proteinfragment fusioniert und unter Kontrolle eines T5-Promotor Transkriptions-Translations Systems exprimiert. Das resultierende Plasmid (pSB3) wurde in dem *E. coli* Stamm M15 exprimiert, der viele Kopien des pREP4 Plamids enthält, was eine hohe Kopienzahl des Lac-Repressor-Proteins sichert. Das Lac-Repressor-Protein bindet an die Operatorsequenz und reguliert die Expression des rekombinanten Proteins. Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird das Lac-Repressor-Protein gebunden, und dadurch inaktiviert, wodurch die Expression des rekombinanten Proteins induziert wird. Die rekombinanten Proteine wurden über eine Ni-IDA-Matrix (Protino ® Ni-IDA 2000 packed columns, Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. IDA ist eine 3-zahnige chelatbildende Verbindung, welche drei der sechs Bindestellen des Nickel-Ions besetzt. Die verbleibenden drei Koordinationsstellen sind normalerweise mit Wassermolekülen besetzt und können durch Histidin-Reste des rekombinanten Proteins ausgetauscht werden. Imidazol konkurriert mit den rekombinanten Proteinen um die Bindestellen an der Matrix, so dass steigende Konzentrationen von Imidazol benutzt werden, um diese Proteine zu eluieren.

Zusätzlich wurde das Fragment über Gelfiltration aufgereinigt. Gelfiltrationssäulen bestehen aus porösen Kügelchen eines unlöslichen, hochhydratisierten Polymers. Kleine Moleküle können in diese Kügelchen hineingelangen und sind in der wässrigen Lösung in und zwischen den Kügelchen verteilt. Große Moleküle befinden sich ausschließlich außerhalb der Kügelchen und werden daher zuerst eluiert. So können Proteine in einer Lösung der Größe nach aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurde dazu eine Sephadex 75 Säule verwendet.

In einem dritten Schritt wurde Tar_c -6 x His über einen Ionenaustauscher aufgereinigt. Da Tar_c einen pI-Wert von ~4,66 hat, wurde dazu ein Anionenaustauscher gewählt. Hier ist eine

kationische Gruppe kovalent an eine feste, unlösliche Matrix gebunden. Das neutralisierende Anion (hier: Tar_c) ist dagegen nur ionisch gebunden, und ist daher durch andere Anionen austauschbar. Somit kann das betreffende Protein bei ansteigenden Salzgradienten eluiert werden. Negativ geladene Ionen des Salzes konkurrieren dabei mit dem Protein um die Bindung an der Matrix. Je nach Ladung wird das Protein bei einem bestimmten Salzgehalt eluiert.

Wachstumsbedingungen

Es wurde eine 20 ml Übernachtskultur von M15 pSB3 in LB-Medium, das die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin enthielt, bei 37°C schüttelnde angezogen. Am nächsten Morgen wurde 1l LB-Medium inklusive Ampicillin und Kanamycin 1:50 mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C schüttelnd angezogen, bis eine OD₆₀₀ = 0,5-0,7 erreicht war. Nachdem eine 1 ml Probe entnommen wurde, wurde die Kultur mit 1mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nachdem die Kultur 5 Stunden bei 37°C gewachsen war, wurde eine zweite 1 ml Probe entnommen und die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (4000 x g, 20 min).

Proteinaufreinigung

Abzentrifugierte Zellen wurden je g in 2 ml 1 x LEW-Puffer resuspendiert. Die Zellwände wurden durch Zugabe von 1 mg/ml Lysozym 45 min bei 4°C abgebaut. Mittels Ultraschall wurden die Zellen aufgeschlossen bis die Lösung nicht mehr viskos war. Zelltrümmer wurden 30 min bei 10.000 Rpm und 4°C abzentrifugiert. Zusätzlich wurde der Überstand durch einen 0,45 µm Sterilfilter filtriert, bis das Lysat klar war. Die eigentliche Proteinaufreinigung erfolgte über das „Protino ® Ni-IDA 2000 packed columns Kit“ von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf den Gehalt von Tar_c-6xHis untersucht. Entsprechende Eluate wurden vereinigt und in TEGDP-Puffer dialysiert, um das Imidazol zu entfernen. Die Dialyse ist ein konzentrationsgetriebener Membranprozess, mit dessen Hilfe man sehr kleine Teilchen,

typischerweise Ionen, aus Lösungen entfernen kann, während große Moleküle, zum Beispiel Proteine, zurückgehalten werden. Die Proteinlösung wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt, dieser verschlossen und über Nacht bei 4°C in 1 Liter TEGDP-Puffer bewegt. Nur Moleküle mit einer molaren Masse unterhalb des Porendurchmessers konnten durch die Wand des Schlauchs gelangen. Die Trenngrenze des Dialyseschlauchs lag bei ca. 30 -35 Å. Daher konnten die Proteine den Schlauch nicht verlassen und die Salzkonzentrationen beider Lösungen konnten sich aufgrund der geringen Größe der Ionen angleichen. Da das Volumen außerhalb des Schlauchs erheblich größer war, stellte sich deren Salzkonzentration auch innerhalb des Schlauchs ein. Auf diese Weise konnte die Konzentration der ursprünglich vorhandenen unerwünschten Salze auf ein vernachlässigbares Maß reduziert werden.

Zusätzlich wurde Tar_c-6xHis durch Gelfiltration über eine Sephadex 75 Säule aufgereinigt. Diese wurde unter Verwendung einer Vakuumpumpe bei 4°C jeweils 2 Stunden mit H₂O und TEGDP-Puffer equilibriert. Die Proteinlösung wurde mittels einer Millipore „Centriprep®“ Säule auf 1,5 ml durch 60 minütige Zentrifugation bei 3000 Rpm aufkonzentriert. Nachdem die Probe nochmals für 15 min bei 4°C abzentrifugiert wurde, um ein Verstopfen der Säule zu verhindern, wurde sie auf die Säule aufgetragen. Nach 30 ml Durchlauf wurden 47 Proben mit jeweils 2 ml gesammelt. Die Eluate wurden auch hier mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf den Gehalt von Tar_c-6xHis untersucht. Entsprechende Eluate wurden vereinigt und nochmals über einen Anionenaustauscher gereinigt. Pumpen wurden vorher 10 min mit H₂O (1 ml/min) und die Säule 3x im Wechsel mit 3 ml Niedrig- und Hochsalzpuffer gewaschen. Bevor die Proteinlösung aufgetragen wurde, wurde die Säule nochmals mit 5 ml Niedrigsalzpuffer äquilibriert. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit 10 ml Niedrigsalzpuffer gespült. Um einen Salzgradienten zu herzustellen, wurden danach 10 ml Hochsalzpuffer eingeleitet. Um jegliche Proteine von der Säule zu waschen wurde am Ende nochmals mit 5 ml Hochsalzpuffer gespült. Mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurden die Eluate bestimmt, die Tar_c enthielten. Diese wurden vereinigt, in TEGDP-Puffer dialysiert und die Proteinmenge mittels des BRADFORD- Tests bestimmt. Dabei wird durch die Zugabe eines Farbstoffes (Coomassie® Brilliant Blue G-250) zu einer Proteinlösung und anschließender Messung der Absorption in einem Spektrometer bei 595 nm die Konzentration gelöster Proteine in einer Lösung bestimmt. Der Farbstoff bindet vor allem an basische und

aromatische Aminosäurereste. Nach Bindung des Farbstoffs an ein Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes kann mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagenz photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Erstellung der Eichkurve wurden BSA-Lösungen mit den Konzentrationen 1 µg, 2 µg, 5 µg, 10µg und 15 µg verwendet.

Tar_c-6xHis wurde im kristallinen Zustand zur Immunisierung geschickt. Die Antikörper wurden über die Charles River Laboratories bestellt.

2.10.3. Western Blots

Die in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinfractionen wurden entweder durch Tank-Blots oder Semi-Dry-Blots auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Durch den vorgefärbten Größenmarker war es möglich, entsprechende Gelbereiche vorher auszuschneiden, um nicht das ganze Gel blotten zu müssen. Proteine wurden mittels Elektrophorese auf die Membran übertragen. In der Reihenfolge Anode, 3 Lagen Whatman Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Gel, 3 Lagen Whatman Filterpapier, Kathode wurde die Apperatur zusammgebaut. Tank-Blots wurden mittels der Mini Trans-Blot ® Cell von BIO-RAD, USA durchgeführt. Hier lagen die Membranen für 2 Stunden bei 100 V, 350 mA bei 4°C oder über Nacht bei 30 V, 90 mA bei 4°C im Transferpuffer.

Bei Semi-Dry-Blots wird dagegen nur wenig Transferpuffer benötigt, um Membran, Filterpapiere und Gel zu befeuchten. Es wurden Semi-Dry-Blot-Apperaturen von Biometra, Göttingen (Fastblot B34 und B44) verwendet, die bei 4°C für 45 min an eine Stromstärke von 2,5 mA/cm² Membran angeschlossen wurden.

2.10.4. Markierung von Proteinen durch Antikörperfärbung

Definierte Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Alle Inkubationsschritte fanden unter ständigem Wippen statt, um eine optimale Verteilung der entsprechenden Lösung zu gewährleisten. Unspezifische Bindungen der Antikörper wurden vermieden, indem die Membran für 10 Minuten in 10% Magermilchpulver in 1xTBS-T vorinkubiert wurde. Danach wurde die Membran 3 Mal 5

Minuten in 1x TBS-T gewaschen und für 1 Stunde mit dem ersten Antikörper markiert. Als primäre Antikörper dienten Kaninchen- α -Tar (1:5000 in 1 x TBS-T mit 0,5% Magermilchpulver) und Kaninchen- α -CheB (1:1000 in 1x TBS-T mit 0,5% Magermilchpulver). Die Membran wurde durch 3-maliges 10-minütiges Waschen mit 1x TBS-T von ungebundenem Erstantikörper befreit, bevor sie 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurde. Für die Entwicklung mittels Chemilumineszenz wurde Esel- α -Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat von Amersham Biosciences (1:2000 in 1x TBS-T mit 0,5% Magermilchpulver), für die Entwicklung über Fluoreszenz bei ~800 nm wurde Ziege- α -Kaninchen IRDyeTM800 oder Ziege- α -Kaninchen IRDyeTM700DX von Rockland, USA (1:5000 in 1x TBS-T mit 0,5% Magermilchpulver) verwendet. Ungebundener Zweitantikörper wurde durch 3-maliges, 10-minütiges Waschen mit 1x TBS-T abgewaschen.

2.10.5. Entwicklung der Antikörperfärbung

Chemilumineszenz

Für die Visualisierung der markierten Proteine über Chemilumineszenz wurde das ECL Western Blotting Reagents von Amersham Biosciences (GE Healthcare) verwendet. Die Reagenzien enthalten Luminol, ein Substrat für die am Zweitantikörper gebundene Meerrettichperoxidase. Die Oxidation von Luminol durch die Peroxidase führt zur Emission von Licht. Die maximale Lichtemission liegt bei einer Wellenlänge von 428 nm und kann auf einem Film, der sensitiv auf Licht dieser Wellenlänge reagiert, detektiert werden (Amersham Hyperfilm ECL). Da die enzymatische Reaktion dynamisch ist, verändert sich die Lichtemission über die Zeit. Daher ist es notwendig, die Reaktions- und Belichtungszeiten zu optimieren.

Der Blot wurde 2 Minuten mit einem 1:1 Gemisch aus den Reagenzien 1 und 2 inkubiert. Die Filme wurden entsprechend der Signale 30 Sekunden bis 1 Stunde belichtet und anschließend entwickelt.

Fluoreszenzdetektion

Die Visualisierung über direkt an den Zweitantikörper gebundene Fluorophore vereinfacht die Entwicklung der Western Blots, da die enzymatische Reaktion entfällt. Das von den membrangebunden Proteinen generierte Signal ist statisch und erlaubt ein breiteres lineares Detektionsspektrum ohne Signalverlust (Mathews *et al.* 2009). In dieser Arbeit wurde ein Fluorophor nahe des infraroten Bereichs (IRDye™ 800 und IRDye™ 700DX) verwendet. Da Nitrocellulosemembranen und Biomoleküle eine sehr niedrige Autofluoreszenz in diesem Bereich haben ist die Hintergrundfluoreszenz gering (Schutz-Geschwender *et al.* 2004).

Die Membran wurde 2 Mal kurz mit 1 x PBS gewaschen und direkt mit einem LI-COR Odyssey® Infrared Imaging System gescannt.

2.10.6. Auswertung der Rezeptormethylierung

Western Blots mit Methylierungszuständen von Tsr-Rezeptorpopulationen dienen als Grundlage für die Bestimmung von Methylierungsgeschwindigkeiten. Methylierungszustände wurden mittels ImageJ, Version 1.34l (W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij>) ausgewertet, indem die Intensitäten einzelner Banden abzüglich des Hintergrunds gemessen, und den entsprechenden Methylierungszuständen zugeordnet wurden. Mit der KalaidaGraph Software, Version 3.6 (Synergy Software), wurden für jeden Zeitpunkt die mittleren Modifikationsniveaus M berechnet:

$$M = 1 - \left(\frac{(1 * I_0) + (2 * I_1) + (3 * I_2) + (4 * I_3) + (5 * I_4)}{I} \right)$$

[1]

Dabei war I_0 die Bandenintensität des unmethylierten, I_1 die des einfach methylierten, I_2 die des zweifach methylierten, I_3 die des dreifach methylierten und I_4 die des vierfach methylierten Zustands. I war die Summe der Intensitäten aller Methylierungszustände. Die mittleren Modifikationsniveaus wurden gegen die Zeit aufgetragen. Aus der Steigung des anfänglichen linearen Teils der Kurve konnten die Methylierungsgeschwindigkeiten V abgelesen werden.

Für die Beurteilung der Kreuzmethylierung zwischen Tsr und Tar wurden Fluoreszenzintensitäten in einem Streifen, der über das gesamte Methylierungsprofil gezogen wurde, gemessen. Im mittleren Teil des Profils überschritten sich hochmethylierten Tsr-Zustände mit niedrig methylierten Tar-Zuständen und konnten nicht unterschieden werden. Daher wurde mittels des Integrate-Area Macros von KalaidaGraph (Synergy Software) die Fläche unter den Kurven der eindeutig zuzuordnenden Methylierungszustände für jeden Zeitpunkt bestimmt und die Kreuzmethylierung über die Verschiebung der Methylierung in diesen Bereichen bewertet.

2.11. Chemotaxis-Analyse

2.11.1. Wachstumsbedingungen

Für Rezeptormodifikationsstudien, CheB-Quantifizierung, FRAP- und FRET- Experimente wurden Bakterien wie folgt angezogen: Übernachtskulturen wurden in TB-Medium mit entsprechenden Antibiotika inkubiert, bis die Zelldichte gesättigt war. Am nächsten Morgen wurde die Übernachtskultur 1:100 in 10 ml frischem TB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika und Induktoren verdünnt. Nach 3,5 bis 4 Stunden bei $OD_{600}=0,45 - 0,5$ war das exponentielle Wachstum erreicht und die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 Rpm, 10min) geerntet. Anschließend wurden die Zellen zweimal in Tethering-Puffer gewaschen und für 1h im Kühlschrank inkubiert, um weiteres Wachstum und Proteinexpression zu unterbinden.

Sollten Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden, wurden die Kulturen 5:1 aufkonzentriert. Für die CheB-Quantifizierung wurde die Zellsuspension danach mit 1/3 Volumen 3 x Lämmli-Puffer gemischt und 10 Minuten bei 100°C gekocht. Während der Rezeptormodifikationsstudien wurde die aufkonzentrierte Zellkultur in einem kleinen Becherglas bei Raumtemperatur 20 min geschüttelt. Danach wurden je 200 µl Zellsuspension entnommen und in 100 µl vorgeheizten Lämmli-Puffer überführt. Die erste Probenentnahme erfolgte direkt vor der Induktion mit dem entsprechenden Lockstoff ($t=0$). Danach wurden in Zeitabständen von 30, 60, 180, 360 und 600 Sekunden Proben entnommen. Nach 10 minütigem Kochen bei 100°C wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.11.2. Schwärmplatten

Verfügen *E. coli* Zellen über ein funktionales Chemotaxissystem, breiten sie sich in Weichagar aus. Durch Metabolisierung von Nährstoffen im Agar entsteht ein Lockstoffgradient, woraufhin sich die Bakterien ringförmig verteilen. Schwärmplatten wurden aus 35 ml TB mit 0,3% Agar, den benötigten Antibiotika und Induktoren hergestellt. Mit einem Zahnstocher wurden die Zellen von einer LB-Platte in den Weichagar überimpft. Dabei wurden die zu beobachtenden Stämme zusammen mit geeigneten Positiv- und Negativkontrollen auf einer Platte aufgetragen. Schwärmplatten wurden 6 – 8 Stunden bei 34°C, oder über Nacht bei 30°C inkubiert, bis der Schwärmring der Positivkontrolle einen Durchmesser von ca. 2 cm hatte. Um die Fähigkeit zur Chemotaxis zu quantifizieren wurden die Schwärmplatten mit einer Canon EOS 300D (DS6042) Kamera fotografiert und der Durchmesser der Schwärmringe mittels ImageJ in Pixel gemessen. Die Schwärmringgröße wurde immer auf den Durchmesser der Positivkontrolle normalisiert. Die gewonnenen Daten wurden mittels KalaidaGraph Software, Version 3.6 (Synergy Software) abgebildet.

2.11.3. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Hintergrund

FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ist die Methode der Wahl um Austauschraten in biologischen Systemen zu untersuchen. An das zu beobachtende Protein wird ein Fluoreszenzmarker gebunden so dass es durch konfokale Mikroskopie beobachtet werden kann. Im nächsten Schritt wird die Fluoreszenzintensität an einem bestimmten Ort vermessen. Am selben Ort wird diese Fluoreszenz durch einen kurzen Laserimpuls lokal zerstört. Bei dieser Photobleichung gehen die fluoreszierenden Moleküle irreversibel in einen nicht-fluoreszierenden Zustand über. Als Folge bildet sich ein „schwarzer Fleck“ in der Probe aus, in den die fluoreszierenden Proteine der nicht gebleichten Umgebung eindiffundieren können. In dieser Arbeit diente YFP (*yellow fluorescent protein*) als Fluoreszenzmarker. Durch Messung der Rückkehr der Fluoreszenz in dem am Zellpol befindlichen Cluster

wurden *in vivo* Diffusions- und Bindeparameter aller Chemotaxisproteine bestimmt. Ferner wurde mittels dieser Technik die „Wanderung“ der Proteine innerhalb des Clusters, sowie der Einfluss von Clusteraktivität und Temperatur auf den Proteinaustausch untersucht.

Herstellung der Zellpräparate

Für alle FRAP Experimente wurden die Zellen wie in 2.11.1 angezogen. Für Experimente, die bei 20°C Raumtemperatur durchgeführt wurden, wurden Deckgläschen (quadratisch, 15 mm) 5 min mit 100µl Poly-L-Lysin beschichtet. Kurz vor der Messung wurden Poly-L-Lysin Reste vom Deckglas mit Wasser entfernt. Um die Zellen zu immobilisieren wurde 1 ml der gekühlten Zellsuspension auf das vorbereitete Deckglas pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension abgezogen, überflüssige Zellen mit Wasser entfernt und das Deckglas auf einem Objektträger platziert. Die FRAP-Messungen wurden sofort nach Fertigstellung durchgeführt, um eine Austrocknung des Präparats zu vermeiden. Für FRAP-Experimente bei 37°C und 39°C wurde das Zellpräparat vor Austrocknung geschützt, indem zwischen Deckglas und Objektträger eine Fettschicht aufgebracht wurde. Vor Beginn der FRAP-Messungen wurde der Objektträger 15 Minuten mit einem Wasserbad bei 38,5°C bzw. 40°C beheizt, um eine Temperatur des Präparats von 37°C bzw. 39°C auf dem Objektträger zu gewährleisten.

FRAP Analyse

Die FRAP-Messungen wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP2) ausgeführt, das mit einem 20 mV Argon-Laser und einem FRAP-Software-Modul ausgestattet war. Unter Verwendung des 63x Öl-Objektivs und einer 32 fachen Vergrößerung wurden einzelne Zellen visualisiert. Die YFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine wurde mittels eines 514 nm Lasers angeregt und über einen YFP Emissionskanal (525–600 nm) detektiert. Für die Messungen wurden Zellen ausgewählt, die ähnlich fluoreszent waren. Abhängig vom Experiment wurde jeweils ein ganzes Cluster oder ein Teil des Clusters durch zwei kurze (0,336 s), starke Laser-Impulse (50% Laser-Intensität) ausgebleicht. Die Aufnahmen vor und nach dem Bleichen wurden jeweils mit 1-5% Laser-Intensität aufgenommen. Um die Rückkehr der Fluoreszenz zu verfolgen, wurden 10 Bilder im Abstand von 0,336 s, 10 Bilder im Abstand von 3 s und, abhängig vom Experiment 5-40 Bilder im Abstand von 30 s aufgenommen.

Auswertung voll gebleichter Cluster

Bildserien der FRAP Experimente wurden mit der Leica Confocal Software, Version 2.61 aufgenommen und über ImageJ, Version 1.34l (W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij>) ausgewertet. Um Bleichprofile zu erhalten, wurde die Fluoreszenzintensität in einem Streifen, der über die gesamte Zelle gezeichnet wurde, für unterschiedliche Zeitpunkte der Sequenz gemessen. Das resultierende Profil wurde mittels der „Smooth“-Funktion in KaleidaGraph geglättet.

Die Fluoreszenzintensitäten der gebleichten Region wurden automatisch, durch ein ImageJ Plug-in gemessen. Die Größe der Region wurde auf 52 Pixel definiert. Die relative Fluoreszenzintensität der Cluster in den Bildserien (F_{Rel}) wurde durch Normalisierung der Cluster-Fluoreszenz ($F_{Cluster}$) auf die Fluoreszenz der gesamten Zelle (F_{Zelle}) berechnet um graduelles Bleichen während der Messung zu kompensieren.

$$F_{Rel} = \frac{F_{Cluster} - F_{Hintergrund}}{F_{Zelle} - F_{Hintergrund}}$$

[2]

Um mehrere Experimente mit unterschiedlichen Bleichtiefen vergleichen zu können, wurde die relative Fluoreszenzintensität der Cluster in den Bildserien wiederum auf die relative Fluoreszenzintensität des Clusters vor dem Bleichen (F^0) normalisiert.

$$FRAP = \frac{F_{Rel}}{F^0}$$

[3]

Die gewonnenen Daten wurden mittels KaleidaGraph Software, Version 3.6 (Synergy Software) abgebildet.

Fluoreszenzrückkehr $I(t)$ durch Diffusion der Chemotaxisproteine in dem *E. coli*-Stamm VS116 wurde durch folgende Gleichung ermittelt:

$$I(t) = \frac{F_0 + F_\infty \left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^\alpha}{1 + \left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^\alpha}$$

[4]

F_0 ist die relative Fluoreszenzintensität direkt nach der Photobleichung, F_∞ die relative Fluoreszenzintensität nach der Rückkehr der Fluoreszenz, $t_{1/2}$ die Halbwertszeit der Fluoreszenzrückkehr und der Faktor α beschreibt die anomale Diffusion in einer dichtbepackten Umgebung (Feder *et al.* 1996).

Zweiphasische Fluoreszenzrückkehr in Bakterienzellen mit Proteinbindung an Rezeptorclustern stellt eine Kombination aus Diffusion und Proteinaustausch am Rezeptorcluster dar und wurde mittels folgender Gleichung ermittelt:

$$I(t) = \frac{F_0 + F_\infty \left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^\alpha}{1 + \left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^\alpha} + C \left(1 - e^{-\left[\frac{t}{\tau_{obs}}\right]}\right)$$

[5]

Der Proteinaustausch am Cluster wurde als ein umgekehrter exponentieller Zerfall mit der charakteristischen Zeit τ_{obs} berechnet (Bulinski *et al.* 2001; Sprague *et al.* 2004). Dabei stellen $F = F_\infty - F_0$ und C die Amplituden der ausgetauschten Proteine während der Diffusion und Bindung dar.

Auswertung teilweise gebleichter Cluster

Bildserien teilweise gebleichter Cluster wurden ebenfalls über Leica Confocal Software der Version 2.61 aufgenommen und über ImageJ, Version 1.341 (W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij>), sowie KalaidaGraph Software, Version 3.6 (Synergy Software) ausgewertet. Wegen der geringen Auflösung des Mikroskops sowie

mangelnder Zielgenauigkeit des Lasers wurden teilweise gebleichte Cluster im Vorfeld untersucht, indem Intensitätsprofile innerhalb eines über das Cluster gezogenen Streifens erstellt wurden. Nur diejenigen Cluster, die teilweise gebleicht waren, wurden ausgewertet. Die relative Fluoreszenzintensität der Cluster in den Bildserien wurde durch Normalisierung der Fluoreszenz der teilweise gebleichten Cluster auf die Fluoreszenz des gesamten Clusters berechnet um graduelles Bleichen während der Messung zu kompensieren (s. Gleichung 2).

2.11.4. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Hintergrund

Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) ist eine Variante des Förster-Resonanzenergietransfers (Förster 1948), bei dem Energie eines angeregten Donor-Fluorophors strahlungsfrei in Form von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen Fluoreszierenden Akzeptor übertragen wird. FRET kann somit über eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz oder einer Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz detektiert werden. Um eine Energieübertragung zu ermöglichen, muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Dieses Kriterium wird besonders gut von dem Fluorophorenpaar CFP (*cyan fluorescent protein*) und YFP (*yellow fluorescent protein*) erfüllt. Donor und Akzeptor sollten nur wenige Nanometer von einander entfernt sein, da die Intensität des FRET-Signals mit der 6. Potenz des Abstands beider Fluorophore r abnimmt. Die Effizienz des Energietransfers E ist ebenso vom Förster-Radius R_0 des Fluorophorenpaars abhängig.

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

[6]

Der Förster-Radius ist der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren, bei dem die Energieübertragung zu 50% erfolgt. Im Falle des Fluorophorenpaars CFP–YFP beträgt der

Förster-Radius 4,9 nm. Da Donor und Akzeptor einen geringen Abstand haben müssen, hat sich FRET als nützliche Methode in der quantitativen Biophysik und -Biochemie erwiesen. So können zum Beispiel Protein-Protein-Wechselwirkungen, Protein-DNA-Wechselwirkungen oder Konformationsänderungen von Proteinen untersucht werden. In dieser Arbeit wurde über CheY- und CheZ-Wechselwirkungen FRET als Antwort auf chemotaktische Stimulation gemessen (Sourjik & Berg 2002a). Dabei wurden *cheY* an *yfp* und *cheZ* an *cfp* fusioniert und vom selben Promotor auf Plasmid pVS88 exprimiert. Durch Bindung von Lockstoffmolekülen kommt es zur Inaktivierung der Histidinkinase, wodurch weniger CheY-P gebildet wird. Infolge einer Reduktion der CheY–CheZ-Wechselwirkungen kann eine Senkung des YFP/CFP-Quotienten beobachtet werden. Eine Verminderung der Lockstoffkonzentration dagegen resultiert in einer Zunahme des YFP/CFP-Verhältnisses. Somit kann die Kinaseaktivität direkt durch Untersuchung des YFP/CFP-Verhältnisses untersucht werden.

Herstellung der Zellpräparate

Alle Stämme, die für FRET Experimente genutzt wurden, trugen das Plasmid pVS88, welches für *cheY-yfp* und *cheZ-cfp* codiert. Die Zellen wurden wie in 2.11.1 angezogen. Deckgläschen (rund, 12 mm Durchmesser) wurden für 20 min mit 40 µl Poly-L-Lysin beschichtet. Nachdem das Poly-L-Lysin entfernt und das Deckgläschen mit H₂O gewaschen worden war, wurde 1 ml der gekühlten Zellsuspension 1 min bei 8000 Rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet im Restvolumen Tethering Puffer resuspendiert. Ein Tropfen von dieser hochkonzentrierten Zellsuspension wurde auf das Deckgläschen pipettiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Zellen in hoher Zahl anhaften konnten. Mit einer Pinzette wurde das Deckglas auf die FRET-Kammer aufgebracht, wobei die Kammer mit Fett luftdicht verschlossen wurde. Sofort nachdem das Deckglas aufgebracht war, wurde die Pumpe gestartet.

FRET Analyse

Die FRET Experimente wurden an einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop durchgeführt. Eine dichte, einlagige Zellschicht aus 500 bis 600 Zellen wurden durch ein 40 x Objektiv (Zeiss Plan – Neofluar 40 x / 0.75) fokussiert und CFP-spezifisch (436 / 20 nm) mittels einer 75 nm Xenon Lampe angeregt. Ein 455 nm dichromatischer Spiegel wurde benutzt, um das Anregungs- und Emissionslicht in zwei Spektren zu teilen. CFP- und YFP-Emissionen wurden durch 480 / 40 nm und 520 nm Emissionsfilter detektiert und die Signale durch Photomultiplier (Hamamatsu photon counting head) verstärkt. Die Daten wurden mittels eines PCI-6034E counting board erfasst und mit LabView7/Template Software ausgewertet. Die Messungen fanden unter ständigem Austausch von Tethering Puffer statt (0,3 ml/min). Ein stabiles YFP/CFP-Verhältnis wurde nach 20 Minuten erreicht (Basisniveau). Bei einem Wechsel von Puffer zu Lockstoff (nicht metabolisierbares α -Methylaspartat (MeAsp) wurde die Pumpe gestoppt und der Schlauch in eine Lockstofflösung getaucht. Die Amplitude des YFP/CFP-Quotienten wurde bei Lockstoffkonzentrationen zwischen 3 μ M und 1 mM gemessen.

Auswertung

FRET ist der Kinaseaktivität äquivalent, und wurde durch folgende Gleichung berechnet:

$$FRET = \frac{\Delta R_{max} - \Delta R}{\frac{\Delta Y}{\Delta C} + R_0 + \Delta R_{max} - \Delta R}$$

[7]

Hierbei ist ΔR_{max} die Änderung des YFP/CFP-Verhältnisses nach Stimulation mit einer sättigenden Konzentration von α -Methylaspartat. Eine spezifische Konstante, $\frac{\Delta Y}{\Delta C}$ (abhängig vom Strahlenteiler 1,1 oder 2,4), stellt das Verhältnis zwischen der Abnahme der YFP- und der Zunahme der CFP-Fluoreszenz bei sättigender Stimulation dar. R_0 ist das YFP/CFP-Verhältnis bei maximaler Stimulation, ΔR ist die Änderung des YFP/CFP-Verhältnisses vor- und direkt nach der Zugabe des Lockstoffes.

3. Ergebnisse

3.1. Proteindynamik und Chemotaxisclusterstabilität

Um die Mobilität und die Austauschraten der Chemotaxisproteine am Rezeptorcluster zu untersuchen wurde eine Technik namens FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) verwendet (s. Abschnitt 2.11.3). In einem typischen FRAP-Experiment wurde die Fluoreszenz eines an YFP fusionierten Chemotaxisproteins in der polaren Region einer *E. coli* Zelle ausgebleicht. Dabei standen N- und C- terminale YFP-Fusionen aller Chemotaxisproteine von *E. coli* zur Verfügung. Durch Aufnahmen der Zellen zu verschiedenen Zeitintervallen konnte die Rückkehr der Fluoreszenz in den gebleichten Bereich berechnet werden. Um die Auswertung zu vereinfachen, wurde zu jedem Zeitpunkt die Fluoreszenzintensität in der gebleichten Region auf die Fluoreszenz der gesamten Zelle normalisiert. Dieses Verhältnis wurde nochmals auf die Fluoreszenz vor dem Bleichen normalisiert, um mehrere Experimente vergleichen zu können (s. Abschnitt 2.11.3.). Wegen der begrenzten Auflösung der Fluoreszenzmikroskopie und der relativ geringen Größe eines Bakteriums wurde immer ein größeres Zellvolumen als nur das Cluster gebleicht (Abb. 3.1.a und c). In Zellen mit Rezeptorcluster wurde folglich eine biphasische Fluoreszenzrückkehr beobachtet: anfangs eine schnelle Rückkehr, durch Diffusion der fluoreszenten Proteine im Zytoplasma, gefolgt von einem langsameren Austausch zwischen am Cluster gebundenen, und zytoplasmatischen Proteinen (Abb.3.1.a, c und e). Der Fluoreszenzrückgang am ungebleichten Pol der Zelle wurde als Kontrolle genutzt und folgte demselben Verlauf, wie die Fluoreszenzrückkehr am gebleichten Zellpol.

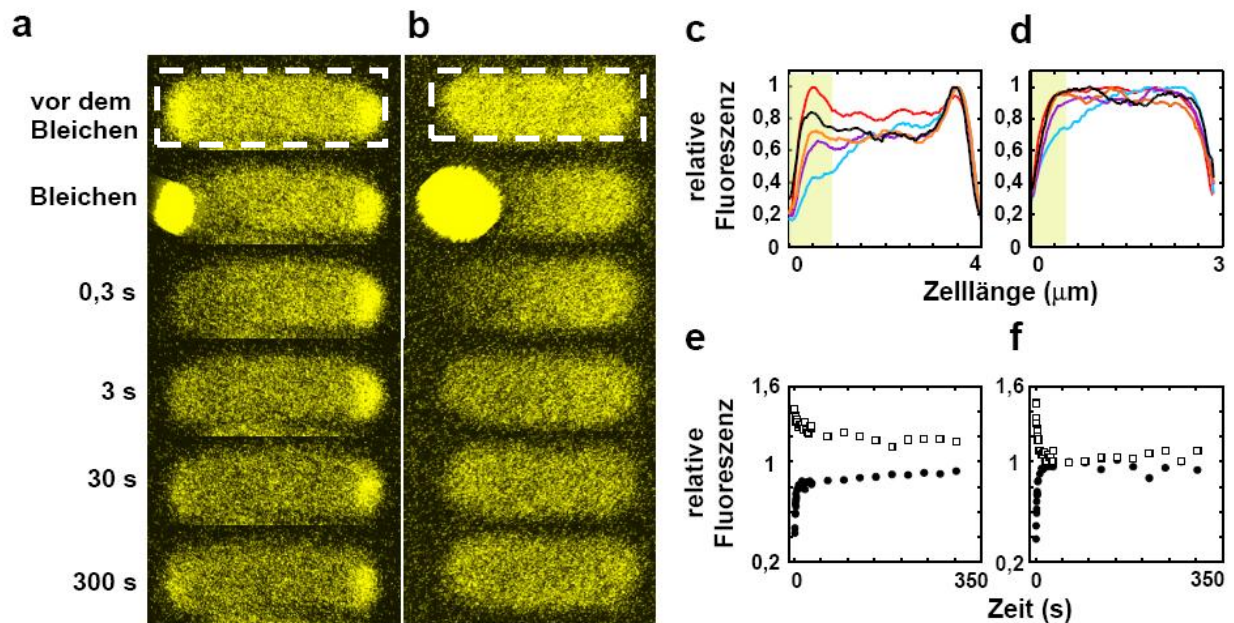


Abb. 3.1. Beispiel eines FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)-Experiments.

FRAP-Messung mit einer CheZ-YFP Fusion in VS102 ($\Delta flgM$) (a) und in VS116 ($\Delta flhC$) (b). Nach einer Aufnahme der Zelle vor dem Bleichen, wurde die polare Region der Zelle mittels zweier starker Laserimpulse gebleicht. Die Fluoreszenzrückkehr wurde über einen Zeitraum von 300 s beobachtet (nur ausgewählte Aufnahmen sind gezeigt). (c und d) Zugehörige Intensitätsprofile von VS102 (c) und VS116 (d) wurden innerhalb eines über die Zelle verlaufenden Streifens gemessen. Hier gezeigt sind die Profile vor dem Bleichen (rot), und 0,3 s (blau), 3 s (lila), 30 s (orange) und 300 s (schwarz) danach. Um die einzelnen Profile vergleichbar zu machen, wurden sie jeweils auf deren maximale Intensität normalisiert. Der gebleichte Bereich ist gelb markiert. (e und f) Die Fluoreszenzrückkehr wurde in der gebleichten Region (schwarze Punkte) und am ungebleichten Pol der Zelle (weiße Quadrate) in VS102 (e) und VS116 (f) untersucht. Die Fluoreszenzintensität in der jeweiligen polaren Region wurde zweimal normalisiert, zunächst auf die Intensität der gesamten Zelle, danach auf die Intensität der Region vor dem Bleichen. Detaillierte Angaben zu Experiment und Analyse sind Abschnitt 2.11.3. zu entnehmen.

3.1.1. Die Austauschdynamik von Chemotaxisproteinen am Rezeptorcluster

Zur Quantifizierung der Bindekinetiken aller Chemotaxisproteine und des Tar-Rezeptors an polaren Rezeptorclustern, wurden Zellen mit zwei unterschiedlichen genetischen Hintergründen verwendet. In VS102 ($\Delta flgM$) ist der Anti-Sigma-Faktor FlgM, deletiert, so dass die negative Transkriptionskontrolle der Chemotaxisproteine entfällt. Der Stamm verfügt zwar über ein funktionales Chemotaxissystem mit korrekter Proteinstöchiometrie, die Proteinexpression aber ist aufgrund der Deletion ungefähr sechsfach erhöht (Kollmann *et al.* 2005). Infolge dessen bilden solche Zellen größere Rezeptorcluster aus, wodurch FRAP-Messungen vereinfacht werden. In VS116 ($\Delta flhC$) werden, aufgrund der Deletion des Transkriptionsaktivators FlhC, keine Chemotaxisproteine exprimiert, d.h. es werden keine Rezeptorcluster ausgebildet, wodurch in FRAP-Messungen ausschließlich die zytoplasmatische Proteindiffusion beobachtet werden konnte (Abb. 3.1.b, d und f). Vor diesem Hintergrund wurden FRAP-Messungen mit YFP-Fusionen aller zytoplasmatischen Chemotaxisproteine und des Aspartat-Rezeptors Tar durchgeführt. In vorausgehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich C- und N-terminale YFP-Fusionen desselben Proteins ähnlich verhalten (s. Anhang, Abb.A.1.), daher wurden mit der Ausnahme von CheA nur die C-terminalen Fusionen genauer untersucht (Abb. 3.2). Vergleichende FRAP-Experimente im Voraus ergaben, dass sich alle getesteten CheA-Varianten (N - und C - terminale YFP-Fusionen von CheA und CheA(s), sowie YFP-CheA ^{$\Delta 258$}) ähnlich verhielten (s. Anhang, Abb.A.2.). Da aber die N-terminal fusionierte, verkürzte Form von CheA, YFP-CheA ^{$\Delta 258$} , die beste Lokalisierung zeigte, wurde diese für genauere Analysen verwendet. Durch den Vergleich der Kurven von VS102 und VS116 konnten bei fast allen Chemotaxisproteinen Diffusion und Austausch am Cluster gut separiert werden. Lediglich CheY bildete eine Ausnahme, dessen Austausch am Cluster sehr schnell erfolgte und von der zytoplasmatischen Diffusion nicht unterscheidbar war (Abb. 3 b-g).

Diffusion von Chemotaxisproteinen

Die im Stamm VS116 gemessene, auf Diffusion beruhende Fluoreszenzrückkehr konnte gut durch die Funktion 4 im Abschnitt 2.11.3. abgebildet werden. Durch den Parameter α wird die anomale Diffusion berücksichtigt (s. unten) (Feder *et al.* 1996). Aus den so ermittelten Halbwertszeiten für die diffusive Fluoreszenzrückkehr ($t_{1/2}$) konnte der effektive Diffusionskoeffizient eines freien Proteins D mit $D \approx 0,07 L^2 / t_{1/2}$ (L = Zelllänge) (Elowitz *et al.* 1999; Konopka *et al.* 2006), für alle untersuchten Proteine ermittelt werden (Tab. 3.1.). Wie erwartet konnte eine umgekehrte Abhängigkeit zwischen Proteingröße und Diffusionskoeffizient festgestellt werden. Die Diffusion des membranständigen Aspartat-Rezeptors war sehr viel langsamer, als die der zytoplasmatischen Chemotaxisproteine. Bei keinem Chemotaxisprotein aber passte die gemessene Fluoreszenzrückkehr zu einem Standard-Diffusions-Modell. Dies deutet darauf hin, dass sich sowohl zytoplasmatische-, als auch membrangebundene Proteine eher durch anomale-, als durch normale Diffusion bewegen. Die anomale Diffusion ist eine durch das mit Makromolekülen dichtbepackte Zytoplasma gebremste Diffusionsbewegung, (Feder *et al.* 1996; Elowitz *et al.* 1999; Weiss *et al.* 2004; Banks & Fradin 2005; Golding & Cox 2006a).

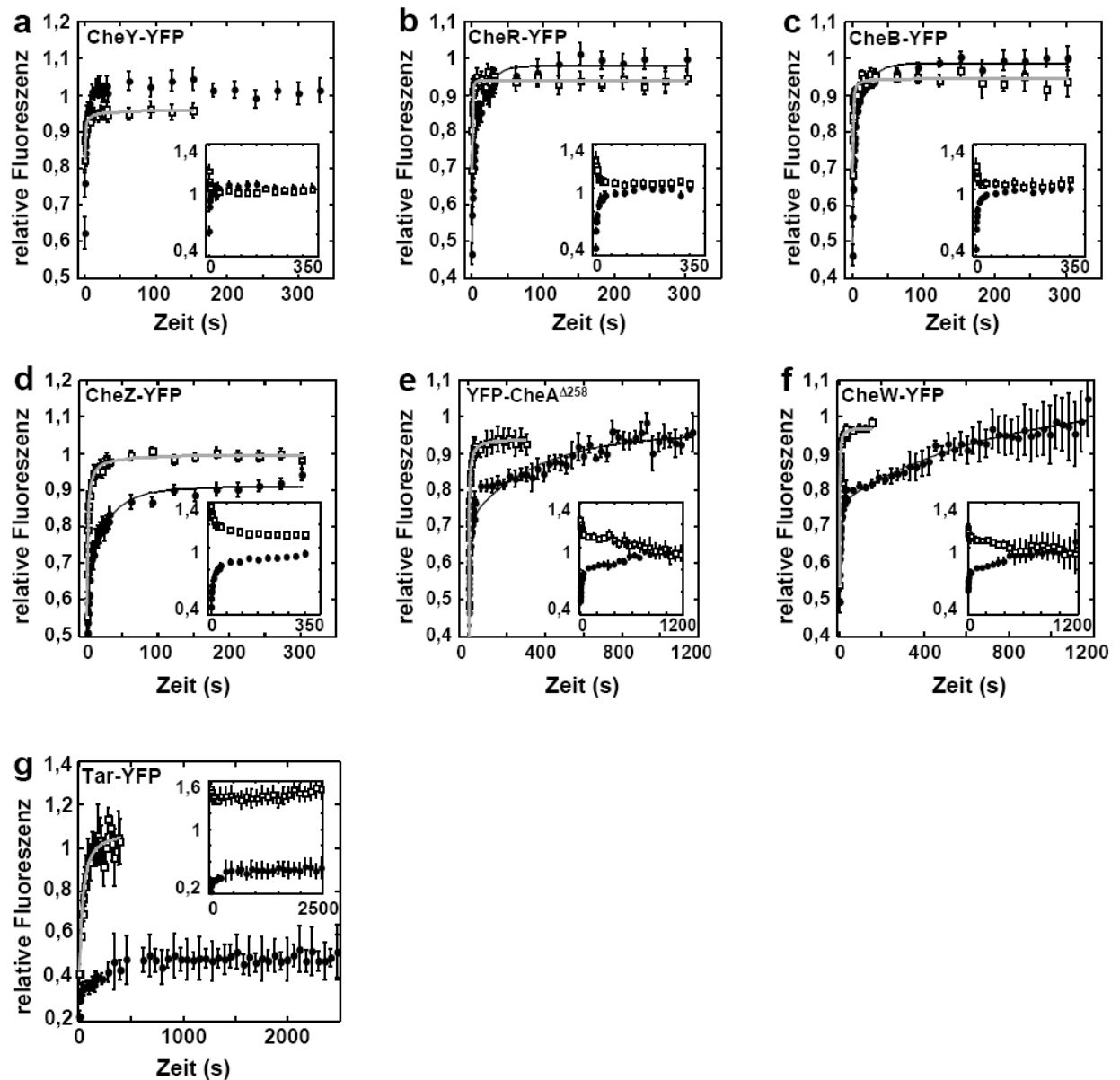


Abb. 3.2. Fluoreszenzrückkehr von Chemotaxisproteinen.

Kinetiken der Fluoreszenzrückkehr in den gebleichten Regionen für YFP-Fusionen an CheY (a), CheB (b), CheR (c), CheZ (d), CheA^{Δ258} (e), CheW (f) und Tar (g) in VS102 (schwarze Kreise) und in VS116 (weiße Quadrate). Gezeigt sind Mittelwerte aus jeweils 7-20 Experimenten; Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Durchgezogene Linien sind Annäherungen an gemessene Daten von VS116 (hellgrau) (s. Funktion 4, Abschnitt 2.11.3) und VS102 (dunkelgrau) (s. Funktion 5, Abschnitt 2.11.3.). Einsätze: Vergleiche der Fluoreszenzrückkehr an gebleichten Clustern (schwarze Kreise) und des Fluoreszenzabfalls an ungebleichten Clustern (weiße Quadrate) in den gleichen Zellen des Stamms VS102.

Der Austausch von Chemotaxisproteinen am Rezeptorcluster

Die Fluoreszenzrückkehr an Rezeptorclustern in VS102 erfolgte, beruhend auf Diffusion und Bindung, biphasisch. Wenn die Proteinbindung sehr viel langsamer ist, als die Diffusion (d.h. der Austausch am Cluster ist von der Bindungsreaktion dominiert), kann die Fluoreszenzrückkehr eindeutig in beide Austauschkomponenten separiert werden. Dabei wird die Bindungsreaktion einem umgekehrten exponentiellen Zerfall gleichgesetzt (Bulinski *et al.* 2001; Sprague *et al.* 2004). Um die gemessenen Daten in VS102 zu berechnen, wurde eine Gleichung verwendet, die Diffusions- und Bindungskinetiken kombiniert (s. Funktion 5, Abschnitt 2.11.3.). Dabei wurden die Werte für $t_{1/2}$ und α den Berechnungen für die Diffusion derselben Fusion in VS116 entnommen. Der Wert τ_{obs} beschreibt die Austauschraten des gebundenen Proteins am Cluster, während die Amplituden von langsamen (F) und schnellen (C) Austauschphasen die Konzentrationen der freien und gebundenen Proteine im Gleichgewicht charakterisieren (Tabelle 3.1.).

Die Austauschzeiten der zytoplasmatischen Chemotaxisproteine ließen sich in drei Kategorien einteilen (Tabelle 3.1.). CheZ, CheA und CheW zeigten die langsamsten Austauschzeiten von ungefähr 5–10 Minuten. Die Adaptationsproteine, CheR und CheB, wurden mit mittlerer Geschwindigkeit von ~15 Sekunden ausgetauscht. CheY wurde so schnell ausgetauscht, dass dessen Bindung an das Cluster nicht von der reinen Diffusion, die in VS116 gemessen wurde, unterschieden werden konnte. Die relativen Konzentrationen von gebundenen und ungebundenen Proteinen waren für alle Fusionen ähnlich. CheY stellte die Ausnahme dar, da auch F und C in diesem Fall nicht berechnet werden konnten. Der membranständige Rezeptor Tar wurde nur partiell ausgetauscht, daher konnten auch hier keine Bindekinetiken berechnet werden. Hier konnte innerhalb eines Zeitrahmens von 30 Minuten eine recht große Fraktion immobilen Proteins beobachtet werden.

Tabelle 3.1. Diffusion und Bindeparameter aller Chemotaxisproteine und Tar.

Proteinfusion	Molekulare Masse (kDa)	$t_{1/2}$ (s) ¹⁾	D ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) ²⁾	F ³⁾	C	τ_{obs} (s) ⁴⁾
CheY-YFP	40,660	$0,61 \pm 0,12$	$1,26 \pm 0,22$	n.d.	n.d.	n.d.
CheW-YFP	44,780	$0,89 \pm 0,04$	$0,86 \pm 0,03$	0,29	0,28	$723,8 \pm 111,0$
CheR-YFP	59,550	$0,40 \pm 0,04$	$1,89 \pm 0,17$	0,24	0,28	$14,7 \pm 1,7$
CheB-YFP	64,170	$0,56 \pm 0,08$	$1,36 \pm 0,18$	0,36	0,18	$16,3 \pm 1,7$
CheZ-YFP	$101,35^5)$	$1,16 \pm 0,06$	$0,66 \pm 0,03$	0,25	0,19	$465,7 \pm 56,5$
YFP-CheAΔ^{258}	$139,17^5)$	$1,21 \pm 0,05$	$0,63 \pm 0,02$	0,12	0,23	$747,7 \pm 236,9$
Tar-YFP	$173,28^5)$	$42,3 \pm 5,7$	$0,018 \pm 0,002$	n.d.	n.d.	n.d.

¹⁾: Berechnet aus den Daten von VS116 durch Funktion 4, Abschnitt 2.11.3.

²⁾: analytischer Schätzwert, berechnet durch $D = 0,07L^2/t_{1/2}$ ($L = 3,3 \mu\text{m}$)

³⁾: Werte für F können unterschätzt sein, da durch die begrenzte Auflösung des konfokalen Mikroskops (0,336 s) schon vor dem ersten Messpunkt, freies Protein in den gebleichten Bereich eindiffundiert sein kann.

⁴⁾: Berechnet aus den Daten von VS102 durch Funktion 5, Abschnitt 2.11.3.

⁵⁾: Größe eines Dimers

3.1.2. Aktivitäts- und Temperaturabhängiger Proteinaustausch

Weitere Experimente wurden durchgeführt, um die Stabilität der Chemotaxiscluster detaillierter zu untersuchen. So wurde bereits gezeigt, dass die Chemotaxisclusterstabilität *in vitro* von der Rezeptoraktivität (Li & Weis 2000) und der Temperatur (Erbse & Falke 2009) abhängig ist. In dieser Arbeit wurde dies *in vivo* mit Hilfe von FRAP-Experimenten geprüft.

Temperaturabhängiger Proteinaustausch

Der temperaturabhängige Proteinaustausch am Chemotaxiscluster wurde am Beispiel der in Abschnitt 3.1.1. beschriebenen YFP-CheA^{Δ258} Fusion in VS102 untersucht. Es wurden FRAP-Experimente, wie in Abschnitt 2.11.3. beschrieben, bei 37°C und 39°C durchgeführt und mit der Fluoreszenzrückkehr bei 20°C (Abschnitt 3.1.1.) verglichen. In Abb. 3.3. sind die Ergebnisse dieses Versuchs abgebildet. Im Gegensatz zu den *in vitro* Ergebnissen wird die Clusterstabilität *in vivo* durch die Temperaturerhöhung auf 37°C und 39°C nicht beeinflusst.

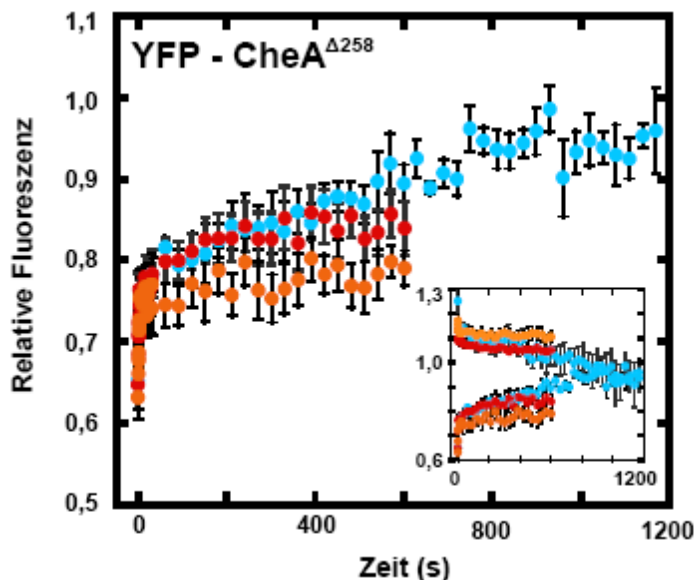


Abb. 3.3. Temperaturabhängiger Austausch von CheA.

Fluoreszenzrückkehr von YFP-CheA^{Δ258} in VS102 bei 20°C (blau), 37°C (orange) und 39°C (rot). Einsatz: Vergleich der Fluoreszenzrückkehr am gebleichten Cluster mit dem Fluoreszenzabfall am ungebleichten Cluster.

Aktivitätsabhängiger Proteinaustausch

Um den Effekt der Rezeptoraktivität auf die Clusterstabilität zu prüfen, wurde die Fluoreszenzrückkehr von YFP-Fusionen an CheW und CheA (Abb. 3.4.a und b) in zwei verschiedenen Stammhintergründen untersucht. Beide Stämme trugen, wie zuvor VS102, eine Deletion des Anti-Sigma-Faktors *flgM*, durch die die Expression der Chemotaxisproteine sechsfach erhöht wird, sowie eine Deletion von CheY und CheZ. Der Stamm LL4 enthält die Adaptationsproteine CheR und CheB. Die Chemotaxisrezeptoren dieses Stammes sind, wie auch im Wildtyp, vorwiegend niedrig methyliert, d.h. sie haben ein niedriges Aktivitätsniveau. Dem Stamm LL5 hingegen fehlen zusätzlich die Adaptationsproteine.. Die Rezeptoren in diesem Stamm liegen daher in ihrem nativen, halbmodifizierten Zustand vor, haben also ein höheres Aktivitätsniveau und können nicht weiter modifiziert werden. In einem weiteren Experiment wurde der Austausch des Aspartat-Rezeptors in vollmodifiziertem Zustand (QQQQ) und im unmodifizierten Zustand (EEEE) ebenfalls in dem Stamm LL5 gemessen (Abb. 3.4. c). Wie Abbildung 3.4. zeigt, konnte tatsächlich durch die Erhöhung der Rezeptoraktivität eine leichte Reduktion des Austauschs für CheW und CheA^{Δ258} am Cluster festgestellt werden. Der Austausch der Rezeptoren selbst schien jedoch nicht von ihrer Aktivität abhängig zu sein.

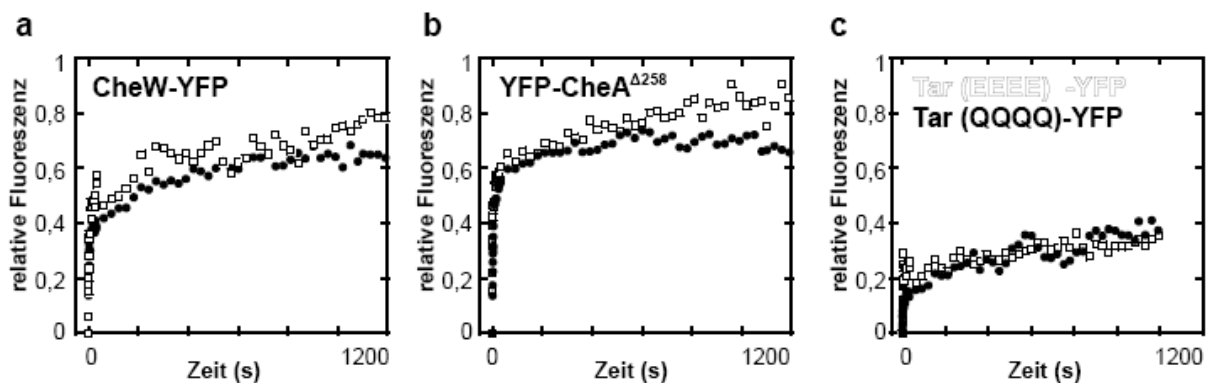


Abb. 3.4. Aktivitätsabhängiger Proteinaustausch am Rezeptorcluster.

Fluoreszenzrückkehr für Fusionen an CheW (a) und CheA (b) an Rezeptoren geringer Aktivität (weiße Quadrate) und Rezeptoren mittlerer Aktivität (schwarze Punkte), sowie in (c) die Fluoreszenzrückkehr des vollmethylierten- (schwarze Punkte), und des unmethylierten Tar-Rezeptors (weiße Quadrate). Wegen erheblicher Schwankungen der Bleichtiefe, wurde der erste Bleichpunkt zusätzlich auf 0 normiert.

3.1.3. Proteinmobilität innerhalb eines Rezeptorclusters

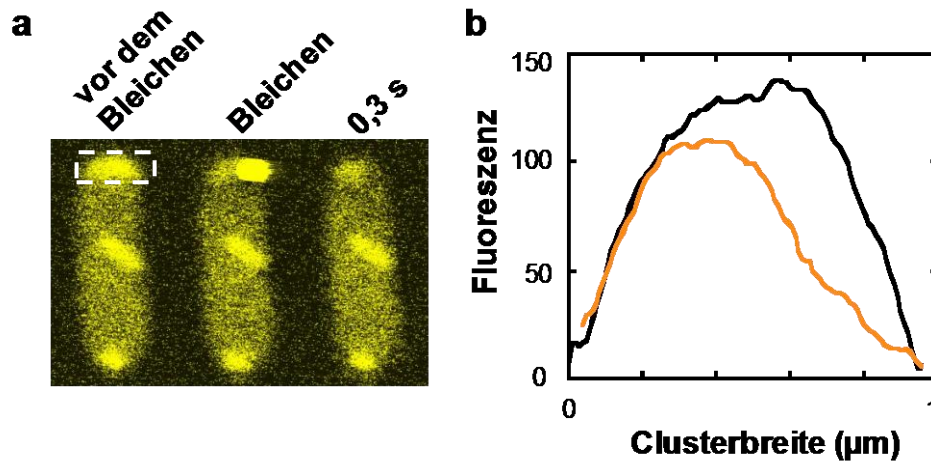


Abb. 3.5. Messung der Proteinmobilität innerhalb eines Chemotaxisclusters.

Bleichung einer CheZ-YFP Fusion in VS102 (a). Für die Auswertung der Proteinmobilität wurden nur Experimente ausgewertet, in denen die Cluster tatsächlich partiell gebleicht wurden. Dazu wurde von jedem gebleichten Cluster ein Intensitätsprofil innerhalb eines quer über das Cluster gezogenen Streifens erstellt. Gezeigt sind die Profile vor- (schwarz) und 0,3 s nach der Bleichung (orange) (b).

In theoretischen Modellen wurde vorgeschlagen, dass CheR durch abwechselnde Bindung seiner zwei Bindestellen in der Lage sein sollte, durch das Rezeptorcluster zu wandern (Levin *et al.* 2002). Da auch CheB über zwei Bindestellen am Chemotaxiscluster verfügt, wurde spekuliert, dass sich auch die Methylesterase durch diesen Mechanismus durch das Chemotaxiscluster bewegt (Banno *et al.* 2004). Theoretisch ist dies auch für das CheZ-Dimer möglich. Um diesem Sachverhalt auf den Grund zu gehen, wurden in dem Stamm VS102 entsprechende YFP-Fusionen exprimiert, um mittels FRAP, die Proteinmobilität innerhalb eines Clusters zu messen. Dazu wurden Chemotaxiscluster nur teilweise gebleicht. Gäbe es eine entsprechende Proteinbewegung innerhalb des Clusters, sollte der Proteinaustausch in partiell gebleichten Clustern wesentlich schneller erfolgen, als in voll gebleichten Clustern. Ein Problem bei diesem Versuchsaufbau war wiederum die begrenzte Auflösung der Fluoreszenzmikroskopie, die geringe Größe einer Bakterienzelle und der kleine Bleichbereich innerhalb eines Clusters. Deshalb wurde immer mehr, als nur der ausgewählte Bereich gebleicht. Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, wurde von jedem vermessenen Cluster ein

Intensitätsprofil erstellt und nur diejenigen ausgewertet, bei denen das partielle Bleichen gelungen war (s. Abb. 3.5. Abschnitt 2.11.3.). Wie in Abb. 3.6. zu sehen, konnte im Vergleich mit voll gebleichten Clustern, weder für CheR noch für CheB oder CheZ eine signifikant schnellere Fluoreszenzrückkehr in partiell gebleichten Clustern beobachtet werden. CheR, CheB und CheZ scheinen somit primär mit freien Proteinen aus dem Zytoplasma auszutauschen und nicht durch die postulierte Wanderung.

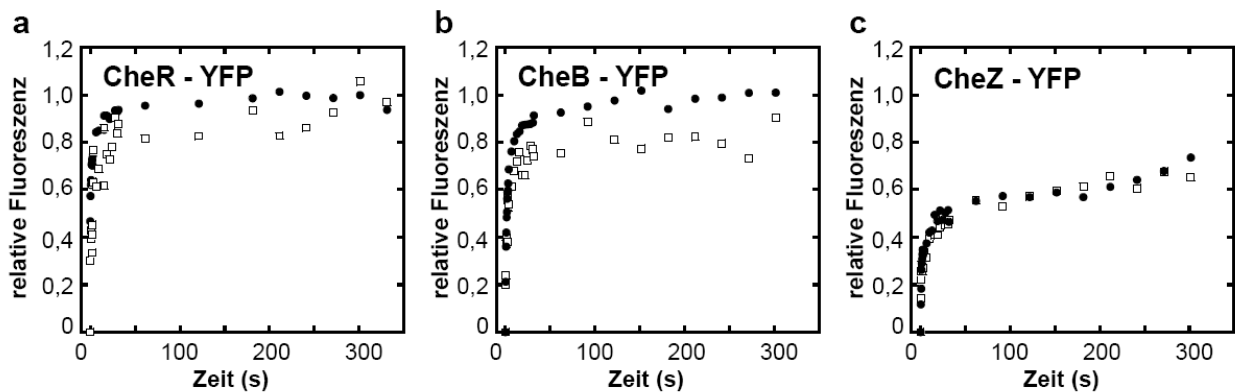


Abb. 3.6. Fluoreszenzrückkehr innerhalb eines Clusters.

Fluoreszenzrückkehr in teilweise gebleichten Regionen (schwarze Kreise) und ganzen Clustern (weiße Quadrate) für YFP-Fusionen an CheR (a), CheB (b) und CheZ (c) in VS102. Gezeigt sind Mittelwerte aus 4 bis 10 Experimenten. Um unterschiedliche Bleichtiefen von partiell- und vollständig-gebleichten Clustern zu kompensieren, wurde der erste Wert nach dem Bleichen auf 0 gesetzt, danach wurde auf die Fluoreszenz vor dem Bleichen normiert.

3.2. Die Funktion der CheB-Phosphorylierung während der Chemotaxis

CheB besteht aus zwei Domänen, die durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Im inaktiven Zustand blockiert die N-terminale, regulatorische Domäne die katalytische Funktion der C-terminalen Domäne. Während der Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung, so dass die katalytische Domäne frei, d.h. das Enzym aktiviert wird. Um die Funktion der CheB-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit drei plasmidcodierte, durch Arabinose induzierbare CheB-Versionen verwendet: Wildtyp CheB, eine Phosphorylierungsmutante (CheB^{D56E}), die weniger aktiv ist, und die verkürzte CheB-Version, CheB_c. Letztere besteht lediglich aus der katalytischen Domäne und ist aufgrund des Fehlens der regulatorischen Domäne konstitutiv aktiv. Ebenfalls fehlt die in der N-terminalen Domäne enthaltene Hauptbindestelle an den Rezeptor-Kinase-Komplex (Abb 3.7.a). In Vorversuchen wurde die Konzentration der jeweiligen CheB-Versionen unter ansteigenden Induktionsniveaus ermittelt. Dazu wurde der Stamm VS179 mit einem Plasmid, das jeweils eine der CheB-Versionen codiert, transformiert, mit verschiedenen Arabinose-Konzentrationen induziert und wie in Abschnitt 2.11.1. beschrieben, präpariert. Danach wurden mit Western-Blots die Konzentrationen der plasmidcodierten CheB-Versionen bei gegebenen Induktionsniveaus relativ zur Konzentration des chromosomal codierten CheB quantifiziert. Die Expression der Phosphorylierungsmutante ist, im Vergleich mit der des plasmidcodierten Wildtyp-CheB, stark erhöht. Die CheB_c-Menge dagegen ist selbst bei hohen Induktionsniveaus stark herabgesetzt (s. Abb. 3.7.b).

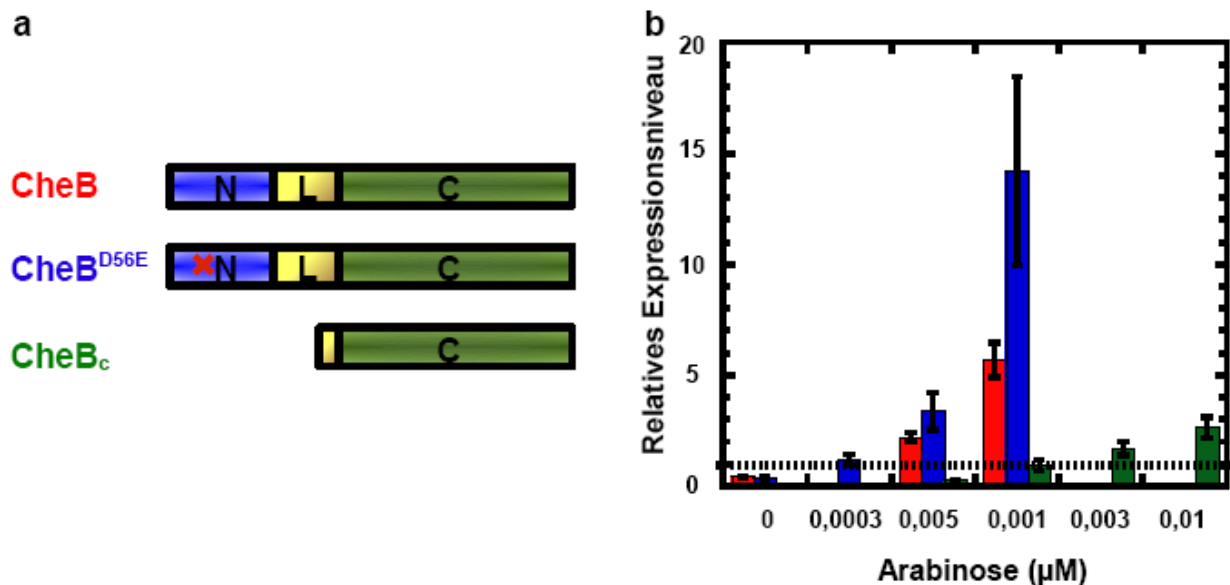


Abb. 3.7. Quantifizierung von CheB, CheB^{D56E} und CheB_c.

Drei plasmidcodierte, durch Arabinose induzierbare Versionen von CheB wurden verwendet (a). Wildtyp-CheB (oben), CheB^{D56E} (mittig), dessen Asp-56 durch Glutamat substituiert wurde (rotes Kreuz), sowie CheB_c (unten), bestehend aus der katalytischen Domäne. Mit Hilfe von Western Blots wurde die Menge des jeweiligen Konstrukts bei ansteigenden Induktionsniveaus bestimmt (b). Dabei wurde Wildtyp-CheB (rot), CheB^{D56E} (blau) und CheB_c (grün) relativ zur Menge von chromosomal codiertem CheB (gestrichelte Linie) berechnet.

3.2.1. Effekt der CheB-Phosphorylierung auf die Rezeptordemethylierung

Um den Einfluss der CheB-Phosphorylierung auf die Rezeptormodifikation zu untersuchen, wurden wie in Abschnitt 2.10. und 2.11.1. beschrieben, die Modifikationszustände einer Tar-Rezeptorpopulationen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western Blots visualisiert. Dabei wurde die Demethylierungs-Kompetenz jedes CheB-Konstrukts unter verschiedenen Induktionsniveaus in dem Stamm VS179 untersucht (Abb. 3.8). In dem verwendeten Bakterienstamm war chromosomales CheB, sowie der primäre Responseregulator CheY und seine zugehörige Phosphatase CheZ, sowie der Hauptrezeptor Tsr, der ebenfalls von dem verwendeten Tar-Antikörper erkannt wird, deletiert. Zur Identifikation der verschiedenen Modifikationszustände von nativem Tar standen Kontrollen mit fixierten Modifikationszuständen zur Verfügung. Während Glutamatreste (E)

unmethylierte Modifikationsstellen repräsentierten, mimikrierten Glutaminreste (Q) methylierte Modifikationsstellen, d.h. sie haben denselben Effekt auf die Rezeptorfunktion wie methylierte Glutamatreste (Dunten & Koshland 1991). Die verwendeten Stämme hierfür waren VS144 für Tar (EEEE), VS 141 für Tar (QEEE), VS148 für Tar (QEQE), VS150 für Tar (QEQQ) und SB1 für Tar (QQQQ). Die Verteilung der Methylierungszustände von nativem Tar wich jedoch von den fixierten Kontrollen ab: zwischen dem einfach- und doppelt methylierten Zustand erschien eine Bande, deren zugehörige Rezeptoren möglicherweise Methylierungen an anderen Modifikationsstellen, als QEQE trugen.

Abb. 3.8. zeigt die Ergebnisse dieser Versuche. Aus den Western Blots (Abb. 3.8.a) ist ersichtlich, dass alle drei Konstrukte zur Demethylierung der Rezeptoren fähig waren. Dies belegt, dass die CheB-Phosphorylierung für die Rezeptordemethylierung nicht notwendig ist. Da sich die Expressionslevel von CheB, CheB^{D56E} und CheB_c bei gleichen Induktionsniveaus stark unterscheiden (s.o.), wurden mittlere Methylierungszustände errechnet und den zuvor ermittelten Expressionsniveaus der drei CheB-Konstrukte gegenübergestellt (Abb. 3.8.b). Dieser Vergleich zeigt, dass Wildtyp-CheB kompetenter ist und Tar-Rezeptoren effizienter in niedrigere Methylierungszustände versetzen kann, als die anderen beiden Konstrukte. CheB_c fehlt die N-terminale Domäne, also die Hauptbindestelle an die P2-Domäne von CheA und zeigte ähnliche Beeinträchtigungen wie das nicht phosphorylierbare, konstitutiv inaktive CheB^{D56E}, wobei die Aktivität von CheB_c noch etwas stärker herabgesetzt war. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die CheB-Phosphorylierung einen relativen Effekt auf die Esterase-Aktivität ausübt. Bei gleicher CheR-Konzentration wurde im Vergleich zu CheB^{D56E} und CheB_c eine geringere Konzentration des voll funktionsfähigen CheB benötigt, um gleiche Methylierungsniveaus zu erreichen.

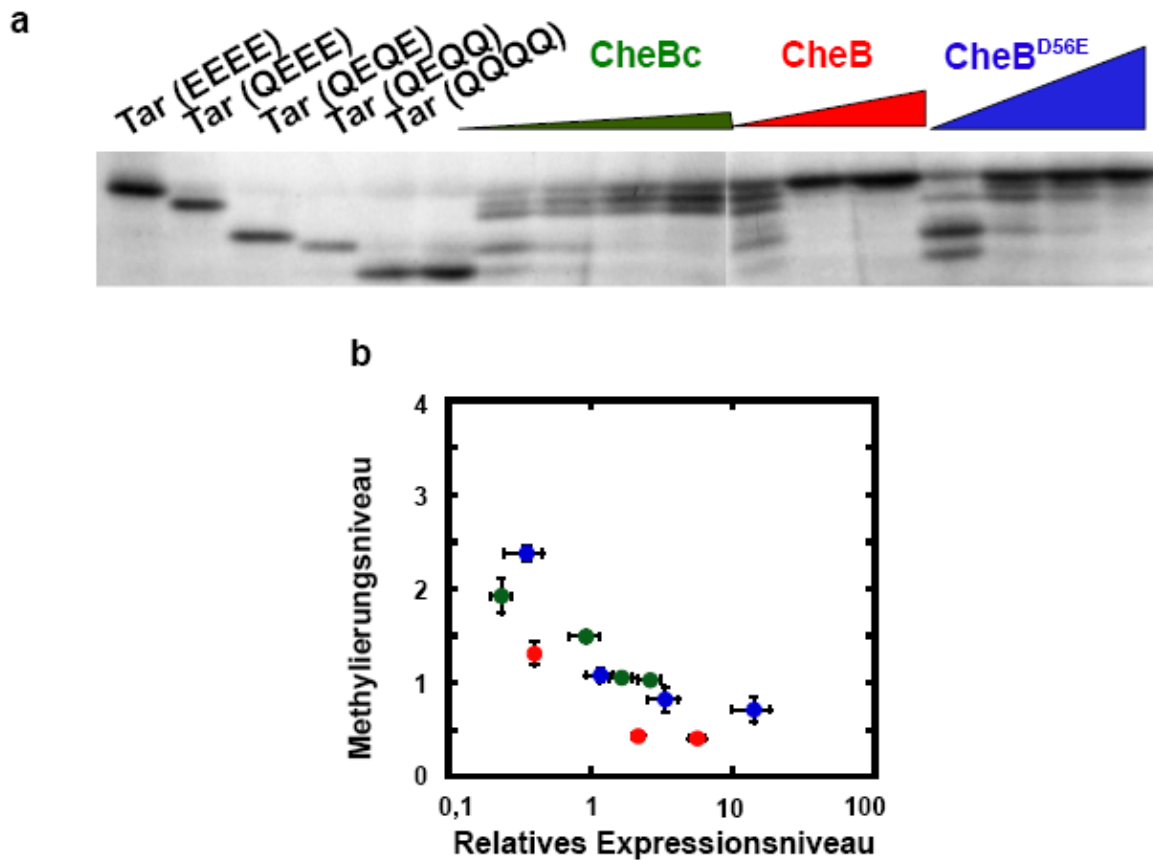


Abb. 3.8. CheB-Phosphorylierung und Rezeptordemethylierung.

(a) Repräsentativer Western Blot der Tar-Methylierungszustände unter Einfluss von CheB_c (grün), CheB (rot) und CheB^{D56E} (blau). Die Dreiecke über den Proben stellen die jeweiligen Expressionsniveaus unter ansteigender Arabinose-Induktion dar. Als Kontrolle dienten Tar-Rezeptoren in fixierten Modifikationszuständen, wobei Glutamat (E) eine unmodifizierte Modifikationsstelle repräsentiert und Glutamin (Q) einer methylierten Modifikationsstelle äquivalent ist. Die Entwicklung erfolgte hier mit einem Esel- α -Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat und ECL. (b) Demethylierungskompetenz von CheB (rot), CheB^{D56E} (blau) und CheB_c (grün) unter ansteigenden Expressionsniveaus.

3.2.2. Die CheB-Bindung am Chemotaxiscluster

Um den Einfluss der CheB-Phosphorylierung auf die CheB Bindung am Chemotaxiscluster zu untersuchen, wurden FRAP-Experimente (s. Abschnitt 2.11.3.) mit an YFP fusionierten CheB-Mutanten durchgeführt. In dieser Versuchsreihe wurden Wildtyp-CheB, die Phosphorylierungsmutante CheB^{D56E}, sowie eine katalytische Mutante, CheB^{S164C}, verwendet. In letzterer wurde durch den Austausch des Codons 164 die enzymatische Aktivität eliminiert (West *et al.* 1995). Bei diesen FRAP-Messungen wurden die Austauschraten der CheB-Konstrukte in dem Stamm LL5 gemessen. Diesem fehlen unter anderem die Adaptationsproteine CheR und CheB, sowie der Anti-Sigma-Faktor FlgM, (s. Abschnitt 3.1.2.). Nach Bleichung der Cluster und der Berechnung der Fluoreszenzrückkehr, wurden die Austauschraten wie in Abschnitt 2.11.3. berechnet. Dieser Berechnung wurden die in Abschnitt 3.1.1. ermittelten Diffusionskonstanten für $t_{1/2}$ und α zugrunde gelegt. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Fehlen der Phosphorylierung in der CheB^{D56E}-Mutante zu einer Beschleunigung der Austauschrate am Cluster führt, d.h. die CheB-Bindung am Rezeptorcluster scheint durch die CheB Phosphorylierung stabilisiert zu werden, was in unserem Labor auch durch FRET-Experimente gezeigt werden konnte (Kentner & Sourjik 2009). Die Mutation S164C im katalytischen Zentrum von CheB verursachte eine vergleichbare Beschleunigung der Austauschrate. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch das katalytische Zentrum an der Clusterbindung beteiligt ist (Abb. 3.9.).

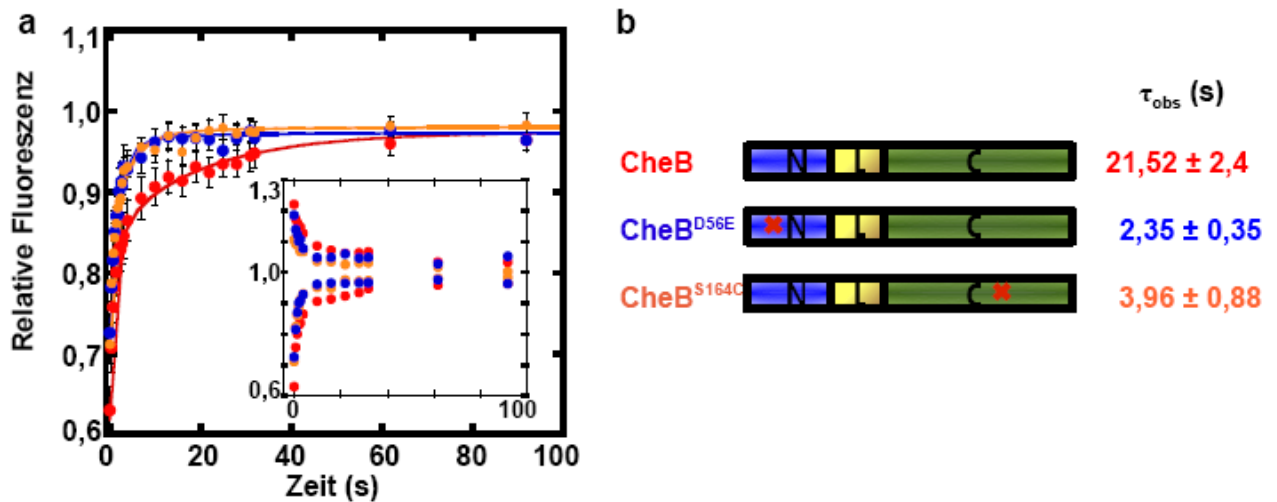


Abb. 3.9. Untersuchung der CheB-Bindung am Chemotaxiscluster.

(a) Fluoreszenzrückkehr von CheB (rot), CheB^{D56E} (blau) und CheB^{S164C} (orange). Einsatz: Vergleich der Fluoreszenzrückkehr am gebleichten Cluster und des Fluoreszenzabfalls am ungebleichten Cluster in den gleichen Zellen des Stammes LL4. (b) Das Bindeverhalten wurde unter Verwendung von YFP-Fusionen von CheB (oben), der Phosphorylierungsmutante CheB^{D56E} (mittig) und der katalytischen Mutante CheB^{S164C} (unten) untersucht und anhand der Austauschraten am Cluster (τ_{obs}) quantifiziert.

3.2.3. Der Effekt der CheB-Phosphorylierung auf die Sensitivität

In Zusammenarbeit mit Thomas S. Shimizu (Harvard University) wurde der Effekt der CheB-Phosphorylierung auf die chemotaktische Antwort *in vivo* untersucht. Dazu wurden FRET-Messungen wie in Abschnitt 2.11.4. beschrieben, durchgeführt. Auch hier wurde der Stamm VS179 mit plasmidcodiertem CheB, -CheB^{D56E} oder -CheB_c, transformiert. Um den Effekt der CheB-Phosphorylierung zu quantifizieren, wurden Dosis-Wirkung-Kurven jedes Konstrukts bei steigender Arabinose-Induktion erstellt (Abb. 3.11.a-c) und die Sensitivität jeder Antwort errechnet. Je niedriger die erkannte Lockstoffkonzentration, desto höher ist die Sensitivität. Mathematisch formuliert ergibt sich damit die Sensitivität aus $1/K_{1/2}$, wobei $K_{1/2}$ die Lockstoffkonzentration bei halbmaximaler Kinase-Aktivität darstellt. Die Sensitivität wurde den vorher bestimmten, zugehörigen Methylierungsniveaus jedes Stammes gegenübergestellt (s. Abschnitt 3.2.1.), woraus sich eine umgekehrte Korrelation beider Werte feststellen ließ. Je höher die Sensitivität war, desto niedriger war der zugehörige Methylierungszustand. Außerdem konnte beobachtet werden, dass sich die Sensitivität für alle

CheB-Konstrukte bei ähnlichen Methylierungszuständen nicht signifikant unterschieden (Abb. 3.10.d). Obwohl CheB^{D56E} und CheB_c weniger aktiv waren, konnte gezeigt werden, dass die CheB-Phosphorylierung auch nicht für die Sensitivität der chemotaktischen Antwort benötigt wird.

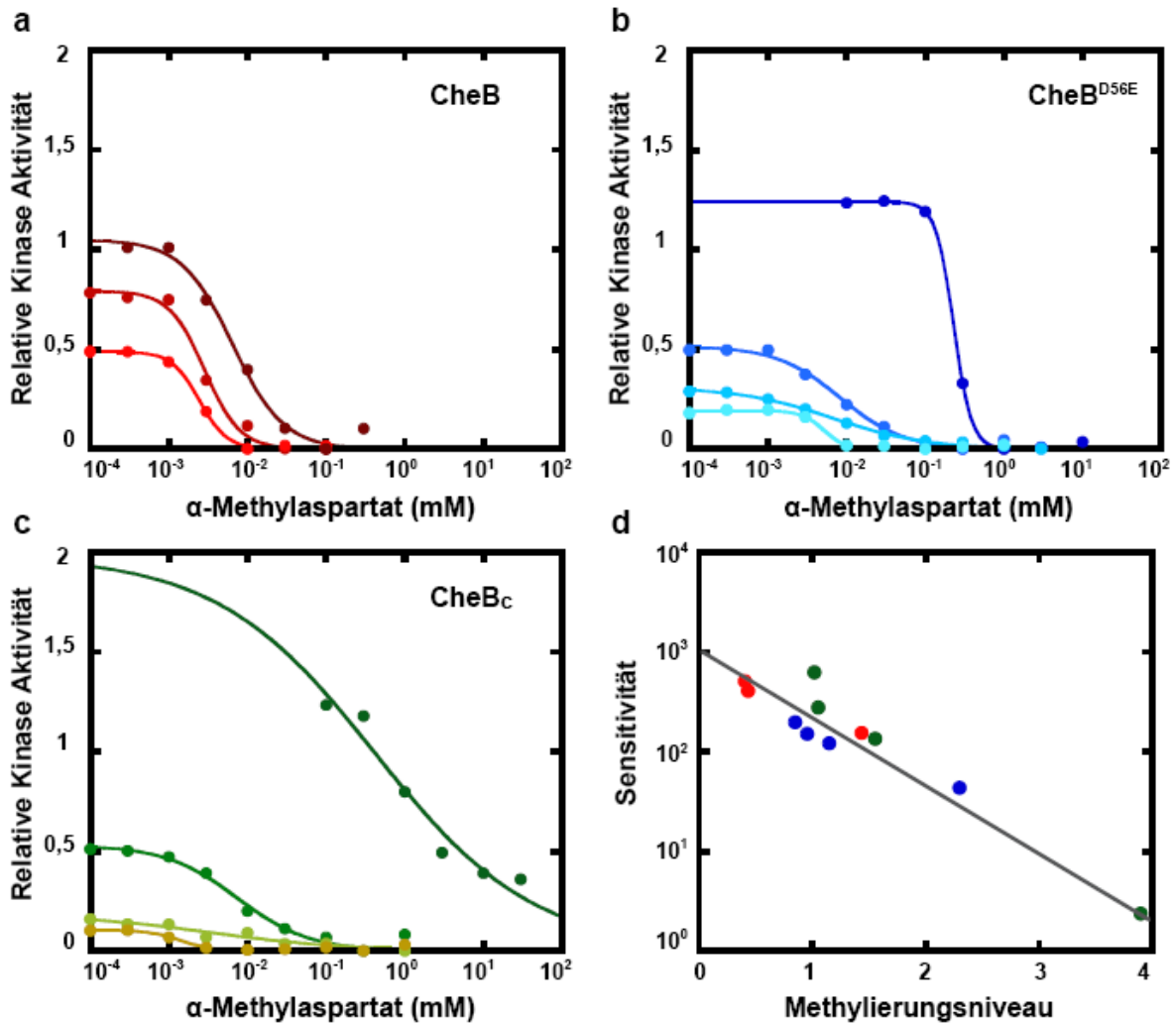


Abb. 3.10. Effekt der Phosphorylierung auf die Sensitivität der chemotaktischen Antwort.

In VS179 ($\Delta cheB$) wurden CheB (a), CheB^{D56E} (b) und CheB_c (c) exprimiert. Mit Hilfe eines FRET-Reporters für Kinaseaktivität (s. Abschnitt 2.11.4.) wurden Dosis-Wirkungs-Kurven bei steigenden Induktionsniveaus erstellt. Steigende Induktionsniveaus sind hier mit heller werdenden Farben gekennzeichnet. Die Sensitivität wurde als $1/K_{1/2}$ berechnet, wobei $K_{1/2}$ die Lockstoffkonzentration bei halbmaximaler Kinase Aktivität darstellt. (d) Die Sensitivität wurde den zuvor berechneten Methylierungsniveaus gegenübergestellt. Rot: CheB; blau: CheB^{D56E}; grün: CheB_c. Graue Linie: Korrelation zwischen Methylierungsniveau und Sensitivität.

3.2.4. Die Physiologische Funktion der CheB-Phosphorylierung

Da in vorausgehenden Versuchen gezeigt werden konnte, dass die CheB-Phosphorylierung weder für die Demethylierung der Rezeptoren, noch für die Sensitivität der chemotaktischen Antwort benötigt wird, wurde die physiologische Funktion der CheB-Phosphorylierung für die Chemotaxis untersucht. Dazu wurden Schwärmlatten-Experimente mit ansteigenden Induktionsniveaus der plasmidcodierten CheB-Versionen (CheB, CheB^{D56E} oder CheB_c) in dem Stamm VS185 (*tsr cheB*⁻) durchgeführt (s. Abschnitt 2.11.2.). Als Kontrollen wurden mit leerem Vektor transformierte VS185-Zellen, sowie HCB268-Zellen verwendet. Letztere tragen ebenfalls eine Deletion in *tsr*, exprimieren aber chromosomal codiertes CheB. Die Größe aller durch die CheB-Konstrukte entstandenen Schwärmrings wurde gemessen und relativ zu denen beider Kontrollen berechnet (Abb. 3.11.). Um sich in Weichagar auszubreiten, muss ein Bakterium chemotaktisch sein, und über ein funktionales Adaptationssystem verfügen. Die Ergebnisse dieses Tests zeigten eindeutig, dass letztlich jedes CheB-Konstrukt Schwärmen in einer Weichagarplatte vermittelte. Somit konnte demonstriert werden, dass die CheB-Phosphorylierung auch für die Adaptation der chemotaktischen Antwort nicht notwendig ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CheB über einen weiten Expressionsbereich effektives Schwärmen vermittelt, CheB^{D56E} und CheB_c dagegen nur bei ein- bis zwei Induktionsniveaus. Dies lässt darauf schließen, dass die CheB-Phosphorylierung eine Robustheit gegenüber Schwankungen der eigenen zellulären Konzentration bewirkt.

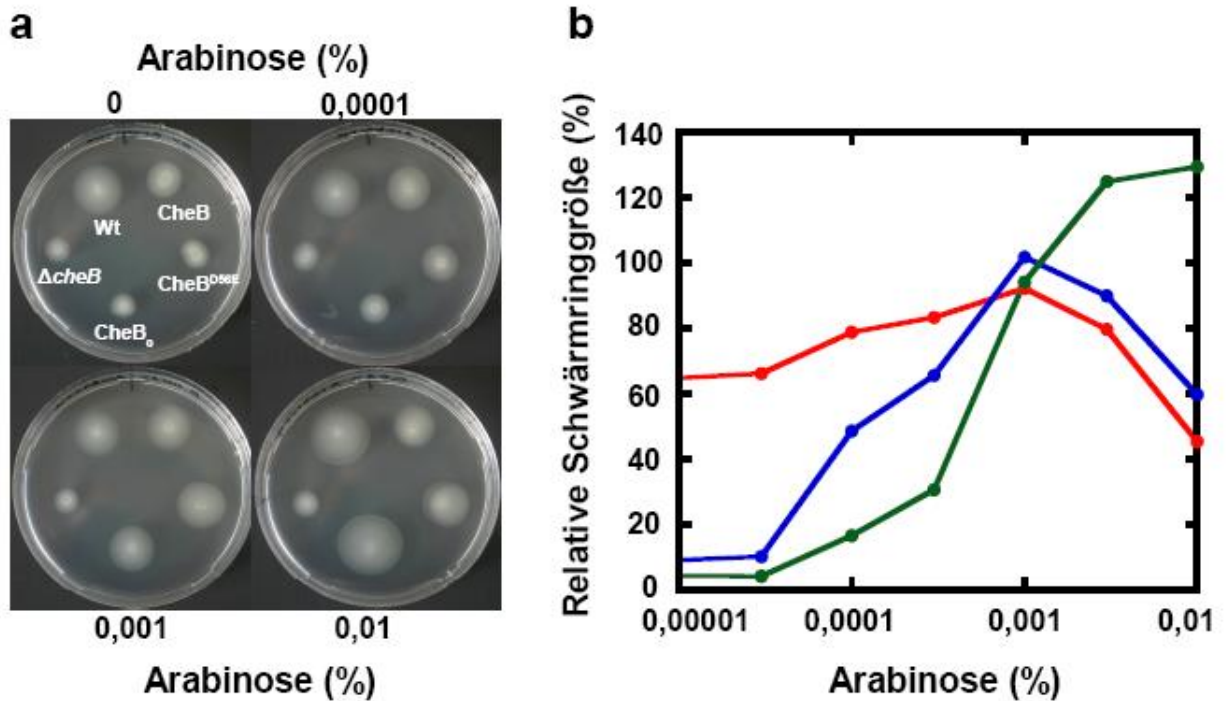


Abb. 3.11. CheB-Phosphorylierung in der Chemotaxis.

(a) Schwärmfähigkeit auf Weichagarplatten vermittelt durch plasmidcodiertes CheB, -CheB^{D56E} und -CheB_c, sowie durch chromosomal codiertes CheB (Wt) und $\Delta cheB$ (Negativkontrolle). Gezeigt sind repräsentative Schwärmlatten ausgewählter Induktionsniveaus, auf denen jeweils die Stämme in gleicher Reihenfolge aufgetragen wurden. (b) Die Größe der Schwärminge bei steigenden Induktionsniveaus von plasmidcodiertem CheB (rot), -CheB^{D56E} (blau), sowie -CheB_c (grün) relativ zu denen der Kontrollen $\Delta cheB$ und Wt.

3.3. Charakterisierung der lockstoffinduzierten Rezeptormethylierung

Die Rezeptormethylierung ist ein essentielles Element der chemotaktischen Antwort, da sie die Adaptation ermöglicht. Biochemische Daten deuten außerdem darauf hin, dass sie die Signalgebung zusätzlich beeinflussen kann, wie durch Stabilisierung der Bindung zwischen Rezeptoren, CheA und CheW (Li & Weis 2000)(Abschnitt 3.1.2.), Steigerung der Affinität für den entsprechenden Lockstoff, sowie durch Steigerung der Kooperativität zwischen den Rezeptoren (Bornhorst & Falke 2000). Um den Effekt der Rezeptorkopplung auf die Rezeptormethylierung genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Methylierungszustände von Rezeptorenpopulationen elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert (s. Abschnitte 2.10.1., 2.10.3. und 2.11.1). Rezeptoren hoher Modifikationszustände laufen im Gel schneller als Rezeptoren niedriger Modifikationszustände. Die Neutralisierung negativer Ladungen durch Methylierung erhöht die SDS-Bindung, was zu einer Steigerung des Ladung-Masse-Verhältnisses relativ zu demethylierten Rezeptoren, und daher zu einer Erhöhung der Mobilität im SDS-Gel führt (Boyd & Simon 1980).

3.3.1. Der Effekt der Rezeptorcluster auf das Methylierungsverhalten

Der Effekt der Rezeptorclusterbildung auf die Geschwindigkeit der Rezeptormethylierung wurde anhand des Rezeptors Tsr untersucht. Dazu wurde die mit der Zeit zunehmende Tsr-Methylierung infolge einer Lockstoffstimulation in *E. coli*-Zellen mit und ohne Rezeptorcluster untersucht. Da sowohl Tsr als auch Tar von dem verwendeten Antikörper erkannt werden und das Bandenmuster beider Hauptrezeptoren in SDS-Gelen nicht separierbar ist, wurden die Stämme VS172 und HCB1262 verwendet, in denen *tar* deletiert ist. Beide Stämme tragen außerdem Deletionen in CheR, CheB, CheY und CheZ. Im Gegensatz zu VS172 bildet HCB1262 keine Rezeptorcluster aus, da ihm zusätzlich CheA und CheW fehlen. Um die Modifikation der Rezeptoren zu gewährleisten, wurden in beiden Stämmen die Adaptationsenzyme von Plasmiden exprimiert. Statt CheB wurde hier CheB_c verwendet, da es nicht an CheA binden kann. Die optimalen Induktionsniveaus von 0,01% Arabinose für CheR und 30 µM IPTG für CheB_c wurden vorher in Schwärmplatten-

Experimenten ermittelt. Die Rezeptormethylierung wurde durch die Zugabe von 1 mM Serin induziert. Da nicht metabolisierbare Serin-Analoga keinen Effekt auf die Rezeptormethylierung hatten (Anhang, Abb.A.3.), wurde L-Serin verwendet, das aufgrund seiner kontinuierlichen Verstoffwechslung, minütlich zugegeben werden musste. Als Tsr-Standard wurden Tsr-Rezeptoren in fixierten Modifikationszustängen verwendet (s. Abschnitt 3.2.1.). Diese waren Tsr (EEEE) exprimiert von pVS362, Tsr (QEEEE) exprimiert von pVS356, Tsr (QEQEE) aus dem Stamm VS172, Tsr (QQQEE) exprimiert von pVS361, Tsr (QQQQE) exprimiert von pVS363 und Tsr (QQQQQ) exprimiert von pVS502. Wie bereits für Tar beschrieben, wich auch hier die Verteilung der tatsächlichen Methylierungszustände von denen der fixierten Kontrollen ab.

Das Methylierungslevel der Tsr-Population wurde vor der Lockstoffzugabe, sowie 30, 60, 180, 360 und 600 Sekunden danach durch Western Blots bestimmt (Abb. 3.12.a). Nach der Quantifizierung der Bandenintensitäten wurde das mittlere Modifikationsniveau zu jedem gemessenen Zeitpunkt berechnet (s. Abschnitt 2.10.6.). Das mittlere Methylierungsniveau geclusterter Rezeptoren in dem Stamm VS172 war schon vom Beginn an höher (1,9), als das ungeclusterter Rezeptoren in HCB1262 (1,4) und erreichte auch nach 600 Sekunden ein höheres Niveau (3,9 im Vergleich zu 2,8). In beiden Fällen stieg das Methylierungsniveau in den ersten 3 Minuten linear und wurde danach langsamer. Die Methylierungsgeschwindigkeit V ergab sich aus der Steigung der linearen Anteile der Kurven und betrug für ungeclusterte Rezeptoren (in HCB1262) 0,0035 Meth/R/s (Methylierungen pro Rezeptor pro Sekunde) und für geclusterte Rezeptoren (in VS172) 0,006 Meth/R/s (Abb 3.12.b). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Clusterbildung die Rezeptormethylierung um ~40% beschleunigt wird.

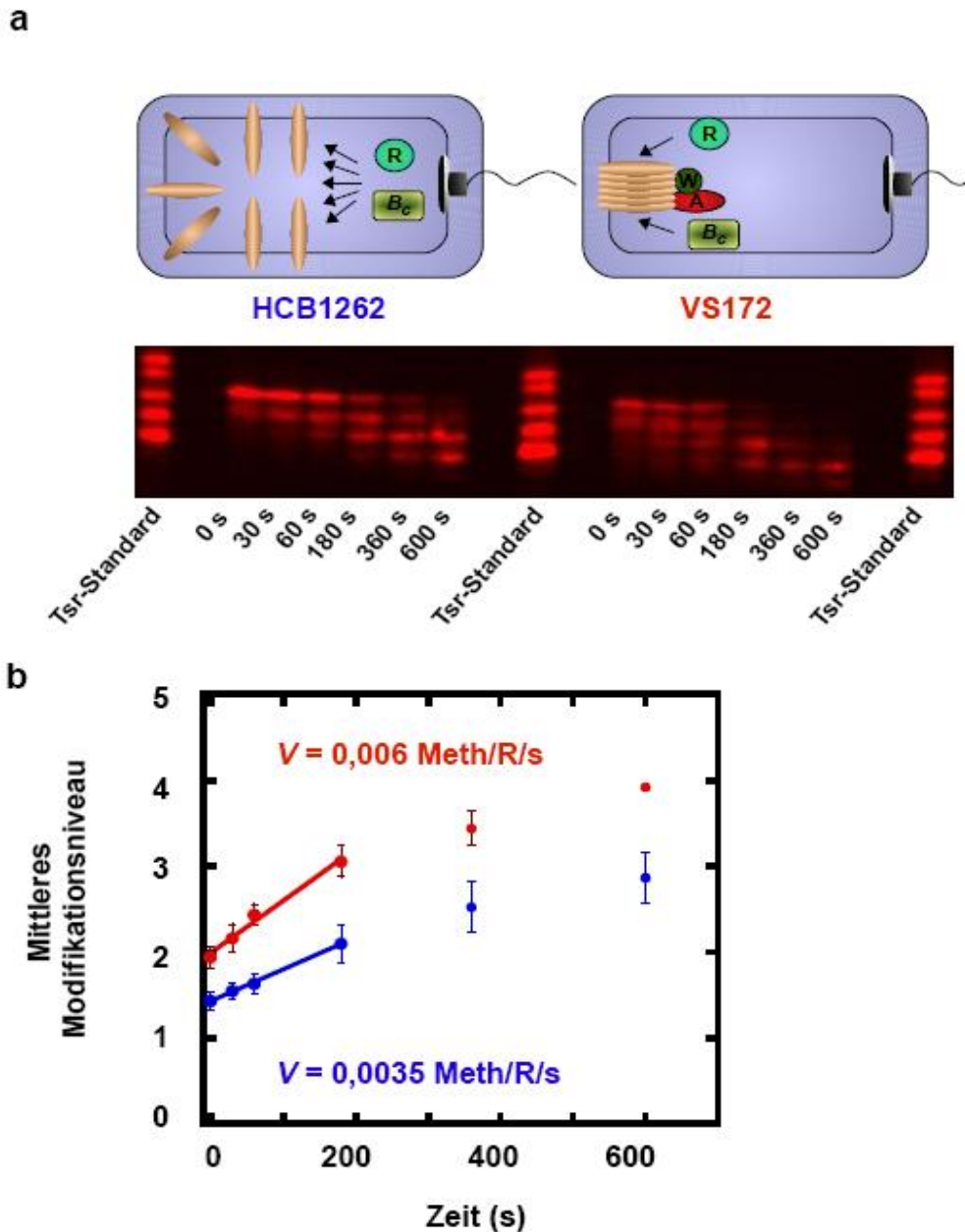


Abb. 3.12. Tsr-Methylierung.

a) Repräsentativer Western Blot der zeitlichen Tsr-Methylierung in HCB1262 (ohne Rezeptorcluster) und in VS172 (Rezeptoren organisiert in Clustern). Rezeptoren wurden mit Kaninchen- α -Tsr_c und Ziege- α -Kaninchen IgG IRDye®700DX Konjugat (Rockland, USA) markiert, mit einer Wellenlänge von 700 nm angeregt und aufgenommen. (b) Ausgehend von 3 Western Blots wurde das mittlere Modifikationsniveau jedes Zeitpunkts errechnet und die Methylierungsgeschwindigkeit V in HCB1262 (blau) und VS172 (rot) bestimmt (s. Abschnitt 2.10.6.).

3.3.2. Kreuzmethylierung an Rezeptorclustern

Um die Kreuzmethylierung von Rezeptoren verschiedener Spezifität in einem heterogenen Rezeptorcluster zu untersuchen, wurden wie oben beschrieben, Western Blots verwendet. Eine Kreuzmethylierung kommt zustande, wenn eine Stimulation durch einen bestimmten Lockstoff nicht nur die Methylierung des spezifischen Rezeptors verursacht, sondern auch die von Rezeptoren anderer Subtypen. Dies kann durch funktionell gekoppelte Rezeptoren geschehen, die die Aktivität ihrer Nachbarn beeinflussen, aber auch durch Kumulation von CheR-Proteinen am Rezeptorcluster. In einleitenden Kontrollexperimenten konnte gezeigt werden, dass es experimentell möglich war, die Methylierung des Tar-Rezeptors durch α -Methylaspartat, sowie die des Tsr-Rezeptors durch L-Serin zu visualisieren (Abb. 3.13.). Eine Kreuzmethylierung von Tsr durch α -Methylaspartat, sowie eine Methylierung von Tar durch L-Serin in einem heterogenen Rezeptorcluster hingegen konnte ausgeschlossen werden (Abb. 3.14).

Lockstoffinduzierte zeitliche Verschiebungen der Rezeptormethylierung wurden in dem Stamm HCB42 gemessen, der beide Hauptrezeptoren, den Aspartat-Rezeptor Tar und den Serin-Rezeptor Tsr, exprimiert. Die schon oben beschriebenen Tsr- und Tar- Kontrollen wurden ebenfalls auf die Gele aufgetragen. Der α -Tar-Antikörper erkannte beide Hauptrezeptoren wegen großer Sequenzhomologie und konnte daher zur simultanen Visualisierung der Methylierungsprofile beider Rezeptoren als Antwort auf Stimulationen mit L-Serin und α -Methylaspartat verwendet werden. Auch in diesem Stamm wurden CheB_c und CheR von Plasmiden exprimiert. In vorausgehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Rezeptormethylierung in Zellen die CheB oder CheB_c exprimierten qualitativ ähnlich verlief (Anhang, Abb. A.4.), daher wurde nur die Rezeptormethylierung durch CheB_c Expression genauer untersucht. In Abb. 3.15. sind die Ergebnisse dargestellt. Für jeden Zeitpunkt wurden Intensitätsprofile erstellt. Ein Problem war, dass sich hochmethylierte Tsr-Banden mit den niedrigmethylierten Tar-Banden überschneiden. Daher konnten in der Auswertung nur die in Abb. 3.15 a) und b) grau eingefärbten Bereiche berücksichtigt werden, die eindeutig einem Rezeptor zugeordnet werden konnten. So konnte die Methylierung der Tar-Population nur über die Zunahme der Fläche unterhalb der Profile der dreifach- und vierfach methylierten Rezeptoren verfolgt werden, die Methylierung der Tsr-Population

hingegen über die Abnahme der Fläche unterhalb der Profile ihrer einfach- und zweifach methylierten Rezeptoren. Erwartungsgemäß wurden Tar-Rezeptoren als Folge der Stimulation mit α -Methylaspartat, und Tsr-Rezeptoren als Folge der Stimulation mit L-Serin methyliert. Auch konnte eine Kreuzmethylierung von Tar im heterogenen Rezeptorcluster als Folge einer Stimulation mit L-Serin nachgewiesen werden (s. Abb. 3.15. b und d). Eine Methylierung der Tsr-Rezeptoren durch stimulation mit α -Methylaspartat blieb allerdings aus (Abb. 3.15.a und c.)

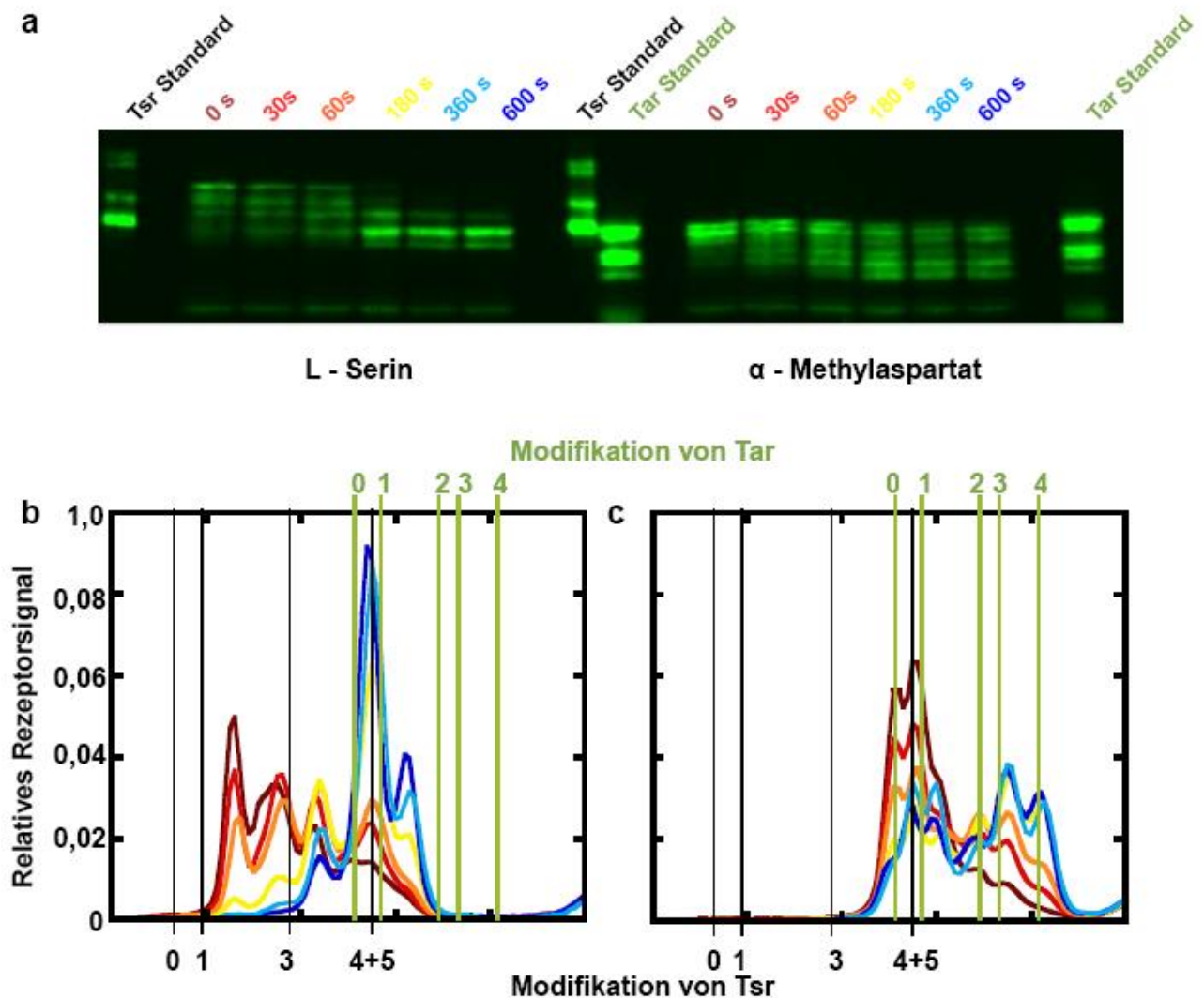


Abb. 3.13. Tsr-Methylierung durch Serin und Tar-Methylierung durch α -Methylaspartat.

In diesem Kontrollexperiment wurden homogene Rezeptorcluster aus Tsr mit Serin (in dem Stamm VS172) und Rezeptorcluster aus Tar mit α -Methylaspartat (in dem Stamm VS148) stimuliert, um die Funktionalität der Kreuzmethylierungsexperimente zu testen. Die verwendeten Bakterienstämme exprimierten plasmidcodiertes CheR und CheB_c. (a) Repräsentativer Western Blot, markiert mit Kaninchen- α -Tar_c und Ziege- α -Kaninchen IgG IRDye®800 Konjugat (Rockland, USA). Zugehörige Intensitätsprofile von Tsr stimuliert mit L-Serin (b) und Tar stimuliert mit α -Methylaspartat (c) vor der Stimulation (dunkelrot), sowie 30 s (rot), 60 s (orange), 180 s (gelb), 360 s (hellblau) und 600 s (blau) danach. Senkrechte Linien markieren die Position des Tsr- (schwarz) bzw. Tar- (grün) Standards.

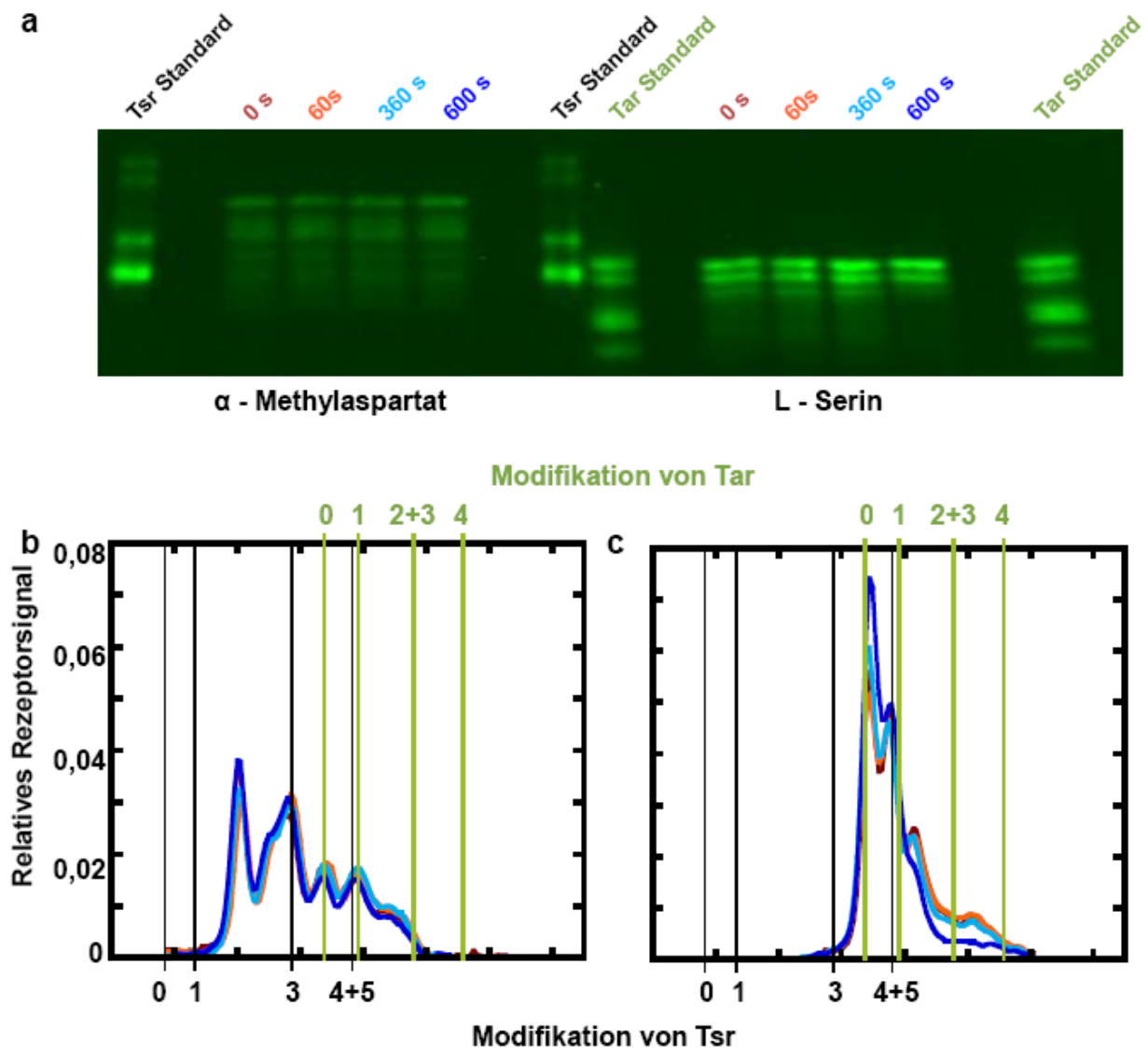


Abb. 3.14. Stimulation von Tsr mit α -Methylaspartat und von Tar mit L-Serin.

Um die Methylierung von Tsr durch α -Methylaspartat und von Tar durch L-Serin auszuschließen wurde dieses Experiment durchgeführt. (a) Repräsentativer Western Blot markiert mit Kaninchen- α -Tar_c und Ziege- α -Kaninchen IgG IRDye@800 Konjugat (Rockland, USA). Rechts: Tsr-Rezeptor stimuliert mit α -Methylaspartat, Links: Tar-Rezeptor stimuliert mit L-Serin zu verschiedenen Zeitpunkten. Zugehörige Intensitätsprofile von Tsr (b) und Tar (c) vor der Stimulation (dunkelrot), 60 s (orange), sowie 180 s (gelb), 360 s (hellblau) und 600 s (blau) danach.

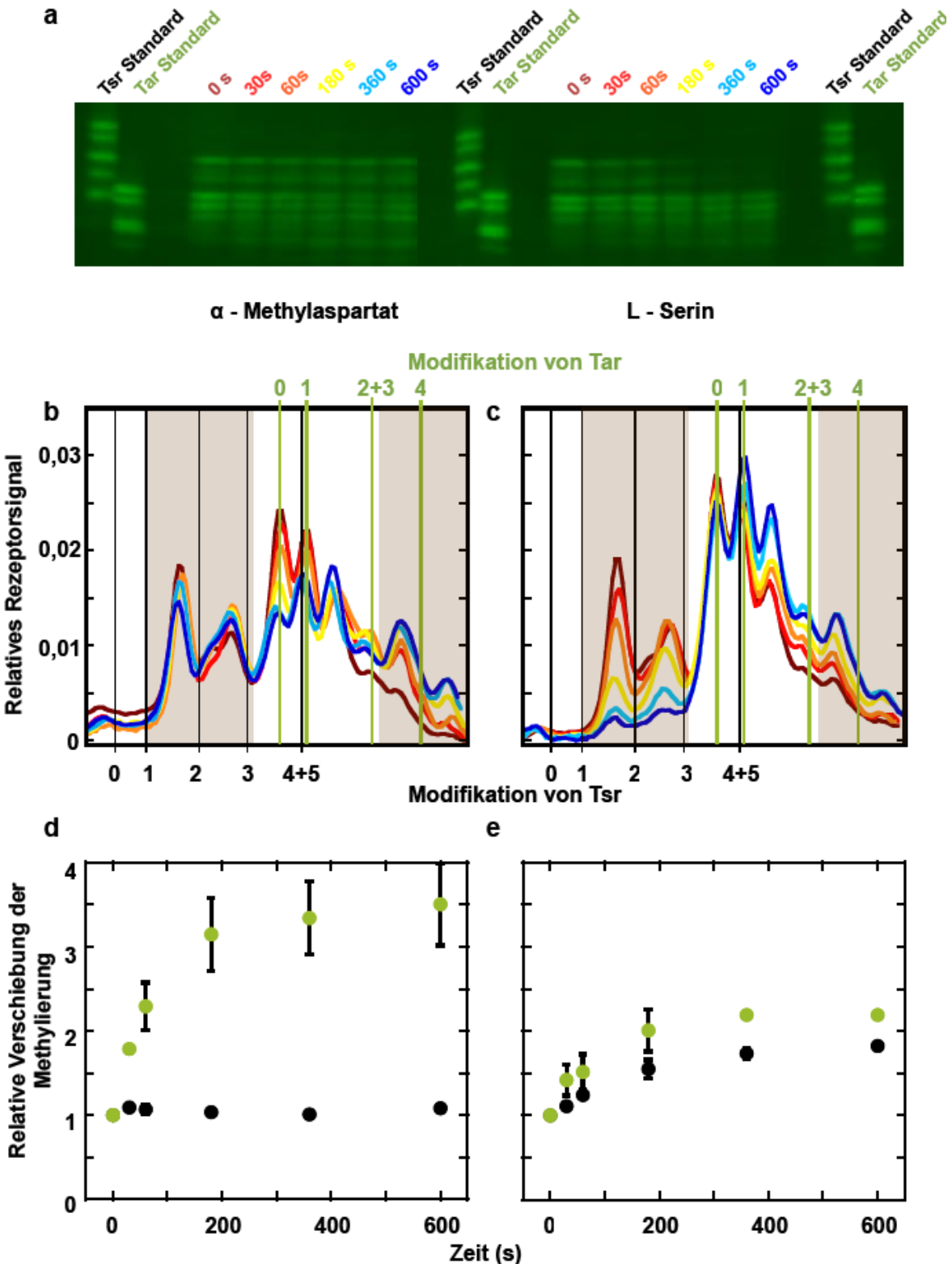


Abb. 3.15. Kreuzmethylierung des Aspartat-Rezeptors Tar und des Serin-Rezeptors Tsr.

(a) Repräsentativer Western Blot markiert Kaninchen- α -Tar_c und Ziege- α -Kaninchen IgG IRDye®800 Konjugat (Rockland, USA) und bei einer Wellenlänge von 800nm gescannt. Methylierung von Tsr und Tar unter Einfluss von plasmidcodiertem CheR und CheB_c unter Stimulation von α -Methylaspartat (rechts) und L-Serin (links). Zugehörige Intensitätsprofile unter Stimulation mit α -Methylaspartat (b) und L-Serin (c). Es sind die Profile aller gemessenen Zeitpunkte gezeigt: vor der Lockstoffstimulation (dunkelrot), sowie 30 s (rot), 60 s (orange), 180 s (gelb), 360 s (hellblau) und 600 s (dunkelblau) danach. Die senkrechten Linien zeigen die Positionen der Modifikationen des Tsr-Standards (schwarz) und des Tar-Standards (grün). Da die Banden hochmethylierter Tsr-Rezeptoren und niedrigmethylierter Tar-Rezeptoren überlappen, können Änderungen der Rezeptormethylierung nur über die negative Verschiebung des Methylierungsniveaus niedrig methylierter Tsr-Rezeptoren, sowie die Methylierung hoch methylierter Tar-Rezeptoren (grau eingefärbt) nachvollzogen werden. Die Fläche unter den entsprechenden Kurven wurde als relative Verschiebung der Methylierung berechnet. Dabei wurde die negative Methylierungsverschiebung niedrig methylierter Tsr-Rezeptoren invertiert. Die relative Methylierungsverschiebung von Tar (grün) und Tsr (schwarz) unter Stimulation mit α -Methylaspartat (d) und L-Serin (e) wurde gegen die Zeit aufgetragen.

4. Diskussion

4.1. Die Stabilität des Chemotaxisclusters

Durch FRAP (Flourescence Recovery After Photobleaching) wurden Diffusions- und Bindeparameter aller zytoplasmatischen Chemotaxisproteine und des Aspartat-Rezeptors Tar ermittelt (Abschnitt 3.1.1.). Die Mobilität der zytoplasmatischen chemotaktischen Proteine zeigte eine erwartete inverse Korrelation zwischen Molekülmasse und dem berechneten Diffusionskoeffizienten (Tabelle 3.1.). Der Austausch aller zytoplasmatischen Proteine am Cluster erfolgte relativ schnell: Selbst größere Proteine äquilibrierten mit einer Halbwertszeit von weniger als 1,5 Sekunden, was in etwa der Zeitspanne der chemotaktischen Antwort entspricht. Numerische Berechnungen ergaben, dass sich der zytoplasmatische Austausch der Proteine nicht durch eine einfache Diffusion beschreiben lässt. Vielmehr erfolgt er durch die sogenannte anomale Diffusion, welche bereits für Bakterien (Elowitz *et al.* 1999; Golding & Cox 2006a) und Eukaryonten (Feder *et al.* 1996; Weiss *et al.* 2004) beschrieben wurde. Während der anomalen Diffusion wird die Bewegung der Proteine durch Kollisionen mit umgebenden Hindernissen beeinträchtigt. In Eukaryonten stellen zytoskeletale Filamente, in Bakterien eher die hohe Dichte von Makromolekülen im Zytoplasma und der inneren Membran solche Hindernisse dar (Weiss *et al.* 2004; Golding & Cox 2006a; Golding & Cox 2006b).

Anhand der gemessenen Austauschzeiten konnte zwischen drei Klassen von Proteinen unterschieden werden. Rezeptoren bilden den stabilen Kern des Clusters, der extrem fest ist und länger als eine Zellgeneration besteht. Diese Stabilität resultiert vermutlich nicht nur aus einer starken Interaktion der Rezeptoren untereinander, sondern auch aus deren Wechselwirkung mit CheA und CheW. CheW und CheA halten die Rezeptoren innerhalb des Clusters zusammen und weisen ebenfalls langsame Austauschzeiten auf. Die in dieser Arbeit ermittelten Austauschzeiten von ~12 Minuten entsprechen den Werten, die *in vitro* für den Einbau von CheA und CheW in ternäre Komplexe gemessen wurden (Gegner *et al.* 1992). Eine andere Studie dagegen ergab, dass ein bestehender Clusterkern aus Rezeptoren, CheA und CheW *in vitro* ultrastabil ist. Dabei verharrte CheA in aktivem Zustand über Tage am sensorischen Komplex (Erbse & Falke 2009). In der Zelle würde Ultrastabilität zu einem

unkontrollierten Wachstum des Signalkomplexes führen. Daher wurde spekuliert, dass dieses Wachstum in der Zelle durch Chaperone oder Proteasen kontrolliert wird, was die Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Daten erklären würde. *In vivo* ist der Komplex innerhalb der Zeitspanne von Antwort und Adaptation stabil.

Mit einer Austauschzeit von ~8 Minuten ist CheZ ebenfalls ein Teil des Clusterkerns. Die feste Bindung zwischen Phosphatase und Cluster verhindert die Bildung eines CheY-P Gradienten mit hohen CheY-P Konzentrationen am sensorischen Komplex (Sourjik & Berg 2002a; Vaknin & Berg 2004).

Die Adaptationsproteine CheR und CheB bilden die nächste Stufe der Stabilität. Ihre Äquilibrierungszeiten von ~15 Sekunden sind wesentlich länger als die charakteristischen Antwortzeiten des Chemotaxissystems (~0,1 – 1 s) (Segall *et al.* 1982; Segall *et al.* 1986; Jasuja *et al.* 1999; Sourjik & Berg 2002a), oder als die typische Schwimmpase einer adaptierten Zelle (~2 s) (Berg & Brown 1972). Dafür entsprechen sie den Zeiten, die für die Adaptation auf sättigende Stimuli benötigt werden (Berg & Tedesco 1975; Spudich & Koshland 1975). Die Äquilibrierung in dieser Zeitspanne sichert die einheitliche Verteilung der Adaptationsenzyme innerhalb eines Clusters und zwischen den Clustern innerhalb einer Zelle. Dies könnte wegen der relativ niedrigen Kopienzahl der Adaptationsproteine (200 – 400) im Vergleich mit der hohen Kopienzahl der Rezeptoren (~15000) und aller anderen zytoplasmatischen Proteine (3000 – 8000) in einer Zelle bedeutsam sein (Li & Hazelbauer 2004). Eine geringe Konzentration der Adaptationsproteine setzt voraus, dass sie sich durch das Cluster bewegen können, um alle verfügbaren Methylierungsstellen abzutasten (Levin *et al.* 2002). Gleichzeitig muss die Verweildauer lange genug sein, um eine langsame Adaptation sicherzustellen. Die ermittelten Austauschzeiten für CheR und CheB entsprechen ebenfalls den beobachteten, langsamen Fluktuationen der flagellaren Drehrichtung. Diese sollen das bakterielle Suchverhalten optimieren (Korobkova *et al.* 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass diese Fluktuationen von CheR und CheB ausgelöst werden könnten.

CheY ist das einzige Protein, das eine schnelle, der Zeitspanne der chemotaktischen Antwort entsprechende Austauschzeit aufzeigte. Dies passt sehr gut zu der Rolle des primären Responseregulators, der die Strecke zwischen Rezeptoren und Flagellenmotoren sehr schnell überwinden muss. Wie bereits durch frühere Analysen gezeigt wurde, ist die Diffusion von

CheY-P der primäre geschwindigkeitslimitierende Faktor der chemotaktischen Antwort, und nicht etwa dessen Zerfall oder der Kinase-vermittelte Phosphotransfer (Sourjik & Berg 2002a).

Um eine Wanderung multivalenter Proteine innerhalb des Chemotaxisclusters zu untersuchen wurden partielle Bleichungen von Chemotaxisclustern durchgeführt (Abschnitt 3.1.2.). Bestehenden Studien zufolge erfolgt die Wanderung durch aufeinanderfolgende Ablösung von einer und Interaktion mit einer anderen Bindestelle (Levin *et al.* 2002; Banno *et al.* 2004). Da sich die Austauschkinetiken partiell gebleichter Cluster nicht signifikant von denen voll gebleichter Cluster unterscheiden, legt die vorliegende Studie nahe, dass der Austausch der Chemotaxisproteine am Cluster primär mit freien Proteinen aus dem Zytoplasma (oder der Membran) und nicht durch die postulierte Wanderung erfolgt.

Die Austauschkinetiken in dieser Arbeit wurden unter Standardbedingungen untersucht, unter denen die meisten quantitativen Chemotaxis-Experimente durchgeführt wurden. Die ermittelten Austauschzeiten gelten somit für einzelne, adaptierte Zellen bei 20°C. Es liegt aber nahe, dass die Stabilität der Chemotaxiscluster durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden könnte (Bornhorst & Falke 2000; Li & Weis 2000; Erbse & Falke 2009). *In vitro* Studien berichteten kürzlich über eine Destabilisierung des Clusters durch Erhöhung der Temperatur (Erbse & Falke 2009), was in dieser Arbeit *in vivo* geprüft werden sollte. Dabei konnte weder eine Umgebungstemperatur von 37°C, noch von 39°C eine Schwächung der Clusterstabilität bewirken. Die Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Beobachtung legt nahe, dass die Präsenz eines oder mehrerer Proteine in der Zelle zur Clusterstabilität beiträgt. Proteine, die eine solch stabilisierende Funktion ausüben könnten, sind Chaperone oder Proteasen, die beschädigte Clusterkomponenten erkennen, reparieren, ersetzen oder abbauen können. Ein geeigneter Kandidat hierfür wäre das Chaperon Hsp90 (HtpG in *E. coli*), das mit Chemotaxis- und Flagellenproteinen interagiert, von dem jedoch noch keine Funktion bekannt ist (H. Li, persönliche Rücksprache). Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass die CheA- und CheW-Bindung *in vitro* am Rezeptorcluster von dem Modifikationslevel der Rezeptoren abhängig ist (Li & Weis 2000). In dieser Arbeit wurde dies mittels FRAP-Experimenten in Zellen mit halb- und niedrig modifizierten Rezeptoren untersucht (Abschnitt 3.1.2.). Auch *in vivo* konnte eine leichte Reduktion des CheA- und CheW-Austauschs bei steigender

Rezeptoraktivität beobachtet werden. Eine solche Abhängigkeit könnte möglicherweise die Regulation der Proteinstöchiometrie und die Größe der Rezeptorcluster als Antwort auf eine Stimulation bewirken und so eine wichtige Rolle bei der Signalgebung, beispielsweise bei der Adaptation spielen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die *in vivo* Dynamik und Stabilität der chemosensorischen Cluster in *E. coli* systematisch untersucht. Diese Ergebnisse füllen eine der letzten Lücken des ansonsten so gut charakterisierten chemotaktischen Signaltransduktionswegs.

4.2. Rezeptormodifikation in der Chemotaxis

Die Modifikation der Rezeptoren hat vielfältige Effekte und ist ein entscheidendes Element der chemotaktischen Antwort. So wird es der Zelle durch die CheR- und CheB-vermittelte Adaptation ermöglicht, die jetzige Zusammensetzung der Umwelt mit der der jüngsten Vergangenheit zu vergleichen und damit auf Änderungen der Ligandenkonzentration zu reagieren. Dies geschieht durch kontinuierliche, CheR-vermittelte Rezeptormethylierung und CheB-abhängige Rezeptordemethylierung. Durch Schreckstoffe oder sinkende Lockstoffkonzentrationen der Umgebung werden Rezeptor-Kinase-Komplexe aktiviert, was einen Anstieg der Autophosphorylierungsrate der CheA-Kinasen zur Folge hat. Die Kinasemoleküle phosphorylieren daraufhin wiederum die beiden Responseregulatoren CheY und CheB. Während CheY durch Interaktion mit den Flagellen die Änderung der Schwimmrichtung hervorruft, demethylieren/deamidieren CheB-Proteine die Rezeptoren und verringern auf diese Weise deren Aktivität. Theoretisch konnte aber schon gezeigt werden, dass dieser negative Feedback-Mechanismus alleine nicht ausreicht, um die Adaptation zu erklären (Alon *et al.* 1999). In dieser Arbeit (Abschnitt 3.2.) konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die CheB-Phosphorylierung weder für die Adaptation, noch für die Demethylierung der Rezeptoren oder die Sensitivität der chemotaktischen Antwort benötigt wird. Desweiteren konnte beobachtet werden, dass nicht-phosphorylierbares CheB (CheB^{D56E}) weniger aktiv war. Dieses Ergebnis stimmt mit biochemischen Studien überein, in denen die Aktivität von CheB als Folge der Phosphorylierung um den Faktor 100 stieg (Anand & Stock 2002). Erst die Untersuchung der Austauschkinetik einer phosphorylierungsdefekten Mutante durch FRAP konnte eine mögliche Rolle der CheB-Phosphorylierung aufzeigen. In dem verwendeten *E. coli*-Stamm äquilibrierte funktionales CheB in ~20 Sekunden etwas langsamer, als in Abschnitt 3.1. gemessen. Ein Unterschied von ~5 Sekunden liegt aber innerhalb der Fehlergrenze zwischen verschiedenen Versuchsreihen und Stämmen. Die nicht-phosphorylierbare konstitutiv inaktive Mutante von CheB zeigte eine ungefähr zehnfach schnellere Austauschzeit, woraus geschlossen werden konnte, dass die Phosphorylierung eine bedeutende Rolle bei der Bindung von CheB an das Chemotaxiscluster spielt. Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse von FRET-Experimenten, in denen sich die Bindung zwischen

CheB^{S164C} und dem Rezeptor Tar sowie zwischen CheB^{S164C} und CheA infolge der Kinase-Aktivierung stabilisierte. (Kentner & Sourjik 2009). Im nichtphosphorylierten Zustand ist die putative Bindestelle von CheB an CheA durch Interaktion mit der C-Terminalen Domäne blockiert (Djordjevic *et al.* 1998). Es ist vorstellbar, dass durch die Phosphorylierung und das Auseinanderstreben beider Domänen die Bindestelle frei und die Affinität von CheB zu CheA erhöht wird. Eine phosphorylierungsabhängige Stabilisierung der Bindung von CheB an das Chemotaxiscluster würde die lokale Konzentration von aktiviertem CheB in nächster Nähe zu den Methylierungshelices der Rezeptoren erhöhen und auf diese Weise die Adaptation effizienter gestalten. Auch die im katalytischen Zentrum mutierte CheB-Variante (CheB^{S164C}) zeigte in der vorliegenden Studie fünffach schnellere Austauschzeiten als Wildtyp-CheB. Offensichtlich spielt also auch die Interaktion des katalytischen Zentrums mit den Methylierungshelices der Rezeptoren eine Rolle bei der Bindung von CheB an das Chemotaxiscluster.

Eine mögliche weitere Funktion der CheB-Phosphorylierung konnte in dieser Arbeit mittels Schwärmexperimenten aufgezeigt werden. So zeigten Zellen über einen weiten Expressionsbereich von Wildtyp-CheB effektives Schwärmen, während die Phosphorylierungsmutante und CheB_c erst ab einer Induktion von 0,001% Arabinose vergleichbares Verhalten aufwies. Dies deutet darauf hin, dass die CheB-Phosphorylierung eine Robustheit gegenüber Schwankungen in der zellulären CheB-Konzentration verursacht. Theoretischen Analysen zufolge könnte der negative Feedback-Mechanismus sogar die Aufrechterhaltung der chemotaktischen Antworten trotz des Rauschens der Genexpression, d.h. trotz Änderungen der zellulären Konzentration *aller* Chemotaxisproteine, bewirken (Kollmann *et al.* 2005). Experimentell konnte schon gezeigt werden, dass die Präzision der Adaptation von *E. coli* gegenüber schwankenden Konzentrationen *aller* Chemotaxisproteine robust bleibt (Alon *et al.* 1999). Die vorliegende Arbeit lieferte Hinweise darauf, dass dies teilweise durch den negativen Feedback-Mechanismus erreicht werden könnte.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Auswirkung der Rezeptorkopplung auf die Kinetik der CheR- und CheB-vermittelten Rezeptormodifikation *in vivo* genauer untersucht. Zunächst konnte eine 40%ige Beschleunigung der Rezeptormethylierung durch Clusterbildung festgestellt werden (Abschnitt 3.3.1.). Dies könnte zwei Ursachen haben: zum einen könnten

funktionell stark gekoppelte Rezeptoren in einem Cluster die Methylierung durch CheR beschleunigen, indem sie die Aktivität benachbarter Rezeptoren beeinflussen. Demzufolge könnte CheR nicht nur den ligandengebundenen, sondern auch benachbarte Rezeptoren methylieren. Zum anderen ist es aber auch denkbar, dass durch Kumulation von CheR am Chemotaxiscluster die Methylierungsgeschwindigkeit gesteigert wird. In Anbetracht der im Vergleich zur Rezeptorkonzentration geringen Menge an CheR und CheB (Li & Hazelbauer 2004) ist es nachvollziehbar, dass die Adaptationsproteine in Zellen ohne Rezeptorcluster längere Wege von einem zum nächsten Rezeptor zurücklegen müssen. Setzt man einer theoretischen Analyse zufolge die Rezeptorkopplung auf 0, so erhält man nach Zugabe des Lockstoffes eine nur 10%ige Senkung der Methylierungsgeschwindigkeit (Ganhui Lan, persönliche Rücksprache). Da der reale Unterschied zwischen geclusterten und ungeclusterten Rezeptoren jedoch ~40% beträgt, spielt vermutlich die Kumulation der CheR Proteine an den Rezeptoren die größere Rolle.

Aber wie funktioniert Rezeptormethylierung in einem heterogenen Rezeptorcluster? In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch eine Kopplung der Methylierung von Rezeptoren unterschiedlicher Subtypen in einem Cluster besteht. Methylierungsexperimente in Zellen, die beide Hauptrezeptoren exprimierten ergaben, dass eine Stimulation mit L-Serin neben der Methylierung des Serin-Rezeptors auch die des Aspartat-Rezeptors Tar verursachte. Auf Zugabe von α -Methylaspartat erfolgte allerdings keine Kreuzmethylierung des Tsr-Rezeptors (Abschnitt 3.3.2.). Dies ist interessant, da *E. coli* zudem eine unvollständige Adaptation auf hohe Serin-Konzentrationen zeigt (Berg & Brown 1972); (Silke Neumann, noch nicht publiziert), während eine Stimulation mit hohen Konzentrationen von α -Methylaspartat zu einer schnellen, exakten Adaptation führt. Vorliegende Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass nach Bindung von α -Methylaspartat bevorzugt ligandengebundene, d.h. Tar-Rezeptoren methyliert werden und die davon ausgehende Aktivierung für eine präzise Adaptation ausreicht. Die Methylierung der Tsr-Rezeptoren als Folge einer starken Serin-Bindung hingegen reicht nicht für die exakte Adaptation aus, woraufhin die ebenfalls im Cluster präsenten Tar-Rezeptoren methyliert werden. Trotz dieser Kreuzmethylierung kann aber die Kinase-Aktivität nicht voll regeneriert werden. Diese „Beeinträchtigung“ der Tsr-Funktion verhindert die Zellbewegung zu hohen Konzentrationen von Serin, die das Wachstum von *E.*

coli inhibieren (Amos & Cohen 1954).

Die Annahme der selektiven Rezeptormethylierung geht von einer schwachen Rezeptorkopplung im Cluster aus, obwohl frühere theoretische Studien auf eine starke Rezeptorkopplung hindeuten (Skoge *et al.* 2006), die durch das MWC-Modell (Abschnitt 1.7.) beschrieben wird. Eine schwache Rezeptorkopplung deutete sich in dieser Arbeit schon an anderer Stelle an, wo einer theoretischen Berechnung folgend die Erhöhung der Methylierungsgeschwindigkeit vorwiegend der Akkumulation von CheR und nur zu einem geringen Teil der Rezeptorkopplung zugeschrieben wurde (s.o.). Diese Arbeit lieferte daher Hinweise auf ein alternatives Adaptationsmodell, wonach Methylierungs- und Demethylierungsreaktionen auf der Aktivität der Rezeptoren beruhen (Barkai & Leibler 1997). Demnach würden CheR Moleküle in einem schwach gekoppelten Rezeptorcluster vorwiegend ligandengebundene, d.h. inaktive Rezeptoren methylieren. Möglicherweise kann CheR diese aufgrund ihrer Konformationsänderung im ligandengebundenen Zustand erkennen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben vielfältigen Proteininteraktionen, Proteinaustausche am Rezeptorcluster, Modifikationsreaktionen der Rezeptoren sowie phosphorylierungs- und aktivitätsabhängige Stabilisierung von Proteininteraktionen maßgeblich an der chemotaktischen Signalgebung in *E. coli* beteiligt sind. Auf diese Weise ist es diesem nur aus wenigen Proteinen bestehenden Signaltransduktionssystem möglich, das Spektrum chemotaktischer Antworten zu erweitern. Dynamische Proteininteraktionen sind dieser Arbeit zufolge eine wichtige, bisher kaum beachtete neue Ebene der Regulation chemotaktischer Antworten in *Escherichia coli*.

5. Fazit und Perspektiven

Die Chemotaxis erlaubt Bakterien, optimale Wachstumsbedingungen zu finden und so ihre Umwelt effizient zu besiedeln. In *E. coli* liegt dieser Strategie ein Signaltransduktionssystem, bestehend aus fünf Subtypen von Transmembranrezeptoren sowie sechs zytoplasmatischen Proteinen, zugrunde. Trotz minimaler Topologie ist dieses System zu komplexen Antworten auf vielfältige Reize fähig. Obwohl die Chemotaxis von *E. coli* Gegenstand intensiver Forschung ist und war, sind vor allem Fragen offen, die die Dynamik der beteiligten Komponenten betreffen. In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, Diffusions- und Bindeparameter dieses Systems *in vivo* zu charakterisieren. Durch FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) konnte ein stabiler Clusterkern bestehend aus Rezeptoren, CheA, CheW und CheZ identifiziert werden. Im Gegensatz zu biochemischen Untersuchungen waren CheA und CheW jedoch nicht ultrastabil an das Rezeptorcluster gebunden. Diese Diskrepanz könnte durch die Präsenz von Chaperonen oder Proteasen in der Zelle erklärt werden, die defekte Proteine im Chemotaxiscluster erkennen, reparieren oder austauschen können. Ein Kandidat hierfür ist das Chaperon Hsp90 (HtpG in *E. coli*), dem bisher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte, von dem man allerdings weiß, dass es an Chemotaxis- und Flagellenproteine binden kann (H. Li, persönliche Rücksprache). Durch FRAP-Messungen von Chemotaxisproteinen in *htpG* Knockout Stämmen könnte evaluiert werden, ob HtpG an den Austauschraten dieser Proteine am Cluster beteiligt ist.

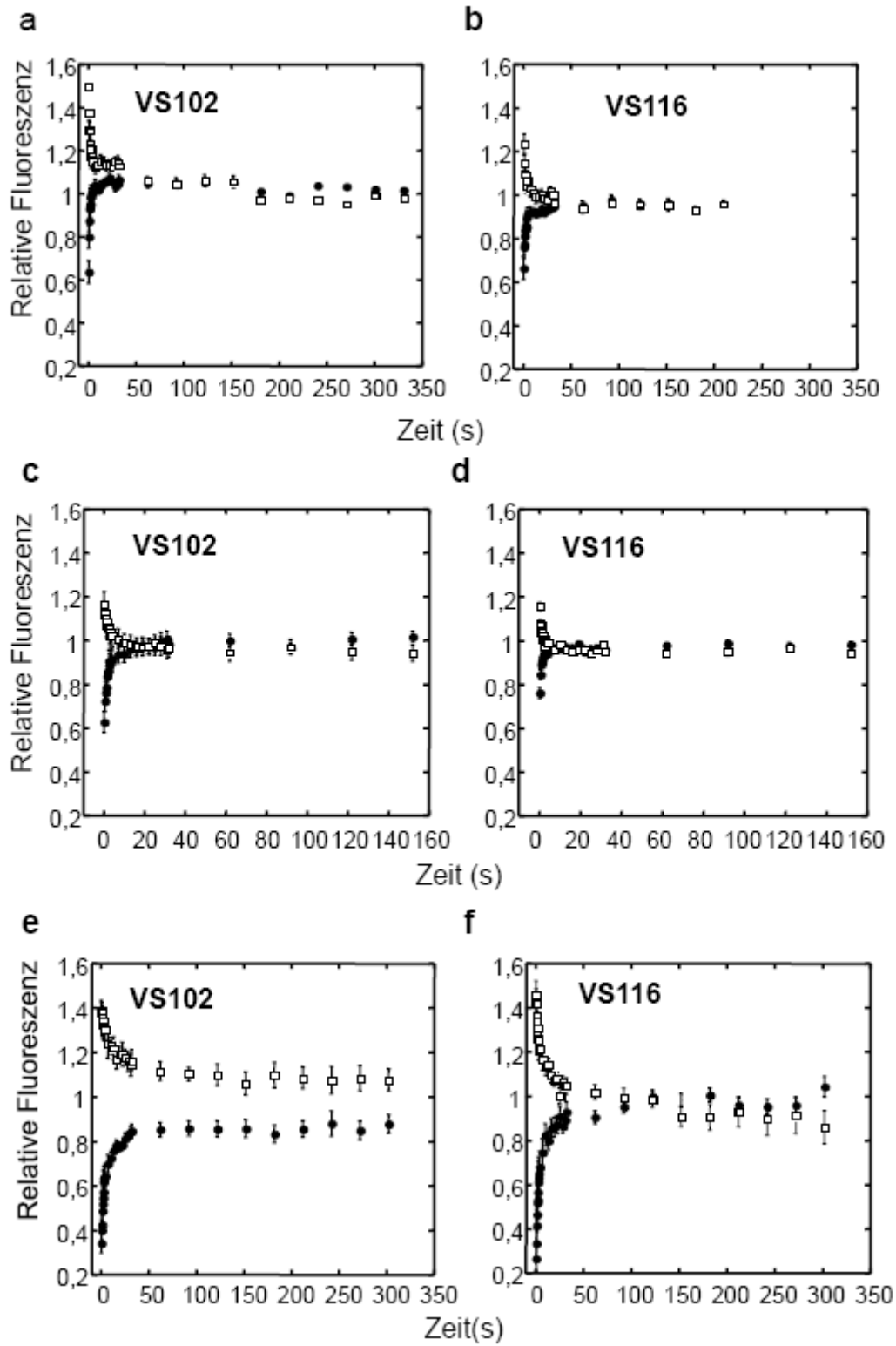
Die Adaptationsproteine CheR und CheB sind dynamisch mit dem Chemotaxiscluster assoziiert, während der primäre Responseregulator CheY sehr schnell zu den Flagellenmotoren diffundieren kann. Eine Wanderung von bivalenten Proteinen innerhalb des Clusters konnte ausgeschlossen werden. Am Beispiel ausgewählter Proteine wurde die Stabilität dieses Gefüges unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass die Stabilität des Chemotaxisclusters nicht durch Temperatur, wohl aber durch die Aktivität der Rezeptoren beeinflusst werden könnte. Aktivitätsabhängige Proteininteraktionen am Chemotaxiscluster könnten Signalgebung und Antwortverhalten zusätzlich beeinflussen und eine weitere Ebene der Regulation darstellen. Dies ist vor allem auch im Hinblick auf die Adaptation interessant, da in dieser Arbeit auch

gezeigt werden konnte, dass der negative Feedback-Mechanismus, d.h. die CheB-Phosphorylierung durch CheA, nicht für die Adaptation verantwortlich ist. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die Vermutung untermauert werden, dass CheR während der Adaptation nur inaktive Rezeptoren methyliert und CheB vorwiegend aktive Rezeptoren demethyliert. Um diese Theorie zu untersuchen, könnten mittels FRAP rezeptoraktivitätsabhängige Austauschzeiten der Adaptationsproteine CheR und CheB quantifiziert werden.

Auch die Kopplung der Rezeptoren innerhalb des Clusters könnte eine bisher nicht beachtete Ebene der Regulation und Adaptation darstellen. So konnte in dieser Arbeit durch Western Blots gezeigt werden, dass geclusterte Rezeptoren den Methylierungsprozess um 40% beschleunigen können. Kreuzmethylierung in heterogenen Rezeptorclustern bestehend aus den Hauptrezeptoren Tsr und Tar konnte nur in eine Richtung beobachtet werden, was für eine schwache Kopplung von Rezeptoren innerhalb des Rezeptorclusters spricht. Um die Natur der Rezeptorkopplung zusätzlich zu untersuchen, könnte durch Western Blots die Methylierungsgeschwindigkeit von geclusterten und ungeclusterten Nebenrezeptoren, denen die Bindestelle für CheR fehlt, ermittelt werden.

Durch FRAP und Schwärmplattenexperimente konnten mögliche Funktionen der CheB-Phosphorylierung aufgezeigt werden. Den vorliegenden Ergebnissen zufolge wird durch die Phosphorylierung die CheB-Bindung an das Rezeptorcluster gefestigt und die Robustheit gegenüber Schwankungen der zellulären CheB-Konzentration vermittelt. Über eine Beteiligung der CheB-Phosphorylierung an der Resistenz gegenüber zellulären Schwankungen aller Chemotaxisproteine wurde bereits spekuliert (Kollmann *et al.* 2005). Dies könnte mittels weiterer Schwärmplattenexperimente untersucht werden. So könnte das Schwärmverhalten von *E. coli*, die entweder Wildtyp-CheB oder CheB^{D56E} exprimieren, unter steigenden Konzentrationen aller anderen Chemotaxisproteine untersucht werden.

Anhang



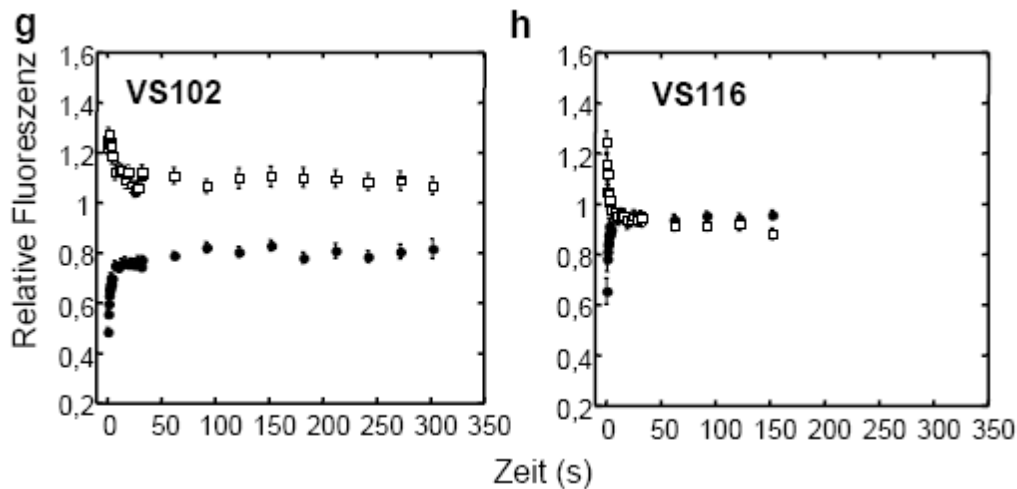


Abb. A.1. Austauschkinetiken von N-terminaler YFP-Fusionen.

Austauschkinetiken in VS102 (a, c, e, g) und VS116 (c, d, f, h). Gezeigt sind YFP-CheY (a, b), YFP-CheR (c, d), YFP-CheZ (e, f), sowie YFP-CheW (g, h). Schwarze Punkte repräsentieren jeweils den Proteinaustausch am gebleichten, polaren Cluster, während weiße Quadrate jeweils Proteinaustausche an ungebleichten Cluster darstellen.

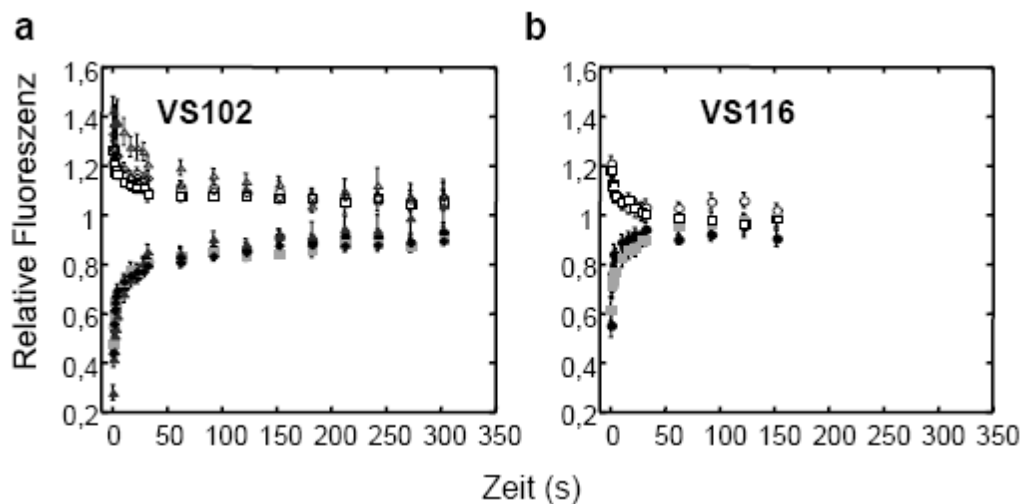


Abb. A.2. Austauschkinetiken verschiedener CheA-Varianten.

(a) Fluoreszenzrückkehr von YFP-CheA (Dreiecke), CheA-YFP (Diamanten), YFP-CheA(s) (Kreise) und CheA (s)-YFP (Quadrate) in VS102. (b): Fluoreszenzrückkehr von YFP-CheA (s) (Kreise) und CheA(s)-YFP (Quadrate) in VS116. Schwarze Symbole repräsentieren jeweils den Proteinaustausch gebleichter polarer Regionen, während weiße Symbole die Fluoreszenzrückkehr in ungebleichten Regionen anzeigen.

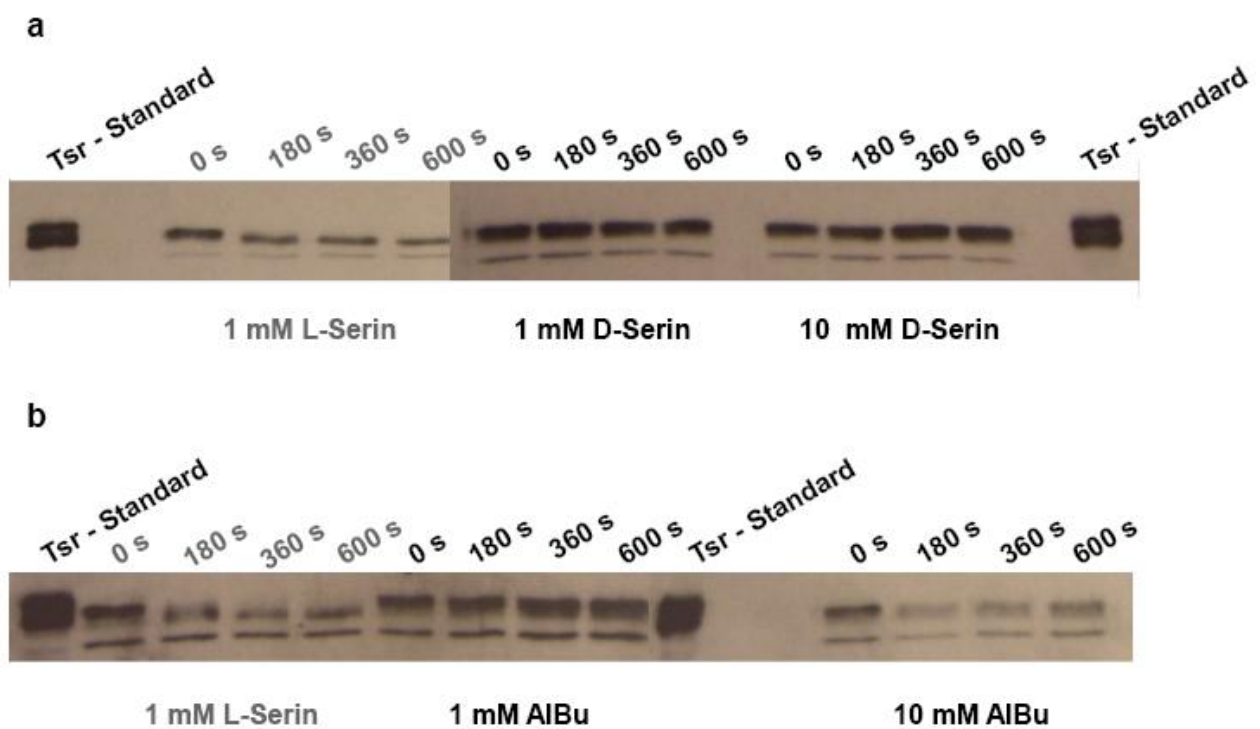


Abb. A.3. Effekt nicht metabolisierbarer Serin-Analoga auf die Tsr-Methylierung.

Western Blots von Minigelen der (a) lockstoffinduzierte Rezeptormethylierung mit L-Serin (links) sowie 1 mM D-Serin (mittig) und 10 mM D-Serin (rechts) und (b) Rezeptormethylierung mit L-Serin (links), 1 mM α -Amino-iso-Buttersäure (AIBu) und 10 mM AIBu. Tsr wurde durch den Kaninchen- α -Tar_c-Antikörper markiert. Die Entwicklung erfolgte hier mittels des Esel- α -Kaninchen IgG Peroxidase Konjugats und ECL.

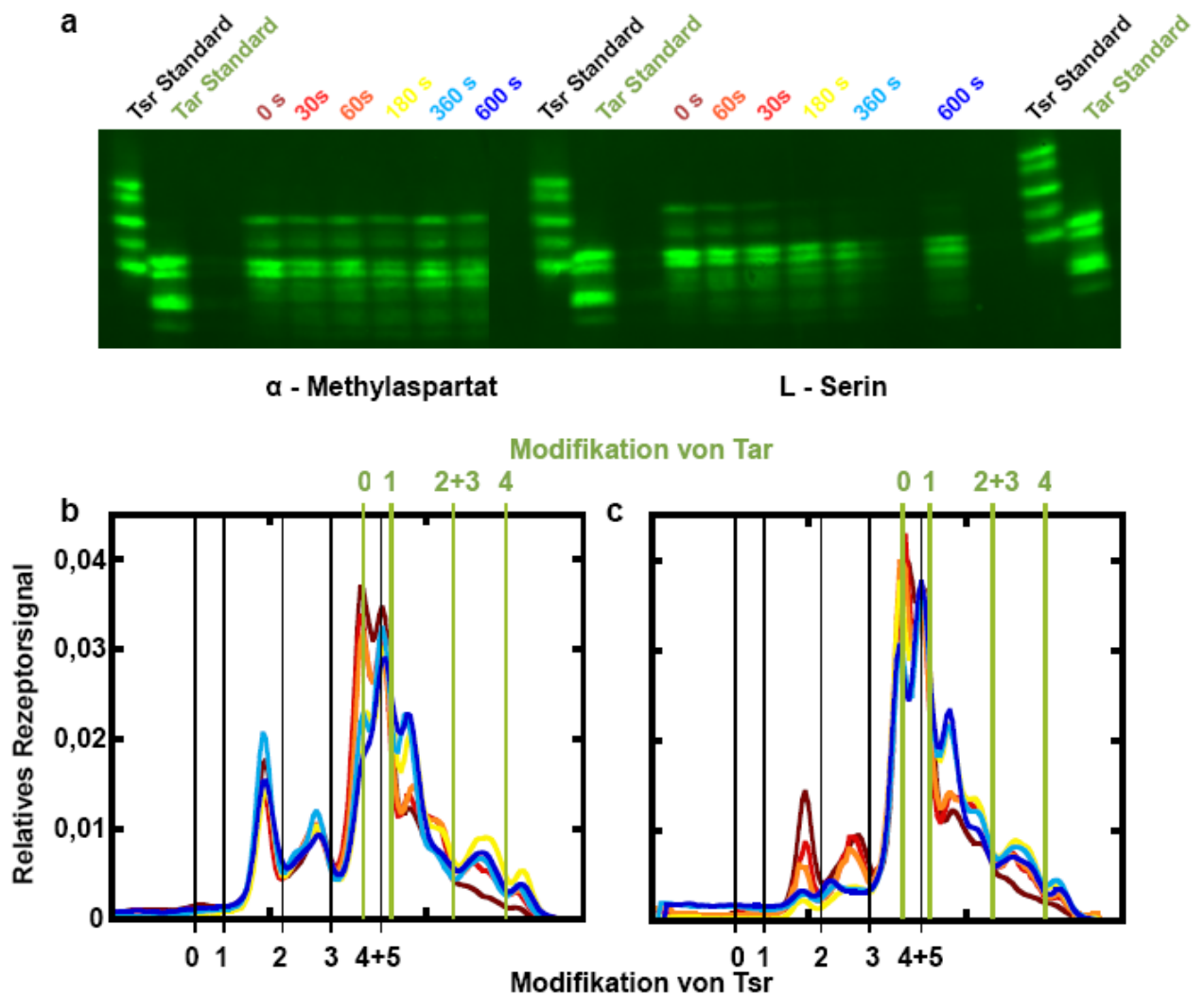


Abb. A.4. Kreuzmethylierung von Tar und Tsr in Anwesenheit von CheB.

(a) Repräsentativer Western Blot markiert mit Kaninchen- α -Tar_c-Antikörper und Ziege- α -Kaninchen IgG IRDye@800 Konjugat (Rockland, USA) und mit einer Wellenlänge von 800nm gescannt. Die Methylierung von Tsr und Tar erfolgte unter dem Einfluss von plasmidcodiertem CheR und CheB in HCB42 unter Stimulation von α -Methylaspartat (rechts) und L-Serin (links). Die zugehörige Intensitätsprofile unter Stimulation mit α -Methylaspartat (b) und L-Serin (c) zeigen Methylierungsniveaus vor der Lockstoffstimulation (dunkelrot), sowie 30 s (rot), 60 s (orange), 180 s (gelb), 360 s (hellblau) und 600 s (dunkelblau) danach. Die senkrechten Linien markieren die Positionen der fixierten Modifikationszustände des Tsr-Standards (schwarz) und des Tar-Standards (grün).

Referenzen

- Alexander RP , Zhulin IB (2007). Evolutionary genomics reveals conserved structural determinants of signaling and adaptation in microbial chemoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 2885-2890.
- Alon U, Surette MG, Barkai N , Leibler S (1999). Robustness in bacterial chemotaxis. *Nature*. **397**, 168-171.
- Amann E, Ochs B , Abel KJ (1988). Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in Escherichia coli. *Gene*. **69**, 301-315.
- Ames P , Parkinson JS (1994). Constitutively signaling fragments of Tsr, the Escherichia coli serine chemoreceptor. *J Bacteriol*. **176**, 6340-6348.
- Ames P, Studdert CA, Reiser RH , Parkinson JS (2002). Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 7060-7065.
- Amos H , Cohen GN (1954). Amino acid utilization in bacterial growth. II. A study of threonine-isoleucine relationships in mutants of Escherichia coli. *Biochem J*. **57**, 338-343.
- Anand GS, Goudreau PN, Lewis JK , Stoc AM (2000). Evidence for phosphorylation-dependent conformational changes in methylesterase CheB. *Protein Sci*. **9**, 898-906.
- Anand GS, Goudreau PN , Stock AM (1998). Activation of methylesterase CheB: evidence of a dual role for the regulatory domain. *Biochemistry*. **37**, 14038-14047.
- Anand GS , Stock A (2002). Kinetic basis for the stimulatory effect of phosphorylation on the methylesterase activity of CheB. *Biochemistry*. **41**, 6752-6760.
- Banks DS , Fradin C (2005). Anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding. *Biophys J*. **89**, 2960-2971.
- Banno S, Shiomi D, Homma M , Kawagishi I (2004). Targeting of the chemotaxis methylesterase/deamidase CheB to the polar receptor-kinase cluster in an Escherichia coli cell. *Mol Microbiol*. **53**, 1051-1063.
- Barak R , Eisenbach M (1992). Correlation between phosphorylation of the chemotaxis protein CheY and its activity at the flagellar motor. *Biochemistry*. **31**, 1821-1826.
- Barkai N , Leibler S (1997). Robustness in simple biochemical networks. *Nature*. **387**, 913-917.
- Barnakov AN, Barnakova LA , Hazelbauer GL (1998). Comparison in vitro of a high- and a low-abundance chemoreceptor of Escherichia coli: similar kinase activation but different methyl-accepting activities. *J Bacteriol*. **180**, 6713-6718.
- Barnakov AN, Barnakova LA , Hazelbauer GL (1999). Efficient adaptational demethylation of chemoreceptors requires the same enzyme-docking site as efficient methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 10667-10672.
- Barnakov AN, Barnakova LA , Hazelbauer GL (2001). Location of the receptor-interaction site on CheB, the methylesterase response regulator of bacterial chemotaxis. *J Biol Chem*. **276**, 32984-32989.
- Barnakov AN, Barnakova LA , Hazelbauer GL (2002). Allosteric enhancement of adaptational demethylation by a carboxyl-terminal sequence on chemoreceptors. *J Biol Chem*. **277**, 42151-42156.
- Bass RB, Coleman MD , Falke JJ (1999). Signaling domain of the aspartate receptor is a

-
- helical hairpin with a localized kinase docking surface: cysteine and disulfide scanning studies. *Biochemistry*. **38**, 9317-9327.
- Berg HC (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem*. **72**, 19-54.
- Berg HC , Brown DA (1972). Chemotaxis in Escherichia coli analysed by three-dimensional tracking. *Nature*. **239**, 500-504.
- Berg HC , Tedesco PM (1975). Transient response to chemotactic stimuli in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **72**, 3235-3239.
- Bibikov SI, Biran R, Rudd KE , Parkinson JS (1997). A signal transducer for aerotaxis in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **179**, 4075-4079.
- Biemann HP , Koshland DE, Jr. (1994). Aspartate receptors of Escherichia coli and Salmonella typhimurium bind ligand with negative and half-of-the-sites cooperativity. *Biochemistry*. **33**, 629-634.
- Bilwes AM, Alex, L. A., Crane, B. R., Simon M. I. (1999). Structure of CheA, a Signal-Transducing Histidine Kinase. *Cell*. **96**, 131-141.
- Blat Y , Eisenbach M (1996). Conserved C-terminus of the phosphatase CheZ is a binding domain for the chemotactic response regulator CheY. *Biochemistry*. **35**, 5679-5683.
- Bornhorst JA , Falke JJ (2000). Attractant regulation of the aspartate receptor-kinase complex: limited cooperative interactions between receptors and effects of the receptor modification state. *Biochemistry*. **39**, 9486-9493.
- Bourret RB , Stock AM (2002). Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. *J Biol Chem*. **277**, 9625-9628.
- Boyd A , Simon MI (1980). Multiple electrophoretic forms of methyl-accepting chemotaxis proteins generated by stimulus-elicited methylation in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **143**, 809-815.
- Bulinski JC, Odde DJ, Howell BJ, Salmon TD , Waterman-Storer CM (2001). Rapid dynamics of the microtubule binding of ensconsin in vivo. *J Cell Sci*. **114**, 3885-3897.
- Cantwell BJ, Draheim RR, Weart RB, Nguyen C, Stewart RC , Manson MD (2003). CheZ phosphatase localizes to chemoreceptor patches via CheA-short. *J Bacteriol*. **185**, 2354-2361.
- Chervitz SA , Falke JJ (1996). Molecular mechanism of transmembrane signaling by the aspartate receptor: a model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 2545-2550.
- Cluzel P, Surette M , Leibler S (2000). An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. *Science*. **287**, 1652-1655.
- Djordjevic S, Goudreau PN, Xu Q, Stock AM , West AH (1998). Structural basis for methylesterase CheB regulation by phosphorylation-activated domain. *Proc Natl Acad Sci*. **95**, 1381 - 1386.
- Djordjevic S , Stock A (1997). Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif or binding S-adenosylmethionine. *Structure*. **5**, 545-558.
- Djordjevic S , Stock AM (1998a). Chemotaxis receptor recognition by protein methyltransferase CheR. *Nat Struct Biol*. **5**, 446-450.
- Djordjevic S , Stock AM (1998b). Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: components of a dynamic signaling system. *J Struct Biol*. **124**, 189-200.
- Duke TA , Bray D (1999). Heightened sensitivity of a lattice of membrane receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**, 10104-10108.
- Dunten P , Koshland DE, Jr. (1991). Tuning the responsiveness of a sensory receptor via covalent modification. *J Biol Chem*. **266**, 1491-1496.
-

- Elowitz MB, Surette MG, Wolf PE, Stock JB , Leibler S (1999). Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **181**, 197-203.
- Erbse AH , Falke JJ (2009). The Core Signaling Proteins of Bacterial Chemotaxis Assemble To Form an Ultrastable Complex. *Biochemistry.*
- Falke JJ, Bass RB, Butler SL, Chervitz SA , Danielson MA (1997). The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: A molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **13**, 457-512.
- Falke JJ , Hazelbauer GL (2001). Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem Sci.* **26**, 257-265.
- Feder TJ, Brust-Mascher I, Slattery JP, Baird B , Webb WW (1996). Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces: a new interpretation. *Biophys J.* **70**, 2767-2773.
- Förster T (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In *Annalen der Physik*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, pp. 55-75.
- Gegner JA, Graham DR, Roth AF , Dahlquist FW (1992). Assembly of an MCP receptor, CheW, and kinase CheA complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Cell.* **70**, 975-982.
- Gestwicki JE , Kiessling LL (2002). Inter-receptor communication through arrays of bacterial chemoreceptors. *Nature.* **415**, 81-84.
- Gestwicki JE, Lamanna AC, Harshey RM, McCarter LL, Kiessling LL , Adler J (2000). Evolutionary conservation of methyl-accepting chemotaxis protein location in Bacteria and Archaea. *J Bacteriol.* **182**, 6499-6502.
- Golding I , Cox E (2006a). Physical nature of bacterial cytoplasm. *Phys Rev Lett.* **96**, 098102.
- Golding I , Cox EC (2006b). Physical nature of bacterial cytoplasm. *Phys Rev Lett.* **96**, 098102.
- Griswold IJ, Zhou H, Matison M, Swanson RV, McIntosh LP, Simon MI , Dahlquist FW (2002). The solution structure and interactions of CheW from *Thermotoga maritima*. *Nat Struct Biol.* **9**, 121-125.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ , Beckwith J (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol.* **177**, 4121-4130.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**, 557-580.
- Homma M, Shiomi D , Kawagishi I (2004). Attractant binding alters arrangement of chemoreceptor dimers within its cluster at a cell pole. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 3462-3467.
- Jasuja R, Keyoung J, Reid GP, Trentham DR , Khan S (1999). Chemotactic responses of *Escherichia coli* to small jumps of photoreleased L-aspartate. *Biophys J.* **76**, 1706-1719.
- Kehry MR, Bond MW, Hunkapiller MW , Dahlquist FW (1983). Enzymatic deamidation of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Escherichia coli* catalyzed by the cheB gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**, 3599-3603.
- Kentner D (2008). Kooperative Verarbeitung chemotaktischer Signale bei *E. coli* In *BIOspektrum* (eds), pp. 240-242.
- Kentner D , Sourjik V (2009). Dynamic map of protein interactions in the *Escherichia coli* chemotaxis pathway. *Mol Syst Biol.* **5**, 238.
- Kentner D, Thiem S, Hildenbeutel M , Sourjik V (2006). Determinants of chemoreceptor cluster formation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **61**, 407-417.

- Keymer JE, Endres RG, Skoge M, Meir Y, Wingreen NS (2006). Chemosensing in *Escherichia coli*: two regimes of two-state receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 1786-1791.
- Khursigara CM, Wu X, Zhang P, Lefman J, Subramaniam S (2008). Role of HAMP domains in chemotaxis signaling by bacterial chemoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 16555-16560.
- Kim C, Jackson M, Lux R, Khan S (2001). Determinants of chemotactic signal amplification in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **307**, 119-135.
- Kim KK, Yokota H, Kim SH (1999). Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature.* **400**, 787-792.
- Kollmann M, Lovdok L, Bartholome K, Timmer J, Sourjik V (2005). Design principles of a bacterial signalling network. *Nature.* **438**, 504-507.
- Konopka MC, Shkel IA, Cayley S, Record MT, Weisshaar JC (2006). Crowding and confinement effects on protein diffusion in vivo. *J Bacteriol.* **188**, 6115-6123.
- Korobkova E, Emonet T, Vilar JM, Shimizu TS, Cluzel P (2004). From molecular noise to behavioural variability in a single bacterium. *Nature.* **428**, 574-578.
- Kott L, Braswell EH, Shrout AL, Weis RM (2004). Distributed subunit interactions in CheA contribute to dimer stability: a sedimentation equilibrium study. *Biochim Biophys Acta.* **1696**, 131-140.
- Lai RZ, Manson JM, Bormans AF, Draheim RR, Nguyen NT, Manson MD (2005). Cooperative signaling among bacterial chemoreceptors. *Biochemistry.* **44**, 14298-14307.
- Le Moual H, Quang T, Koshland DE, Jr. (1997). Methylation of the *Escherichia coli* chemotaxis receptors: intra- and interdimer mechanisms. *Biochemistry.* **36**, 13441-13448.
- Lee GF, Burrows GG, Lebert MR, Dutton DP, Hazelbauer GL (1994). Deducing the organization of a transmembrane domain by disulfide cross-linking. The bacterial chemoreceptor Trg. *J Biol Chem.* **269**, 29920-29927.
- Levin MD, Shimizu TS, Bray D (2002). Binding and diffusion of CheR molecules within a cluster of membrane receptors. *Biophys J.* **82**, 1809-1817.
- Li G, Weis RM (2000). Covalent modification regulates ligand binding to receptor complexes in the chemosensory system of *Escherichia coli*. *Cell.* **100**, 357-365.
- Li J, Swanson RV, Simon MI, Weis RM (1995). The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry.* **34**, 14626-14636.
- Li M, Hazelbauer GL (2004). Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex. *J Bacteriol.* **186**, 3687-3694.
- Li Y, Hu Y, Fu W, Xia B, Jin C (2007). Solution structure of the bacterial chemotaxis adaptor protein CheW from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* **360**, 863-867.
- Lieberman L, Berg HC, Sourjik V (2004). Effect of chemoreceptor modification on assembly and activity of the receptor-kinase complex in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **186**, 6643-6646.
- Lipkow K, Andrews SS, Bray D (2005). Simulated diffusion of phosphorylated CheY through the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **187**, 45-53.
- Lovdok L, Kollmann M, Sourjik V (2007). Co-expression of signaling proteins improves robustness of the bacterial chemotaxis pathway. *J Biotechnol.* **129**, 173-180.
- Lowry DF, Roth AF, Rupert PB, Dahlquist FW, Moy FJ, Domaille PJ, Matsumura P (1994). Signal transduction in chemotaxis. A propagating conformation change upon

-
- phosphorylation of CheY. *J Biol Chem.* **269**, 26358-26362.
- Lugtenberg B, Meijers J, Peters R, van der Hoek P , van Alphen L (1975). Electrophoretic resolution of the "major outer membrane protein" of Escherichia coli K12 into four bands. *FEBS Lett.* **58**, 254-258.
- Maddock JR , Shapiro L (1993). Polar location of the chemoreceptor complex in the Escherichia coli cell. *Science.* **259**, 1717-1723.
- Madigan MT, Martinko JM , Parker J (2002). *Brock Mikrobiologie*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- Mathews ST, Plaisance EP , Kim T (2009). Imaging systems for westerns: chemiluminescence vs. infrared detection. *Methods Mol Biol.* **536**, 499-513.
- McNamara BP , Wolfe AJ (1997). Coexpression of the long and short forms of CheA, the chemotaxis histidine kinase, by members of the family Enterobacteriaceae. *J Bacteriol.* **179**, 1813-1818.
- Mello BA , Tu Y (2003). Quantitative modeling of sensitivity in bacterial chemotaxis: the role of coupling among different chemoreceptor species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 8223-8228.
- Mello BA , Tu Y (2005). An allosteric model for heterogeneous receptor complexes: understanding bacterial chemotaxis responses to multiple stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 17354-17359.
- Milburn MV, Prive GG, Milligan DL, Scott WG, Yeh J, Jancarik J, Koshland DE, Jr. , Kim SH (1991). Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science.* **254**, 1342-1347.
- Miller AS , Falke JJ (2004). Side chains at the membrane-water interface modulate the signaling state of a transmembrane receptor. *Biochemistry.* **43**, 1763-1770.
- Mizuno T (1998). His-Asp Phosphotransfer Signal Transduction. *JB Review J. Biochem.* **123**, 555-563.
- Monod J, Wyman J , Changeaux JP (1965). On the Nature of Allosteric Transitions: a plausible Model. *J Mol Biol.* **12**, 88-118.
- Morrison TB , Parkinson JS (1994). Liberation of an interaction domain from the phosphotransfer region of CheA, a signaling kinase of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 5485-5489.
- Mourey L, Da Re S, Pedelacq JD, Tolstykh T, Faurie C, Guillet V, Stock JB , Samama JP (2001). Crystal structure of the CheA histidine phosphotransfer domain that mediates response regulator phosphorylation in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem.* **276**, 31074-31082.
- Ottemann KM, Xiao W, Shin YK , Koshland DE, Jr. (1999). A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science.* **285**, 1751-1754.
- Park S-Y, Borbat PP, Gonzalez-Bonet G, Bhatnagar J, Pollard AM, Freed JH, Bilwes AM , Crane BR (2006). Reconstruction of the chemotaxis receptor - kinase assembly. *Nat Struct Mol Biol.* **13**, 400-407.
- Parkinson JS, Ames P , Studdert CA (2005). Collaborative signaling by bacterial chemoreceptors. *Curr Opin Microbiol.* **8**, 116-121.
- Parkinson JS , Houts SE (1982). Isolation and behavior of Escherichia coli deletion mutants lacking chemotaxis functions. *J Bacteriol.* **151**, 106-113.
- Sanders DA, Gillece-Castro BL, Stock AM, Burlingame AL , Koshland DE, Jr. (1989). Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J Biol Chem.* **264**, 21770-21778.
-

-
- Schulmeister S, Rutterf M, Thiem S, Kentner D, Lebiez D , Sourjik V (2008). Protein exchange dynamics at chemoreceptor clusters in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**, 6403-6408.
- Schuster SC, Swanson RV, Alex LA, Bourret RB , Simon MI (1993). Assembly and function of a quaternary signal transduction complex monitored by surface plasmon resonance. *Nature*. **365**, 343-347.
- Schutz-Geschwender A, Zhang Y, Holt T, McDermitt D , Olive DM (2004). Quantitative, Two-Color Western Blot Detection With Infrared Fluorescence. *LI-COR Biosciences*.
- Segall JE, Block SM , Berg HC (1986). Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **83**, 8987-8991.
- Segall JE, Manson MD , Berg HC (1982). Signal processing times in bacterial chemotaxis. *Nature*. **296**, 855-857.
- Shimizu TS, Le Novere N, Levin MD, Bevil AJ, Sutton BJ , Bray D (2000). Molecular model of a lattice of signalling proteins involved in bacterial chemotaxis. *Nat Cell Biol*. **2**, 792-796.
- Shiomi D, Zhulin IB, Homma M , Kawagishi I (2002). Dual recognition of the bacterial chemoreceptor by chemotaxis-specific domains of the CheR methyltransferase. *J Biol Chem*. **277**, 42325-42333.
- Skidmore JM, Ellefson DD, McNamara BP, Couto MM, Wolfe AJ , Maddock JR (2000). Polar clustering of the chemoreceptor complex in Escherichia coli occurs in the absence of complete CheA function. *J Bacteriol*. **182**, 967-973.
- Skoge ML, Endres RG , Wingreen NS (2006). Receptor-receptor coupling in bacterial chemotaxis: evidence for strongly coupled clusters. *Biophys J*. **90**, 4317-4326.
- Sourjik V (2004). Receptor clustering and signal processing in E. coli chemotaxis. *Trends Microbiol*. **12**, 569-576.
- Sourjik V , Berg HC (2000). Localization of components of the chemotaxis machinery of Escherichia coli using fluorescent protein fusions. *Mol Microbiol*. **37**, 740-751.
- Sourjik V , Berg HC (2002a). Binding of the Escherichia coli response regulator CheY to its target measured in vivo by fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 12669-12674.
- Sourjik V , Berg HC (2002b). Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 123-127.
- Sourjik V , Berg HC (2004). Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis. *Nature*. **428**, 437-441.
- Sprague BL, Pego RL, Stavreva DA , McNally JG (2004). Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J*. **86**, 3473-3495.
- Spudich JL , Koshland DE, Jr. (1975). Quantitation of the sensory response in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **72**, 710-713.
- Studdert CA , Parkinson JS (2004). Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 2117-2122.
- Studdert CA , Parkinson JS (2005). Insights into the organization and dynamics of bacterial chemoreceptor clusters through in vivo crosslinking studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 15623-15628.
- Taylor BL, Zhulin IB , Johnson MS (1999). Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. **53**, 103-128.
- Terwilliger TC, Bogonez E, Wang EA , Koshland DE, Jr. (1983). Sites of methyl esterification on the aspartate receptor involved in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem*.
-

-
- 258**, 9608-9611.
- Turner L, Ryu WS , Berg HC (2000). Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J Bacteriol.* **182**, 2793-2801.
- Vaknin A , Berg HC (2004). Single-cell FRET imaging of phosphatase activity in the Escherichia coli chemotaxis system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 17072-17077.
- Villarejo MR , Zabin I (1974). Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol.* **120**, 466-474.
- Wadhams GH , Armitage JP (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**, 1024-1037.
- Weis RM, Hirai T, Chalah A, Kessel M, Peters PJ , Subramaniam S (2003). Electron microscopic analysis of membrane assemblies formed by the bacterial chemotaxis receptor Tsr. *J Bacteriol.* **185**, 3636-3643.
- Weiss M, Elsner M, Kartberg F , Nilsson T (2004). Anomalous subdiffusion is a measure for cytoplasmic crowding in living cells. *Biophys J.* **87**, 3518-3524.
- Welch M, Oosawa K, Aizawa SI , Eisenbach M (1994). Effects of phosphorylation, Mg²⁺, and conformation of the chemotaxis protein CheY on its binding to the flagellar switch protein FliM. *Biochemistry.* **33**, 10470-10476.
- West AH, Djordjevic S, Martinez-Hackert E , Stock AM (1995). Purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analyses of the bacterial chemotaxis receptor modifying enzymes. *Proteins.* **21**, 345-350.
- West AH , Stock AM (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci.* **26**, 369-376.
- Wu J, Li J, Li G, Long DG , Weis RM (1996). The receptor binding site for the methyltransferase of bacterial chemotaxis is distinct from the sites of methylation. *Biochemistry.* **35**, 4984-4993.
- Yeh JI, Biemann HP, Pandit J, Koshland DE , Kim SH (1993). The three-dimensional structure of the ligand-binding domain of a wild-type bacterial chemotaxis receptor. Structural comparison to the cross-linked mutant forms and conformational changes upon ligand binding. *J Biol Chem.* **268**, 9787-9792.
- Zhao J , Parkinson JS (2006). Mutational analysis of the chemoreceptor-coupling domain of the Escherichia coli chemotaxis signaling kinase CheA. *J Bacteriol.* **188**, 3299-3307.
- Zhao R, Collins EJ, Bourret RB , Silversmith RE (2002). Structure and catalytic mechanism of the E. coli chemotaxis phosphatase CheZ. *Nat Struct Biol.* **9**, 570-575.