# Untersuchungen zur genetischen Regulation der CO<sub>2</sub>-Assimilation in *Ralstonia* spp.

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Caroline Höfle aus Winterthur, Schweiz

> > Göttingen 2005

D7

Referent:	Prof. Dr. B. Bowien
Korreferent:	Prof. Dr. W. Liebl
Tag der mündlichen Prüfung:	2.11.2005

Inl	nalstvo	erzeichnis	
Ab	kürzun	gen	VI
1.	Einle	itung	1
2.	. Material und Methoden		
2.1	Orga	anismen und Plasmide	9
2.2	Näh	rmedien und Zellanzucht	15
	2.2.1	Nährmedien für Ralstonia spp.	15
	2.2.2	Nährmedien für E. coli	16
	2.2.3	Antibiotika	17
	2.2.4	Anzuchtbedingungen	18
	2.2.5	Bestimmung der Zelldichte	18
	2.2.6	Stammhaltung und Reinheitskontrolle	18
	2.2.7	Zellernte	19
	2.2.8	Heterologe Genexpression in E. coli	19
	2.2	8.1 Heterologe Genexpression mit dem T7-RNA-Polymerase/	
		Promoter-System	19
	2.2	.8.2 Genexpression mit dem Impact-CN <sup>TM</sup> -System	20
	2.2	.8.3 Co-Expression von Chaperongenen	20
2.3	Zella	ufschluß und Herstellung von Rohextrakten	21
2.4	Elek	trophorese von Proteinen	22
	2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
	2.4.2	Comassie Blue-Färbung	23
	2.4.3	Colloidale Comassie Blue-Färbung	23
	2.4.4	Silberfärbung	24
2.5	2D-H	Elektrophorese	25
	2.5.1	Probenvorbereitung	25
	2.5.2	Auftrennung der Proteine in der 2D-PAGE	26
2.6	Tryp	otischer Proteinverdau im Gel	28
2.7	Mass	senspektrometrie von Proteinen	29
2.8	West	tern-Blot	30
	2.8.1	Übertragung der Proteine auf PVDF Membranen	30
	2.8.2	Unspezifische Färbung mit Ponceau Rot	30
	2.8.3	Immun-Blot	31

2.9 DNA	-Affinitätschromatographie	32
2.9.1	Streptavidin-Sepharose-Minisäulen	32
2.9.2	Paramagnetische Partikel	33
2.10 Anro	icherung von Proteinen mit dem Impact $^{\mathrm{TM}}$ -CN-System	34
2.11 Dialy	vse von Proteinlösungen	35
2.12 Best	mmung von Enzymaktivitäten	36
2.12.1	Optische Tests	36
2.12.2	β-Galactosidase (EC 3.2.1.23)	38
2.13 Über	tragung von DNA nach und Selektion von <i>E. coli</i> Klonen	39
2.13.1	Transformation von E. coli	39
2.13.2	Selektion rekombinanter Klone	39
2.14 Kon	ugative Plasmidübertragung	40
2.15 Mut	genese durch homologe Rekombination	40
2.16 Isoli	erung von Nucleinsäuren	41
2.16.1	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	41
2.16.2	Phenolextraktion und Fällung von DNA	41
2.16.3	Analytische Isolierung von Gesamt-DNA	42
2.16.4	Präparative Isolierung von Gesamt-DNA	43
2.16.5	Isolierung von Plasmid-DNA	43
2.1	5.5.1 Analytische Präparation durch schnelles Kochen	44
2.1	5.5.2 Analytische Präparation durch alkalische Lyse	44
2.1	5.5.3 Präparative Isolierung mit dem 'QIAprep Miniprep Kit'	45
2.1	5.5.4 Präparative Isolierung durch alkalische Lyse	45
2.16.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	46
2.1	5.6.1 Isolierung mit dem 'QIAquick' Gel Extraction Kit'	46
2.1	5.6.2 Isolierung aus niedrigschmelzender Agarose	46
2.17 Kon	entrationsbestimmung von Nucleinsäuren	47
2.18 Enzy	matische Modifikation von DNA	47
2.18.1	Restriktionsspaltung	47
2.18.2	Dephosphorylierung	47
2.18.3	Ligation	48
2.19 Mar	kierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin	48
2.20 PCR	-Methoden	49
2.20.1	Standard-PCR	49

	2.20.2	Einführung von Mutationen durch PCR	51
	2.20.3	Radioaktive Markierung durch PCR	52
2.2	1 Gelel	ektrophorese von Nucleinsäuren	53
	2.21.1	Agarose-Gelelektrophorese	53
	2.21.2	LMP-Agarose-Gelelektrophorese	54
2.2	2 Gelre	etardation von DNA-Protein-Komplexen	55
	2.22.1	Nicht-denaturierende PAGE	55
	2.22.2	In der Agarose-Gelelektrophorese	56
	2.22.3	Gelretardation mit dem LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit	57
2.2	3 Über	tragung von Nucleinsäuren auf Nylonmembranen-Southern-Blotting	59
2.2	4 Hybr	idisierungen mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden	60
2.2	5 Auto	radiographie	62
2.2	6 Sequ	enzierung	62
2.2	7 Chen	nikalien und Materialien	62
3.	Exper	rimente und Ergebnisse	64
3.1	Stand	d der Vorarbeiten	64
3.2	Such	e nach Regulatoren der CO <sub>2</sub> -Assimilation in <i>R. eutropha</i> H16	66
	3.2.1	Anreicherung und Identifizierung DNA-bindender Proteine	66
	3.2.	1.1 DNA-Affinitätschromatograpie	66
	3.2.	1.2 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen aus der DNA-	
		Affinitätschromatographie	72
	3.2.2	Suche nach direkt mit CbbR interagierenden Proteinen	75
	3.2.	2.1 Konstruktion der Plasmide	76
	3.2.	2.2 Konstruktion der Genombanken von <i>R. eutropha</i>	77
	3.2.	2.3 ,Screening' nach interagierenden Proteinen	79
	3.2.3	Identifizierung von Proteinen in H16, deren Homologe in anderen	
		Organismen an der <i>cbb</i> -Regulation beteiligt sind	81
	3.2.	3.1 Heterologe Überexpression von <i>orfR</i> und <i>regA</i> in E. coli	82
	3.2.	3.2 Bindungstudien mit OrfR und RegA aus <i>R. eutropha</i> H16	83
	3.2.4	Erzeugung und phänotypische Charakterisierung von Nullmutanten	
		in <i>R. eutropha</i> H16	84
	3.2.	4.1 Konstruktion der Deletions-Plasmide	84
	3.2.	4.2 Isolierung der Homogenoten	86

	3.2.	4.3	Phänotypische Charakterisierung der Mutanten	88
	3	.2.4.3.	.1 Charakterisierung des Wachstums	88
	3	.2.4.3.	.2 Aktivität von Enzymen des Fructoseabbaus und des <i>cbb</i> -	
			Operonpromotors in der Mutante HB72	90
3.3	Muta	ations	analyse des Transkriptionsregulators CbbR von <i>R. eutropha</i> H16	95
	3.3.1	Orts	pezifische Mutagenese von <i>cbbR</i>	97
	3.3.2	Kom	plementationsanalyse mit dem mutierten <i>cbbR</i>	100
	3.3.3	Bind	ungsaktivität der mutierten CbbR-Proteine	103
3.4	Char	akter	isierung der CbbR-Proteine in R. metallidurans CH34	105
	3.4.1	Bind	ungsstudien mit CbbR aus R. eutropha H16 und R. metallidurans CH34	105
	3.4.	1.1	Plasmidkonstruktion zur heterologen Expression von <i>cbbR</i> <sub>II</sub>	105
	3.4.	1.2	Bindung der CbbR-Proteine an die cbb-Kontrollregionen aus	
			R. metallidurans CH34 und R. eutropha H16	106
	3.4.2	Hers	tellung und Charakterisierung einer <i>cbbR</i> <sub>II</sub> Deletionsmutante	
		von	R. metallidurans CH34	109
	3.4.	2.1	Konstruktion der Deletionsplasmide und Isolierung von Homogenoten	109
	3.4.	2.2	Charakterisierung des lithoautotrophen Wachstums der	
			<i>cbbR</i> <sub>II</sub> - Deletionsmutante <i>R. metallidurans</i> CHM1	110
	3.4.	2.3	Komplementationsstudien mit R. metallidurans CHM1	
			und <i>R. eutropha</i> HB17	111
4.	Disku	ssion	L Contraction of the second	113
4.1	Die c	bb-Ge	ene und ihre Regulation	113
	4.1.1	Orga	nisation der cbb-Operone in Ralstonia spp. und anderen Organismen	113
	4.1.2	Die a	cbb-Kontrollregionen	119
	4.1.3	Inter	aktion von CbbR mit <i>cbb</i> -Kontrollregionen	121
	4.1.4	Die I	Regulation von <i>cbb</i> -Genen	124
	4.1.5	Kom	plementation von <i>cbbR</i> -Deletionmutanten	128
4.2	Effel	cte voi	n Mutationen in <i>cbbR</i>	129
4.3	Zusä	tzlich	e Regulatoren der <i>cbb</i> -Gene	135
	4.3.1	Das 2	Zwei-Komponenten-System RegBA	135
	4.3.2	Die a	cbb-Regulation durch RegBA	142
	4.3.3	DNA	A-Bindung von RegA	143
	4.3.4	Zur I	ldentität von OrfR	144

4.4	Potentiell	e Faktoren der cbb-Genregulation in R. eutropha H16	147
	4.4.1 Ide	ntität potentieller Transkriptionsregulatoren	149
	4.4.2 Ide	ntität und Funktion von FrcR	153
	4.4.2.1	Der potentielle Repressor FrcR	153
	4.4.2.2	Einfluß von FrcR auf den Kohlenstoffwechsel in R. eutropha H16	154
4.5	Ausblick		159
5.	Zusamme	enfassung	160
6.	Literatur	verzeichnis	162
I.	Anhang Pi	rimer zur Amplifikation von DNA	188
II.	Anhang		194
	Massenspe	ktrometrisch identifizierte Proteine aus der 2D-PAGE.	
III.	Anhang N	ucleotid- und Aminosäuresequenzen von R. eutropha H16	198
A.	Nucleotid	- und abgeleitete Aminosäuresequenz von sspA.	198
B.	Nucleotid	- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>frcR</i>	200
C.	Nucleotid	- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>cmk</i> .	202
D.	Nucleotid	- und abgeleitete Aminosäuresequenz von orfV.	204
E.	Nucleotid	- und abgeleitete Aminosäuresequenz von orfG.	206
F.	Nucleotid	- und abgeleitete Aminosäuresequenz von orfP.	208
G.	Nucleotid	- und abgeleitete Aminosäuresequenz von aepA.	210
H.	Nucleotid	- und abgeleitete Aminosäuresequenz der Gene <i>regB</i> und <i>regA</i> .	212
I.	Nucleotid	- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>orfR</i> .	215

## Abkürzungen

A	Alanin
Ap <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
ATTC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bidest.	zweimal destilliert
Bis	N,N-Methylen-bis-Acrylamid
b(p)	Basenpaare (DNA)/Basen (RNA)
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
C	Cystein, Cytosin
CBB	Calvin-Bensson-Bassham-Cyclus
CBD	Chitin-Binde-Domäne
Ci	Curie
CRP	Catabolite Repression Protein
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
d	Desoxy-, Küvettenschichtdicke, Tag
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMF	N, N'-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreit
ε	Extinktionskoeffizient
E	Glutamat/Extinktion
EC	Enzymkommission (Enzyme Commission)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ED	Entner-Doudoroff
et al.	et alteri (und andere)
F	Phenylalanin
G	Glycin, Guanin
G6PD	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Н	Histidin
I	Isoleucin
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
K	Lysin
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
Km <sup>r</sup>	Kanamycinresistenz
L	Leucin
LB	Luria Bertani
LMP	niedriger Schmelzpunkt (low melting point)

LTTR	LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren
M	Methionin, molar
MB	Methylenblau/ Megabasen
MBq	Megabecquerel
MM	Mineralmedium
mol	6.023 x 10 <sup>23</sup> Teilchen
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
N	Asparagin
NAD(H)(P)	(reduziertes) Nicotinamid-Adenindinucleotid(phosphat)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NB	Nutrient Broth
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
P	Prolin
PcbbL	<i>cbb</i> -Operonpromotor
PcbbR	<i>cbbR</i> -Promotor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGI	Phosphoglucose-Isomerase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	Ribonucleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur (ca. 23°C)
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat
T	Threonin, Thymin, Transposon
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc <sup>r</sup>	Tetracylinresistenz
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Valin, Volt
Vol	Volumen
W	Tryptophan, Watt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid
Y	Tyrosin

## 1. Einleitung

Veränderungen der Umwelt wirken sich auf Mikroorganismen besonders drastisch aus, da diese über ihre gesamte Oberfläche mit der Umgebung in Kontakt stehen. Sie haben einen vielseitigen Stoffwechsel und sehen sich der Herausforderung gegenüber, diesen den wechselnden Umweltbedingungen anzupassen, um Schädigungen zu vermeiden. Trotz oder gerade aufgrund ihrer geringen Größe haben Mikroorganismen fast jede denkbare, ökologische Nische besetzt und sind auch unter Extrembedingungen wie große Hitze oder sehr niedrigen Temperaturen zu finden. Außerdem treten sie unter anderem als Bewohner von Verdauungstrakt und Haut der Metazoen auf und haben große Bedeutung als pathogene Organismen.

Eine Anpassung an diese unterschiedlichen Bedingungen erreichen die Mikroorganismen zum einen, durch eine unmittelbare Regulation der Enzymaktivität, zum anderen durch die Regulation der Genexpression. Veränderungen werden durch spezielle Proteine (Sensorproteine) wahrgenommen und an Effektorproteine weitergeleitet. Diese können wieder auf andere Proteine und/oder auf die Genexpression direkt wirken. Um eine fein abgestimmte Expression der Gene zu erreichen, besitzen die Mikroorganismen ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk. In diesem sind manche Gene in Operonen zusammengefasst, die von einem spezifischen Transkriptionsregulator reguliert werden. Häufig stehen die Operone, aber auch Einzelgene, zusätzlich unter der Kontrolle eines weiteren übergeordneten Regulators und sind so in Regulonen zusammengefasst. Die Regulatoren können dabei sowohl reprimierend als auch aktivierend auf die Genexpression wirken. Globale Regulatoren, wie das CAP aus Escherichia coli, das Crc aus Pseudomonas putida und das CcpA aus Bacillus subtilis modulieren zusätzlich die Genregulation (Warner und Lolkema, 2003). Die genannten Beispiele sorgen für eine koordinierte Expression der Gene des Kohlenstoffkatabolismus (Carbon Catabolite Repression [CCR]) und die optimale Nutzung der Ressourcen (Tobisch et al., 1999; Morales et al., 2004). Die Mechanismen der globalen Regulatoren, welche die CCR vermitteln, sind in den einzelnen Organismen deutlich verschieden. Gemeinsam ist ihnen aber, soweit bekannt, eine direkte oder indirekte Interaktion mit dem Phosphotransferase-System (PTS). Das CAP reagiert auf Veränderungen des cAMP-Spiegels und steht so indirekt mit dem PTS-System in Verbindung (Bruckner und Titgemeyer, 2002; Warner und Lolkema, 2003). Dagegen interagiert CcpA direkt mit einer Kinase (HprK) des PTS (Henkin, 1996).

Eine genaue, den Bedürfnissen des Organismus angepasste Regulation ist besonders bei Stoffwechselwegen mit hohem Energieverbrauch wie dem Calvin-Bensson-Bassham (CBB)-Cyclus (Bassham et al., 1954) notwendig. Der CBB-Cyclus ist in Eukaryonten und Prokaryonten weit verbreitet und dient der CO<sub>2</sub>-Assimilation. Ein Großteil der globalen Biomasse wird über diesen Stoffwechselweg aufgebaut. Bis vor kurzem war der Cyclus nur in Eukarvonten, Cyanobakterien und Proteobakterien bekannt. Eines der Schlüsselenzyme, die Ribulose-1,5-bisphophat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO), wurde inzwischen auch in Archaeen entdeckt (Tabita, 1999; Finn und Tabita, 2003). Das zweite Schlüsselenzym die Phosphoribulokinase (PRK) scheinen die Archaeen aber nicht zu enthalten. Die PRK ist notwendig, um den CO<sub>2</sub>-Akzeptor Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) zu regenerieren. Inzwischen gibt es Hinweise, dass RuBP in Archaeen auf einem alternativen Weg über 5-Phospho-D-ribose-1-pyrophosphat gebildet wird (Finn und Tabita, 2004). Der CBB-Cyclus hat vor allem eine Bedeutung in Organismen, die relativ hohe Energieausbeuten aus einem phototrophen oder chemotrophen Stoffwechsel erzielen. Unter energetisch ungünstigeren Bedingungen nutzen Prokaryonten andere Wege zur CO<sub>2</sub>-Fixierung. Diese sind der reduktive Tricarbonsäure-Cyclus, der in phylogenetisch sehr unterschiedlichen autotrophen Bakterien und Archaeen zu finden ist (Evans et al., 1966; Hügler et al., 2003, 2005), der reduktive Acetyl-CoA-Weg (Wood et al., 1986; Pereto et al., 1999) und der 3-Hydroxypropionat-Cyclus (Eisenreich et al., 1989; Herter et al., 2001; Ishii et al., 2004).

Zu den energetisch begünstigten Organismen, die  $CO_2$  über den CBB-Cyclus assimilieren, gehören die metabolisch vielseitigen, fakultativ chemolithoautotrophen  $\beta$ -Proteobakterien *Ralstonia eutropha* H16 (Stackebrandt et al., 1988; Yabuuchi et al., 1995) und *Ralstonia metallidurans* CH34 (Goris et al., 2001). (Wurden Anfang des Jahres 2004 in *Wautersia eutropha* H16 bzw. *Wautersia metallidurans* CH34 [Vaneechoutte et al., 2004], Ende des Jahres in *Cupriavidus necator* H16 bzw. *Cupriavidus metallidurans* CH34 [Vandamme und Coenye, 2004] umbenannt.) Beide Organismen sind in der Lage, während des heterotrophen Wachstums viele organische Kohlenstoffquellen zu verwerten, wobei Säuren wie Pyruvat und Succinat bevorzugt werden. Mit Ausnahme von Fructose, die in den Stämmen über den Entner-Doudoroff-Weg (ED-Weg) abgebaut wird, werden Hexosen oder Pentosen jedoch nicht verwertet. Beide *Ralstonia*-Stämme können organoautotroph mit Formiat oder lithoautotroph mit Wasserstoff als Energie- und mit CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle wachsen. Energie und Reduktionskraft werden dabei aus der Oxidation von Wasserstoff oder Formiat durch jeweils eine membrangebundene und eine cytosolische, NAD<sup>+</sup>-abhängige Hydrogenase

bzw. Formiat-Dehydrogenasen (Friedrich et al., 1979; Friedebold und Bowien, 1993; Friedrich und Schwartz, 1993; Burgdorf et al., 2001) gewonnen.

Für eine koordinierte Bereitstellung der Enzyme des CBB-Cyclus in *R eutropha* H16 und *R. metallidurans* CH34 sorgt die Organisation der entsprechenden Gene (*cbb*-Gene) in Operonen (*cbb*-Operone).

In *R. eutropha* H16 sind die *cbb*-Gene in zwei sehr homologen *cbb*-Operonen vereinigt. Eines der Operone ist auf einem der beiden Chromosomen, das andere auf dem Megaplasmid pHG1 lokalisiert. Außer der Triosephosphat-Isomerase und der Ribose-5-phosphat-Isomerase sind alle Enzyme des Cyclus in den Operonen codiert. Die Gene beider Schlüsselenzyme des Cyclus, RubisCO (*cbbLS*) und PRK (*cbbP*) sind sowohl in dem chromosomalen (*cbb<sub>c</sub>*) als dem plasmidären *cbb*-Operon (*cbb<sub>p</sub>*) vorhanden (Abb. 1A; Kusian und Bowien, 1997; Schwartz und Friedrich, 2001; Bowien und Kusian, 2002).

Die Operone von R. eutropha H16 beginnen mit den Strukturgenen cbbL bzw. cbbS, welche die große und die kleine Untereinheit einer Form I-RubisCO der sogenannten ,roten' Untergruppe codieren. Das benachbart liegende Gen *cbbX* ist ein Protein der AAA<sup>+</sup>-Protein-Superfamilie (Neuwald et al., 1999) mit unbekannter Funktion, aber essentiell für das autotrophe Wachstum von H16 (Bowien und Kusian, 2002). Im Gegensatz dazu ist das Produkt von *cbbY*, dem darauf folgenden Gen für das autotrophe Wachstum nicht notwendig. Ein weiteres nicht am CBB-Cyclus beteiligtes Protein, die 2-Phosphoglycolat-Phosphatase, wird von cbbZ codiert (Windhövel und Bowien, 1990; Yoo und Bowien, 1995; Kusian et al., 1995; Kusian und Bowien, 1997; Bowien und Kusian, 2002). Zusätzlich enthält das cbb<sub>c</sub>-Operon zwei Gene unbekannter Funktion. Das Gen cbbB codiert die Sequenz eines der Formiat-Dehydrogenase ähnlichen Proteins (Bömmer at al., 1996). Ein weiteres Protein der AAA<sup>+</sup>-Protein-Superfamilie, ClpC, ist das Produkt des letzten Gens dieses Operons (Abb. 1A). Das clpC-Gen wird unter induzierenden Bedingungen zusammen mit dem cbb-Operon transkribiert, besitzt aber einen eigenen zusätzlichen Promotor, der auch -obwohl weniger- aktiv ist, wenn das cbb-Operon reprimiert wird (P. Olbermann und B. Bowien, persönliche Mitteilung).



# Abb. 1. Organisation der Gene des chromosomalen *cbb*-Operons (A) von *R. eutropha* H16 (nach Kusian & Bowien 1997). und der *cbb*-Operone I und II (B) von *R. metallidurans* CH34.

Genbezeichnungen und die von ihnen codierten Produkte: cbbA, Fructose-1,6-bisphosphat-/Sedoheptulose-1,7-bisphosphat-Aldolase; *cbbB*, Genprodukt ähnelt der Formiat-Dehydrogenase; *cbbE*, Pentose-5-phosphat-3-Epimerase; *cbbF*, Fructose-1,6-bisphosphatase/Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; cbbG, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydro-Triosephosphat-Isomerase; genase; cbbI. cbbJ. Ribose-5-phosphat-Isomerase; cbbK, Phosphoglycerat-Kinase; cbbL und cbbS, große bzw. kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase; cbbP, Phosphoribulokinase; cbbO und cbbQ, Genprodukte mit unbekannter Funktion; cbbT, Transketolase; cbbX und cbbY, Genprodukte mit unbekannter Funktion; cbbZ, 2-Phosphoglycolat-Phosphatase; cbbR, Aktivatorgen: clpC, ClpC-ATPase pykA, Pyruvat-Kinase; pntAA, NAD(P)-Transhydrogenase; hox-Gene, Gene der löslichen NAD-abhängigen Hydrogenase: hoxF,  $\alpha$ -Untereinheit, hoxU,  $\gamma$ -Untereinheit, hoxY,  $\delta$ -Untereinheit, hoxH,  $\beta$ -Untereinheit; hoxW, Hydrogenase-spezifische Endopeptidase und hoxl, aktivierende Untereinheit der löslichen Hydrogenase. Indices c, I und II bedeuten chromosomal bzw. im cbb-Operon I oder cbb-Operon II lokalisiert.

Nach der Analyse der bisher verfügbaren Genomsequenz (http://genome.jgi-psf.org/mic\_ home.html) besitzt auch *R. metallidurans* CH34 zwei *cbb*-Operone, die aber nicht homolog

sind. Beide scheinen chromosomal lokalisiert zu sein. Im Gegensatz zu H16 sind in CH34 die Gene der Schlüsselenzyme des Calvin-Cyclus in getrennten Operonen lokalisiert. Das *cbb<sub>I</sub>*-Operon enthält die Stukturgene einer Form I-RubisCO und die Gene *cbbQ* und *cbbO* (Abb. 1B). Außerdem sind im *cbb<sub>I</sub>*-Operon noch zwei hypothetische Proteine sowie *cbbA* und die unvollständige Kopie eines *cbbY*-Gens codiert.

Das  $cbb_{II}$ -Operon, ist sehr viel größer und diverser in seiner Zusammensetzung (Abb. 1B). Bis auf die RubisCO-Gene enthält es alle Gene der CBB-Enzyme (cbbEFPTGKAJI) und zusätzlich die Strukturgene der Untereinheiten der NAD<sup>+</sup>-reduzierenden, löslichen Hydrogenase (hoxFUYHI). Die Gene zur Assemblierung dieser Hydrogenase (hypABCFDE) sowie eines Nickeltransporters sind mehr als 6.0 kb stromabwärts dieses Operons lokalisiert. Wie in *R. eutropha* H16 enthält das  $cbb_{II}$ -Operon ein cbbZ-Gen, zusätzlich aber das Gen einer Pyruvat-Kinase (pykA), einer Hydrogenase-spezifischen Endopeptidase (hoxW) und einer Untereinheit der NAD(P)-Transhydrogenase (ptnAA).

Allen diesen *cbb*-Operonen gemeinsam ist ein in divergenter Orientierung vorangestelltes Gen des Transkriptionsregulators *cbbR* (Abb. 1). Nur das vor dem plasmidären *cbb*-Operon von *R. eutropha* H16 gelegene *cbbR*<sup>+</sup> ist aufgrund mehrerer kleiner Deletionen nicht funktionell. Der Transkriptionsregulator CbbR gehört zur Familie der LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren (LTTR), die in Prokaryonten weit verbreitet sind. In der Regel wirken sie aktivierend auf ihre Zielgene/-operone. (Schell, 1993; Bowien und Kusian, 2002). In der 167 bp umfassenden intergenen Regionen (*cbb*-Kontrollregion) zwischen den *cbb*-Operonen von *R. eutropha* H16 und den Regulatorgenen (*cbbR* und *cbbR*<sup>+</sup>) liegen die  $\sigma^{70}$ -abhängigen Promotoren des Operons, *p<sub>cbbL</sub>*, und des Regulatorgens, *p<sub>cbbR</sub>*, mit sich überlappenden `-35´ Regionen (Jeffke et al., 1999). Es kann angenommen werden, dass auch in *R. metallidurans* CH34 die Promotoren der Operone und der Regulatorgene in den intergenen Regionen des *cbb<sub>I</sub>*- (124 bp) und des *cbb<sub>II</sub>*-Operons (288 bp) liegen.

Die Regulation der *cbb*-Operone in *R. eutropha* H16 folgt einem charakteristischen Muster. Bei heterotrophem Wachstum auf den meisten organischen Substraten (z.B. Succinat und Pyruvat) ist das Operon vollständig reprimiert. Auf einigen Substraten, wie Fructose und Gluconat, wird der Promotor allerdings partiell dereprimiert (sog. heterotrophe Derepression) und erreicht bis etwa die Hälfte seiner Aktivität unter autotrophen Bedingungen (Friedrich et al., 1981a; Jeffke et al., 1999). Diese heterotrophe Derepression tritt vor allem in Stämmen sehr deutlich auf, die das Megaplasmid pHG1 tragen (Bowien et al., 1984). Wird dem Stamm nur Formiat zum Wachstum angeboten, kommt es zu einer hohen Expression des Operons, die durch H<sub>2</sub> plus CO<sub>2</sub> noch verstärkt wird. Eine ähnlich hohe Aktivität entwickelt der Promoter beim Wachstum unter mixotrophen Bedingungen mit Fructose und Formiat (Kusian und Bowien, 1997). In *R. metallidurans* CH34 ist ebenfalls eine starke Expression des *cbb<sub>I</sub>*-Operons nach Wachstum mit H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> oder Formiat zu beobachten. Auch in diesem Stamm wird beim heterotrophen Wachstum auf Gluconat etwas mehr RubisCO gebildet als mit Pyruvat oder Succinat, auf denen scheinbar eine fast vollständige Repression des *cbb<sub>I</sub>*-Operons erfolgt (Mergeay et al., 1985). Dieser Effekt ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt als in *R. eutropha* H16.

Essentiell für die Expression der *cbb*-Operone in *R. eutropha* H16 und anderen Organismen ist der Transkriptionsregulator CbbR. Die DNA-Bindung von CbbR erfolgt über ein N-terminales Helix-Turn-Helix-Motiv, wie es für die LTTR charakteristisch ist (Windhövel und Bowien, 1991; Schell, 1993; Jeffke et al., 1999). Der C-Terminus von LTTR dient im Allgemeinen der Oligomerisierung und der Bindung von Effektoren. Diese stammen häufig aus dem Stoffwechselweg, mit dem die regulierten Gene zusammenhängen, und vermitteln so über die LTTR eine aktivierende oder reprimierende Wirkung auf die Genexpression. Die DNA-Bindung von LTTR verursacht meist eine Krümmung der DNA, die sich durch die LTTR-Effektor-Interaktion verändert –häufig relaxiert- und zu einer Modulation der Regulation führt (Schell, 1993; Rhee et al., 1999).

In der intergenen *cbb*-Kontrollregion von *R. eutropha* H16 wurden zwei CbbR-Binderegionen identifiziert. Die ,R-Region' (,recognition-region') liegt proximal zu *cbbR* und dient vermutlich der Rekrutierung eines CbbR-Tetramers oder Dimers, welches wahrscheinlich die Bindung eines zweiten CbbR-Tetramers oder Dimers an die proximal zu *cbbL* liegende ,A-Region' (,activation-region') fördert. Diese Region überlappt mit der `-35′-Region des  $p_{cbbL}$ und ermöglicht so eine direkte Interaktion zwischen CbbR und der RNA-Polymerase (Abb. 2; Kusian und Bowien, 1995). Diese Interaktion wird wahrscheinlich durch einen positiven Effektor, aus dem metabolischen Umfeld des Systems der bisher noch nicht identifiziert werden konnte, oder durch ein weiteres Protein induziert. Als negativer Effektor in *R. eutropha* H16 wirkt Phosphoenolpyruvat (PEP), indem es die Affinität von CbbR an die *cbb*-Kontrollregion erhöht (Grzeszik et al., 2000). Über die Interaktion der CbbR-Proteine aus *R. metallidurans* CH34 und deren mögliche Effektoren ist noch nichts bekannt.



Abb. 2. Intergene *cbb*-Kontrollregion des chromosomalen *cbb*-Operons von *R. eutropha* H16 (nach Kusian und Bowien, 1995; Jeffke, 2001). Zwei CbbR-Di/Tetramere sind in Kontakt mit ihren potentiellen Binderegionen A und R, Die unvollständigen Palindrome der Binderegionen sind fett gedruckt. Die `-35´- und `-10´-Bereiche der Promotoren  $p_{cbbL}$  und  $p_{cbbR}$  sind unterstrichen. Die Transkriptionsstartpunkte von *cbbL* und *cbbR* sind jeweils mit +1 bezeichnet.

Bei Promotorstudien mit  $p_{cbbL}$  in den cbbR-Deletionsmutanten HB14 und HB15 von *R. eutropha* H16 wurde der prinzipielle Erhalt des Regulationsmusters beobachtet, wie es aus dem Wildtyp H16 bekannt war (Jeffke et al., 1999). Dies schien die Beteiligung zumindest eines weiteren Regulators bei der Kontrolle der *cbb*-Operone nahe zu legen. Diese(r) Regulator(en) könnten Teil eines regulatorischen Netzwerkes sein und das Verbindungsglied zwischen dem Kohlenstoff- und Energiestoffwechsel in H16 darstellen.

Drei DNA-Proteinkomplexe wurden in Bindungstudien mit der *cbb*-Kontrollregion und Rohextrakten aus H16 beobachtet (Abb. 3). Die beteiligten Bindungspartner von zwei Komplexen wurden inzwischen identifiziert. Das/die bindende(n) Protein(e), welche den schwach ausgeprägten dritten Komplex bilden, wurden noch nicht gefunden. Das Protein, das zur Bildung des Komplexes P2 führt, wurde als Ortholog von PhcA des pflanzenpathogenen Bakteriums *Ralstonia solanacearum* charakterisiert. PhcA ist in *R. solanacearum* Teil eines sensorischen Netzwerkes, das eine Schlüsselfunktion bei der Regulation von Virulenz- und Pathogenitätsgenen hat (Schell, 2000). Obwohl eine Mutation in *phcA* die Übernahme der Aktivatorfunktion von CbbR durch das veränderte PhcA ermöglicht, zeigte die Untersuchung von *phcA*-Deletionsmutanten, dass dieses Protein nicht an der Regulation der *cbb*-Gene beteiligt ist (Jeffke, 2001).

Der zweite sehr intensive Komplex P1 wird durch die hochaffine Bindung des Proteins P1 an ein symmetrisches Sequenzmotiv unmittelbar stromaufwärts der CbbR-Binderegion verursacht. Auch die Deletion dieses Gens hatte keinen Effekt auf das autotrophe Wachstum von *R. eutropha* H16 (B. Bowien, persönliche Mitteilung). Beide Proteine sind daher nicht essentiell für das autotrophe Wachstum.



Abb. 3. Gelretardation eines DNA-Fragments aus der *cbb*-Kontrollregion mit Rohextrakten des Wildtyps von *R. eutropha* H16 und verschiedenen Mutanten.
Als DNA-Fragment wurde die vollständige (243 bp) *cbb*-Kontrollregion aus *R. eutropha* H16 eingesetzt. 0, freie DNA; P1, P1-DNA-Komplex; P2, PhcA-DNA-Komplex; P3, Komplex aus DNA und unbekannten Protein(en).

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, potentielle Regulatoren der *cbb*-Gene in *R. eutropha* H16 zu identifizieren und durch Deletion ihrer Gene die Funktion im Stoffwechsel aufzudecken. Ferner sollte durch ortspezifische Mutagenese des Regulators CbbR die Rolle einzelner Aminosäurereste in konservierten Bereichen des Proteins bei der DNA-Bindung und der Aktivierung des *cbb*-Operons festgestellt werden. Zum Vergleich wurden Bindungsstudien mit den CbbR-Proteinen aus dem nahe verwandten Stamm *R. metallidurans* CH34 durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die beiden CbbR-Proteine in CH34 austauschbar sind, wurde eine *cbbR<sub>II</sub>*-Deletionsmutante hergestellt und charakterisiert.

#### 2. **Material und Methoden**

#### 2.1 **Organismen und Plasmide**

Die Stämme von Ralstonia spp. und Escherichia coli sowie bereits vorhandene und neukonstruierte Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind mit ihren entsprechenden phäno- bzw. genotypischen Eigenschaften und ihrer Herkunft in den Tab. 1-3 aufgeführt.

Stamm	Relevanter Phäno- und Genotyp	Referenz
R. eutropha H16	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; autotrophes Wachstum	DSM 428, ATCC 17699
<i>R. eutropha</i> HB14	Cfx <sup>-</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\triangle cbbR$ ; autotroph negative Mutante von H16	Jeffke et al. (1999)
<i>R. eutropha</i> HB14R	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\triangle cbbR$ , phcA <sup>+</sup> ; phänotypische Revertante von HB14	D. Oed & B. Bowien
R. eutropha HB17	Cfx <sup>-</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\triangle cbbR$ , $\triangle phcA$ ; autotroph negative Doppelmutante von H16	Jeffke (2001)
R. eutropha HB44	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\Delta$ P1, $\Delta$ phcA, Zweifachmutante von H16	S. Walburg & C. Höfle
<i>R. eutropha</i> HB45	Cfx <sup>-</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\Delta$ P1, $\Delta$ phcA; autotroph negative Dreifachmutante von H16	S. Walburg & C. Höfle
R. eutropha HB71	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\Delta orfR$ ; Mutante von H16	Diese Arbeit
R. eutropha HB72	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\Delta frcR$ ; Mutante von H16	Diese Arbeit
R. eutropha HB73	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\Delta orfV$ ; Mutante von H16	Diese Arbeit
R. eutropha HB74	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\Delta orfG$ ; Mutante von H16	Diese Arbeit
R. eutropha HB75	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\Delta aepA$ ; Mutante von H16	Diese Arbeit
R. eutropha HB76	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\Delta regA$ ; Mutante von H16	Diese Arbeit
R. eutropha HB77	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> ; $\Delta regB$ ; Mutante von H16	Diese Arbeit

Tab. 1. Stämme von Ralstonia spp.

Fortsetzung Tab. 1 nächste Seite

Stamm	Relevanter Phäno- und Genotyp	Referenz
R. eutropha HB78	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; pHG1 <sup>+</sup> , $\Delta orfP$ , Mutante von H16	Diese Arbeit
R. metallidurans CH34	Cfx <sup>+</sup> , Hox <sup>+</sup> ; autotrophes Wachstum	Mergeay et al. (1985), DSM 2839
R. metallidurans CHM 1	Cfx <sup>-</sup> , Hox <sup>+</sup> ; $\Delta cbbR_{II}$ ; Mutante von CH34	Diese Arbeit

### Tab. 1. Stämme von Ralstonia spp. (Fortsetzung)

Bezeichnung des Phänotyps: Cfx, CO<sub>2</sub>-Fixierung; Hox, Wasserstoffoxidation; pHG1, Megaplasmid; *phcA*\*, *phcA*-Punktmutation; +, Merkmal vorhanden; -, Merkmal nicht vorhanden.

Stamm	Relevanter Phäno- und Genotyp	Referenz
JW1	ara, $\Delta$ (lac-proAB), rpsL, thi, $\Phi$ 80, (lacZ $\Delta M15$ ), F'(lac <sup>q</sup> , lacZ $\Delta M15$ , proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> )	Kolmar et al. (1990)
XL1-Blue	Tc <sup>r</sup> ; recA <sup>-</sup> , thi, hsdR1, supE44, relA1, F'(lac[ proAB, lacI <sup>q</sup> , lacZΔM15, Tn10])	Bullock et al. (1987)
S17-1	Sm <sup>r</sup> , Tp <sup>r</sup> , Mod <sup>+</sup> , Res <sup>-</sup> ; <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> ; integriertes Plasmid RP4-Tc::Mu- Km::Tn7	Simon et al. (1983)
DH5a	endA1, hsdR17 ( $r_k m_k^+$ ) supE44, thi-1, recA1, gyr A, (Nal <sup>r</sup> ), relA1 $\Delta$ (lacIZYA- argF), U169, deoR	New England Biolabs
ER2566	F <sup>-</sup> , lambda <sup>-</sup> ; <i>fhuA2</i> [lon], <i>ompT</i> , <i>lacZ</i> :: T7 gene1, gal, sulA11, Δ(mcrC-mrr), 114 :: <i>IS10</i> R(mcr-73 ::miniTn10TetS)2, R(zgb-210 ::Tn10) (TetS) endA1[dcm]	New England Biolabs
BL21-DE3	F <sup>-</sup> , ompT, hsdSB (rB-mB-), gal, dcm (DE3)	Studier & Moffat (1986)
XL1-Blue MRF'Kan	$\Delta(mrcA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hdsSMR-mrr)$ 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn5 (Kan')]	Stratagene
BacterioMatch <sup>TM</sup> Two-Hybrid System Reporter Stamm	$\Delta(mrcA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hdsSMR-mrr)$ 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F' lacI <sup>q</sup> bla lacZKan <sup>r</sup> ]	Stratagene

#### Tab. 2. Stämme von Escherichia coli

Bezeichnung der Phänotypen: Sm<sup>r</sup>, Streptomycinresistenz; Kan<sup>r</sup>, Kanamycinresistenz Tp<sup>r</sup>, Trimethoprimresistenz; ; +, Merkmal vorhanden; -, Merkmal nicht vorhanden; Genotypenbezeichnungen gemäß Berlyn et al. (1996).

## Tab. 3. Verwendete Plasmide

Plasmid	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz
pUC19	Ap <sup>r</sup> ; <i>lacPOZ</i> '	Yanisch-Perron et al. (1985)
pUC18	Ap <sup>r</sup> ; <i>lacPOZ</i> '	Yanisch-Perron et al. (1985)
pBluescriptSK	Ap <sup>r</sup> ; <i>lacPOZ</i> '	Stratagene
pNHG1	Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> ; sacB, RP4 oriT, ColE1 ori	Jeffke et al. (1999)
pTYB12	Ap <sup>r</sup> ; P <sub>tac</sub> –Promoter, Intein-CBD- Expressionsvektor	New England Biolabs
pCYB2	Ap <sup>r</sup> ; <i>lac</i> –Promoter, Intein-CBD- Expressionsvektor	New England Biolabs
pT7-7	Ap <sup>r</sup> ; ColE1 <i>ori</i> , P <sub>T7</sub> -Promotor	Tabor (1985)
pAECR5	Ap <sup>r</sup> ; pT7-7::958 bp- <i>cbbR</i> -Fragment aus H16 mit artifizieller RBS, P <sub>T7</sub> - Promotor	Windhövel & Bowien (1991)
pAECR6	pTYB12::843 bp- <i>NdeI/NdeI</i> + 129 bp- <i>NdeI/Hin</i> dIII-Fragment aus pAECR5, N-terminale Fusion	Jeffke (2001)
pAECR7	pUC18::1015 bp- <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII Fragment aus pAECR5	Jeffke (2001)
pAECR8	pCYB2::960 bp- <i>Hin</i> cII/SalI-cbbR- Fragment aus H16, C-terminale Fusion	Diese Arbeit
pMP921	Tc <sup>r</sup> ; Mob <sup>+</sup> , Tra <sup>-</sup>	Freter & Bowien (1994)
pMP922	Tc <sup>r</sup> ; Mob <sup>+</sup> , Tra <sup>-</sup>	Freter & Bowien (1994)
pVK101	Tc <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; Mob <sup>+</sup> , Tra <sup>-</sup>	Knauf & Nester (1982)
pUW5	Tc <sup>r</sup> ; pVK101::1.8 kb- <i>Hin</i> dIII/SalI- Fragment mit cbbR aus H16	Windhövel (1989)
pBBR1MCS2	Km <sup>r</sup> ; Mob <sup>+</sup> ; <i>lac</i> POZ	Kovach et al. (1995)
рВК	Tc <sup>r</sup> ; pMP220::1.87 kb- <i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I mit <i>gus</i> A aus pUIDA	Kusian & Bowien (1995)
pBK2241	pBK::236 bp-XbaI/PstI aus pBH2241	Kusian & Bowien (1995)
pTRG	Tc <sup>r</sup> ; <i>lac</i> -UV5 Promoter, RNAPα Orf, ColE1 <i>ori</i>	Stratagene
pBT	Cm <sup>r</sup> ; <i>lac</i> -UV5 Promoter, λC1 Orf, p15A <i>ori</i>	Stratagene
pBH2241	pUC19::224 bp- <i>Eco</i> RI/ <i>Hin</i> dIII; inter- gene <i>cbb</i> -Kontrollregion von H16	Kusian & Bowien (1995)

Fortsetzung Tab. 3 nächste Seite

Plasmid	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz	
pG-KJE8	Cm <sup>r</sup> ; araC, tetR, pACYC ori, dnak-dnaJ- grpE, groES-groEL, araB, Pzt1	TaKaRa Bio	
pGro7	Cm <sup>r</sup> ; <i>araC, tetR</i> , pACYC <i>ori, groES-groEL, araB</i>	TaKaRa Bio	
pKJE7	Cm <sup>r</sup> ; <i>araC, tetR</i> , pACYC <i>ori, dnak-dnaJ-</i> grpE, araB	TaKaRa Bio	
pG-Tf2	Cm <sup>r</sup> ; tetR, pACYC ori, groES-groEL-tig, Pzt1	TaKaRa Bio	
pTf16	Cm <sup>r</sup> ; araC, pACYC ori, tig, araB	TaKaRa Bio	
pSK+::igRL	Ap <sup>r</sup> ; pBluescriptSK+::301 bp- <i>XbaI/PstI</i> - Fragment aus <i>R. metallidurans</i> CH34, mit der intergenen Kontrollregion <i>cbbR-cbbL</i>	T. Mahlmann B. Bowien	&
pSK+::igRE	Ap <sup>r</sup> ; pBluescriptSK+::261 bp- <i>XbaI/PstI</i> - Fragment aus <i>R. metallidurans</i> CH34 mit der intergenen Kontrollregion <i>cbbR-cbbE</i>	Diese Arbeit	
pSK:: <i>cbbR<sub>II</sub></i>	Ap <sup>r</sup> , pBluescriptSK+::1183 bp- <i>SalI/Pst</i> I- Fragment aus <i>R. metallidurans</i> CH34, <i>cbbR<sub>II</sub></i> mit der intergenen Kontrollregion <i>cbbR-cbbE</i>	Diese Arbeit	
pMP921:: <i>cbbR<sub>I</sub></i>	Tc <sup>r</sup> ; pMP921::1395 bp- <i>Pst</i> I-Fragment aus <i>R. metallidurans</i> CH34, <i>cbbR</i> <sub>1</sub> mit der intergenen Kontrollregion <i>cbbR-cbbL</i>	T. Mahlmann B. Bowien	&
pMP922:: <i>cbbR</i> <sub>I</sub>	Tc <sup>r</sup> ; pMP922::1395 bp- <i>Pst</i> I-Fragment aus <i>R. metallidurans</i> CH34, <i>cbbR</i> <sub>1</sub> Gen mit der intergenen Kontrollregion <i>cbbR-cbbL</i>	T. Mahlmann B. Bowien	&
pMP921:: <i>cbbR<sub>II</sub></i>	Tc <sup>r</sup> ; pMP921::1183 bp- <i>KpnI/Pst</i> I-Fragment aus pSK:: <i>cbbR</i> <sub>II</sub>	Diese Arbeit	
pMP921::phcA*	Tc <sup>r</sup> ; pMP921::3,3 kb- <i>KpnI/Bam</i> HI-Fragment mit <i>phcA</i> <sup>*</sup> aus HB14R	Diese Arbeit	
pUC19:: $\Delta cbbR_{II}$	Ap <sup>r</sup> ; pUC19::569 bp- <i>XbaI/SacI-cbbR<sub>II</sub></i> Deletionsfragment aus <i>R. metallidurans</i> CH34	Diese Arbeit	
pNHG::∆ <i>cbbR</i> <sub>II</sub>	Ap <sup>r</sup> ; pUC19::569 bp- <i>Xba</i> I/SacI-cbbR <sub>II</sub> Deletionsfragment aus pUC19::ΔcbbR <sub>II</sub>	Diese Arbeit	
pUC19:: $\Delta cbbR_I$	Ap <sup>r</sup> ; pUC19::534 bp- <i>XbaI/Bam</i> HI- <i>cbbR<sub>II</sub></i> Deletionsfragment aus <i>R. metallidurans</i> CH34	Diese Arbeit	
pNHG:: $\Delta cbbR_I$	Ap <sup>r</sup> ; pNHG::534 bp- <i>XbaI/SacI-cbbR<sub>I</sub></i> - Deletionsfragment aus pUC19::∆ <i>cbbR</i> <sub>I</sub>	Diese Arbeit	
pT7-7:: <i>cbbR</i> <sub>I</sub>	Ap <sup>r</sup> ; pT7-7::894 bp- <i>NdeI/Bam</i> HI-Fragment mit <i>cbbR<sub>I</sub></i> aus <i>R. metallidurans</i> CH34	T. Mahlmann B. Bowien	&

Tab. 3. Verwendete Plasmide (Fortsetzung)

Fortsetzung Tab. 3 nächste Seite

Plasmid	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz
pT7-7:: <i>cbbR</i> <sub>II</sub>	Ap <sup>r</sup> ; pT7-7::929 bp- <i>NdeI/Sal</i> I-Fragment mit <i>cbbR<sub>II</sub></i> aus <i>R. metallidurans</i> CH34	Diese Arbeit
pBTR23	pBT::962 bp- <i>XhoI/Eco</i> RI-Fragment mit <i>cbbR</i> aus H16	Diese Arbeit
pTRGR83	pTRG::923 bp- <i>XhoI/Eco</i> RI-Fragment mit <i>cbbR</i> aus H16	Diese Arbeit
pAECRG203L	pUC18::1015 bp- <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> G203L-Fragment amplifiziert mit pAECR7	Diese Arbeit
pAECRA175E	pUC18::1015 bp- <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> A175E-Fragment amplifiziert mit pAECR7	Diese Arbeit
pAECRW274R	pUC18::1015 bp- <i>XbaI/Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> W274R-Fragment amplifiziert mit pAECR7	Diese Arbeit
pAECRG205E	pUC18::1015 bp- <i>XbaI/Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> G205E-Fragment amplifiziert mit pAECR7	Diese Arbeit
pAECRR135C	pUC18::1015 bp- <i>XbaI/Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> R135C-Fragment amplifiziert mit pAECR7	Diese Arbeit
pDSCH	pBBR1MCS2::198 bp- <i>XbaI/SacI-Fragment</i> mit <i>cbb</i> -Kontrollregion von H16	Diese Arbeit
pDSCHR 203	pDSCHR::1015 bp- <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> G205L-Fragment aus pAECRG203L	Diese Arbeit
pDSCHR 175	pDSCHR::1015 bp- <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> A175E-Fragment aus pAECRA175E	Diese Arbeit
pDSCHR 274	pDSCHR::1015 bp- <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> W274R-Fragment aus pAECRW274R	Diese Arbeit
pDSCHR 205	pDSCHR::1015 bp- <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> G203E-Fragment aus pAECRG205E	Diese Arbeit
pDSCHR 135	pDSCHR::1015 bp- <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> R135C-Fragment aus pAECRR135C	Diese Arbeit
pDSCHR WT	pDSCHR::1015 bp- <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> - Fragment aus pAECR 7	Diese Arbeit
pAECR8	pT7-7::1015 bp- <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> W274R-Fragment aus pAECR W274R	Diese Arbeit
pAECR9	pT7-7::1015 bp- <i>XbaI/Hin</i> dIII- <i>cbbR</i> A175E- Fragment aus pAECR A174E	Diese Arbeit
pUC19::∆ <i>regA</i>	pUC19::562 bp- <i>XbaI/Bam</i> HI- <i>regA</i> - Deletionsfragment, amplifiziert mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit

Tab. 3. Verwendete Plasmide (Fortsetzung)

Fortsetzung Tab. 3 nächste Seite

Plasmid	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz
pNHG::∆regA	pNHG1::562 bp- <i>PmeI/SacI-regA</i> - Deletionsfragment aus pUC19::∆ <i>regA</i>	Diese Arbeit
pT7-7:: <i>regA</i>	pT7-7::875 bp- <i>NdeI/Bam</i> HI- <i>regA</i> - Fragment, amplifiziert mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit
pUC19::∆ <i>regB</i>	pUC19::649 bp- <i>XbaI/Bam</i> HI- <i>regB</i> - Deletionsfragment, amplifiziert mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit
pNHG::∆regB	pNHG1::649 bp- <i>PmeI/SacI-regB</i> - Deletionsfragment aus pUC19::∆ <i>regB</i>	Diese Arbeit
pUC19::∆ <i>orfR</i>	pUC19::644 bp- <i>XbaI/Bam</i> HI- <i>orfR</i> - Deletionsfragment, amplifiziert mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit
pNHG::∆orfR	pNHG1::644 bp- <i>PmeI/SacI-orfR</i> -Deletions- fragment aus pUC19::∆ <i>orfR</i>	Diese Arbeit
pUC18:: <i>orfR</i>	pUC18::1240 bp- <i>PstI/XbaI-orfR</i> -Fragment amplifiziert, mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit
pUC19::ΔorfV	pUC19::775 bp- <i>XbaI/SacI-orfV</i> -Deletions- fragment, amplifiziert mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit
pNHG::∆orfV	pNHG1::775 bp- <i>XbaI/SacI-orfV</i> -Deletions- fragment aus pUC19::∆ <i>orfV</i>	Diese Arbeit
pUC19::∆orfG	pUC19::534 bp- <i>XbaI/SacI-orfG</i> -Deletions- fragment, amplifiziert mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit
pNHG::∆orfG	pNHG1::534 bp- <i>XbaI/SacI-orfG</i> -Deletions- fragment aus pUC19::∆ <i>orfG</i>	Diese Arbeit
pUC19::∆aepA	pUC19::617 bp- <i>XbaI/Bam</i> HI- <i>aepA</i> - Deletionsfragment, amplifiziert mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit
pNHG∷∆aepA	pNHG1::617 bp- <i>XbaI/SacI-aepA-</i> Deletionsfragment aus pUC19::∆ <i>aepA</i>	Diese Arbeit
pUC19::ΔsspA	pUC19::755 bp- <i>SmaI/SacI-sspA</i> -Deletions- fragment, amplifiziert mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit
pNHG::∆sspA	pNHG1::755 bp-SmaI/SacI-sspA- Deletionsfragment aus pUC19::∆sspA	Diese Arbeit
pUC19::ΔfrcR	pUC19::692 bp- <i>XbaI/SacI-frcR</i> -Deletions- fragment aus pUC19::∆ <i>frcR</i>	Diese Arbeit

Tab. 3. Verwendete Plasmide (Fortsetzung)

Plasmid	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz
pNHG::∆ <i>frcR</i>	pNHG1::692 bp- <i>XbaI/SacI-frcR</i> -Deletions- fragment, amplifiziert mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit
pUC19::∆ <i>cmk</i>	pUC19::555 bp- <i>Xba</i> I/SacI-cmk-Deletions- fragment, amplifiziert mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit
pNHG::∆ <i>cmk</i>	pNHG1::555 bp- <i>XbaI/SacI-cmk</i> -Deletions- fragment aus pUC19::∆ <i>cmk</i>	Diese Arbeit
pUC19::∆orfP	pUC19::559 bp- <i>Xba</i> I/SacI-orfP-Deletions- fragment, amplifiziert mit chromosomaler DNA von H16	Diese Arbeit
pNHG::ΔorfP	pNHG1::559 bp- <i>XbaI/SacI-orfP</i> Deletions- fragment aus pUC19::∆orfP	Diese Arbeit

Tab. 3. Verwendete Plasmide (Fortsetzung)

Bezeichnung der Phänotypen: Ap<sup>r</sup>, Ampicillinresistenz; Km<sup>r</sup>, Kanamycinresistenz; Tc<sup>r</sup>, Tetracyclinresistenz; Cm<sup>r</sup>, Chloramphenicolresistenz; +, Merkmal vorhanden; -, Merkmal nicht vorhanden; Genotypenbezeichnungen gemäß Berlyn et al., (1996).

## 2.2 Nährmedien und Zellanzucht

## 2.2.1 Nährmedien für *Ralstonia* spp.

Die Stämme von *Ralstonia* wurden in Mineralmedium mit unterschiedlichen organischen und anorganischen Supplementen oder in Komplexmedien angezogen. Zur Herstellung fester Nährböden wurde den Medien vor dem Autoklavieren Agar in einer Konzentration von 1.5 % (w/v) zugesetzt.

### Mineralmedium (nach Schlegel et al., 1961)

Lösung A (30x)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	270	g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	45	g
	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1,000	ml
Lösung B (30x)	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	6	g
	NH <sub>4</sub> Cl	60	g
	SL7	30	ml
	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1,000	ml
Lösung C	Fe(III)NH <sub>4</sub> -Citrat	125	mg
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	250	mg
	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 250	ml

Spurenelementelösung	SL7	(Pfennig	& Trüper,	1981; modifiziert)
----------------------	-----	----------	-----------	--------------------

1.3	ml
62	mg
190	mg
17	mg
100	mg
36	mg
24	mg
70	mg
ad 1,000	ml; pH 6.5
	1.3 62 190 17 100 36 24 70 ad 1,000

Die Lösungen A und B wurden im Verhältnis 1:1:28 mit  $H_2O$  bidest. gemischt. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit verdünnter Phosphorsäure auf 7.0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 0.01 Volumen Lösung C und der jeweiligen Substrate.

#### Komplexmedium

Nutrient Broth (NB)	8	g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1,000	ml

#### Anzuchten in Mineralmedium

Die Substratlösungen wurden als 100-fach konzentrierte Stammlösungen (5-40 % [w/v]) angesetzt und sterilfiltriert. Für heterotrophe Anzuchten unter Luft wurde das Mineralmedium mit 0.2 oder 0.4 % (w/v) Fructose oder 0.2 % (w/v) der jeweiligen Substrate supplementiert. Lithoautotrophe Anzuchten erfolgten nach Zusatz von 0.05 % (w/v) NaHCO<sub>3</sub> zum Medium unter einer Atmosphäre aus 80 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 10 % O<sub>2</sub> (v/v).

#### 2.2.2 Nährmedien für *E. coli*

Die Anzuchten von *E. coli* wurden in LB-Medium (Sambrook et al., 1989; modifiziert) durchgeführt.

#### Luria-Bertani Broth (LB)

Bacto-Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	5	g
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1,000	ml

Zur Bereitung von Nährböden wurde dem Medium vor dem Autoklavieren Agar in einer Endkonzentration von 1.5 % (w/v) zugesetzt. Indikatorplatten zur Selektion rekombinanter Klone enthielten zusätzlich 0.1 mM IPTG und 0.002 % (w/v) X-Gal. Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde das Medium durch Zugabe von 12.5 ml 40 % (w/v) Glucose und 2.5 ml 1 M  $MgCl_2 + 1 M MgSO_4$  supplementiert.

Für die Suche nach interagierenden Proteinen mit dem "Bacteriomatch Two Hybrid"-System (Stratagene, Amsterdam) wurden LB-Platten mit vier Antibiotika (Chloramphenicol, Tetracyclin, Kanamycin und Carbenicillin; CTCK-Platten) oder mit drei Antibiotika und X-Gal als Indikator verwendet (s. 2.2.3). In die X-Gal-Indikatorplatten wurde zusätzlich ein  $\beta$ -Galactosidase-Hemmstoff, Phenylethyl- $\beta$ -D-thiogalactosid, gegeben, um die Hintergrund-aktivität zu verringern. Da Carbenicillin insbesondere in wässrigen Lösungen nicht lange stabil ist, wurden die Platten über Nacht getrocknet und am nächsten Tag verwendet.

#### **X-Gal Indikator Platten**

NaCl	10	g
Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
Phenylethyl-β-D-thiogalactosid	200	mМ
X-Gal	0.2	mМ
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1000	ml

Der Indikator X-Gal, das Phenylethyl- $\beta$ -D-thiogalactosid und die Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

## 2.2.3 Antibiotika

Für die Selektion von Klonen mit Hilfe von Resistenzmarkern erfolgten die Anzuchten unter Zusatz folgender Antibiotika (nach den Angaben von Sambrook et al., 1989):

E. coli:	Ampicillin	50	µg/ml
	Kanamycin	50	µg/ml
	Chloramphenicol	20-34	µg/ml
	Tetracyclin	15	µg/ml
	Carbenicillin	300	µg/ml
R. eutropha:	Kanamycin	120	µg/ml (NB-Medium)
_		350-500	µg/ml (Mineralmedium)
	Tetracyclin	20	μg/ml
R. metallidurans	Kanamycin	6	mg/ml (Mineralmedium)
	Tetracyclin	20	µg/ml

#### 2.2.4 Anzuchtbedingungen

Die Vermehrung der Stämme erfolgte in Erlenmeyerkolben oder Reagenzgläsern mit 1-10 % Kulturvolumen. Kulturen von *R. eutropha* und *R. metallidurans* wurden bei 30°C, diejenigen von *E. coli* bei 37°C unter Schütteln angezogen. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien, Hauptkulturen mit 1-2 % (v/v) einer gut gewachsenen Vorkultur beimpft. Für lithoautotrophe Anzuchten von *Ralstonia* spp. wurden die Kolben im Witt'schen Topf unter entsprechendem Gasgemisch inkubiert. Um größere Mengen Zellen zu erhalten, wurde *R. eutropha* im 100 1 Fermenter (B. Braun Diessel Biotech, Melsungen) angezogen. Zum Animpfen des Fermenters wurde zunächst eine Vorkultur von 4 1 in einer 6 1 Steilhalsflasche im entsprechenden Medium unter Rühren und Belüftung mit Druckluft bis zu einer OD<sub>436</sub> von 1.5-2 angezogen. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD<sub>436</sub> von max. 7.0 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Durchfluß-Zentrifuge (CEPA, Lahr/Schwarzwald) geerntet, portioniert und bei -20°C eingefroren.

#### 2.2.5 Bestimmung der Zelldichte

Das Wachstum von Kulturen wurde anhand der optischen Dichte (OD) verfolgt. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer (Shimadzu UV 120-02; Shimadzu, Duisburg) bei einer Wellenlänge von 436 nm für *Ralstonia* spp. sowie bei 550 oder 600 nm für *E. coli* durchgeführt. Die Kulturen wurden dabei so verdünnt, dass eine gemessene OD von 0.3 nicht überschritten wurde.

Wachstumsversuche unter heterotrophen und organoautotrophen Bedingungen mit *Ralstonia* wurden in Photometerkolben durchgeführt. Die Trübungsmessung erfolgte dabei direkt im Seitenarm der Kolben in einem Klett-Summerson-Photometer (Klett, New York, NY, USA; Filter No. 54: 520-580 nm). Anhand einer Eichkurve wurden die gemessenen Werte (Klett-Einheiten) in  $OD_{436}$ -Werte umgerechnet. Wachstumsverläufe unter lithoautotrophen Bedingungen wurden mit Proben bestimmt, die aus Kulturen in entsprechenden Zeitabständen entnommen wurden.

#### 2.2.6 Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Für eine Lagerung bis zu 8 Wochen wurden häufig benötigte Stämme von *Ralstonia* und *E. coli* auf Agarplatten angezogen und bei 4°C gelagert. Kurzfristig bis maximal 14 Tage wurden die Stämme in 10 ml-Flüssigmedien kultiviert und bei 4°C gelagert. Eine Langzeitlagerung erfolgte in Glycerin-Suspensionen nach Yanisch-Perron et al. (1985). Dazu

wurden sterile 2 ml-Schraubdeckelröhrchen mit 0.5 ml 87 % (w/v) Glycerin angesetzt, mit 0.5 ml einer frisch gewachsenen Kultur gemischt und bei -70°C gelagert. *Ralstonia* spp. wurde dafür in Mineral- oder NB-, *E. coli* in LB-Medium angezogen.

Eine Reinheitsüberprüfung der Kulturen erfolgte durch mikroskopische Kontrolle (Zellform), Ausstrich auf Komplexnährböden (Koloniemorphologie) unter entsprechendem Selektionsdruck in Gegenwart von Antibiotika oder durch Anzucht unter spezifischen Bedingungen (autotrophe Kultivierung von *Ralstonia* spp.).

#### 2.2.7 Zellernte

Kulturen im Maßstab von 10-100 ml wurden durch Zentrifugation in 10 ml- oder 50 ml-Pyrex-Schraubdeckelröhrchen (Sigma 3K-1; Sigma, Osterode; 20 min, 4,000 Upm, 4°C) oder in 40 ml-Polyallomerröhrchen (SS 34-Rotor, Sorvall RC5C, DuPont de Nemours, Bad Homburg; 10 min, 10,000 Upm, 4°C) geerntet.

Bei kleineren Kulturvolumina von bis zu 4 ml erfolgte die Zellernte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einer Mikrozentrifuge (Sigma 1-15, Sigma, Osterode) bei RT und 13,000 Upm für 5 min. Für einen Aufschluss vorgesehene Zellen wurden mit dem jeweiligen Aufschlusspuffer oder Saline gewaschen und bei 4°C und 13,000 Upm für 5 min sedimentiert (Sigma 1-15 K, Sigma, Osterode).

 Saline
 NaCl
 0,8 % (w/v)

#### 2.2.8 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Die heterologe Genexpression in *E. coli* erfolgte mit Hilfe verschiedener Vektoren unter der Kontrolle von *lac-, tac-, araB-* oder *Pzt-1* (tet)-Promotoren. Alternativ oder parallel wurde ein T7-RNA-Polymerase/Promotor System genutzt. Die verwendeten Systeme waren durch die Zugabe von IPTG, L-Arabinose oder Tetracyclin induzierbar. Die Anzucht der Kulturen erfolgte bei 37°C zunächst bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0.4-0.8 daraufhin wurde die Expression induziert und die Kultur für weitere 3-5 h inkubiert.

#### 2.2.8.1 Heterologe Genexpression mit dem T7-RNA-Polymerase/Promoter-System

Für die heterologe Genexpression in *E. coli* wurde das T7-RNA-Polymerase/Promotor-System in Verbindung mit dem Vektor pT7-7 verwendet. Die Induktion der Expression von Genen, die in pT7-7 kloniert vorlagen, erfolgte in *E. coli* BL21-DE3. Dieser Stamm besitzt ein chromosomal integriertes Gen für die T7-RNA-Polymerase, dessen Expression unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors steht. Dieser ist durch die Zugabe IPTG in einer Endkonzentration von 0.5 mM induzierbar. Zusätzlich besitzt der Vektor eine optimierte Ribosomenbindungsstelle, um eine verbesserte Translation der klonierten Gene zu gewährleisten.

#### 2.2.8.2 Genexpression mit dem Impact-CN<sup>TM</sup>-System

Das Impact-CN-System (New England Biolabs, Schwalbach) erlaubt die schnelle Isolation und Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie. Es erfolgt eine C- oder Nterminale Fusion des Zielproteins mit einem Chitin-bindenden Affinitäts-,Tag'. Dieser enthält ein selbstspleißendes Proteinelement (Intein), das unter reduzierenden Bedingungen aktiv wird und so den ,Tag' vom Zielprotein trennt. Der Vektor pCYB2 dient der Konstruktion eines C-terminalen Fusionsproteins, das unter der Kontrolle eines mit IPTG induzierbaren *lac-* Promoters steht. Die Expression wurde in *E. coli* JW1 durchgeführt. Eine N-terminale Fusion ist mit dem Vektor pTYB12 möglich. Die Expression des Fusionsproteins in diesem Vektor liegt unter der Kontrolle eines T7-RNA-Polymerase/Promotor-Systems. Sie erfolgte in *E. coli* ER2566. Dieser Stamm trägt ein chromosomal integriertes T7-RNA-Polymerase Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Zusätzlich sind in diesem Stamm die Proteasegene *lon* und *ompT* deletiert. Beide Systeme wurden mit 0.5 mM IPTG induziert.

#### 2.2.8.3 Co-Expression von Chaperongenen

Die Überproduktion von Proteinen in *E. coli* führt häufig zur Bildung von Einschlußkörpern (inclusion bodies) in den Zellen und zum proteolytischen Abbau dieser Proteine. Eine Möglichkeit, dies zu verhindern, ist die Co-Expression des Zielprotein- und eines Chaperongenes (Chaperone Plasmid Set, TaKaRa Bio Inc., Potsdam). Die Chaperon Plasmide pGro7, pKJE7, pTf16, pG-KJE8 enthalten ein bzw. mehrere Chaperongene unter der Kontrolle eines *araB*-Promoters. In den Plasmiden pG-Tf2 und pG-KJE8 stehen die Gene unter der Kontrolle des *Pzt-1* (tet)-Promoters. Außerdem haben sie den Replikationsursprung von pACYC und sind damit kompatibel zu Plasmiden mit ColE1-Replikationsursprung wie pT7-7. Zunächst wurden kompetente Zellen von BL21DE3 hergestellt (s. 2.13.1), die ein entsprechendes Chaperon Plasmid trugen. Das betreffende Expressionsplasmid für das Zielprotein wurde anschließend in die Zellen transformiert. Die Zellen wurden bei 30°C in LB-Medium bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0.4-0.6 angezogen. Wonach die Zugabe von L-Arabinose und/oder Tetracyclin bis zu einer Endkonzentration von 4 mg/ml bzw. 5 ng/ml erfolgte. Nach

weiterer Inkubation für 1-3 h bei 30°C wurde das Zielprotein mit 0.5 mM IPTG induziert und für weitere 3 h bei 30°C inkubiert.

### 2.3 Zellaufschluß und Herstellung von Rohextrakten

Der Aufschluss kleinerer Zellmengen erfolgte durch Ultraschallbehandlung. Hierzu wurden die Zellen in einem geeignetem Aufschlusspuffer resuspendiert, so dass eine OD<sub>436</sub> von 100 - 200 ereicht wurde. Die Zellsuspension wurde in Cyclen von 0.5 s und 0.5 s Kühlpause (Eis/NaCl-Mischung) bei einer Amplitude von 30 % für 5-10 min beschallt (Ultraschallgerät UP 200s, Dr. Hielscher, Stuttgart). Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (13,000 Upm, 4°C, 20 min; Mikrozentrifuge). Der zellfreie Überstand diente als Rohextrakt und wurde bis zur direkt anschließenden Verwendung auf Eis gelagert.

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach Bradford (1976; modifiziert) unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Referenzprotein. Von der Proteinlösung wurden 10 µl einer geeigneten Verdünnung mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 578 nm innerhalb eines linearen Bereiches ( $\leq 0.3$ ) gegen den Reagenzienleerwert im Spektralphotometer (Uvikon Spektralphotometer 922; Kontron Instruments, Eching) gemessen.

#### **Bradford-Reagenz**

Serva Blau G-250	70	mg
96 % (w/v) Ethanol	50	ml
85 % (w/v) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100	ml
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1,000	ml

Die frisch angesetzte Lösung wurde nach 24 h filtriert und anschließend mit dieser eine Eichgerade erstellt. Sie konnte lichtgeschützt in einer Braunglasflasche bis zu einem Jahr gelagert werden.

#### Erstellen der Eichgerade

Für die Erstellung der Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Zunächst wurde eine Stammlösung mit 5 mg/ml in bidest. Wasser hergestellt. Von einer Verdünnung dieser Stammlösung (1:10) wurde zur Bestimmung der tatsächlichen Konzentration die Adsorption bei 280 nm (Quarzküvette) gegen Wasser gemessen. Betrug diese nicht 0.33, so

wurde der tatsächliche Wert durch 0.33 dividiert und mit 5 multipliziert. Die Stammlösung wurde anschließend auf eine Konzentration von genau 1 mg/ml eingestellt.

Die Eichgerade selbst wurde mit Doppelproben aufgenommen, die jeweils 1, 2, 4, 6, 8 und  $10 \mu g$  BSA enthielten.

#### 2.4 Elektrophorese von Proteinen

#### 2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in eindimensionalen, diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE; Laemmli, 1970; modifiziert). Die Elektrophorese wurde in vertikalen Minigelen (6 x 8 x 0.1 cm) in geeigneten Gelkammern (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Sammel- und Trenngele wurden nach folgender Zusammensetzung hergestellt:

Stammlösung	Zusammensetzung	Trenn 12 % (	gel (w/v)	Sammelgel 5% (w/v)	
Acrylamid-	30 % (w/v) Acrylamid	2.4	ml	0.34	ml
/Bisacrylamidlösung	0.8 % (w/v) Bisacrylamid				
Puffer Sammelgel	1 M Tris-HCl, pH 8.9	2.3	ml		
Puffer Trenngel	0.25 M Tris-HCl, pH 6.8			1	ml
SDS-Stammlösung	20 % (w/v) SDS	30	μl	10	μl
H <sub>2</sub> O bidest.		1.9	ml	0.65	ml
Ammoniumpersulfat	10 % (w/v) in $H_2O$ bidest.	30	μl	12	μl
TEMED		5	μl	2	μl

Die Gellösungen wurden jeweils frisch angesetzt. Durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED wurde die Polymerisation gestartet. Nach dem blasenfreien Eingießen der Trenngellösung wurde diese sofort mit Wasser überschichtet, um einen glatten Abschluss des Geles zu gewährleisten. Nach 30 min Polymerisation des Trenngels wurden die Sammelgel-Lösung aufgetragen und der Kamm eingesetzt. Pro Geltasche konnten bei Verwendung eines zehnzähnigen Kamms maximal 15 µl aufgetragen werden.

#### **Probenvorbereitung und Elektrophorese**

Die Proteinprobe wurde mit 0.3 Volumen Probenpuffer versetzt, 10 min im kochendem Wasserbad denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach dem Abkühlen auf RT wurden die Proben kurz anzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Als Proteingrößenstandard diente eine 10 kDa-Proteinleiter (Page Ruler; Fermentas, St. Leon-Rot). Die Menge der aufgetragenen Proteine hing von der sich anschließenden Färbemethode ab (10 µg bei Coomassiefärbung, 1-

10 µg Colloidale Comassiefärbung oder 0.1-1 µg bei Silberfärbung). Die Elektrophorese erfolgte bei RT und einer Stromstärke von 25 mA, bis die Farbmarkerbande den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Proben- und Elektrophoresepuffer setzten sich folgendermaßen zusammen:

Probenpuffer	Tris-HCl, pH 7.0	60	mM
-	Glycerin	10	% (w/v)
	SDS	1	% (w/v)
	Bromphenolblau	0.01	% (w/v)
	$\beta$ -Mercaptoethanol (frisch)	1	% (w/v)
Elektrophoresepuffer	Tris pH 8.3	25	mM
	Glycin	192	mM
	SDS	0.1	% (w/v)

#### 2.4.2 Comassie Blue-Färbung

Für die Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blue wurden diese für 20-30 min in Färbelösung (Weber & Osborn, 1969) geschwenkt und anschließend solange mit Entfärbelösung behandelt, bis der Hintergrund vollständig entfärbt war. Die Entfärbelösung wurde dabei ein- bis zweimal gewechselt. Die gefärbten Gele wurden mit Azidlösung (0.02 % [w/v] NaN<sub>3</sub>) in Folie eingeschweißt und konnten so im Dunkeln bei 4 °C über längere Zeiträume gelagert werden.

Färbelösung	Serva Blau G-250	1.65 g
	Methanol	330 ml
	Essigsäure	100 ml
	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1,000 ml
Entfärbelösung	Methanol	330 ml
	Essigsäure	100 ml
	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1,000 ml

#### 2.4.3 Colloidale Comassie Blue-Färbung

Die colloidale Comassiefärbung (nach Neuhoff et al., 1985, 1988) wurde zur Färbung von Zweidimensionalen-Polyacrylamidgelen verwendet. Sie hat eine höhere Empfindlichkeit als die Comassie Blue-Färbung (0.25 ng/Bande) und stört die massenspektrometrische Auswertung von Proteinen weniger als die Silberfärbung. Die Fixierung der Proteine erfolgte zunächst in der Fixierungslösung für 1 h. Daraufhin wurde die Fixierungslösung gegen die Gebrauchslösung ausgetauscht und das Gel in dieser 1-16 h gefärbt. Anschließend wurde das

Gel 1-3 min in Puffer CC gewaschen und überschüssige Farbe durch Schwenken mit 25 % Methanol für 1 min entfernt. Zur Lagerung wurde das Gel mit 20-25 % (w/v) Ammoniumsulfat-Lösung behandelt und in Folie eingeschweißt.

Sollte das Gel anschließend noch mit Silber gefärbt werden, wurde es in CC-Entfärbelösung (50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Wasser) entfärbt.

Fixierungslösung		Gebrauchslösung für die Färbung		
12 % (w/v)	Trichloressigsäure	80 ml 20 ml	Färbelösung Methanol	
Färbelösung		Puffer CC		
2 % (w/v)	Phosphorsäure (2 g 85 % Säure in 100 ml H <sub>2</sub> O bidest., Ammoniumsulfat vor Zugabe des Farbstoffes komplett in der Säure lösen)	0.1 M	Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.5	
10 % (w/v)	Ammoniumsulfat	Farbstoff-St	ammlösung	
0.1 % (w/v)	Serva Blue G-250	1 g Serva Blu	ue G-250 in 20 ml Wasser	

#### 2.4.4 Silberfärbung

Für geringe Proteinmengen (<1  $\mu$ g) wurde eine Silberfärbung (Blum et al., 1987) eingesetzt. Sie zeichnet sich gegenüber der Färbung mit Coomassie-Blue durch eine um etwa drei Größenordnungen höhere Sensitivität aus. Die Nachweisgrenze für die Silberfärbung liegt bei 2 - 5 ng, die für Coomassie-Blau bei 0.3 - 1  $\mu$ g (Ausubel et al., 1988). Alle Schritte wurden in Plastikschalen bei RT unter Schwenken durchgeführt.

Schritt	Lösungen			Dauer
Fixieren	Methanol Essigsäure 37 % (w/v) Formaldehyd H <sub>2</sub> O bidest.	500 120 0.5 ad 1,000	ml ml ml ml	1 h oder länger
Waschen	Ethanol H <sub>2</sub> O bidest.	500 ad 1,000	ml ml	3 x 20 min
Vorbehandlung	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O bidest.	0.2 ad 1,000	g ml	30 s
Waschen	H <sub>2</sub> O bidest.			3 x 20 s
Imprägnieren	AgNO <sub>3</sub> 37 % (w/v) Formaldehyd H <sub>2</sub> O bidest.	2 0.5 ad 1,000	g ml ml	20 min
Waschen	H <sub>2</sub> O bidest.			2 x 20 s
Entwickeln	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 37 % (w/v) Formaldehyd	60 0.5	g ml	2 - 8 min
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O bidest.	4 ad 1,000	mg ml	
Stop	EDTA H <sub>2</sub> O bidest.	18.6 ad 1,000	g ml	15 min

#### 2.5 2D-Elektrophorese

#### 2.5.1 Probenvorbereitung

Sollten Lysate ganzer Zellen verwendet werden, wurden die Zellen direkt im 2D-Probenpuffer aufgeschlossen. Da die isoelektrische Fokussierung (erste Dimension) der 2D-PAGE sehr empfindlich auf Salzkonzentrationen >10 mM reagiert, wurden Proteinlösungen, die aus der Affinitätschromatographie (s. 2.9) stammten, zunächst gegen DNA-Bindepuffer über Nacht dialysiert. Um weiteres Salz zu entfernen und die verdünnte Proteinlösung zu konzentrieren, wurde dann eine Chloroform/Methanolfällung (Wessel & Flügge, 1984) durchgeführt. Für die Fällung wurde die Proteinlösung zunächst in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf ein Volumen von 100  $\mu$ l gebracht. Nach dem Einmischen von 400  $\mu$ l Methanol erfolgte eine Zentrifugation (10 s, 9,000 x g) und eine weitere Zugabe von 100  $\mu$ l Chloroform. Dem folgte eine weitere Zentrifugation für 10 s bei 9,000 x g daraufhin wurden weitere 300  $\mu$ l Wasser eingemischt. Das Gemisch wurde 3 min bei 9,000 x g bei 4°C zentrifugiert, wobei sich zwei Phasen bilden sollten. War dies nicht der Fall, wurden weitere 100  $\mu$ l Chloroform hinzugefügt. Die obere Phase wurde abgenommen, ohne die Interphase zu stören, in der sich zu diesem Zeitpunkt das Protein befand, und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die untere Phase wurde mit 300 μl Methanol gemischt und 10 min bei 4°C und 14,000 x g zentrifugiert. Das Protein bildete dabei ein Pellet, das über die Wand des Reaktionsgefäßes verteilt war. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei RT getrocknet. Bis zur Verwendung konnte das Pellet bei -20°C gelagert werden.

#### 2.5.2 Auftrennung der Proteine in der 2D-PAGE

Zum Auftrennen komplexer Proteingemische wurden diese einer zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE; O'-Farell, 1975, mod.) unterzogen. In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, werden die Proteine in einem pH-Gradienten (pH 3-10) durch ihre spezifische Ladung (isoelektrischer Punkt) getrennt. In der zweiten Dimension erfolgt eine Auftrennung anhand der molekularen Masse in einer SDS-PAGE.

#### Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Dabei werden die Proteine innerhalb eines pH Gradienten im elektrischen Feld aufgetrennt. Aufgrund ihrer spezifischen Ladung wandern die Proteine im elektrischen Feld bis zu dem pH-Wert an dem die Summe der positiv und negativ geladenen Aminosäurereste ausgeglichen ist (isoelektrischer Punkt). Da an diesem Punkt die Nettoladung der Proteine gleich Null ist, findet keine weitere Wanderung im elektrischen Feld statt. Die Bildung eines stabilen pH-Gradienten wird bei den verwendeten Gelstreifen (IPG-Streifen; Amersham Pharmacia, Freiburg) durch die Copolymerisation definierter Chemikalien, den Immobilinen, an die Acrylamidmatrix erreicht. Um eine möglichst gute Trennung der Proteingemische zu erreichen, wurde in der ersten Dimension ein breiter pH-Gradient von 3-11 verwendet.

Die gewünschte in Probenpuffer gelöste Proteinmenge (100 µg) wurde mit zusätzlichem Probenpuffer auf 170 µl aufgefüllt. Vor der Applikation wurden 170 µl Rehydrierungslösung hinzugefügt und das Gemisch in ein Keramikgefäß pipettiert. Von einem IPG-Streifen wurde kurz vor Gebrauch die Plastikfolie entfernt, der Streifen mit der Gelseite nach unten in das Keramikgefäß gelegt und so lange bewegt, bis die Probe gleichmäßig verteilt war und den Streifen gleichmäßig und luftblasenfrei benetzte. Um ein Austrocknen während des Rehydrierens und dem Lauf zu verhindern, wurde der Streifen mit 2 ml Silikonöl (Dry-stripcover-fluid; Amersham Pharmacia) bedeckt. Die verschlossene Keramikhalterung wurde dann auf die IPGphor-Apparatur (Amersham Pharmacia) gelegt. Nach einer 12-stündigen Rehydrierung des Gelstreifens wurde die Isofokussierung bei 20°C und 50 µA pro Streifen durchgeführt. Dabei fand folgendes Programm Verwendung:

Stufe		Zeit (h)	Spannung (V)
1		12	Rehydrierung
2	Konstant	3	100
3	Konstant	1	200
4	Konstant	1	500
5	Gradient	1	500-8000
6	Konstant	6	8000

Programm für die Isoelektrische Fokussierung:

#### Zweite Dimension (SDS-PAGE):

Nach der Isofokussierung konnten die IPG-Streifen entweder bei -80°C eingefroren oder direkt in der zweiten Dimension eingesetzt werden. Vor der SDS-PAGE wurden die Streifen in Plastikfolie eingeschweißt, 15 min bei RT in 10 ml Äquilibrierungspuffer geschwenkt und anschließend kurz auf wassergetränktes Filterpapier gelegt um überschüssigen Puffer zu entfernen. Dann wurden die Streifen durch SDS-Laufpuffer (s. 2.4.1) gezogen und mit Hilfe einer Pinzette und eines Spatels auf ein SDS-Polyacrylamidgel (20 x 20 cm x 1 mm, 12 % [w/v] Acrylamid) gelegt. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA für 15 h durchgeführt bis die blaue Bande des Farbstoffs eine Position ca. 1 cm vor Gelende erreicht hatte. Je nach eingesetzter Proteinmenge wurden die Gele durch Colloidale Comassie Blue- (s. 2.4.3) oder Silberfärbung (s. 2.4.4) gefärbt.

Probenpuffer <sup>a</sup>		Rehydrierungslösung <sup>a</sup>		
Harnstoff	8 M	Harnstoff	8 M	
CHAPS	2 % (w/	v) CHAPS	2 % (w/v)	
Tris	40 mM	Pharmalyte <sup>b</sup>	0.5 % (v/v)	
Pharmalyte pH 3-10 <sup>b</sup>	0.5 % (v/v	y) Bromphenolblau	wenige Kristalle	
DTT <sup>b</sup>	1 % (w/	v) DTT <sup>b</sup>	2.8  mg/ml	
<sup>b</sup> Die Komponenten wurden nach de	em auftauen hinzu	igefiigt.	C	

<sup>a</sup>Die Puffer wurde aliquotiert (1ml) bei –20°C gelagert.

## Equilibrierungslösung<sup>a</sup>

### Trenngelpuffer

Tris HCl pH 8 8	50 mM	Tris HCl pH 8 8	15 M
Glycerol 87 % (v/v)	30 % (v/v)	SDS	40 % (w/v)
SDS	2 % (w/v)	~~~~	
Harnstoff	6 M		
Bromphenolblau	einige Kristalle		

<sup>b</sup>Die Lösung wurde aliqoutiert (15 ml) bei –20°C gelagert und kurz vor Gebrauch mit 150 mg DTT versetzt.
Für ein 12 %-iges SDS-Polyacrylamidgel der Größe 20 x 20 cm x 1 mm wurden folgende Mengen verwendet:

#### Trenngel (12 %)

20	ml
12.5	ml
0.5	ml
16.75	ml
0.2	ml
0.05	ml
	20 12.5 0.5 16.75 0.2 0.05

# 2.6 Tryptischer Proteinverdau im Gel

Die Massenspektrometrie ermöglicht die Massenbestimmung von Proteinen auch bei geringen Mengen und deren Identifikation anhand einer Sequenzdatenbank. Für die Analyse werden die Proteine zuvor spezifisch zu Peptiden verdaut. Diese werden ionisiert und im elektrischen Feld gemäß ihrem Masse-Ladungsverhältniss getrennt. Für die massenspektrometrischen Analysen von Proteinen aus der 2D-PAGE wurden die betreffenden Flecken mit einer Skalpellklinge aus dem Gel geschnitten und in einem Tropfen Wasser in kleine Stücke zerteilt. Die Gelstücke konnten in Wasser bei –20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

Im weiteren Prozess wurden störende Substanzen aus der SDS-PAGE entfernt und die Proteine mit DTT reduziert. Um überschüssiges DTT zu entfernen und eine Reoxidation der Proteine zu verhindern, wurden die Gelfragmente mit Iodoacetamid behandelt. Dabei werden die Cysteinreste irreversibel alkyliert. Dazu wurde zunächst das Wasser von den Gelstücken entfernt, 30 µl Acetonitril zur Dehydrierung der Gelstücke hinzugefügt und der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Nach der Abnahme des Acetonitrils wurden die Gelstücke 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zu den getrockneten Gelstücken wurden dann 150 µl DTT-Lösung (10 mM DTT in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) gegeben und diese 1 h auf 56°C erwärmt. Nachdem die Ansätze wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde die DTT-Lösung gegen 150 µl einer Iodoacetamidlösung (55 mM Iodoacetamid in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) ausgetauscht, gefolgt von einer Inkubation von 45 min im Dunkeln. Anschließend wurde die Iodoacetamidlösung wieder abgenommen, die Gelstücke mit 150 µl 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt 150 µl Acetonitril hinzugefügt und die übertstehende Acetonitrillösung nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wieder abgenommen. Diese Waschschritte wurden wiederholt und die Gelstücke anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Zu den vorbehandelten Gelstücken wurden nun 35 µl Trypsin-Verdau-Puffer (12.5 ng/µl Trypsin in 50 mM  $NH_4HCO_3$ ; Promega, Mannheim) gegeben und die Ansätze 45 min auf Eis inkubiert. Für den eigentlichen Verdau wurde der Trypsin-Verdau-Puffer wieder abgenommen und durch 30 µl 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ersetzt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C belassen, zentrifugiert (Mikrozentrifuge, 1 min, 14,000 upm) und die Überstände in einem seperaten Eppendorf Reaktionsgefäß gesammelt. Nach dem Zufügen von 20 µl 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> und Inkubation für 10 min bei RT wurde der Überstand dem zuvor separat wurde gesammelten Überstand hinzugefügt. Schließlich 25 µl Ameisensäure-Acetonitrillösung (5 % [v/v] Ameisensäure, 50 % [v/v] Acetonitril) zu den Gelstücken gegeben, die nach 20 min Inkubation bei RT und einer Zentrifugation von 1 min bei 14,000 upm wieder entfernt und in dem separaten Reaktionsgefäß gesammelt wurde. Dieser letzte Schritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die gesammelten Überstände in dem Reaktionsgefäß wurden anschließend in der Vakkuumzentrifuge bis zur vollständigen Trockenheit eingedampft. Die dabei erhaltenen Peptidpellets konnten bei -20°C bis zur massenspektrometrischen Auswertung gelagert werden.

# 2.7 Massenspektrometrie von Proteinen

Die massenspektrometrische Analyse (ESI-MS/MS) der Proteinproben erfolgte durch die Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik des Instituts in der Arbeitsgruppe "Fungal Proteomics". Nach einem Trypsin-Verdau (s. 2.6) wurden die Peptide auf einer Dionex-NaN75-15-03-C18-PM-Säule mit dem Ultimate-Nano-HPLC-System (Dionex; Bavel, Niederlande) durch einen H<sub>2</sub>O-Acetonitril-Gradienten getrennt. Die ESI-MS/MS2 Spektren wurden auf einem LCQ-DecaXP<sup>plus</sup>-Massenspektrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) ermittelt. Die Identifikation der Proteine anhand der Spektren erfolgte mit Hilfe einer Genomsequenz-Datenbank von *R. eutropha* H16 und der Software SEQUEST/ TURBOSEQUEST (Bioworks Browser 3.1; Thermo Finnigan).

# 2.8 Western-Blot

# 2.8.1 Übertragung der Proteine auf PVDF Membranen

Für den Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurde zunächst die Proteinprobe ( $30 \mu g$ ) durch SDS-PAGE (s. 2.4.1) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit einer "Semi-dry Fast Blot"-Apparatur (Biometra, Göttingen) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, Porengröße 0.45 µm; Millipore, Eschborn) übertragen. Auf die Anode wurden drei Lagen mit Transferpuffer getränktes Filterpapier (Whatman; Schliecher und Schuell, Dassel) gelegt. Auf diese wurden luftblasenfrei die Membran, das Gel und anschließend wieder drei Lagen Filterpapier geschichtet. Um eine gleichmäßige Benetzung der hydrophoben Membran zu gewährleisten, wurde diese erst mit Methanol und dann mit Transferpuffer getränkt. Der eigentliche Transfer erfolgte für 90 min bei 250-300 mA.

# **Transfer-Puffer**

Tris	3	g
Glycin	14.4	g
Methanol	100	ml
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1,000	ml

# 2.8.2 Unspezifische Färbung mit Ponceau Rot

Zur Kontrolle der Übertragung von Proteinen auf PVDF-Membranen wurde eine Ponceau Rot Färbung durchgeführt. Diese Färbung erlaubt die schnelle, unspezifische Färbung und Entfärbung der Proteine auf der Membran ohne negativen Einfluß auf die Bindung der Antikörper. Zur Färbung wurde die Membran 20-30 s in der Färbelösung geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte in Wasser.

# Färbelösung

Ponceau S Red	0.2	g
Trichloressigsäure	ad 100	ml
(3% w/v)		

# 2.8.3 Immun-Blot

Die Reaktion mit den Antikörpern wurde bei RT unter Schwenken in Plastikschalen durchgeführt. Der Nachweis der für das Zielprotein spezifischen Antikörper anti-CbbR-IgG erforderte einen zweiten mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper. Die Farbreaktion erfolgte durch die Zugabe von 5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazolium (NBT). Nach Beendingung der Farbreaktion wurde die Membran bei RT getrocknet und aufbewahrt.

Arbeitschritte	Zeit			
1	3 min		Entfärben in H <sub>2</sub> O dest.	
2	2 x 10 min		Waschen in 40 ml TBS	
3	2.5 h		Blockieren des Hintergrundes mit 50 ml Blotto I	
4	> 16 h (über l	Nacht)	Inkubation mit anti-CbbR-IgG in 40 ml Blotto I (10 µg IgG/ml Blotto II)	
5	2 x 5 min		Waschen mit TBS 40 ml	
6	3 x 5 min		Blockieren mit 40 ml Blotto II	
7	1 h		Inkubation mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörpern in 40 ml Blotto II (80 µl einer Verdünnung [1:100] der Orginallösung)	
8	3 x 15 min		Waschen mit 40 ml Blotto II	
9	3 x 5 min		Waschen mit 40 ml TBS	
10	30 min – 5 h		Färbung durch Inkubation in 10 ml Farbreaktionspuffer mit 200 µl NBT/BCIP Stammlösung (Roche, Mannheim) bis deutliche Banden sichtbar sind	
11			Beenden der Reaktion durch Waschen mit Wasser	
<b>Farbreaktionspuffe</b> Tris-HCl pH 9.5 NaCl	<b>r</b> 0.1 0.15	M M	<b>TBS (Tris-gepufferte Saline)</b> Tris-HCl pH 7.525 mMNaCl150 mM	
<b>Blotto II</b> TritonX-100	0.1	% (w/v	*Blotto IMagermilchpulver5 % (w/v)v)gelöst in TBS	
SDS gelöst in BlottoI	0.1	% (w/v	v) *frisch ansetzten oder bei –20°C	

einfrieren

# 2.9 DNA-Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist eine Methode, die aufgrund ihrer Spezifität besonders für die Anreicherung von Proteinen geeignet ist, die in der Zelle nur in sehr geringen Mengen vorliegen. Für die Anreicherung von DNA-bindenden Proteinen wurde eine DNA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Ziel-DNA wurde durch PCR amplifiziert. Durch die Verwendung am 5'-Ende biotinylierter Oligonucleotidprimer wurde ein Biotinmolekül spezifisch an das 5'-Ende des DNA Fragments anhängt. Das DNA-Fragment (243 bp) der *cbb*-Kontrollregion wurde mit den Primern F1 und R1-Biot oder R1 und F1-Biot amplifiziert (Tab. 4) und über den Biotinrest an Streptavidin Sepharose<sup>™</sup> (Amersham Pharmacia, Freiburg) gebunden. Dieses Säulenmaterial besitzt mit Streptavidin als Ligand eine Bindekapazität für biotinylierte Substanzen von 300 nmol pro ml Material.

Alternativ wurden paramagnetische Partikel benutzt, die mit Streptavidin beschichtet sind (Streptavidin MagneSphere<sup>®</sup> Paramagnetic Particles; Promega).

Primer	Sequenz
F1	5'-GTCGATCTGCAACTGGCGAA-3'
F1-Biot	5'-GTCGATCTGCAACTGGCGAA-3' (am 5'-Ende mit Biotin modifiziert)
R1	5'-GTGATTCAGGTGCGTTCATGC-3'
R1-Biot	5'-GTGATTCAGGTGCGTTCATGC-3' (am 5'-Ende mit Biotin modifiziert)

 

 Tab. 4. Oligonucleotidprimer f
 ür die Amplifikation biotinylierter Fragmente (243 bp) mit der *cbb*-Kontrollregion

# 2.9.1 Streptavidin-Sepharose-Minisäulen

Für die Affinitätschromatographie mit Streptavidin-Sepharose wurden Minisäulen mit einem Bettvolumen von 1.5 ml verwendet.

Vor dem Binden der biotinylierten DNA an die Streptavidin-Sepharose wurden die PCR-Fragmente mit dem NucleoFast-System (Macherey und Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers von Primern und Nucleotiden gereinigt. An eine Säule wurden 200-500 µg DNA gebunden.

Zunächst wurde die Säule mit 10 Bettvolumen DNA-Bindepuffer äquilibriert. Um die Pufferbedingungen für die DNA-Bindung optimal zu gestalten, wurde die gereinigte, in Wasser gelöste DNA mit DNA-Bindepuffer im Verhältniss 1:3 versetzt. Nach dem Durchlauf jeweils eines Bettvolumens wurde der Lauf gestoppt und die Säule 5 min bei RT inkubiert, um eine möglichst vollständige Bindung der DNA zu erreichen. Die Effektivität der Bindung wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert. Die Säule wurde daraufhin mit 10 Bettvolumen DNA-Lagerpuffer gewaschen und konnte mehrere Tage bei 4°C gelagert werden.

DNA-Bindepuffer		<b>DNA-Lagerpuffer</b>	DNA-Lagerpuffer	
Tris-HCl pH 7.5	20 mM	Tris-HCl pH 7.5	20 mM	
EDTA	10 mM	EDTA	50 mM	
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM	

Hohe Salzkonzentrationen stören die Protein-DNA-Interaktion. Daher wurden die Proteine zunächst bei niedriger Salzkonzentration an die DNA gebunden und anschließend mit ansteigender Salzkonzentration eluiert.

Zur Bindung von Proteinen wurde die Säule zunächst mit 10 Bettvolumen Protein-Bindepuffer (s. 2.9.2) äquilibriert. Die Zellen wurden in Protein-Bindepuffer mit der French Press aufgeschlossen (s. 2.3). Daraufhin wurden bis zu 20 ml Proteinrohextrakt auf die Säule gegeben. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurde dem Rohextrakt zuvor Lachsspermien-DNA mit einer Endkonzentration von 5 mg/ml zugesetzt.

Nach dem Durchlauf des Rohextraktes wurde die Säule mit 10 Bettvolumen Protein-Bindepuffer gewaschen, gefolgt von jeweils 5 Bettvolumen Protein-Bindepuffer mit 50 mM KCl und 100 mM KCl. Die Elution der Proteine erfolgte schließlich mit 6 Bettvolumen Elutionspuffer mit Salzkonzentrationen von 200 mM KCl sowie 3 Bettvolumen mit Elutionspuffer mit 2 M KCl. Die einzelnen Fraktionen wurden in 0.5-1 ml-Portionen aufgefangen und auf Eis oder bei –20°C gelagert. Da die eluierten Proteine schnell ihre DNAbindende Aktivität verloren, wurden sie spätestens am nächsten Tag im Gelretardationstest (mobility shift) (s. 2.22) eingesetzt, um den Erfolg der Anreicherung zu überprüfen.

# 2.9.2 Paramagnetische Partikel

Zum schnellen Test von Rohextrakten auf die Anwesenheit DNA-bindender Proteine wurden mit Streptavidin beschichtete, paramagnetische Partikel verwendet.

Die DNA wurde zunächst wie oben beschrieben amplifiziert und gereinigt (s. 2.9.1). Für die Bindung an die Partikel wurde die gelöste DNA im Verhältniss 1 : 4 mit 0.5 x SSC (s. 2.23) versetzt. Die Partikel (0.6 mg) wurden zunächst dreimal mit je 300  $\mu$ l 0.5 x SSC gewaschen. Dabei wurden die Partikel jeweils in der Pufferlösung resuspendiert und anschließend mit Hilfe eines Magneten an der Gefäßwand gesammelt, so dass die Lösung abgenommen werden konnte. Dann wurden die Pertikel mit der DNA (max. 5  $\mu$ g) 20 min bei RT inkubiert. Um ungebundene DNA zu entfernen und die richtigen Pufferbedingungen für die Proteinbindung herzustellen, wurden sie dreimal mit 600  $\mu$ l Protein-Bindepuffer gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Rohextrakt hinzugefügt, der zuvor mit Lachsspermien-DNA versetzt worden war. Nach 25 min Inkubation bei RT wurden die Partikel dreimal mit 600  $\mu$ l Protein-Bindepuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch dreimaliges Resuspendieren mit 100  $\mu$ l Elutionspuffer der 200 mM KCl enthielt, und anschließend mit 2 M KCl Salzkonzentration eluiert. Die Fraktionen wurden auf Eis oder bei –20°C gelagert.

Protein-Bindepuffer			Elutionspuffer		
Tris-HCl pH 7.4	50	mM	Tris-HCl pH 7.4	50	mМ
KCl	0.01-0.1	Μ	KCl	0.2-2	Μ
EDTA	10	mM	EDTA	10	mM
Glycerin	1	% (v/v)	Glycerin	1	% (v/v)
DTT	1	mМ			

# 2.10 Anreicherung von Proteinen mit dem Impact<sup>TM</sup>-CN-System

Zur näheren Untersuchung der Eigenschaften eines Proteins ist es von großem Vorteil, wenn dieses in gereinigter Form vorliegt. Eine schnelle, einfache Anreicherung und Reinigung von Proteinen war mit dem IMPACT<sup>TM</sup>-System (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) möglich. Dieses nutzt die induzierbare Selbstspaltungsaktivität des Inteins, einem Protein-Splicing-Element, um den Affinitäts-,tag<sup>+</sup>, eine Chitin-bindende Proteindomäne (CBD) aus *Bacillus circulans*, von dem Zielprotein abzuspalten. Das Gen des Zielproteins wird zunächst im Leseraster mit den Intein-CBD codierenden Genen fusioniert. Dabei kann die Fusion sowohl mit dem C- als auch mit dem N-terminalen Ende des Zielproteins erfolgen. Nach der Expression des Fusionsgens wird das Fusionsprotein aus dem Zielprotein und Intein-CBD-,tag<sup>+</sup> über die CBD an eine Chitinmatrix gebunden. Durch die Zugabe der Thiole DTT oder Cystein wird sodann die Selbstspaltungsaktivität des Inteins induziert. Das Zielprotein wird abgespalten und eluiert, während der Affinitäts-,tag<sup>+</sup> zunächst an die Säule gebunden bleibt. Bei Verwendung der N-terminalen Fusion wird zudem ein Peptid mit 15 Aminosäureresten abgespalten und zusammen mit dem Zielprotein eluiert.

Die Anreicherung und Reinigung von Proteinen mit dem Impact-System wurde in Minisäulen (3.5 ml Bettvolumen) durchgeführt. Zunächst wurde eine Überproduktion des Fusionsproteins

durch heterologe Expression in *E. coli* im 3 l-Maßstab (s. 2.2.4) durchgeführt. Die Zellen wurden in CB-Säulenpuffer resuspendiert und mit der French-Presse (s. 2.3) aufgeschlossen. Die Chitin-Säule wurde mit 10 Bettvolumen CB-Säulenpuffer äquilibriert und anschließend der Rohextrakt aufgetragen. Um ungebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit 16 Bettvolumen CB-Säulenpuffer gewaschen. Zur Spaltung des Fusionsproteins wurde die Säule mit 3 Bettvolumen Spaltungspuffer gewaschen und über Nacht bei RT oder alternativ bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die Elution des Zielproteins mit CB-Säulenpuffer, dabei wurde das Eluat in Fraktionen von 0.5 ml aufgefangen. Zur Stabilisierung des Proteins wurden die Elutionsfraktionen mit jeweils 0.5 ml Glycerin (Endkonzentration 50 % [v/v]) oder 0.4 ml 2 M NaCl-Lösung (Endkonzentration 1 M) gemischt. Die Fraktionen wurden anschließend entweder auf Eis gelagert oder bei -20°C eingefroren.

Zur Regeneration der Säule wurde diese mit 3 Bettvolumen "Stripping'-Puffer, 5 Bettvolumen Wasser und 5 Bettvolumen CD-Säulenpuffer gewaschen. Sollte die Säule längere Zeit gelagert werden, wurde dem CD-Säulenpuffer 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> zugesetzt.

# **CD-Säulenpuffer**

Tris-HCl, pH 7.5	50	mМ
NaCl	500	$\mathrm{m}\mathrm{M}$
EDTA	1	mM

#### 'Stripping'-Puffer

Tris-HCl, pH 7.5	20	mМ
NaCl	500	mМ
SDS	1	% (w/v)

# Spaltungspuffer

Tris-HCl, pH 7.5	50 mM
NaCl	500 mM
EDTA	1 mM
DTT (frisch zugesetzt)	50 mM

# 2.11 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse von Proteinlösungen diente der Herabsetzung der Salzkonzentration in der Probe. Kleine Volumina (bis zu 20  $\mu$ l) wurden auf Nitrocellulose-Filterplättchen (Millipore, Molsheim) pipettiert, die zuvor auf die Oberfläche eines geeigneten Puffers aufgelegt wurden. Nach 30 min wurde die Probe wieder vom Filterplättchen abgenommen und konnte in weiteren Experimenten eingesetzt werden.

Für größere Volumina wurden Dialyseschläuche (Visking<sup>®</sup> dialysis tubing 20/32; Serva, Heidelberg) verwendet. Vor der Benutzung wurden die Schläuche jeweils kurz in Lösungen mit jeweils 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA und in destilliertem Wasser aufgekocht. Anschließend wurden die Schläuche in Wasser autoklaviert und bei 4°C gelagert. Die Dialyse erfolgte

gegen den gewünschten Puffer für 4-16 h. Zur Beschleunigung der Dialyse wurde der Puffer nach spätestens 4 h ausgewechselt. Sollte die Probe während des Entsalzens konzentriert werden, wurde die Probe mit Vivaspin-Konzentratoren (10,000 MWCO, PES; Vivascience, Hannover) nach Angaben des Herstellers behandelt. Um möglichst alles Salz zu entfernen, wurde die Probe dabei mindestens dreimal gewaschen.

# 2.12 Bestimmung von Enzymaktivitäten

# 2.12.1 Optische Tests

Optische Tests von Enzymaktivitäten (nach Reutz et al., 1982) wurden in Küvetten mit 1 ml Volumen in einem Spektralphotometer (Uvikon 922, Kontron) bei 30°C durchgeführt. Die durch die Oxidation von NAD(P)H oder Reduktion von NAD(P) während der Enzymreaktion bedingte Extinktionsänderung wurde bei 365 nm über einen Zeitraum von 6-10 min verfolgt. Unter Einbeziehung der eingesetzten Proteinmenge wurde die spezifische Aktivität berechnet ( $\mu$ mol/min x mg = U/mg).

 $\frac{\Delta E / \min x V}{\epsilon x v x d x Proteinkonzentration}$ 

 $\epsilon$  : molarer Extinktionskoeffizent (bei 365 nm für NAD(P): 3.43 ml/  $\mu$ mo x cm)  $\Delta$ E/min: Extinktionsänderung pro Minute im Testansatz

- v : eingesetztes Volumen der Enzymlösung (ml)
- d : Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Falls nicht anders angegeben, wurden die Enzymaktivitäten in internationalen Einheiten (U) angegeben. 1 U entspricht der Enzymmenge, die 1  $\mu$ mol Substrat/min umsetzt. Die Bestandteile der Tests wurden in der angegebenen Reihenfolge zusammengefügt und 2-3 min bei 30°C vorinkubiert. Nach der Bestimmung des Blindlaufs wurde die Reaktion durch die Zugabe des Substrats gestartet.

V : Gesamtvolumen des Testansatzes (ml)

Stammlösung	eingesetzte Menge	Endkonzentration
0.05 M Tris-HCl, pH 8,0	800 µ1	40 mM
H <sub>2</sub> O bidest.	130 µl	
0.02 M NADP	30 µl	0.6 mM
Rohextrakt	10 µl	
0.15 M Glucose-6-phosphat	30 µl	4.5 mM
	1000 µl	

# Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)

# Phosphoglucose-Isomerase (EC 5.3.1.9)

Stammlösung	eingesetzte Menge	Endkonzentration
0.05 M Tris-HCl, pH 7.6	800 µ1	40 mM
H <sub>2</sub> O bidest.	80 µl	
0.25 M MgCl <sub>2</sub>	40 µ1	10 mM
0.02 M NADP	30 µ1	0.6 mM
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (1 mg/ml)	10 µl	
Rohextrakt	10 µl	
0.15 M Fructose-6-phosphat	30 µ1	3 mM
	1000 µl	

Kombinierte Aktivität des Entner-Doudoroff-Enzymsystems (Gluconat-6-phosphat-Dehydratase [EC 4.2.1.12] und 2-Keto-3-desoxygluconat-6-phosphat-Aldolase [EC 4.1.2.14])

Stammlösung	eingesetzte Menge	Endkonzentration
0.05 M Tris-HCl, pH 7.6	800 µl	40 mM
H <sub>2</sub> O bidest.	110 µl	
0.25 M MgCl <sub>2</sub>	20 µl	5 mM
0.015 M NADH	20 µl	0.3 mM
Lactat-Dehydrogenase (5 mg/ml)	10 µl	
Rohextrakt	20 µl	
0.15 M 6-Phosphogluconat	20 µ1	2 mM
	1000 µl	

# 2.12.2 β-Galactosidase (EC 3.2.1.23)

Die für den Test verwendeten Zellen von *R. eutropha* wurden im gewünschten Medium (s. 2.2.1) bis zu einer OD<sub>436</sub> von 2-3 angezogen, geerntet (s. 2.2.7) und in  $\beta$ -Galactosidase-Puffer gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung (s. 2.3). Der colorimetrische Test (Miller; 1972; modifiziert) erfasst, die Umsetzung des Substratanalogons *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (oNPG) zu *o*-Nitrophenol.

# $\beta$ -Galaktosidase-Puffer

Na PO <sub>4</sub> , pH 7.0	50 mM
KCl	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM
(frisch zugefügt)	

# Testansatz

Rohextrakt	10 µl
(ggf.verdünnt)	
β-Galactosidase-Puffer	990 µl

Der Testansatz wurde zunächst bei 37°C in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß für 2 min vorinkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 200  $\mu$ l 0.2 % (w/v) oNPG gestartet. Nachdem eine deutliche Gelbfärbung eingetreten war, spätestens jedoch nach 20 min, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.5 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt. Die Extinktion der Lösung wurde bei 420 nm (E<sub>420</sub>) gegen einen Blindwert, bei dem der Ansatz direkt nach Beginn des Tests abgestoppt wurde, gemessen.

Die spezifische Aktivität des Enzyms (mU/mg) wurde anhand des molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_{420}$  für *o*-Nitrophenol, der 21,300 ml · mmol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup> beträgt (Dawson et.al., 1986), errechnet:

 $E_{420} \; [\text{cm}^{\text{-1}}] \cdot 1.7 \; [\text{ml}] \cdot 10^6$ 

21,300  $[ml \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}] \cdot Reaktionszeit [min] \cdot Probenvolumen [ml] \cdot Proteinkonzentration [mg x ml^{-1}] [mU/mg]$ 

# 2.13 Übertragung von DNA nach und Selektion von *E. coli* Klonen

## 2.13.1 Transformation von E. coli

Zur Übertragung von Plasmiden in *E. coli* wurden chemokompetente Zellen hergestellt und mit DNA aus Ligationsansätzen transformiert (Hanahan, 1983, 1985).

Dazu wurde eine 50 ml-Kultur des Wirtsstammes in supplementiertem LB-Medium (s. 2.2.2) angezogen. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von etwa 0.5 wurden die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend in vorgekühlten 50 ml-Pyrex-Röhrchen abzentrifugiert (15 min, 3,500 Upm, 4°C; Sigma 3K-1). Die Zellen wurden dann in 10 ml eiskaltem Transformationspuffer I aufgenommen und 60 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Zellpellet in 2 ml eiskaltem Transformationspuffer II resuspendiert, in Portionen von 100 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und bis zum Gebrauch bei  $-70^{\circ}$ C eingefroren. Dadurch blieben die Zellen mehrere Monate lang kompetent.

Transformationspuffer I		Transformationspuffer II		
100 mM	RbCl <sub>2</sub>	10 mM	Mops	
50 mM	MnCl <sub>2</sub>	75 mM	$CaCl_2$	
30 mM	K-Acetat	10 mM	RbCl <sub>2</sub>	
10 mM	$CaCl_2$	15 % (w/v)	Glycerin	
pH 5.8 mit verd	l. Essigsäure eingestellt	pH 7.0 mit 2 M Na	OH eingestellt	

Für die Transformation wurden 100  $\mu$ l auf Eis aufgetauter Suspension kompetenter Zellen mit dem gesamten Ligationsansatz (max. 200 ng DNA) 30 min auf Eis inkubiert. Daran schlossen sich ein Hitzeschock von 2 min bei 42°C und eine Inkubation für weitere 3 min auf Eis an. Schließlich wurden dem Ansatz 400-700  $\mu$ l LB-Medium zugefügt und es wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Jeweils 100  $\mu$ l des Ansatzes wurden dann auf LB-Selektivplatten (mit geignetem Antibiotika) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zum "Screening" der Transformanten wurden analytische Plasmidisolierungen nach Holmes & Quigley (1981) (s. 2.16.5.1) durchgeführt.

# 2.13.2 Selektion rekombinanter Klone

Bei der Selektion von Transformanten mit Plasmid-Derivaten von pUC19 und pBluescript SK konnte der X-Gal-Plattentest verwendet werden. Diese Plasmide enthalten neben dem Promotor- und Operatorbereich des *lac*-Operons auch das 5'-Ende des *lacZ*-Gens (Vieira &

Messing, 1982), welches das sog.  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galactosidase codiert. Dieses kann die inaktive  $\beta$ -Galactosidase verschiedener Wirtsstämme von *E. coli*, wie z.B. XL1-Blue oder JW1, komplementieren. Da sich die multiple Klonierungsstelle der oben genannten Vektoren innerhalb des *lacZ*'-Gens befindet, sind nur Plasmide ohne fremdes DNA-Insert zur  $\alpha$ -Komplementation fähig. In diesem Fall ist die aktive  $\beta$ -Galaktosidase anhand der Blaufärbung von Kolonien auf LB-Platten nach der Induktion von *lacZ*' mit IPTG in Gegenwart des artifiziellen Substrates X-Gal zu erkennen. Inserthaltige Transformanten sind daher an der fehlenden Farbstoffbildung, d.h. als weiße Kolonien, zu unterscheiden (sog. Blau-Weiß-Selektion).

# 2.14 Konjugative Plasmidübertragung

Zur Plasmidübertragung in Stämme, die wie *Ralstonia* einer Tranformation nicht zugänglich sind, wurde bei Plasmiden mit breitem Wirtsbereich ein konjugativer Transfer mit *E. coli* S17-1 als Donor durchgeführt. *E. coli* S17-1 verfügt über die für die Konjugation nötigen *tra*-Genfunktionen des chromosomal integrierten RP4-Plasmids. Donor und Rezipient wurden über Nacht in LB- plus Antibiotikum bzw. NB-Medium angezogen. Jeweils 500  $\mu$ l Zellsuspension wurden übereinander auf eine frische NB-Platte getropft und für ca. 24 h bei 30 °C inkubiert ('agar-spot-mating'; Friedrich et al., 1981b). Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Saline abgeschwemmt, abzentrifugiert (5 min, 6000 upm) und in 1 ml Saline resuspendiert. Nach dem Anlegen einer Verdünnungsreihe (10<sup>-1</sup>- 10<sup>-4</sup>) wurden jeweils 100  $\mu$ l auf Platten mit Fructose-, Pyruvat- oder Gluconat-Mineralmedium plus Antibiotikum ausplattiert. Nach 2-4 Tagen bei 30°C erfolgte erneut eine Selektion von Einzelkolonien der Transkonjuganten von *R. eutropha* auf Mineralmedium plus Antibiotikum. Im Anschluß wurden Klone durch Isolierung der chromosomalen DNA (s. 2.16.3) und anschließender PCR (s. 2.20.1) überprüft. Sind Plasmide übertragen worden, die in *Ralstonia* replizieren können, wurden die Plasmide mit Alkalischer Lyse (s. 2.16.5.2) isoliert.

# 2.15 Mutagenese durch homologe Rekombination

Für die Einführungen von Markerlosen Deletionen in *Ralstonia* spp. wurde die ,gene replacement'-Mutagenese verwendet. Nach der Konstruktion eines, die Deletion tragenden Fragments des Zielgens, wurde dies in den Suizidvektor pNHG1 kloniert und durch Konjugation (s. 2.14) nach *Ralstonia* spp. transferiert. Der Suizidvektor pNHG1 kann in *Ralstonia* nicht replizieren ist, aber in der Lage, wenn homologe Sequenzen vorhanden sind,

durch homologe Rekombination in das Genom von *Ralstonia* zu inserieren. Die Selektion der Heterogenoten erfolgt auf Mineralmedium mit Tetracyclin und Kanamycin und beruht auf der Tetracyclin- und Kanamycinresistenz, welche die Transkonjuganten durch die Intergation des Suizidplasmids erworben haben. Die resultierenden Heterogenoten tragen eine Kopie des Wildtyp und des deletierten Gens im Genom und werden daher als Heterogenoten bezeichnet. Zur Isolation der Homogenoten, die nur noch das deletierte Allel tragen, wurden einige identifizierte Heterogenoten unter nicht selektiven Bedingungen in NB-Medium angezogen. Nach 9, 24 und 48 h wurden den Kulturen jeweils 20 und 100  $\mu$ l entnommen und auf NB– Platten mit 15 % (w/v) Saccharose ausgestrichen. Die Selektion auf NB mit Saccharose beruht auf dem *sacB* Gen des Suizidvektors, das unter diesen Bedingungen induziert wird. Die gebildete Levansucrase, synthetisiert Levan (Gay et al., 1985), das für *Ralstonia* spp. in Gegenwart von Saccharose letal ist (Lenz et al., 1994).

Im Allgemeinen hatte in gegen Saccharose resistenten Kolonien eine zweite Rekombination stattgefunden. Dabei wurde das Wildtyp Gen oder das deletierte Gen wieder zusammen mit dem Suizidplasmid aus dem Genom entfernt. Um die Excisison des Suizidplasmids zu überprüfen wurden potentielle Homogenoten auf ihre Tetracyclinsensivität getestet. Von sensitiven Klonen wurde die genomische DNA (s. 2.16.3) extrahiert und mittels PCR (s. 2.20) auf das Vorhandensein des Wildtypallels oder des deletierten Gens überprüft.

# 2.16 Isolierung von Nucleinsäuren

# 2.16.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzebeständigen Lösungen und Geräte wurden zur Inaktivierung von Nucleasen für 20 min bei 121°C autoklaviert. Nicht-autoklavierbare Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol behandelt und anschließend mit sterilem H<sub>2</sub>O bidest. gespült. Bei nicht-autoklavierbaren Lösungen erfolgte eine Sterilfiltration zur Entfernung von Mikroorganismen.

## 2.16.2 Phenolextraktion und Fällung von DNA

Zur Reinigung wässriger DNA-Lösungen von Proteinen erfolgte eine Extraktion mit Phenol-Chloroform. Dazu wurde die Lösung mit 1 Vol. des Lösungsmittelgemisches versetzt und bis zur Bildung einer homogenen Emulsion geschwenkt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt (5 min, 13,000 Upm, RT; Mikrozentrifuge). Die wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion so oft wiederholt, bis kein Präzipitat mehr in der Interphase sichtbar war.

Phenol-Chloroform	25 Vol.	Phenol (äquilibriert mit TE-Puffer, pH 8.0)
	24 Vol.	Chloroform
	1 Vol.	Isoamylalkohol
	0.1 % (w/v)	Hydroxychinolin

Die DNA-Fällung aus wässrigen Lösungen mit hoher Ionenstärke erfolgte durch Zugabe organischer Lösungsmittel. Dazu wurde die Lösung zunächst mit 0.1 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 5.2, oder mit 0.4 Vol. 5 M NH<sub>4</sub>-Acetat, pH 7.5, versetzt. Anschließend erfolgte die Fällung durch Zugabe von 2 Vol. 96 % (w/v) Ethanol oder 0.7 Vol. Isopropanol. Nach gründlichem Durchmischen wurde je nach Art und Menge der DNA unterschiedlich lange inkubiert (1 min bis über Nacht bei 4°C oder RT) und abzentrifugiert (15 min, 13,000 Upm, RT; Mikrozentrifuge oder 30 min, 14,000 Upm, 4°C; Sorvall RC5C, Rotor SS-34).

Zum Waschen wurde das DNA-Pellet in 1 ml 70 % (w/v) Ethanol resuspendiert. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 13,000 Upm, RT; Mikrozentrifuge) wurde der Überstand entfernt und die DNA für 3 min in der Vakuumzentrifuge (Univapo 150 H; Zirbus, Osterode) oder an der Luft für 5-10 min bei 37°C getrocknet. Schließlich wurde die DNA in einem angemessenem Volumen H<sub>2</sub>O bidest. oder TE- Puffer gelöst.

# 2.16.3 Analytische Isolierung von Gesamt-DNA

Für die Isolierung bakterieller Gesamt-DNA nach Ausubel et al. (1988) wurden die Stämme über Nacht in 10 ml geeignetem Medium angezogen. Von der Kultur wurden 1.0-1.5 ml abzentrifugiert und die Zellen in 567  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert. Alternativ wurden die Zellen auf geeigneten Agarplatten angezogen und mit der Impföse in TE-Puffer direkt suspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 30  $\mu$ l 10 % (w/v) SDS sowie 3  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml). Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde das Lysat mit 100  $\mu$ l 5 M NaCl versetzt. Zum Entfernen von Proteinen und Polysacchariden wurden 80  $\mu$ l auf 65°C temperierte CTAB-NaCl-Lösung (10 % [w/v] CTAB in 0.7 M NaCl) eingemischt und der Ansatz wurde für 10 min bei 65°C weiterinkubiert. Schließlich erfolgten Extraktionen mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) und 1 Vol. Phenol-Chloroform (s. 2.16.2). Die Fällung der DNA erfolgte mit 0.7 Vol. Isopropanol. Das Präzipitat wurde mit 70 % (w/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen.

## 2.16.4 Präparative Isolierung von Gesamt-DNA

Die präparative Isolierung von Gesamt-DNA aus R. eutropha erfolgte nach Ausubel et al. (1988). Die Zellen wurden über Nacht in 40 ml NB-Medium bei 30°C angezogen, geerntet (s. 2.2.7.) und in 9.5 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0.5 ml 10 % (w/v) SDS-Lösung und 50 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) wurde der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden zunächst 1.8 ml 5 M NaCl-Lösung und anschließend 1.5 ml CTAB-NaCl-Lösung (10 % [w/v] CTAB in 0.7 M NaCl) eingemischt, bevor 20 min bei 65°C weiter inkubiert wurde. Zur anschließenden Extraktion der CTAB-Protein-Polysaccharid-Komplexe wurden 14 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 [v/v])eingemischt. Die anschließende Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 13,000 Upm (Sorvall RC5C, Rotor SS-34). Der wässrige Überstand wurde mit 1 Vol. Phenol-Chloroform extrahiert (s. 2.16.2) und erneut abzentrifugiert. Die Nucleinsäuren aus dem Überstand der Extraktion wurden nach Zugabe von 0.1 Vol. 3 M Na-Acetat-Lösung, pH 5.2, mit 0.7 Vol. Isopropanol gefällt und für 60 min bei 13,000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % (w/v) Ethanol gewaschen, in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, anschließend luftgetrocknet und zuletzt in 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Die so präparierte Gesamt-DNA konnte direkt für die PCR (s. 2.20) und zur Restriktionsspaltung (s. 2.18.1) eingesetzt werden.

#### 2.16.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Je nach Mengenbedarf, Organismus und späterem Verwendungszweck wurden zur Plasmidisolierung verschiedene Methoden angewendet. Isolierungen im analytischen Maßstab aus *E. coli* erfolgten entweder nach der Methode des schnellen Kochens ('rapid boiling'; Holmes & Quigley, 1981; modifiziert nach Riggs & McLachlan, 1986) oder durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979; modifiziert). Plasmid-DNA aus *R. eutropha* konnte nur durch alkalische Lyse isoliert werden. Größere Plasmidmengen wurden sowohl aus *E. coli* als auch aus *R. eutropha* nach alkalischer Lyse der Zellen isoliert.

#### 2.16.5.1 Analytische Präparation durch schnelles Kochen

Zur analytischen Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde die Methode des schnellen Kochens angewendet. Die Anzucht der zu testenden Klone erfolgte über Nacht auf LB-Selektivagar. Eine Impföse Zellmaterial wurde in 285  $\mu$ l Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurden 15  $\mu$ l Lysispuffer (mit 20 mg Lysozym/ml) eingemischt und die Proben 60 s im Wasserbad gekocht. Zur Abkühlung wurden die Ansätze für mindestens 3 min auf Eis gestellt. Im Anschluß erfolgte eine Pelletierung der denaturierten Proteine durch Zentrifugation für 10 min bei RT und 13,000 Upm (Mikrozentrifuge). Das Sediment wurde anschließend mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0.4 Vol. 5 M NH<sub>4</sub>-Acetat, pH 7.5, und 0.7 Vol. Isopropanol (s. 2.16.2.). Nach 10 min Trocknung bei 37°C wurde die DNA in 20  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen.

Lysispuffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
	50 mM	EDTA, pH 8.0
	8 % (w/v)	) Saccharose
	0.5 % (w/v)	) Triton X-100
	8 % (w/v) 0.5 % (w/v)	) Saccharose ) Triton X-100

# 2.16.5.2 Analytische Präparation durch alkalische Lyse

Für die alkalische Lyse von *R. eutropha* wurde ein modifiziertes Protokoll der präparativen Plasmidisolierung (s. 2.16.5.4) verwendet. Um aus *E. coli* im analytischen Maßstab Plasmid-DNA zu erhalten, wurde diese Methode alternativ zur Qiagen-Plasmidisolierung (s. 2.16.5.3) angewendet.

Dazu wurden bei Plasmiden mit hoher Kopienzahl 2 ml, bei Plasmiden mit niedriger Kopienzahl 4-6 ml einer in LB-Medium angezogenen Bakterienkultur verwendet. Im Fall von *R. eutropha* wurden 2-4 ml einer NB- oder Fructose-MM-Kultur eingesetzt. Nach Ernte der Zellen (s. 2.2.7) wurden diese in 300  $\mu$ l Lösung 1 resuspendiert. Auf die Zugabe von 300  $\mu$ l frisch angesetzter Lösung 2 folgte ein Durchmischen des Reaktionsansatzes durch mehrfaches Schwenken des Eppendorf-Reaktionsgefäßes. Die Lyse der Zellen war nach maximal 5 min Inkubation bei RT abgeschlossen. Nach dem Einmischen von 300  $\mu$ l Lösung 3 wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten SDS-Proteinkomplexe wurden dann durch Zentrifugation (15 min, 13,000 Upm, RT) pelletiert. Zur Entfernung der restlichen Proteine aus dem Überstand erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Die DNA wurde anschließend gefällt, gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen (s. 2.16.2).

Eine Überprüfung von Qualität und Ausbeute der isolierten Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsverdau (s. 2.18.1) und anschließende elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (s. 2.21.1) vorgenommen.

Lösung 1	50 mM 10 mM	Tris-HCl, pH 8.0 EDTA
Lösung 2	0.2 N 1 % (w/v)	NaOH (vor Gebrauch frisch angesetzt) SDS
Lösung 3	3 M	K-Acetat, pH 5.5

#### 2.16.5.3 Präparative Isolierung mit dem 'QIAprep Miniprep Kit'

Um qualitativ besonders hochwertige Plasmid-DNA, u.a. für Sequenzierungen, zu gewinnen, wurden Plasmide mit hoher Kopienzahl mit Hilfe des 'QIAprep Miniprep Kit' (Qiagen, Hilden) isoliert. Dieses Verfahren beruht auf der Methode der alkalischen Zelllyse nach Birnboim & Doly (1979) (s. 2.16.5.2), mit einer sich anschließenden Adsorption der DNA an die Silikagelmembran einer Minisäule bei hoher Ionenstärke und einer abschließenden Elution bei niedriger Ionenkonzentration.

Für eine Standardplasmidisolierung wurden von 10 ml einer bei 37°C über Nacht gewachsenen Kultur von *E. coli* 2 x 1.5 ml abgenommen und die Zellen für 1 min bei 13,000 Upm abzentrifugiert. Die anschließende Plasmidisolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### 2.16.5.4 Präparative Isolierung durch alkalische Lyse

Größere Mengen von Plasmid-DNA wurden bei Plasmiden hoher Kopienzahl aus 50 ml, bei Plasmiden niedriger Kopienzahl aus 100 ml einer über Nacht in LB-Medium angezogenen Kultur von *E. coli* isoliert. Nach Ernte der Zellen (s. 2.2.7) erfolgte eine Resuspension in 4 ml Lösung 1 plus 40 µl RNase-Lösung (10 mg/ml). Anschließend wurden 4 ml frisch angesetzter Lösung 2 zugegeben und durch Schwenken eingemischt. Nach maximal 5 min Inkubation bei RT wurde das klare Lysat mit 4 ml eiskalter Lösung 3 versetzt, gründlich durchmischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt (15 min, 14,000 Upm, 4°C; Sorvall RC5C, Rotor SS-34). Danach wurde die DNA aus dem wässrigen Überstand durch Zugabe von 0.7 Vol. Isopropanol gefällt. Nach der Zentrifugation (30 min, 14,000 Upm, 4°C; Sorvall RC5C, Rotor SS-34) wurde das DNA-Pellet mit 70 % (w/v) Ethanol gewaschen und dabei in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die DNA wurde getrocknet und in 500  $\mu$ l TE-Puffer gelöst. Proteinreste wurden durch Phenolextraktion (s. 2.16.2) entfernt. Die DNA wurde erneut gefällt, gewaschen, getrocknet (s. 2.16.2) und je nach Ausbeute in 50-200  $\mu$ l TE-Puffer gelöst. Qualität und Ausbeute der isolierten DNA wurden durch Restriktionsverdau (s. 2.18.1) und anschließende elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (s. 2.21.1) überprüft.

# 2.16.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

#### 2.16.6.1 Isolierung mit dem 'QIAquick' Gel Extraction Kit'

Mit dem 'QIAquick Gel Extraction Kit' (Qiagen) wurden DNA-Fragmente für Klonierungen und Sequenzierungen aus Agarosegelen isoliert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung des zu isolierenden Fragments in einem TAE-Agarosegel (s. 2.21.1) wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht (366 nm) aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Aufgrund der Volumenbegrenzung der Präparation mußte das Gelstück möglichst knapp ausgeschnitten werden. Anschließend wurde die Isolierung des Fragments nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.16.6.2 Isolierung aus niedrigschmelzender Agarose

Im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in niedrigschmelzender (,low melting point', LMP) Agarose (s. 2.21.2) wurde der Gelbereich, welcher das gewünschte DNA-Fragment enthielt, unter UV-Licht ( $\lambda = 366$  nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Da eine Agarose-Konzentration von > 0.5 % (w/v) die nachfolgenden Reaktionen stört, wurde entsprechend mit TE-Puffer verdünnt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 65°C, um die Agarose zu schmelzen und gleichzeitig mögliche DNasen zu inaktivieren. Anschließend wurde die Probe bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die isolierten Fragmente wurden in Ligationsreaktionen eingesetzt.

# 2.17 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde entweder photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm gegen H<sub>2</sub>O bidest. bestimmt oder im Rahmen einer Agarose-Gelelektrophorese bei parallelem Auftrag eines definierten Standards mit bekannter Konzentration (z.B. mit *Hin*dIII verdaute  $\lambda$ -DNA) geschätzt.

# 2.18 Enzymatische Modifikation von DNA

# 2.18.1 Restriktionsspaltung

Die Restriktion von DNA wurde mit 2-10 U Restriktionsenzym/µg DNA im geeigneten Puffersystem des jeweiligen Herstellers zwischen 30 min und 5 h bei empfohlener Temperatur durchgeführt. Zur Entfernung von RNA wurde RNase in einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt. Doppelverdaue mit Restriktionsenzymen, die unterschiedliche Puffer benötigten, wurden in 'Tango Buffer' (MBI Fermentas, St. Leon Rot) durchgeführt. In Fällen, bei denen die Enzyme verschiedene Temperaturen oder Pufferkonzentrationen benötigten, erfolgten die Doppelverdaue in zwei Schritten, wobei -wenn nötig- nach dem ersten Verdau eine DNA-Fällung mit Ethanol durchgeführt wurde (s. 2.16.2). Die Restriktionsverdaue wurden durch Hitzeinaktivierung (nach Angaben des Herstellers), Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung (s. 2.16.2) oder Zugabe des Auftragepuffers für die Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.21.1) abgestoppt.

#### 2.18.2 Dephosphorylierung

Erfolgte der Restriktionsverdau von Vektor-DNA mit nur einem Restriktionsenzym, wurde zur Vermeidung einer Religation, die endständige 5'-Phosphatgruppe des linearisierten Vektors durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase abgespalten. Dazu wurde dem Restriktionsansatz während der letzten 30 min der Inkubation 1 U alkalische Phosphatase pro µg DNA zugesetzt. Anschließend wurde das Enzym durch Phenol-Chloroform-Extraktion inaktiviert und die DNA gefällt (s. 2.16.2). Bei der Herstellung von Genombanken wurde die DNA während der letzten Stunde des Restriktionsverdaus mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um später eine gleichzeitige Insertion von verschiedenen DNA-Fragmenten in den Vektor zu verhindern.

# 2.18.3 Ligation

Für die Ligation wurde das zu klonierende DNA-Fragment in etwa zweifachem molaren Überschuß im Vergleich zum dephosphorylierten Vektor vorgelegt. Die Ligation erfolgte in einem 20  $\mu$ l-Ansatz (DNA-Konz. 10-100 ng/ $\mu$ l) in Gegenwart von 1 U T4-DNA-Ligase in 1 x Ligase-Puffer entweder für 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C.

5 x Ligase-Puffer	250	mМ	Tris-HCl, pH 7.6
(Life Technologies)	100	mМ	MgCl <sub>2</sub>
	10	mМ	ATP
	10	mМ	Dithioerythrit
	25	% (w/v)	PEG-8000

War das Fragment aus einem LMP-Agarosegel (s. 2.16.6.2) isoliert worden, so wurde ein äquimolares Verhältnis von Insert- und Vektor-DNA eingestellt, wobei die Menge an Insert-DNA je nach Größe des Fragmentes zwischen 50 und 300 ng lag.

Der Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

#### Ligationsansatz

DNA-Fragment (in LMP-Agarose)	15-30	μl
Linearisierte Vektor-DANN	2-5	μl
5 x Ligase-Puffer	24	μl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 120	μl

Das Ansatzvolumen wurde so gewählt, daß die Endkonzentration der LMP-Agarose unterhalb von 0.4 % (w/v) lag. Die Ligation wurde durch Zugabe von 2 U T4-DNA-Ligase gestartet und erfolgte für 12-16 h bei 16°C. Zur Beendigung der Reaktion wurde die Ligase für 10 min bei 65°C inaktiviert. Anschließend wurde der Ligationsansatz direkt transformiert oder in einem weiteren Restriktionansatz eingesetzt.

# 2.19 Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin

Die Digoxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten (Roche/Boehringer, Mannheim) dient der Herstellung von nicht-radioaktiven DNA-Sonden Für Hybridisierungen. Dabei ist das Digoxigenin (DIG), ein Steroid-Molekül aus der Fingerhut-Pflanze (Digitalis), über ein Spacer-Molekül an dUTP gekoppelt (DIG-dUTP). In dieser Form wird es als Nucleotid-Analogon durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I während der ,randompriming'-Reaktion in neu synthetisierte DNA-Stränge eingebaut. Bei dieser Methode werden Hexanucleotide, die mit statistischer Häufigkeit an DNA binden, an das Sondenfragment hybridisiert. Dort fungieren sie als Starter (,primer') für das Klenow-Fragment. Während der Neusynthese von kurzen DNA-Strängen werden dann markierte Nucleotide eingebaut.

Zur Markierung wurde ein ,Dig DNA Labeling Mix' (Roche, Mannheim) verwendet. Der **Markierungsansatz** hatte folgende Zusammensetzung:

15 µl (ca.1 µg)	denaturierte DNA <sup>a</sup>
2 µl	1 mM DIG-dNTP-Mix
2 µl	,random primer mix'
<sup>a</sup> Denaturierung für 10	min bei 95°C, dann auf Eis abgekühlt

Der Ansatz wurde nach Zugabe von 1  $\mu$ l Klenow-Fragment (2 U) für 3 h bei 37°C inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurden 2  $\mu$ l einer 200 mM EDTA-Lösung (pH 8.0) eingemischt. Anschließend wurde die DNA für 10 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

Alternativ erfolgte die Markierung durch eine Standard-PCR-Reaktion (s. 2.20.1) mit den für das Fragment spezifischen Primern. Dabei wurde statt des üblichen Nucleotidmix das ,dNTP Labeling Mix' (Roche, Mannheim) eingesetzt. Der Erfolg der Markierung konnte nach der PCR durch die geringere Mobilität des markierten Fragments im Agarosegel (s. 2.21.1) im Vergleich zum unmarkierten Fragment kontrolliert werden.

# 2.20 PCR-Methoden

Bei der *In vitro*-Amplifikation von DNA durch PCR (Mullis & Faloona, 1987) fanden entweder die *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen), die *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega) oder die *Pwo*-DNA-Polymerase SuperYield (Roche) Verwendung. Als Matrizen dienten chromosomale DNA, Plasmid-DNA oder bereits zuvor durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente. Für die Amplifikation zu klonierender Fragmente aus chromosomaler DNA wurde die *Pfu*-, die *Pwo*- oder die *Proof start*<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase (Quiagen) verwendet, da diese aufgrund ihrer 3' $\rightarrow$ 5'-'proofreading'-Aktivität sehr viel weniger Punktmutationen generiert und damit die Matrize genauer repliziert als *Taq*-DNA-Polymerase.

# 2.20.1 Standard-PCR

Aufgrund ihrer deutlich höheren Amplifikationseffizienz wurde für Standardamplifikationen die *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt. Die verwendeten Primer variierten in ihrer Länge zwischen 17 und 26 Basen. Für die Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes

wurden die beiden Primer, die diesen Bereich einschlossen, möglichst so gewählt, daß sie annähernd gleiche Hybridschmelzpunkte aufwiesen.

Der Schmelzpunkt wurde nach folgender Formel berechnet (Chester & Marshak, 1993):

$$T_{m} = 69.3 + 0.41 (\% G + C - Gehalt) - \frac{650}{L}$$

G+C-Gehalt: prozentualer molarer Gehalt des Primers an G und C L: Länge des Primers (in Basen).

Die PCR wurde in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Tgradient; Biometra, Göttingen) durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

# **PCR-Reaktionsansatz**

- 0.5  $\mu$ l DNA ( $\leq$  500 ng Gesamt-DNA;  $\leq$  200 ng Plasmid-DNA)
  - 1  $\mu$ l Primer 1 (100 pmol)
  - 1  $\mu$ l Primer 2 (100
    - (100 pmol) P-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
  - μl 10 mM dNTP-Mix
     μl 10 x Reaktionspuffer
- 10  $\mu$ l 5 x Q-Solution
- $0.5 \ \mu l Taq$ -Polymerase
- ad 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest.

<sup>\*</sup>Die Q-Solution (Qiagen) ändert das Schmelzverhalten der DNA und erhöht sowohl die quantitative Ausbeute als auch die Spezifität der Amplifikation von Matrizen, die unter Standardbedingungen nur sehr wenig oder gar kein Produkt liefern.

Die Komponenten wurden auf Eis in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (0.2 ml) pipettiert. Folgendes Programm wurde für die PCR verwendet.

# **PCR-Programm**

1	4 min	Denaturierung	95°C	
2	30 s	Denaturierung	95°C	Schritt 2-4 29x wieder-
3	30 s	Anlagerung der Primer	50-68°C	holen
4	1 min	Polymerisation	70°C	
5	5 min	Polymerisation	70°C	
6	$\infty$	Abkühlung	4°C	

Die Hybridisierungstemperatur war abhängig von den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer. Im Regelfall lag sie 2-5°C unterhalb der Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur. Nach Abschluß der PCR wurde der Ansatz auf Eis gehalten. Eine Probe wurde elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.21.1), um die Reaktionsprodukte zu überprüfen. Sollte das Produkt noch weiter verwendet werden, wurde es nach einer präparativen Elektrophorese aus dem Gel extrahiert (s. 2.16.6.1) oder direkt mit einem Kit (Quiagen) nach den Angaben des Herstellers durch Bindung an Silikasäulen gereinigt.

#### 2.20.2 **Einführung von Mutationen durch PCR**

Die Einführung von definierten Mutationen erfolgte mittels PCR. Dabei wurden Primerpaare verwendet, von denen jeweils der eine Primer die gewünschte Mutation trug. In einer ersten PCR-Reaktion wurden erst das 5'- und das 3'-Ende des Gens separat amplifiziert. In einer zweiten Reaktion wurden die Fragmente anschließend zusammengefügt. Dabei wurden Primer verwendet, die vor dem 5'- und hinter dem 3'-Ende des Gens anlagerten. Als Matrizen-DNA diente das klonierte Gen, in das die Mutationen eingefügt werden sollten. Um unerwünschte Mutationen zu vermeiden und eine ausreichende Fragmentausbeute zu erhalten, wurde die Pwo-Polymerase SuperYield (Roche, Mannheim) verwendet.

Der Reaktionsansatz der ersten Reaktion hatte folgende Zusammensetzung:

#### **PCR-Reaktionsansatz 1**

- 0.5 µl Plasmid-DNA  $(\leq 500 \text{ ng Gesamt-DNA}; \leq 200 \text{ ng Plasmid-DNA})$
- 3 ul Primer 1 (100 pmol/ul)
- 3 µl Primer 2  $(100 \text{ pmol/}\mu\text{l})$
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 5 µl 10 x Reaktionspuffer
- 0.5 µl Pwo-Polymerase
- ad 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest.

In der zweiten Reaktion erfolgte das Zusammenfügen der Einzelfragmente. Der Reaktionsansatz der zweiten Reaktion hatte folgende Zusammensetzung:

#### **PCR-Reaktionsansatz 2**

- PCR-Fragmente aus der ersten ( $\leq 500 \text{ ng DNA}$ ) 5 µl Reaktion, 5'-Ende des Gens PCR-Fragmente aus der ersten ( $\leq 500 \text{ ng DNA}$ ) 5 µl Reaktion, 3'-Ende des Gens
  - Primer 1
- 3 µl Primer 2
- 3 µl
- 10 mM dNTP-Mix  $1 \mu l$
- 5 µl 10 x Reaktionspuffer
- 0.5 µl Pwo-Polymerase
- H<sub>2</sub>O bidest. ad 50 µl

- $(100 \text{ pmol/}\mu\text{l})$
- $(100 \text{ pmol/}\mu\text{l})$
- (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

PCR-Programm				
1	4 min	Denaturierung	95°C	
2	30 s	Denaturierung	95°C	Schritt 2-4 29x wieder-
3	30 s	Anlagerung der Primer	50-68°C	holen
4	1.5 min	Polymerisation	70°C	
5	5 min	Polymerisation	70°C	
6	8	Abkühlung	4°C	

Folgendes Programm wurde für die Amplifikation verwendet:

Nach der erfolgreichen Amplifikation des gesamten Gens wurde das PCR-Fragment mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut, aus einem TAE- Agarosegel (s. 2.16.6.1) extrahiert und in einen geeigneten Vektor ligiert.

# 2.20.3 Radioaktive Markierung durch PCR

Für Gelretardationsexperimente in der nativen PAGE (s. 2.22.1) wurden verschiedene Fragmente der *cbb*-Kontrollregion zunächst durch Standard-PCR (s. 2.20.1) amplifiziert und danach in einer sich anschließenden 'heißen' PCR durch den Einbau von <sup>35</sup>S aus [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP radioaktiv markiert. Die Markierung erfolgte mit *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega), da dieses Enzym [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-Nucleotide im Vergleich zur *Taq*-Polymerase wesentlich effektiver einbaut. Im Gegensatz zur Standard-PCR werden zur Markierung nur 5 Cyclen benötigt, wobei im letzten Cyclus unmarkiertes dATP zugegeben wurde, um eine vollständige Auffüllung der Fragmente zu gewährleisten ('chase reaction').

# Markierungs-Ansatz (50µl)

10x Pfu-DNA-Polymerase-Puffer	10 µl
3x dNTP-Mix (je 2 mM dCTP, dGTP, dTTP)	2.5 µl
$[\alpha - {}^{35}S]dATP (10 \ \mu Ci)$	5 µl
Primer 1 (100 pmol)	1 µl
Primer 2 (100 pmol)	1 µl
PCR-Produkt	5 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	22.5 µl
Pfu-DNA-Polymerase	1 µl

PCR-Programm	(5 Cyclen)			
1	4 min	Denaturierung	95°C	
2	30 s	Denaturierung	95°C	Schritt 2-4 3x wieder-
3	30 s	Anlagerung der Primer	59°C	holen (+1x nach Zugabe
4	1 min	Polymerisation	70°C	von 2µl dATP 2mM)*
5	5 min	Polymerisation	70°C	
6	$\infty$	Abkühlung	4°C	
*Zugabe des unmarkie	rten dATP hei 7	0°C-Schritt am Ende des vierten Cy	clus)	

#### 2.21 Gelelektrophorese von Nucleinsäuren

#### Agarose-Gelelektrophorese 2.21.1

(F C

Nucleinsäuren wurden durch Agarose-Gelelektrophorese in horizontalen Gelkammern aufgetrennt. Zur schnellen Analyse wurden Mini-Gelkammern mit Gelen von 7 x 10 cm (Gelvolumen 30 ml) verwendet. Der zur Ausformung der Probentaschen eingesetzte Kamm ermöglichte die Auftrennung von bis zu 18 Proben mit einem Volumen von je 15 µl. Längere Gele, die eine bessere Auflösung erlauben, wurden verwendet, wenn eine exakte Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erforderlich war. In einer Maxi-Gelkammer konnten auf ein Gel mit den Dimensionen von 14.5 x 12.5 x 0.6 cm (Gelvolumen 120 ml) bis zu 25 Proben mit maximal je 30 µl Volumen aufgetragen werden. Die Agarosekonzentration in den Gelen war abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente und variierte zwischen 0.8 % (w/v) und 3 % (w/v). Als Elektrophoresepuffer dienten TAE-Puffer oder TBE-Puffer. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose durch kurzes Aufkochen (Mikrowelle) in TAE- oder TBE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50°C in die Kammer gegossen. Der Kamm wurde sofort in die noch flüssige Agarose eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0.2 Vol. des Auftragepuffers versetzt.

Die Elektrophorese in TAE-Minigelen lief 45 - 90 min bei konstanter Spannung von maximal 90 V und 16 h in Maxigelen bei 15 - 30 V. Wurde TBE-Puffer verwendet erfolgte die Elektrophorese von Minigelen bei 115 V für 50 min. Anschließend wurde das Gel für 5 - 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (1.5 µg/ml) gefärbt und dann ebenso lange gewässert. Das unter UV-Licht fluoreszierende Ethidiumbromid interkaliert in die Nucleinsäuren, so dass die einzelnen Banden im UV-Licht (UV-Transilluminator 312 nm; Vilber Lourmat, Lindau) sichtbar gemacht werden konnten. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Video Dokumentationssystems (INTAS, Göttingen).

TAE-Puffer		Auftragepuffer	
40 mM	Tris-Acetat, pH 8.1	400 mM	Tris-Acetat, pH 8.1
10  mM	Na-Acetat	25 % (v/v)	Glycerin
TRE-Puffer		0.25 % (w/v	Bromphenolblau

89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM**EDTA** pH 8.0

Die mit *Pst*I oder *Hin*dIII verdaute DNA des Bakteriophagen  $\lambda$  (Sanger et al., 1982) diente als Größenmarker und zur Konzentrationsbestimmung linearer DNA-Fragmente (Tab. 5). Alternativ wurde ein komerziell erhältlicher Größenstandart verwendet (100 bp Ladder plus, Fermentas).

Lambda- PstI		Lambda- <i>Hin</i> dIII
11,493 <sup>b</sup>	1,700	23,130 <sup>c</sup>
5,080	1,159	9,416
4,749	1,093	6,557
4,505	0,805	4,361 <sup>c</sup>
2,840	0,516	2,322
2,562 <sup>b</sup>	0,467	2,027
2,454	0,448	0,564
2,443	0,339	0,125
2,139	0,265	
1.986 Und 10 wei	tere Fragmente	

Fragmentgrößen mit PstI oder HindIII verdauter λ-DNA<sup>a</sup> **Tab. 5**.

<sup>a</sup>Größenangaben in bp nach Sanger et al., 1982.

<sup>b</sup>Diese Fragmente tragen die *cos*-sequenzen des  $\lambda$ -Phagen und können durch Hybridisierung ein zusätzliches Fragment von 14,055 bp bilden.

<sup>c</sup>Die beiden gekennzeichneten Fragmente tragen die cos-Sequenzen und können miteinander hybridisieren, wobei ein zusätzliches 27,491 bp-Fragment entsteht.

#### 2.21.2 LMP-Agarose-Gelelektrophorese

Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (LMP-Agarose, Schmelzpunkt  $\leq 65^{\circ}$ C) ist besonders geeignet zur Isolierung von DNA-Fragmenten. Da sie nach dem Schmelzen und anschließendem Verdünnen auf eine Konzentration von < 0.4 % (w/v) nicht mehr erstarrt, erlaubt sie die weitere enzymatische Modifikation der Fragmente in Gegenwart der Agarose. Wegen des niedrigen Schmelzpunktes sind die Gele sehr weich, weshalb sie in separaten Gelschlitten (6.5 x 9 cm; Gelvolumen 25 ml) hergestellt wurden, in denen sie auch nach der Elektrophorese verblieben. Die Agarosekonzentration lag, je nach dem aufzutrennenden Größenbereich der Fragmente, zwischen 0.8 und 1.5 % (w/v). Zur Isolierung von Fragmenten > 1 kb wurde SeaPlaque GTG-Agarose verwendet, für Fragmente < 1 kb NuSieve GTG-Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf). Die LMP-Agarose wurde durch kurzes Aufkochen in TAE-Puffer (s. 2.20.1) gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 45°C mit 2  $\mu$ l Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt. Zur Ausformung der Taschen wurde ein achtzähniger Kamm mit einem Volumen von 10  $\mu$ l pro Tasche verwendet. Zu den Proben wurde vor dem Auftragen 0.1 Vol. Auftragepuffer gegeben. Als Elektrophoresepuffer diente TAE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von maximal 60 V.

# 2.22 Gelretardation von DNA-Protein-Komplexen

Die Interaktion zwischen DNA und Proteinen wurde durch Bildung von Protein-DNA-Komplexen in Gelretardationsexperimenten ('mobility shifts') untersucht (Ausubel et al., 1988; modifiziert). Die Versuche wurden in der nicht-denaturierenden 5 % PAGE sowohl mit  $[\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP-markierten als auch mit Biotin-markierten DNA-Fragmenten (s. 2.22.3) durchgeführt. Letztere wurden mit Biotin-spezifischen, Peroxidase-gekoppelten Antikörpern über die Reaktion mit einem Chemolumineszierenden Substrat detektiert. Im 2 % (w/v)-igen TAE-Agarosegel wurde Die Gelretardation mit einem unmarkiertem DNA-Fragment (s. 2.22.2) durchgeführt.

# 2.22.1 Nicht-denaturierende PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in nicht-denaturierenden, vertikalen Polyacrylamidgelen (5 % [w/v] Acrylamid; 16 x 12 cm) mit einer Dicke von 0.5 mm. Das maximale Auftragevolumen betrug 10  $\mu$ l pro Tasche (5 x 5 x 0.5 mm). Die Glasplatten wurden zuvor mit Aceton und 96 % (w/v) Ethanol gereinigt, mit Binde- bzw. Repellsilan behandelt und nochmal leicht mit 96 % (w/v) Ethanol nachpoliert. Als Puffersystem diente Tris-Glycin-Puffer.

Bindesilan	35 μl 10 ml	3-Metacryloxypropyltrimethoxysilan Ethanol
Repellsilan	500 μl 10 ml	Dimethyldichlorsilan 1,1,1-Trichlorethan
<b>Gel- und Elektrophorespuffer</b> (5 x Tris-Glycin-HCl-Puffer)	50 mM 960 mM 5 mM	Tris-HCl, pH 7.4 Glycin EDTA

Gellösung (5 %; 20 ml)	3.2 ml	Acrylamid-/Bisacrylamid-Lsg.(30 % [w/v] Acrylamid: 0.8 % [w/v] Bisacrylamid)
	4.0 ml	5 x Tris/Glycin pH 7.4
	0.5 ml	Glycerin (87 % [w/v])
	12.3 ml	H <sub>2</sub> O bidest.
	13.3 µl	TEMED*
	160 µl	Ammoniumpersulfat* (10 % [w/v] in H <sub>2</sub> O bidest.)

\* Die Zugabe dieser beiden Komponenten erfolgte erst direkt vor dem Gießen der Gellösung, da hierdurch die Polymerisierung des Gels eingeleitet wurde.

Zur Bindung der Proteine an die DNA erfolgte eine Inkubation des Bindungsansatzes für 5-20 min bei 25°C.

#### **Bindungsansatz**

<sup>35</sup> S- markiertes DNA-Fragment (ca. 2 ng)	2 µl
Kompetitor-DNA (0-2 µg)	0-2 µl
Protein- oder Rohextrakt (max. 2 µg)	1-2 µl
DNA-Bindungspuffer	ad 10 µl

Im Anschluß an die Bindungsreaktion wurden dem Ansatz  $3 \mu$ l MS-Beschwerungslösung zugesetzt und dieser bis zur Elektrophorese auf Eis gehalten. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 9 mA bis zum Austreten des Farbmarkers Bromphenolblau aus dem Gel oder zur höheren Auflösung bis max. 3 h. Anschließend wurde das an der mit Bindesilan behandelten Glasplatte anhaftende Gel zunächst für 45 min bei 80°C getrocknet und danach autoradiographiert (s. 2.25).

DNA-Bindungspuffer	50	mМ	Tris-HCl, pH 7.4
	10	mМ	KCl
	10	mМ	EDTA
	1-50	% (w/v)	Glycerin
MS-Beschwerungslösung	50	% (w/v)	Glycerin
	0.02	% (w/v)	Bromphenolblau

# 2.22.2 In der Agarose-Gelelektrophorese

Eine vereinfachte Form der Gelretardationen wurden in Agarose-Minigelen (2 % [w/v] Agarose in TAE-Puffer) durchgeführt. Sie bot die Möglichkeit einer wesentlich beschleunigten, wenn auch im Gegensatz zu den Gelretardationen in der PAGE weniger spezifischen und empfindlichen relativen Bestimmung der Menge an bindendem Protein.

Die Herstellung des Gels erfolgte wie bei einer Standard-Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.21.1).

10x TAE-Puffer	400 mM	Tris-Acetat, pH 7.8
	100 mM	Na-Acetat
	10 mM	EDTA

Zur Bindung der Proteine an die DNA erfolgte eine Inkubation des Bindungsansatzes für 10-20 min bei 25°C.

#### Bindungsansatz

DNA-Fragment (50-100 ng)	2	μl
Kompetitor-DNA (0-2 µg)	0-2	μl
Protein- bzw. Rohextrakt (max. 2 µg)	1-2	μl
DNA-Bindungspuffer	ad 10	μl

Im Anschluß an die Bindungsreaktion wurden dem Ansatz  $3 \mu$ l MS-Beschwerungslösung zugesetzt und dieser bis zur Elektrophorese auf Eis gehalten. Die Elektrophorese erfolgte für 1.2 h bei einer konstanten Spannung von 60 V und einer Stromstärke von max. 80 mA bis der Farbmarker Bromphenolblau eine Position ca. 2 cm vor dem Gelende erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und mit dem Videosystem dokumentiert (s. 2.21.1).

## 2.22.3 Gelretardation mit dem LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit

Alternativ zu Gelretardationsexperimenten in nativen Polyacrylamidgelen mit radioaktiv markierter DNA wurde Biotin-markierte DNA mit dem LightShift Chemoluminescent EMSA Kit (Pierce, Bonn) verwendet. Nach dem Auftrennen der Bindungsreaktion in der nativen PAGE wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert. Die Biotin-markierte DNA konnte anschließend mit Streptavidin-spezifischen-Antikörpern, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt waren und einem Chemolumeniszierenden Substrat detektiert werden. Die Auftrennung der Bindungsreaktionen erfolgte in 5 %-igen nativen Polyacrylamid-Minigelen (6 x 8 x 0,1 cm). Das Gel hatte folgende Zusammensetzung:

#### Gellösung (5% PAGE):

5 x TBE (s. 2.21.1)	0.8 ml	
Acrylamd/Bisacrylamidlösung (30%/10% [w/v])	1.28 ml	
H <sub>2</sub> O	5.92 ml	
*Ammoniumpersulfat (10%)	64 µl	
*TEMED	5.3 µl	
*Die letzten beiden Komponenten wurden erst kurz vor	dem Gießen zum S	Starten der Polymerisation
hinzugefügt.		

Die Gellösung wurde zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach einstündiger Polymerisation des Gels wurden der Kamm entfernt, die Taschen gespült und das Gel einer 30-60 minütigen Vorelektrophorese bei 100 V unterzogen. Als Laufpuffer wurde 0.5 x TBE-Puffer verwendet. Während der Vorelektrophorese wurde die DNA-Bindungsreaktion auf Eis angesetzt.

## Bindungsansatz

Biotin-markiertes DNA-Fragment	1.5-2 ng	1 µl
Kompetitor DNA Poly(dI•dC)	1-2 µg	1 µl
Proteinextrakt	2-5 μg	1-2 µl
DNA-Bindungspuffer (s. 2.22.1)		ad 20 µl

Nach einer Inkubation von 20 min bei 25°C wurden der Bindungsreaktion 2 µl Ladepuffer hinzugefügt und bis zu 15 µl der Bindungsreaktion auf das Gel geladen. Die Elektrophorese lief bei 100 V bis die blaue Farbmarkerbande ca. ¾ der Gellänge erreicht hatte.

Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Biodyne B; Pall, Dreieich) erfolgte mit Hilfe einer "Semi-dry Fast Blot" Apparatur (Biometra). Das Filterpapier und die Membran wurden vor dem Transfer mit 0.5 x TBE-Puffer getränkt. Anschließend wurden auf drei Lagen Filterpapier zunächst die Membran und dann das Gel aufgelegt, gefolgt von weiteren drei Lagen Filterpapier. Der Transfer erfolgte für 30 min bei 380 mA. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz auf Filterpapier getrocknet und die DNA durch Bestrahlung mit UV Licht (254 nm) für 5 min auf der Membran fixiert. Die Arbeitsschritte zur Detektion der DNA wurden bei RT unter Schwenken in Plastikschalen durchgeführt. Nur für den letzten Schritt wurde die Membran in Plastik eingeschweißt und ruhig liegend im Dunkeln inkubiert.

1.	15 min	Blockieren unspezifischer Bindungen mit 20 ml Blocking-Puffer
2.	15 min	Antikörperbindung (66.7 µl stabilisierte Anti- Streptavidin Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper in 20 ml Blocking- Puffer; Verdünnung 1:300)
3.	5 x 5 min	Waschen mit 20 ml 1 x Waschpuffer
4.	5 min	Äquilibieren der Membran mit 30 ml Äquilibrierungspuffer
5.	5 min ohne Schütteln	Reaktionslösung aus 6 ml Luminol/Enhancer Lösung und 6 ml stabiler Peroxid-Lösung

#### Arbeitschritte zur Detektion der DANN

Nach der Substratreaktion wurde die noch feuchte Membran in Plastikfolie eingeschweißt und ein Röntgenfilm aufgelegt (s. 2.25).

# 2.23 Übertragung von Nucleinsäuren auf Nylonmembranen-Southern-Blotting

Zum Nachweis von DNA-Fragmenten durch Hybridisierung mit einer DNA-Sonde (Southern-Hybridisierung) wurde die zu analysierende DNA elektrophoretisch in einem Maxi-Agarosegel aufgetrennt (s. 2.21.1) und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Laufweiten wurden anhand der DNA-Marker (Längenstandards) dokumentiert. Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B; Pall) erfolgte mit Hilfe einer Vakuum-Blot-Apparatur (Vacu-Gene XL; Amersham Pharmacia Biotech). Dazu wurde die Membran zunächst mit Ethanol getränkt, mit Wasser abgespült und schließlich kurz in 20 x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran auf die gut mit Wasser getränkte poröse Basalplatte platziert. Eine Folienmaske wurde so darübergelegt, dass sie an allen Seiten mit der Membran überlappte. Die Ränder des danach aufgebrachten Gels überlappten ihrerseits die Folienmaske.

Während der nun folgenden Übertragungsprozedur musste darauf geachtet werden, dass sich immer genug Flüssigkeit auf dem Gel befand, um dessen Kollabieren zu vermeiden. Nach dem Anlegen eines Vakuums von 55 mbar wurde das Gel zunächst für 20 min mit Depurinisierungslösung und dann für 20 min mit Denaturierungslösung bedeckt, um die Übertragung großer DNA-Fragmente durch partielle alkalische Hydrolyse zu erleichtern. Anschließend wurde das Gel für 20 min mit Neutralisierungspuffer behandelt. Der eigentliche Transfer erfolgte durch Überschichtung des Gels mit 20 x SSC-Lösung für 90 min. Danach

wurde die Lage der Geltaschen auf der Membran markiert und das Gel abgenommen. Durch kurzes Waschen mit 5 x SSC wurden an der Membran anhaftende Gelreste entfernt. Zur Fixierung der übertragenen DNA auf der Membran wurde diese mit UV-Licht bestrahlt (254 nm, 3 min). Die Membran konnte im Anschluß direkt zur Hybridisierung (s. 2.24) eingesetzt oder in Filterpapier und Alufolie eingeschlagen bei RT aufbewahrt werden.

Depurinisierungslösung		Denaturie	rungslösung
0.2 M	HCl	1 M 0.5 M	NaCl NaOH
Neutralisierungspuffer		20 x SSC	
0.1 M	Tris-HCl, pH 7.4	3 M 0.3 M	NaCl Na-Citrat

# 2.24 Hybridisierungen mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

Southern- und Northern-Hybridisierungen wurden in einem Hybridisierungsofen (Hybaid Mini Hybridization Oven; Biometra) in den dazugehörigen Röhrchen durchgeführt. Die Membran wurde mit der DNA- oder RNA-tragenden Seite nach innen in ein Röhrchen gelegt und mit 5 x SSC-Lösung bedeckt. Das Röhrchen wurde anschließend solange geschwenkt, bis die Membran luftblasenfrei an der Wand haftete. Anschließend wurde die SSC-Lösung gegen die entsprechende Hybridisierungslösung ausgetauscht. Das weitere Vorgehen war abhängig von der Art der verwendeten Sonde.

Zur Vorhybridisierung wurden DNA- oder RNA-beladene Nylonmembranen (s. 2.23) zunächst in 20 ml Hybridisierungslösung für 2 h bei 52°C vorhybridisiert. Danach wurde die denaturierte DNA-Sonde in 800  $\mu$ l Hybridisierungslösung aufgenommen und zum Vorhybridisierungsansatz gegeben. Anschließend wurde bei 52°C über Nacht hybridisiert.

# Hybridisierungslösung

5 X SSC

0.5 % (w/v) Blockier-Reagenz<sup>a</sup>

0.02 % (w/v) SDS

0.1 % (w/v) Na-N-Lauroylsarkosinat

<sup>a</sup>aus dem ,DNA Labelling and Detection Kit' (Roche/Boehringer)

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden-DNA wurden die Membranen zunächst zweimal für 5 min bei RT in  $2 \times SSC + 0.1\%$  (w/v) SDS und anschließend zweimal für 15 min bei  $68^{\circ}C$  in  $0.1 \times SSC + 0.1\%$  (w/v) SDS gewaschen.

Der Nachweis des DIG erfolgte immunologisch mit Hilfe von Anti-DIG-Antikörpern, die mit alkalischer Phosphatase gekoppelt waren. Die Phosphatase katalysiert die Umsetzung von 5-Brom-4-chlor-indolylphosphat (BCIP) mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT) zu einem Farbstoffpräzipitat. Alle Schritte wurden in Plastikschalen bei RT und unter leichtem Schütteln durchgeführt. Lediglich für die Farbreaktion selbst wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt. Zunächst wurden die Membranen 1 min in Tris/NaCl-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5 + 150 mM NaCl) gewaschen und anschließend unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen durch 30 min Inkubation mit Blockierpuffer (0.5 % [w/v] Blockier-Reagenz in Tris/NaCl-Puffer) abgesättigt. Zum Blockierpuffer wurden die konjugierten Anti-DIG-Antikörper in einer Konzentration von 150 mU/ml (verdünnt in Tris/NaCl-Puffer) gegeben und für 30 min mit der Membran inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden dann durch zweimaliges Waschen für 15 min in Tris/NaCl-Puffer von den Membranen entfernt. Die Membranen wurden anschließend für 2 min in Farbreaktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5 + 100 mM NaCl + 50 mM MgCl<sub>2</sub>) äquilibriert, bevor sie mit 10 ml Färbelösung in Plastiktüten eingeschweißt und im Dunkeln inkubiert wurden.

Entsprechend der Menge gebundener Antikörper erschienen die Signale innerhalb von 30 min. Sobald die Signale eine ausreichende Intensität erreicht hatten, wurden die Membranen aus der Farblösung entfernt, zum Abstoppen der Reaktion in TE-Puffer eingelegt und noch feucht photographisch dokumentiert. Über längere Zeit wurden die Membranen getrocknet im Dunkeln aufbewahrt, wobei sich die Farbintensität etwas abschwächte.

#### Färbelösung

Farbreaktionspuffer	10	ml
NBT <sup>a</sup> -BCIP <sup>b</sup> -Lösung	200	μl
<sup>a</sup> Nitroblau-Tetrazoliumsalz		

<sup>b</sup> 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Natriumsalz

# 2.25 Autoradiographie

Der autoradiographische Nachweis radioaktiv markierter DNA in Gelen und auf Membranen erfolgte durch das Auflegen von Röntgenfilmen (Hyperfilm β-max; Amersham Pharmacia). Nach einer Expositionszeit von einem bis zu mehreren Tagen wurde der Film ca. 5 min entwickelt (Entwickler Kodak LX 24), kurz gewässert und 10 min fixiert (Fixierer Kodak AL 4). Abschließend wurde er nochmals gewässert und getrocknet.

# 2.26 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden vom Göttinger Laboratorium für Genomanalyse im (Göttingen Genomics Laboratory) Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen nach Sanger (Sanger et al., 1977) mittels ,dye terminator chemistry' mit dem automatischen Sequenzierer ABI 377 Prism DNA (Amersham Bioscience, Applied Biosystems) durchgeführt.

# 2.27 Chemikalien und Materialien

Von folgenden Firmen stammten die verwendeten Chemikalien und Materialien:

Applichem	Carbenicillin, Kanamycin, Chlor- amphenicol	
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	Agarose NA, Streptavidin-Sepharose, IPG- Streifen, <i>Pwo</i> -Polymerase SuperYield, Ammoniumpersulfat, Desoxynucleotide, Rnase-freie Dnase, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, Restriktionsenzyme, Röntgenfilm, TEMED	
Biozym (Hess. Oldendorf)	SeaPlaque und NuSieve GTG-Agarose,	
Difco (Augsburg)	Bacto-Trypton, Hefeextrakt, Nutrient Broth	
Schütt Labortechnik (Göttingen)	GELoader Tips	
Hartmann Analytics (Braunschweig)	Radiochemikalien	
Kodak (Stuttgart)	Röntgenfilm MS, Röntgenfilmentwickler und –fixierer	
MBI Fermentas (St. Leon-Rot)	Restriktionsendonukleasen, <i>Taq</i> -Polymerase, Dithioerythreit, IPTG, X-Gal, Protein- Größenstandards	
Metabion (Martinsried)	Oligodesoxynucleotide	
New Englands Biolabs (Schwalbach)	Restriktionsendonucleasen, IMPACT <sup>TM</sup> -CN-System	

Nylonmembran Biodyne B
LightShift <sup>®</sup> Chemiluminescent EMSA Kit
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase, Streptavidin Magnesphere <sup>®</sup> Paramagnetic Particles
QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, <i>Taq</i> -Polymerase
Alkalische Phosphatase, Ampicillin, RNase, BCIP/NBT Stocklösung, Tris, Dig-DNA- Markierungsmixtur
Ethidiumbromidlösung, Phenol-Lösung (Rotiphenol), L-Arabinose, DTT
Bromphenolblau, CTAB, Dimethyl- dichlorsilan, EDTA, Kanamycin, Rinder- serumalbumin, Saccharose, Serva Blau G-250, SDS, Tetracyclin, Xylencyanol FF, Phophoenolpyruvat, Pyruvat, Lysozym, Dialyseschläuche, Proteinase K
Tris, Methacryloxypropyltrimethoxysilan, Phenylethyl-β-D-thiogalaktosid, Ribulose- 1,5-bisphosphat, Anti-Rabbit IgG mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt
NucleoFast Kit
Vorgefärbter Proteinmarker, Anti- Digoxygenin-FAB-Antikörper, Random Primer Buffer Mixture, T4-DNA-Ligase
allgemeine Chemiklaien des Reinheitsgrades p.e.
BacterioMatch <sup>®</sup> Two-Hybrid-System,
## 3. Experimente und Ergebnisse

## **3.1 Stand der Vorarbeiten**

Bei Aufnahme dieser Arbeit wurde mit der Sequenzierung des gesamten Genoms von *Ralstonia eutropha* H16 begonnen. Die vollständige Sequenz der beiden *cbb*-Operone von *R. eutropha* H16 war bereits bekannt, ebenso die Sequenz des stromaufwärts in divergenter Orientierung codierten Regulatorgens *cbbR* (Kossman et al., 1989; Windhövel und Bowien, 1991; Kusian et al., 1995; Bömmer et al., 1996; Kusian und Bowien, 1997). Anhand der *cbbR*-Deletionsmutante HB14, die einen autotroph negativen Phänotyp aufweist, wurde gezeigt, dass der LysR-Typ-Transkriptionsregulator (LTTR) CbbR für die Expression der *cbb*-Operone essentiell ist (Jeffke et al., 1999). Durch ,footprinting'-Experimente wurden die Binderegionen von CbbR zwischen *cbbR* und *cbbL*, dem ersten Strukturgen des Operons, identifiziert. Diese Kontrollregion umfasst 167 bp und enthält die Promotoren des *cbb*-Operons, *p<sub>cbbL</sub>*, und von *cbbR*, *p<sub>cbbR</sub>* (Kusian & Bowien, 1995; s. 1., Abb. 1 und 2).

In Untersuchungen mit dem Operon-Promoter  $p_{cbbL}$  waren gezielt Mutationen in den postulierten `10'- und `35'- Regionen gesetzt worden. Die Sequenz wurde dabei dem  $\sigma^{70}$ -Consensusmotiv von Promotoren aus *Escherichia coli* angenähert. Die Angleichung der Sequenz führte zu einer erhöhten Promoteraktivität im Vergleich zur Basalaktivität des Wildtyps und bestätigte damit die Identität von  $p_{cbbL}$  als  $\sigma^{70}$ -abhängigem Promoter (Jeffke et al., 1999). Das Regulationsmuster des Wildtyppromotors blieb aber erhalten. Im CbbR-freien Hintergrund der Mutante HB14 konnte ebenfalls eine Aktivierung des mutierten Promotors  $p_{cbbL}$  unter mixotrophen und heterotroph dereprimierenden Bedingungen mit dem prinzipiell gleichen Regulationsmuster wie im Wildtyp nachgewiesen werden (Jeffke et al., 1999).

Von der *cbbR*-Deletionsmutante wurde unter autotrophen Bedingungen eine Revertante HB14R, isoliert, die wieder einen autotroph positiven Phänotyp zeigte. Die Charakterisierung dieser Revertante ergab, dass die Suppression der Mutation durch ein dem *phcA* aus *Ralstonia solanacearum* homologen Gen erfolgte (Jeffke, 2001). Eine spontane Punktmutation des *phcA*-Gens in HB14R führte zu einem Aminosäureaustausch im Helix-Turn-Helix-Bereich des Proteins. Das veränderte Protein ersetzte CbbR und führte sogar zu einer prinzipiellen Wiederherstellung des Regulationsmusters wie im Wildtyp (Jeffke, 2001). Dies deutete indirekt auf mindestens einen weiteren beteiligten *cbb*-Transkriptionsregulator hin.

Die Aktivität von LTTRs ist in der Regel von der Bindung eines Effektors abhängig, der aus dem metabolischen Umfeld der regulierten Gene stammt. In einem *in vitro*-Transkriptionssystem konnte PEP als negativer Effektor von CbbR aus *R. eutropha* H16 charakterisiert werden. Die Repression durch den Signalmetaboliten PEP beruht dabei auf einer Verstärkung der Bindung von CbbR an die *cbb*-Kontrollregion (Grzeszik et al., 2000). Die Form der Wechselwirkung zwischen CbbR und PEP ist nicht bekannt. Eine Phosphorylierung von CbbR durch PEP konnte durch Markierungsexperimente aber weitgehend ausgeschlossen werden (B. Bowien, persönliche Mitteilung).

Die Sequenzierung des Genoms von *Ralstonia metallidurans* CH34 war zu Beginn dieser Arbeit relativ weit fortgeschritten. Die Analyse der Genomdaten führte zur Entdeckung von zwei *cbb*-Operonen, *cbb<sub>I</sub>* und *cbb<sub>II</sub>*, im Stamm CH34 (s. 1., Abb. 1) vergleichbar der Organisation in *Rhodobacter capsulatus* und *R. sphaeroides*. Beiden Operonen von CH34 sind *cbbR*-ähnliche Gene in divergenter Orientierung vorangestellt. In Bindungsstudien mit dem CbbR<sub>I</sub> konnte eine Bindung an die intergene Region zwischen dem *cbbR<sub>I</sub>* und dem Strukturgen *cbb<sub>L</sub>* nachgewiesen werden. Ebenso wurde eine Bindung dieses Proteins an die intergene *cbb*-Kontrollregion aus *R. eutropha* H16 beobachtet, wenn auch mit deutlich geringerer Affinität (T. Mahlmann und B. Bowien, persönliche Mitteilung).

In einem breit angelegten Ansatz sollten nun im Rahmen dieser Arbeit mögliche weitere, mit der *cbb*-Kontrollregion aus *R. eutropha* H16 oder mit CbbR<sub>H16</sub> interagierende Proteine identifiziert werden. Gene entsprechender Interaktionspartner sollten deletiert und der Phänotyp der Mutanten mit einem besonderen Augenmerk auf die Autotrophie untersucht werden. Die Regulation der *cbb*-Gene in *R. metallidurans* CH34 sollte ebenfalls untersucht und mit der in *R. eutropha* H16 verglichen werden. Zur weiteren Charakterisierung, und um Hinweise auf die Bindung des (der) Effektors(en) und/oder die Interaktion mit anderen Proteinen zu erhalten, wurde eine Mutationsanalyse des Hauptregulators CbbR<sub>H16</sub> durchgeführt.

## **3.2** Suche nach Regulatoren der CO<sub>2</sub>-Assimilation in *R. eutropha* H16

### 3.2.1 Anreicherung und Identifizierung DNA-bindender Proteine

Das Regulationsmuster der *cbb*-Expression des Wildtyps *R. eutropha* H16 war in der Revertante HB14R weitgehend erhalten. Dies deutet auf die Beteiligung mindestens eines weiteren Proteins an der Regulation der *cbb*-Operone hin. Ebenso weist die bisher erfolglose Suche nach einem positiven Effektor von CbbR auf weitere an der *cbb*-Regulation beteiligte Komponenten in Stamm H16 hin. Transkriptionsregulatoren binden meist an ein spezifisches Sequenz-Motiv der DNA. Um DNA-bindende Proteine zu isolieren, ist die Affinitätschromatographie eine Methode der Wahl (Gadgil et al., 2001). Die isolierten Proteine können anschließend auch bei geringen Mengen mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert werden.

#### 3.2.1.1 DNA-Affinitätschromatograpie

Die DNA-Affinitätschromatographie nutzt die spezifische Bindung von Regulatoren an ihr Bindungsmotiv aus. Durch die hohe Anreicherung können selbst in geringen Konzentrationen vorkommende Proteine isoliert werden.

Es wurde angenommen, dass neben CbbR weitere an der Regulation des *cbb*-Operons beteiligte Proteine an den Operatorbereich der Kontrollregion binden. Daher wurde die gesamte intergene Kontrollregion (Abb. 4: Primer F1 und R1, 243 bp) als Ligand in der Affinitätschromatographie eingesetzt. Wie erwartet konnten bei Verwendung der vollständigen *cbb*-Kontrollregion in Affinitätssäulen DNA-bindende Proteine isoliert werden. Bei Verwendung von Teilfragmenten, die entweder nur den *cbbR*- (Primer F5 und R1, 153 bp) oder *cbbL* (Primer F1 und R7, 113 bp) -seitigen Teil der Kontrollregion umfassten, wurden keine DNA-bindende Proteine erhalten.



# Abb. 4. Intergene *cbb*-Kontrollregion von *R. eutropha* H16 mit den zur Amplifikation verwendeten Primern.

Die codierenden Sequenzen des Strukturgens *cbbL* und des Regulatorgens *cbbR* sind gelb hervorgehoben. Die Ribosomenbindestellen (rbs) sind fettgedruckt und die `-10' und `-35' Regionen der Promotoren unterstrichen. Primer sind dunkelgrau eingezeichnet und mit den entsprechenden Bezeichnungen und Sequenzen der ggf. eingefügten Schnittstellen beschriftet.

In vorangegangenen Gelretardationsexperimenten mit Rohextrakten von R. eutropha H16 waren drei DNA-Protein-Komplexe beobachtet, und die beteiligten Proteine P1 und PhcA in Komplexen P1 und P2 charakterisiert worden (s. 1., Abb. den 3). Beide Transkriptionsfaktoren scheinen, nach der Intensität der Komplexe und dem nicht detektierbaren CbbR-DNA Komplex zu schließen, in relativ hoher Konzentration in der Zelle vorzuliegen. Um die Verdrängung des oder der gesuchten Transkriptionsfaktoren zu der DNA-Affinitätschromatographie ein Rohextrakt verhindern, wurde in der Dreifachmutante HB45 (AcbbR, AphcA, AP1) eingesetzt. Eine kooperative Bindung des gesuchten Regulators und damit die Abhängigkeit der DNA-Bindung von CbbR konnte nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden alternativ Rohextrakte der zweifachen Deletionsmutante HB44 ( $\Delta phcA$ ,  $\Delta P1$ ) verwendet.

Nach dem Auftragen des Rohextraktes wurden DNA-bindende Proteine mit einem steigendem Salzgradienten (0.01-2 M KCl) eluiert. Bis zu ca. 300 mg Protein wurden sukzessiv auf die Säulen aufgetragen und insgesamt bis zu 1 mg Protein in den aktiven Fraktionen gewonnen (Tab. 6).

		HB 45			HB 44	
Fraktion	Protein- konz.	Gesamtvol. [ml]	Gesamt- protein	Protein- konz.	Gesamtvol. [ml]	Gesamt- protein
	[mg/ml]		[mg]	[mg/ml]		[mg]
Rohextrakt	18.8	15	282	20.2	10	202
	Elutionsfra	aktionen mit D	ANN-Binde	eaktivität (10	0 mM KCl)	
E2	0.03	1	0.03	0.04	1	0.04
E3	0.08	1	0.08	0.038	1	0.03
E4	0.16	1	0.16	0.04	1	0.04
E5	0.12	1	0.12	0.05	1	0.05
	Elutionsfra	aktionen mit D	ANN-Binde	eaktivität (20	0 mM KCl)	
E6	0.22	1	0.22	0.062	1	0.062
E7	0.32	1	0.32	0.062	1	0.062
E8	0.24	1	0.24	0.081	1	0.081
E9				0.079	1	0.079
E10				0.058	1	0.058
E11				0.047	1	0.047
	Elution	sfraktionen mi	t DNA-Bind	deaktivität (2	M KCl)	
E15				0.072	1	0.072

Tab. 6.DNA-Affinitätschromatographie: Eingesetzte Proteinmengen in Rohextrakten<br/>der Mutantenstämme HB45 und HB44 sowie Proteinkonzentrationen in<br/>Fraktionen mit DNA-Bindeaktivität.

Die aufgefangenen Fraktionen wurden anschließend in Gelretardationsanalysen mit der *cbb*-Kontrollregion auf ihre DNA-Bindungsaktivität untersucht. Bei der Verwendung von Rohextrakten aus HB45 wurden bereits bei einer Konzentration von 100 mM KCl erste DNAbindende Proteine eluiert. Insgesamt wurden bis zu drei DNA-Protein-Komplexe bei Gelretardationsexperimenten mit den Elutionsfraktionen beobachtet (Abb. 5A). Einer der Komplexe (K2) mit mittlerer Mobilität war sowohl in den 100 mM KCl-Fraktionen (E1-E5) als auch in den 200 mM KCl-Fraktionen (E6-E8) zu beobachten. Eine etwas niedrigere Mobilität wies der erste Komplex (K1) auf, der bereits in den Fraktionen mit 100 mM KCl auftrat. Die höchste Mobilität zeigte der dritte Komplex (K3), der erst in Fraktionen mit höherer Salzkonzentration (200 mM KCl) zu finden war. Dieses differenzierte Elutionsverhalten könnte darauf hinweisen, dass es sich tatsächlich um mindestens drei verschiedene Proteine handelt und nicht um höhere Komplexe eines Proteins.

Bei der Verwendung von HB44-Rohextrakten waren in Gelretardationsexperimenten mit den Elutionsfraktionen ebenfalls drei Komplexe zu beobachten. Der Komplex mit mittlerer Mobilität (K2) hatte allerdings eine deutlich schwächere Ausprägung. Dagegen wiesen die Komplexe mit der geringsten und höchsten Mobilität (K1 und K3) größere Intensitäten auf. Dabei erfolgte die Elution der überwiegenden Menge von K1 erst bei einer Salzkonzentration von 200 mM (E6-E11). Auch K3 mit der höchsten Mobilität war bereits in Fraktionen mit niedrigerer Salzkonzentration zu beobachten (E4 und E5), trat aber auch bei höheren Salzkonzentrationen (200 mM KCl) deutlicher hervor (Abb. 5B; E6-E8).





Abb. 5. Gelretardationen mit Fraktionen aus den DNA-Affinitätschromatographien mit Rohextrakten der Mutantenstämme HB45 (A) und HB44 (B).
Native PAGE (5 % [w/v] Acrylamid). Als DNA-Fragment wurde die *cbb*-Kontrollregion (243 bp) von *R. eutropha* H16 eingesetzt. E1-E5 bei einer Konzentration von 100 mM KCl im Elutionspuffer eluierte Fraktionen (HB45: E1 0.13 µg, E2 0.15 µg, E3 0.4 µg, E4 0.8 µg, E5 0.6 µg; HB44: E2 0.2 µg, E3 0.19 µg, E4 0.2 µg, E5 0.25 µg Protein); E6-E11 bei einer Konzentration von 200 mM KCl im Elutionspuffer eluierte Fraktionen (HB45: E6 1.1 µg, E7 1.6 µg, E8 1.2 µg, E9 1.3 µg; HB44: E6 0.31 µg, E7 0.31 µg, E8 0.4 µg, E9 0.39 µg, E10 0.29 µg, E11 0.24 µg Protein); E15 (0.36 µg Protein), bei einer Konzentration von 2 M KCl im Elutionspuffer eluierte Fraktion; 0, freie DNA; K1-3 DNA-Protein-Komplexe.

Ein weiterer Komplex, der erst bei Elution mit 2 M KCl auftrat, wurde mit HB44-Rohextrakten beobachtet (E15; Abb. 6). Das Laufverhalten dieses Komplexes in vergleichenden Gelretartdationsexperimenten ist dem CbbR-DNA-Komplex ähnlich, zeigte aber eine geringfügig höhere Mobilität (Abb. 6), so dass es sich bei dem betreffenden Protein wahrscheinlich nicht um CbbR handelte.



## Abb. 6. Vergleichende Gelretardation mit einer Fraktion (E15) der DNA-Affinitätschromatographie und überproduziertem CbbR. a, bei 2 M KCl im Elutionspuffer aufgefangene Fraktion E15 (0.36 μg Protein) der DNA-Affinitätschromatographie mit Rohextrakt aus HB44; b, Rohextrakt aus *E. coli* (BL21DE3) mit überproduziertem CbbR (0.3 μg Protein, pAECR5); 0, freie DNA; 1, DNA-Protein-Komplexe.

Die Elution DNA-bindender Proteine bei sehr niedrigen Salzkonzentrationen hatte zur Folge, daß viele unspezifisch gebundene Proteine nicht durch das Waschen der Säule mit höherer Salzkonzentration entfernt werden konnten. So zeigte die Analyse der Fraktionen in der SDS-PAGE dann auch ein komplexes Proteingemisch in den Elutionsfraktionen (Abb. 7). Um einzelne Proteine identifizieren zu können, wurde das Proteingemisch in einer 2D-PAGE aufgetrennt und einige Proteine wurden im Massenspektrometer analysiert.



# Abb. 7. SDS-PAGE mit Fraktionen der DNA-Affinitätschromatographie und mit Rohextrakt aus HB45. M, Marker; R, Rohextrakt von HB45; D, Durchbruch der DNA-Affinitätssäule; W1-W16, Waschfraktionen (DNA-Bindepuffer 10-50 mM KCl); E2-5 Elutionsfraktionen (Elutionspuffer 100 mM KCl); E6-9 Elutionsfraktionen (Elutionspuffer 200 mM KCl).

## 3.2.1.2 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen aus der DNA-Affinitätschromatographie

Die 2D-PAGE bietet eine gute Möglichkeit, Proteingemische aufzutrennen und anschließend die einzelnen Proteine zu analysieren.

Zur Analyse der Proteine in den Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie wurden die vereinigten Fraktionen mit DNA-Bindeaktivität in der 2D-PAGE aufgetrennt. Die 2D-Gele zeigten ein komplexes Muster von Proteinen. Wurden Fraktionen aus der Affinitätschromatographie mit Rohextrakt von HB44 (Abb. 8A) eingesetzt, waren deutlich mehr Proteine zu beobachten als mit HB45 (Abb. 8B). Viele der bei HB45 vorhandenen Proteine waren auch bei HB44 wiederzufinden (Abb. 8, Sechsecke). Nur für relativ wenige Proteine von HB45 konnte kein entsprechendes Protein bei HB44 detektiert werden (Abb. 8, Quadrate). Dagegen zeigten sich bei HB44 deutlich mehr zusätzliche Proteine (Abb. 8, Kreise). Der Großteil der Proteine wurde für die massenspektrometrische Analyse ausgeschnitten. In offenbar sehr geringer Konzentration vorliegende Proteine wurden nicht untersucht, da ihre erfolgreiche Identifikation unwahrscheinlich war. Zudem war es aus Kapazitätsgründen nicht möglich, alle Proteine zu analysieren.



Zwei Proteine (Nr. 2 und 3) fielen in den 2D-Gelen durch ihre Intensität besonders auf. Sie wurden als Translations-Elongationsfaktor TU (Nr. 2) und die  $\alpha$ -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase (Nr. 3) identifiziert. Neben einer Reihe von Proteinen, die aufgrund der oben erwähnten frühen Elution DNA-bindender Proteine bei niedrigen Salzkonzentrationen nicht differenziert von der Säule gewaschen werden konnten, war auch die Anreicherung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren zu beobachten. Die relativ große Zahl von LTTRs spiegelt dabei die Häufigkeit dieses Regulatortyps in *R. eutropha* H16 wieder. Sie zeigt aber auch, dass die CbbR-Bindungsregion von H16 ein konserviertes Bindungsmotiv für LTTRs enthält und so die Bindung von nicht an der *cbb*-Regulation beteiligten Regulatoren begünstigt.

Alle identifizierten Proteine sind in Anhang II zusammen gefasst. Der prozentuale Anteil ähnlicher Aminosäuren sowie die Annotation und die Accession-Nummern der ähnlichsten Proteine in der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) sind ebenfalls aufgeführt.

Einige wurden für die Herstellung von Deletionsmutanten ausgewählt (s. 3.2.4), um deren autotrophen Phänotyp zu untersuchen. Die korrespondierenden Gene erhielten vorläufig die Bezeichnungen *sspA* (Nr. 21; RREX07847; 612 bp; Anhang III A), *frcR* (Nr. 24; RREX05230; 1269 bp; Anhang III B), *cmk* (Nr. 22; RREX07275; 669 bp; Anhang III C), *orfV* (Nr. 8; RREX08965; 1119 bp; Anhang III D), *orfG* (Nr. 28; RREX01489, 843 bp; Anhang III E) und *orfP* (Nr. 16; RREX02965, 1089 bp; Anahng III F).

Das Gen *sspA* wird in *E. coli* vor allem unter Stressbedingungen exprimiert und hat Einfluss auf die Lebensfähigkeit in der stationären Phase. Es gibt aber Hinweise, dass es auch an der Regulation von Genen in der exponentiellen Wachstumsphase beteiligt ist (Williams et al., 1994). Der potentielle Regulator *frcR* aus der ROK-Familie liegt direkt stromaufwärts eines Operons, das ein Transportsystem der ABC-Familie codiert. Es wird angenommen, dass über dieses System Fructose in die Zelle aufgenommen wird. Ein ähnliches System wurde in *Sinorhizobium meliloti* gefunden (Lambert et al., 2001). Außer dem ABC-Transporter enthält das potentielle Operon auch die Gene einer Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, einer Phosphoglucose-Isomerase und einem Protein der Ribokinase-Familie. Das Gen zeigt aber auch entfernte Ähnlichkeit zu NagC aus *E. coli*, einem Repressor des N-Acetylglucosamin (*nag*)-Operons, der aber zusätzlich weitere Gene des Amino-Zucker-Metabolismus reguliert (Plumbrigde und Pellegrini, 2004). Das Gen des potentiellen Regulators *orfG* ist mit einem als Pirin bezeichnetem Gen assoziiert. Pirin ist in Pflanzen, Tieren und Prokaryonten zu finden. Für das Protein wird eine modulatorische Funktion bei der Transkriptionsregulation angenommen (Wendler et al., 1997). Da eine Phosphorylierung im Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel für die *cbb*-Regulation in Betracht zu ziehen ist, wurden *cmk* und *orfP* ebenfalls für die Deletion ausgewählt. Die Cytidylat-Kinase (CmK) katalysiert die Phosphorylierung von CMP unter ATP Verbrauch zu CDP und könnte so ein Verbindungsglied zum Energiestoffwechsel darstellen. Der von *orfP* codierte potentielle Transkriptionsregulator enthält eine PAS-Domäne. PAS-Domänen sind in Bakterien häufig mit der Sensordomäne von Histidinkinasen aus Zwei-Komponenten-Systemen assoziiert. In *E. coli* und *S. meliloti* wurden Proteine mit PAS-Domänen als Sauerstoffsensoren charakterisiert (Suquet et al., 2005). Das Gen *orfV* wurde aufgrund seines fehlenden Zusammenhangs mit Genclustern ausgewählt.

## 3.2.2 Suche nach direkt mit CbbR interagierenden Proteinen

Die Arbeithypothese geht von einer direkten Bindung von potentiellen Regulatoren, die außer CbbR an der Kontrolle der *cbb*-Genexpression beteiligt sind, an die *cbb*-Kontrollregion aus. Denkbar ist aber auch eine zusätzliche Protein-Interaktion mit dem Regulator CbbR. Ob diese Wechselwirkung vor, während oder nach der Bindung an die *cbb*-Kontrollregion erfolgt, ist dabei offen. Eine von der DNA unabhängige Interaktion der Proteine erschien aber ebenfalls möglich.

Eine Interaktion mit der DNA und CbbR wird für den "Response'-Regulator PrrA in *R. sphaeroides* angenommen (Dubbs et al., 2000). In diesem Organismus bindet PrrA stromaufwärts der CbbR-Binderegion des *cbb<sub>I</sub>*-Operons und zusätzlich an zwei distal stromaufwärts vom Promotor liegenden Bereichen. Eine Krümmung der DNA ermöglichte dann eine Aktivierung des Promoters durch Interaktion zwischen PrrA und CbbR (Dubbs et al., 2000).

Eine Methode, miteinander interagierende Proteine zu identifizieren, bietet ein Zwei-Hybrid (,Two-Hybrid')-System. Ein solches System macht sich den modularen Aufbau vieler Transkriptionsfaktoren in eine DNA-bindende und eine mit anderen Proteinen interagierende Domäne zunutze. Es basiert auf der Beobachtung, dass eine kovalente Bindung der beiden Domänen für eine korrekte Interaktion und Transkriptionsaktivierung des Reportergens nicht notwendig ist.

#### 3.2.2.1 Konstruktion der Plasmide

Das Zwei-Hybrid-System BacterioMatch (Stratagene) wurde verwendet, um mit CbbR interagierende Proteine zu detektieren. Es besteht aus dem ,Köder'-Plasmid pBT, auf dem der Repressor des Phagen  $\lambda$   $\lambda$ cI unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors codiert ist, und dem ,Zielprotein'-Plasmid pTRG, das die Sequenz des Aminoterminus der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase (RNAP) von *E. coli* unter der Kontrolle des Tandempromotors *lpp/lacUV5* trägt. Beide Plasmide enthalten eine *Not*I-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende der Gene, die für die Aminosäure Alanin codiert (Alanin-Linker). Über diesen Alanin-Linker werden das Köder- oder die Zielproteine mit dem  $\lambda$ cI-Repressor bzw. der  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP fusioniert (Abb. 9).

Der Regulator CbbR enthält am N-terminalen Ende ein Helix-Turn-Helix-Motiv, mit dem das Protein an die DNA bindet. Es folgt damit dem typischen modularen Aufbau von LTTR mit einer N-terminalen DNA-bindenden und einer C-terminalen Domäne, die Effektoren bindet und/oder die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt. Damit der C-Terminus des Proteins für Interaktionen zur Verfügung stand, wurde eine N-terminale Fusion von CbbR mit den Proteinen des Zwei-Hybrid-Systems vorgenommen. Das *cbbR*-Gen wurde dazu für die entsprechenden Fusionen aus Gesamt-DNA von *R. eutropha* H16 amplifiziert: Primer (s. Anhang I: Tab. 1.) CbbRFus\_3revX und CbbRFus\_8forE (Fusion mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP); Primer (s. Anhang I: Tab. 1.) CbbRFus\_2forE und CbbRFus\_3revX (Fusion mit dem  $\lambda$ cI). Für die Klonierung wurde über die Primer am 5'-Ende eine *Eco*RI- und am 3'-Ende des Gens eine *Xho*I-Schnittstelle eingefügt. Die Fragmente wurden dann in die mit *Xho*I und *Eco*RI geschnittenen Plasmide pBT und pTRG kloniert, so dass eine N-terminale Fusion von CbbR mit dem jeweiligen Protein resultierte. Die hergestellten Konstrukte pBTR23 ( $\lambda$ cI-CbbR) und pTRGR83 ( $\alpha$ -RNAP-CbbR) wurden durch Sequenzierung (Primer pBTf und pBTr bzw. pTRGf und pTRGr; s. Anhang I: Tab. 1.) verifiziert.



Abb. 9. Schematische Darstellung des verwendeten Zwei-Hybrid-Systems mit den interagierenden Fusionsproteinen: Transkriptionsaktivierung der Reportergene *bla* und *lacZ*.

α-UE RNAP, α-Untereinheit der RNA-Polymerase; *bla*, Ampicillinresistenzgen; *lacZ*, β-Galactosidasegen; *p*<sub>*lacZ*</sub>, *lac*-Promotor.

### 3.2.2.2 Konstruktion der Genombanken von R. eutropha

Zum ,Screening' nach mit CbbR interagierenden Proteinen wurden mit dem Vektor pTRG Genombanken von *R. eutropha* hergestellt. Da eine Beteiligung der Proteine PhcA und P1 an der Regulation des *cbb*-Operons ausgeschlossen werden konnte (Jeffke, 2001; B. Bowien persönliche Mitteilung) und um einen hohen Hintergrund durch mit sich selbst interagierendem CbbR auszuschließen, wurde DNA aus der Dreifachmutante HB45 ( $\Delta cbbR$ ,  $\Delta phcA$ ,  $\Delta P1$ ) verwendet.

Die Gesamt-DNA wurde in einem partiellen Verdau mit *Sau*3AI behandelt, so dass die Fragmentlängen zwischen 300-3000 bp lagen. Da kleine Fragmente bevorzugt ligieren, wurde eine Gelextraktion durchgeführt, bei der die DNA in Fraktionen mit Fragmentlängen von 1500-3000 bp, 900-1500 bp und 300-900 bp geteilt wurde. Diese Fragmente wurden in das mit *Bam*HI geschnittene Plasmid pTRG ligiert und in *E. coli* XL1Blue MRF'Kan transformiert. Da nur die kleinen Fragmente von 300-900 bp befriedigende Klonzahlen ergaben, wurde alternativ Gesamt-DNA aus HB45 vollständig mit *Eco*RI geschnitten und anschließend in das mit *Eco*RI verdaute Plasmid pTRG ligiert. Der vollständige Verdau von Gesamt DNA aus HB45 ergab Fragmente von 800-8000 bp, so dass auch größere Leserahmen vollständig erfasst werden konnten.



# Abb. 10. Agarose-Gelelektrophorese von pTRG-Hybridplasmiden aus Genombanken von *R. eutropha* HB45 in pTRG.

A, Plasmide der mit *Eco*RI erstellten Genombank, mit *Eco*RI verdaut; B, Plasmide der mit *Sau*3AI erstellten Genombank, mit *Hind*III verdaut; M, Größenstandard *Pst*I-verdaute  $\lambda$ -DNA, Größenangaben in bp.

Die aus mit *Eco*RI-geschnittener DNA hergestellte Genombank enthielt ca. 50,000 Klone. Da die Ligationen mit der *Sau*3AI-geschnittenen DNA eine geringere Effizienz aufwiesen, umfasste die entsprechende partielle Genombank nur ca. 30,000 Klone. Zur Verifikation wurden jeweils 50-70 Plasmid-Klone einem Kontrollverdau unterzogen (Abb. 10). Die Plasmide der *Sau*3AI-Genombank wurden mit *Hin*dIII verdaut, dessen Schnittstellen stromauf- und stromabwärts der multiplen Klonierungsstelle liegen. Von 47 getesten Klonen trugen nur zwei kein Fragment. Die inserierten Fragmente der *Eco*RI-Genombank wurden wieder mit *Eco*RI aus den Plasmiden geschnitten. Von 70 getesteten Klonen zeigten nur vier kein Fragment. Die minimale Fragmentgröße der *Eco*RI-Genombank betrug ca. 800 bp, die der *Sau*3AI-Genombank ca. 300 bp.

Die benötigten Klonzahlen wurden nach Clarke und Carbon (1976) berechnet:

$$\frac{\ln (1-P)}{\ln (1-x/y)} = \text{Anzahl der Kolonien (N)}$$

P = Wahrscheinlichkeit für die Vollständigkeit der Genbank (0,99)

x = minimale Fragmentgröße

 $y = Genomgröße (7.4 x 10^6 bp)$ 

Die *Eco*RI-Genombank müsste demnach  $4.3 \times 10^4$  Klone umfassen, um theoretisch mit 99 % iger Wahrscheinlichkeit das vollständige Genom von HB45 zu repräsentieren. Dies war mit  $5.0 \times 10^4$  Klonen tatsächlich gegeben. Für eine vollständige Abdeckung des Genoms durch die *Sau*3AI-Genombank wären  $11.3 \times 10^4$  Klone erforderlich. In diesem Fall enthielt die Genombank mit 30,000 Klonen allerdings nur knapp ein Drittel der benötigten Klone. Die ,en masse' aus den Klonen extrahierten Plasmide wurden in einer Co-Transformation von *E. coli* (BacterioMatch Zwei-Hybrid-System Reporter-Stamm) mit dem "Köder'-Plasmid pBTR23 eingesetzt

#### 3.2.2.3 ,Screening' nach interagierenden Proteinen

Die Suche nach interagierenden Proteinen erfolgte durch Co-Transformation des ,Köder'-Plasmids pBTR23 mit dem Plasmidpool der Genombanken in den *E. coli* Reporter Stamm des BacterioMatch Zwei-Hybrid-Systems.

Dieser Stamm trägt als Reportergene das Ampicilin-Resistenzgen *bla* und das  $\beta$ -Galactosidasegen *lacZ* unter der Kontrolle eines modifizierten *lac*-Promotors mit nur einem  $\lambda$ -Operator anstelle der ursprünglichen CRP (,catabolite repression protein')-Bindestelle. Das  $\lambda$ cI-CbbR Fusionsprotein bindet über die N-terminale DNA-Bindedomäne des Repressors an den  $\lambda$ -Operator. Interagiert nun das mit dem C-Terminus des Repressors fusionierte CbbR mit einem Zielprotein, das seinerseits mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP fusioniert ist, rekrutiert und stabilisiert es die Bindung der RNAP an den Promotor und aktiviert so die Transkription der Reportergene (s. 3.2.2.1, Abb. 9).

Zuweilen interagiert das "Köder'-Protein direkt mit der α-Untereinheit der RNAP und verursacht so einen starken Hintergrund. Um dies auszuschließen, wurde das Konstrukt pBTR23 mit dem "Zielprotein'-Plasmid pTRG ohne Insert auf Aktivität getestet. Dabei konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. Weil CbbR nur als Dimer aktiv ist, wurden

die in den Plasmiden pBTR23 und pTRGR83 hergestellten Fusionen ebenfalls auf ihre Interaktion getestet. Eine Interaktion wurde jedoch nicht beobachtet.

Für das eigentliche "Screening" wurde das Konstrukt pBTR23 (50 ng) mit dem Plasmidpool der Genbanken (50 ng) co-transformiert. Die Klone wurden zur Selektion auf Carbenicillin, Tetracyclin, Chloramphenicol und Kanamycin haltigen Nährböden (CTCK-Platten) ausplattiert. Für jede Transformation wurden mehrere Platten ohne Carbenicillin (CTK-Platten) mitgeführt, um den Erfolg der Transformation und die erreichten Klonzahlen bestimmen zu können. Resistente Klone wurden erneut auf LB-Platten mit Carbenicillin gepickt und nach dem Anwachsen auf LB-Platten mit X-Gal (X-Gal-Indikatorplatten) umgestempelt. Nur Klone, die Plasmide mit interagierenden Proteinen trugen, sollten eine blaue Farbe zeigen. Tatsächlich wurde aber eine sehr hohe Hintergrundaktivität festgestellt. Blau gefärbte Klone wurden auf LB mit Tetracyclin angezogen, um den Verlust von pBTR23 zu fördern. Die pTRG-Hybridplasmide mit dem Gen eines potentiell interagierenden Proteins wurden anschließend extrahiert, in einem Restriktionsverdau verifiziert und anschließend erneut in Co-Transformationen mit pBTR23 und dem pBT ohne Insert eingesetzt. Nur wenn nach der Transformation mit pBT keine resistenten Kolonien zu beobachten waren und damit eine direkte Interaktion mit der RNAP ausgeschlossen werden konnte, wurden die Plasmide erneut extrahiert und schließlich das in pTRG inserierte Fragment sequenziert.

Bei der Suche nach interagierenden Proteinen aus der *Eco*RI-Genombank wurde kein potentiell mit CbbR interagierendes Protein gefunden. In der ersten Runde des "Screenings" wurden 15 Klone isoliert, die auf den X-Gal-Indikatorplatten eine leichte Blaufärbung zeigten. Nach der Retransformation der extrahierten Plasmide wurden aber bei 14 der Klone keine resistenten Kolonien auf CTCK-Platten gefunden. Keines der codierten Proteine schien also mit CbbR zu interagieren. Nur ein pTRG-Hybridplasmid führte zur Bildung von resistenten Kolonien, allerdings auch mit dem "Köder"-Plasmid pBT ohne CbbR. Das in diesem Plasmid codierte Protein scheint daher direkt mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP Kontakt aufzunehmen und so die Transkription induzieren zu können.

Aus dem Plasmidpool der *Sau*3AI-Genombank wurden im initialen "Screening" 28 Klone isoliert, die scheinbar eine Interaktion mit CbbR zeigten. Bei der Überprüfung der Plasmide ließ sich bei sechs Klonen die Interaktion bestätigen. Nur ein Klon verursachte auch mit pBT und damit in Abwesenheit von CbbR eine Induktion der Reportergene.

Die Plasmide, die nur nach der Co-Transformation mit pBTR23 resistente Kolonien bildeten, wurden wiederum sequenziert. Der Abgleich der Sequenzen mit der Genomsequenz von *R. eutropha* H16 zeigte, dass bei zweien der Klone das DNA-Fragment in falscher Orientierung inseriert war und daher ein artifizielles Protein gebildet wurde. Auf zwei anderen Plasmiden waren hypothetische Proteine (RREX10855; 408 Aminosäuren, 1224 bp; RREX02540; 96 Aminosäuren, 288 bp) codiert. Zwei weitere enthielten die unvollständigen Sequenzen einer Ribonucleosid-diphosphat-Reduktase (RREX03884; 329 Aminosäuren, 987 bp) und einer Uridylat-Kinase (RREX04203; 236 Aminosäuren, 708 bp). Die partielle Sequenz eines Transkriptionsregulators (RREX02539; 527 Aminosäuren, 1581 bp; Anhang III G), der eine Ähnlichkeit von 52 % zu dem Regulator AepA aus *Erwinia carotovora* spp. *carotovora* (Acc. Nr. AAB32244; Liu et al. 1993) aufwies, war auf einem weiteren Plasmid codiert. Da eine Interaktion zwischen CbbR und dem vorerst als AepA bezeicheten potentiellen Regulator am wahrscheinlichsten schien, wurde dessen Gen für eine Deletion ausgewählt (s. 3.2.4). Die resultierende Mutante wurde anschließend auf eine Veränderung im autotrophen Wachstum hin untersucht.

## 3.2.3 Identifizierung von Proteinen in H16, deren Homologe in anderen Organismen an der *cbb*-Regulation beteiligt sind

Die *cbb*-Regulation in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* beruht wie in den übrigen autotrophen Bakterien in erster Linie auf dem Transkriptionsregulator CbbR. Zusätzlich wird über das Zwei-Komponenten-System RegBA (bzw. das homologe PrrBA) eine Integration in den Stoffwechsel vermittelt (Dubbs und Tabita, 2004; Elsen et al., 2004). Zwei-Komponenten-Systeme sind weit verbreitet (Stock et al., 2000) und dienen häufig der Signalweiterleitung in bezug auf Umwelteinflüsse.

In Ähnlichkeitsanalysen der Genomsequenz von H16 mit den Sequenzen des Zwei-Komponenten-Systems RegBA aus *R. capsulatus* konnten zwei homologe Proteine identifiziert werden. Das dem ,Response'-Regulator RegA homologe aus H16 (RREX06744; 609 bp, 203 Aminosäurereste; Anhang III H) zeigte eine Ähnlichkeit von 46 % zu RegA aus *R. capsulatus* (Acc. Nr.: P42508) und zu PrrA aus *R. sphaeroides* (Acc. Nr.: Q53227). Der homologe ,Response'-Regulator RegR aus *Bradyrhizobium japonicum* (Acc. Nr.: CAA06859) wies eine Ähnlichkeit von 42 % auf. Die Ähnlichkeit der assoziierten Sensor-Kinase RegB aus H16 (RREX06743; 1386 bp, 462 Aminosäurereste; Anhang III H) bezüglich RegB aus *R. capsulatus* (Acc. Nr.:AAF01775), PrrB aus *R. sphaeroides* (Acc. Nr.: Q53068) und RegS aus *B. japonicum* (Accession Nr.: CAA06858) war mit 28 %, 24 % bzw. 23 % deutlich geringer. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten war eine Beteiligung des Zwei-Komponenten-Systems von *R. eutropha* H16 an der Regulation der *cbb*-Operone denkbar. Neben dem Zwei-Komponenten-System wurde das Gen eines hypothetischen Proteins (OrfR, RREX04431; 885 bp, 295 Aminosäurereste; Anhang III I) mit hoher Ähnlichkeit (43 %) zu CbbR im Genom von H16 entdeckt. Es bestand die Möglichkeit, dass OrfR an die *cbb*-Kontrollregion binden und den mit H16-Rohextrakten in der Gelretardation zu beobachtenden Komplex P3 (s. 1., Abb. 3) verursachen könnte. Die Bildung eines heterologen Komplexes mit CbbR und eine Rolle bei der Regulation des *cbb*-Operons war also nicht auszuschließen.

Zur Untersuchung der Funktion des RegBA-homologen Systems und von OrfR in *R. eutropha* H16 wurden daher Deletionsmutanten hergestellt (s. 3.2.4) und auf ihren Phänotyp untersucht (s. 3.2.5). Zudem wurden die Gene heterolog in *E. coli* exprimiert und in Gelretardationsexperimenten mit der *cbb*-Kontrollregion aus H16 eingesetzt.

## 3.2.3.1 Heterologe Überexpression von *orfR* und *regA* in E. coli

Sollten die Proteine OrfR und RegA eine Rolle in der Regulation der cbb-Operone von *R. eutropha* H16 spielen, ist eine Bindung an die *cbb*-Kontrollregion wahrscheinlich. Um Bindungsstudien in vitro durchführen zu können, wurden die Gene daher in E. coli überexprimiert. Dazu wurde regA durch PCR amplifiziert, wobei direkt am Startcodon eine NdeI-Schnittstelle und am Ende des Gens eine BamHI-Schnittstelle über die Primer ExRegAfN und RegA2rB (s. Anhang I: Tab. 1.) eingefügt wurde. Anschließend wurde das 875 bp große Fragment in den mit NdeI und BamHI geschnittenen Expressionsvektor pT7-7 kloniert. Analog wurde orfR amplifiziert (ExOrfRfX und ExOrfRrP; s. Anhang I: Tab. 1.) und das 1033 bp umfassende Fragment über die stromauf- (PstI) bzw. stromabwärts (XbaI) vom Gen eingeführten Schnittstellen in den Vektor pUC18 gebracht. Die Fragmente in den resultierenden Plasmiden pT7-7::regA und pUC18::orfR wurden durch eine Sequenzierung verifiziert. Die Analyse der Rohextrakte zeigte in der SDS-PAGE für OrfR die Bande eines schwach überproduzierten Proteins von 32 kDa (Abb. 11B). Dies entspricht relativ gut der für OrfR errechneten Masse von 32.6 kDa. Die Expression von regA führte zu einem scheinbar deutlich größeren Protein (29 kDa) als die errechnete Masse von 21.5 kDa (Abb. 11A). Der relativ hohe Anteil hydrophober Valin- und Leucinreste in dem Protein könnte einen Einfluß auf das elektrophoretische Laufverhalten haben.



Abb. 11. SDS-PAGE (12 %[w/v] Acrylamid) mit heterolog überproduziertem RegA (A) und OrfR (B) aus *R. eutropha* H16.
a, Negativkontrolle *E. coli* BL21DE3 (pT7-7); b überproduziertes RegA in *E. coli* BL21DE3; c, Negativkontrolle *E. coli* JW1 (pUC18); d, überproduziertes Protein OrfR in *E. coli* JW1. Die Molekularmassen (kDa) von Referenzproteinen sind jeweils links angegeben.

## 3.2.3.2 Bindungstudien mit OrfR und RegA aus R. eutropha H16

Rohextrakte der Stämme von *E. coli* mit den überproduzierten Proteinen RegA und OrfR wurden anschließend in Gelretardationsexperimenten mit der *cbb*-Kontrollregion (243 bp) von *R. eutropha* H16 eingesetzt. Dabei zeigte sich mit RegA nach der Auftrennung in der nativen PAGE kein retardierter Komplex. Dagegen war mit OrfR in der Gelretardation ein schwach ausgeprägter Komplex zu beobachten, der im Vergleich zum CbbR-Komplex eine hohe Mobilität aufwies (Abb. 12). Die Zugabe von einigen potentiellen Signalmetaboliten des Energie und des Kohlenstoff-Metabolismus (PEP, NADH, NADPH, Fructose-6-phosphat, Ribose-5-phosphat, Ribulose-1,5-bisphosphat) zur Bindungsreaktion erbrachte weder bei OrfR noch bei RegA einen Effekt. Eine Beteiligung dieser Proteine an der *cbb*-Regulation von *R. eutropha* H16 ist daher unwahrscheinlich.



Abb. 12. Gelretardation mit CbbR und OrfR und der *cbb*-Kontrollregion aus *R. eutropha* H16. Als DNA wurde ein 243 bp langes Fragment mit der vollständigen *cbb*-Kontrollregion aus *R. eutropha* H16 eingesetzt. Native-PAGE (5 % [w/v] Acrylamid): a, Rohextrakt aus *E.coli* JW1 (pUC18) als Negativkontrolle 0.5 μg Protein; b, überproduziertes Protein OrfR (*E.coli* JW1 [pUC18::*orfR*], 0.4 μg Protein); c, überproduziertes CbbR (*E.coli* BL21DE3 [pAECR5], 0.3 μg Protein). 0, freie DNA; 1, OrfR-DNA-Komplex; 2, CbbR-DNA-Komplex.

## 3.2.4 Erzeugung und phänotypische Charakterisierung von Nullmutanten in *R. eutropha* H16

Für die Funktionsuntersuchungen der identifizierten Proteine und den Nachweis ihrer möglichen Beteiligung an der *cbb*-Regulation in *R eutropha* H16 wurden von einigen der entsprechenden Gene Deletionsmutanten hergestellt. Die Deletionen innerhalb der Leserahmen erfolgten durch ,gene replacement' Mutagenese mit Hilfe doppelter homologer Rekombinationen. Diese Methodik hat den Vorteil, dass das Leseraster nicht verändert wird und so polare Effekte auf benachbarte Gene zumeist ganz vermieden werden. Die Deletionen wurden mit Hilfe des Suizidvektors pNHG1 in das Genom eingeführt.

## 3.2.4.1 Konstruktion der Deletions-Plasmide

Für die Konstruktion der Deletion wurde zunächst ein 200-400 bp großes Fragment, das die 5'-flankierende Region sowie einen kurzen Teil der 5'-Region des jeweiligen Gens umfasste, mittels PCR amplifiziert, wobei Restriktionsschnittstellen für die nachfolgende Klonierung eingeführt wurden (Abb. 13). Analog wurde am 3'-Ende des Zielgens verfahren. Die eingeführten Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, dass die Fragmente nach einem Verdau wieder miteinander ligiert werden konnten (Abb. 13, Restriktionsschnittstelle 2). Die

damit erzeugten Deletionsfragmente enthielten das Zielgen, in dem dessen Mittelteil entfernt worden war. Alle verwendeten Primer und Restriktionsschnittstellen für die einzelnen Gene sowie die Fragmentgrößen und der Umfang der Deletionen sind im Anhang I (Tab. 1. und 2.) aufgeführt.

Die Deletionsfragmente wurden nachfolgend (Restriktionsschnittstellen 1 und 3) verdaut und in einen Vektor der pUC-Serie oder in pSK kloniert. Die Fragmente wurden durch Sequenzierung auf ihre Authentizität überprüft und zuletzt in den Suizidvektor pNHG1 umkloniert (Abb. 13, s. 2.1, Tab. 3).



# Abb. 13. Schematische Konstruktionsdarstellung der Deletionsfragmente und Klonierung in das Suizidplasmid pNHG1.

*kan*, Gen für Kanamycinresistenz; *tet*, Gen für Tetracyclinresistenz; *sacB*, Gen für Lavansucrase; *oriT*, Transferursprung; *lacZ*, Gen der  $\beta$ -Galactosidase, *bla*, Ampicillinresistenzgen.

#### 3.2.4.2 Isolierung der Homogenoten

Ein konjugativer Transfer des Suizidvektors pNHG1 nach *Ralstonia* spp. ist mit Hilfe des Donorstamms *E. coli* S17-1 möglich. Die zur Übertragung nötigen Genfunktionen sind in diesem Stamm chromosomal integriert. Das Plasmid pNHG1 kann in *Ralstonia* nicht replizieren, aber durch einfache homologe Rekombination in dessen Genom integrieren, wenn entsprechende Bereiche auf dem Plasmid vorhanden sind. Die entstehenden Rekombinanten (Trans-oder Exkonjuganten) tragen sowohl das deletierte Gen als auch das Wildtypallel und werden daher auch als Heterogenoten bezeichnet (s. 2.15).

Die selektierten Heterogenoten von *R. eutropha* H16 wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von Wildtyp- und deletiertem Gen überprüft (Abb. 14). In den Heterogenoten sollte das Amplifikat des Wildtypgens und das verkürzte Fragment des deletierten Gens nachweisbar sein. Die zum Nachweis der Deletionen verwendeten Primer und die erwarteten Fragmente sind im Anhang I (Tab. 1.) aufgeführt.

Die Erzeugung der korrespondierenden Homogenoten, die nur noch das deletierte Gen trugen, erforderte eine zweite homologe Rekombination (s. 2.1, Tab. 1. und 2.15). Verifiziert wurden die Homogenoten durch PCR mit ihrer genomischen DNA und Primern, die stromauf- und stromabwärts des jeweiligen Zielgens lagen. In den positiven Homogenoten war nur noch das Fragment des deletierten Gens nachweisbar (Abb. 14; Anhang I: Tab. 1. und 2.). Die Homogenoten von *R. eutropha* erhielten die Bezeichnungen HB71 (*orfR*), HB72 (*frcR*), HB73 (*orfV*), HB74 (*orfG*), HB75 (*aepA*), HB76 (*regA*), HB77 (*regB*) und HB78 (*orfP*).

Es gelang nicht, Deletionsmutanten von den Genen *sspA* und *cmk* zu isolieren. In diesen Fällen wurden immer wieder nur Homogenoten mit dem Wildtypallel erhalten. Eine Deletion dieser Gene ist vermutlich letal für den Organismus.

Die hergestellten Mutanten wurden anschließend in Wachstums- und Enzymtests charakterisiert.



Legende (s. folgende Seite)

Abb. 14. Agarose-Gelelektrophorese (1 % [w/v] Agarose) mit PCR-Fragmenten zur Verifikation der Heterogenoten und Deletionsmutanten von *R. eutropha* H16.

Die PCR-Fragmente wurden mit Gesamt-DNA aus den jeweiligen Stämmen amplifiziert. Fragmentgrößen der Größenstandards sind in bp angegeben.

A: M, Größenstandard 100 bp Ladder-Plus; a, 1550 bp-Fragment des Wildtypgens *frcR* und 341 bp-Fragment des deletierten *frcR* der Heterogenote; b und c, 1550 bp-Fragment des Wildtypgens *frcR*; d und e , 341 bp-Fragment des deletierten *frcR* zweier Homogenoten (Primer TestfrcR\_f und TestfrcR\_r); f, 1647 bp-Fragment des Wildtypgens *orfV*; g, 1647 bp-Fragment des Wildtypgens und 558 bp-Fragment des deletierten *orfV* der Heterogenote; h, 558 bp-Fragment des deletierten *orfV* der Homogenote (Primer TestorfV\_f und TestorfV\_r); i, 1104 bp-Fragment des Wildtypgens *orfG*; j, 1104 bp-Fragment des Wildtypgens und 306 bp-Fragment des deletierten *orfG* der Heterogenote; k, 306 bp-Fragment des deletierten *orfG* der Homogenote (Primer TestorfG\_f und TestorfG\_r); l, 1049 bp-Fragment des Wildtypgens *orfR*; m, 1049 bp-Fragment des Wildtypgens und 269 bp-Fragment des deletierten *orfR* der Heterogenote; n, 269 bp-Fragment des deletierten *orfR* der Homogenote (Primer TestorfR\_r).

**B**: M, Größenstandard  $\lambda$ -DNA mit *Pst*I verdaut; a, 1849 bp-Fragment des Wildtypgens *aepA*; b, 1849 bp-Fragment des Wildtypgens und 259 bp-Fragment des deletierten *aepA* der Heterogenote; c, 259 bp-Fragment des deletierten *aepA* der Homogenote (Primer TestaepA\_f und TestaepA\_r); d, 939 bp-Fragment des Wildtypgens *regA*; e, 939 bp-Fragment des Wildtypgens und 384 bp-Fragment des deletierten *regA* der Heterogenote (Primer TestregA\_f und TestregA\_r); f, 1142 bp-Fragment des Wildtypgens *regA*; g, 587 bp-Fragment des deletierten *regA* in der Homogenote (Primer RegA1fX und RegA2rB).

C: M, Größenstandard  $\lambda$ -DNA mit *Pst*I verdaut; a. 1739 bp-Fragment des Wildtypgens *regB*; b, 428 bp-Fragment des deletierten *regB* der Homogenoten (Primer RegB1fX und RegA1rE); c, d und e, 1965 bp-Fragment des Wildtypgens und 654 bp-Fragment des deletierten *regB* in der Heterogenote (Primer TestregBf und RegB2rB).

**D:** M, Größenstandard 100 bp Ladder-Plus; a, 1598 bp-Fragment des Wildtypgens und 611 bp-Fragment des deletierten *orfP* der Heterogenote; b und c, 1598 bp-Fragment des Wildtypgens von *orfP*, d, 611 bp-Fragment des deletierten *orfP* der Homogenoten (Primer OrfP1fX und OrfP2rS).

## 3.2.4.3 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

## 3.2.4.3.1 Charakterisierung des Wachstums

Bakterien sind mit ständig wechselnden Umweltbedingungen konfrontiert. Ein regulatorisches Netzwerk, das die schnelle Anpassung des Organismus gewährleistet, ist daher lebensnotwendig. Eine gewisse Redundanz der beteiligten Mechanismen ist dabei von Vorteil. So führt die Defektmutation eines Regulators keineswegs zwangsläufig zur Letalität. Dies bedeutet auch, dass eine Deletion nicht unbedingt einen völligen Funktionsverlust verursachen muss, sondern nur zu einer reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit führen kann.

Eine Veränderung des Phänotyps war vor allem unter den Bedingungen der  $CO_2$ -Assimilation von Interesse. Daher wurde das Wachstum unter lithoautotrophen Bedingungen verfolgt. Die Wachstumsraten wurden in Flüssigkulturen bestimmt. Als Referenz diente der Wildtyp *R. eutropha* H16. Generell zeigten die Verdopplungszeiten (t<sub>d</sub>) von Wildtyp H16 und Mutanten -außer der *frcR*-Deletionsmutante HB72- keine signifikanten Unterschiede (Tab. 7).

Verdopplungszeit t <sub>d</sub> [h]
3.7
3.8
4.3
3.7
3.7
3.8
3.9
3.8
3.7

Tab. 7.VerdopplungszeitenderDeletionsmutantenunterlithoautotrophenWachstumsbedingungen im Vergleich zum Wildtyp R. eutropha H16

Die *frcR*-Mutante HB72 wies ein deutlich verlangsamtes Wachstum unter lithoautotrophen Bedingungen auf (Tab. 7). Noch deutlicher war das Wachstum von HB72 gegenüber H16 mit Fructose als Kohlenstoff- und Energiequelle verlangsamt (Tab. 8). Keine Veränderung der Verdopplungszeit zeigte die Mutante HB72 mit Pyruvat. Dagegen wuchs sie mit Gluconat geringfügig, mit dem Aminozucker N-Acetylglucosamin aber erheblich schneller als der Wildtyp H16. Die Verlangsamung mit Fructose könnte die Folge einer fehlenden Induktion des postulierten Fructose-Transportsystems wegen des deletierten Transkriptionsregulators FrcR sein. Da die Mutante aber noch in der Lage ist, auf Fructose zu wachsen, müsste in dem Fall noch mindestens ein weiteres Transportsystem für Fructose in *R. eutropha* H16 existieren. Die Produkte der anderen deletierten Gene scheinen jedenfalls keine Rolle in der *cbb*-Regulation von *R. eutropha* H16 zu spielen.

Substrat	Verdopplungszeit t <sub>d</sub> [h]		
	H16	HB72	
Pyruvat	1.4	1.4	
Gluconat	2.3	2.0	
N-Acetylglucosamin	5.9	3.4	
Fructose	2.2	4.2	

Tab. 8.Verdopplungszeiten von R. eutropha H16 und der Mutante HB72 beim<br/>Wachstum mit verschiedenen Substraten

Zusätzlich wurden alle Mutanten auf Agarose-Platten mit einer Reihe von Substraten (Succinat, Gluconat, Malat, Citrat, Glyoxylat, Pyruvat, Acetat, Formiat, Fructose und N-Acetylglucosamin) auf Veränderungen des Wachstums und der Morphologie im Vergleich zum Wildtyp getestet. Bis auf die oben erwähnten Ausnahmen war unter allen untersuchten Bedingungen das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp nahezu identisch (Tab. 9). Eine Veränderung der Koloniemorphologie wurde ebenfalls nicht beobachtet.

Substrat	H16	HB71 $(\Delta orf R)$	НВ72 ( <i>\frcR</i> )	HB73 (ΔorfV)	HB74 (ΔorfG)	HB75 (ΔaepA)	HB76 (ΔregA)	HB77 (Δ <i>regB</i> )	HB78 (ΔorfP)
Succinat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Malat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pyruvat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Glyoxylat	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Acetat	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Gluconat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Formiat	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Fructose	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N-Acetyl- glucosamin	+	+	++	+	+	+	+	+	+

 Tab. 9.
 Wachstum von R. eutropha H16 und der Deletionsmutanten von H16 auf verschiedenen Substraten

+++, sehr gutes Wachstum; ++, gutes Wachstum; +, Wachstum vorhanden

Keines der inaktivierten Genprodukte scheint beim heterotrophen Wachstum in *R. eutropha* H16 unter Laborbedingungen unentbehrlich zu sein. Dagegen deutet das veränderte Wachstumsverhalten der Mutante HB72 auf eine wichtige regulative Funktion von FrcR auf einige Gene des Kohlenstoffmetabolismus hin.

# 3.2.4.3.2 Aktivität von Enzymen des Fructoseabbaus und des *cbb*-Operonpromotors in der Mutante HB72

Es wurde vermutet, das FrcR als Transkriptionsregulator des potentiellen *frc*-Operons fungiert, dem es direkt vorangestellt ist. Das Operon enthält neben den Genen eines vermutlichen Fructosetransporters auch die Gene einer Phosphoglucose-Isomerase (PGI) und einer Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD). Zwei Enzyme, die für den Abbau von Fructose über den ED-Weg essentiell sind. Daher erlaubt die Struktur des *frc*-Operons, über

die Bestimmung der Enzymaktivität von PGI und G6PD eine schnelle tendenzielle Aussage über die Expression des Operons.

Die Mutante HB72 wuchs mit Fructose als Substrat deutlich langsamer als der Wildtyp H16 (s. 3.2.4.3.1). Dies ließ vermuten, dass FrcR auch einen regulativen Einfluß auf die Gene des ED-Weges haben und das Fehlen des Regulators eine verringerte Expression von Schlüsselenzymen des ED-Weges verursachen könnte. Daher wurde zusätzlich die kombinierte Aktivität der Enzyme des ED-Weges, Gluconat-6-phosphat-Dehydratase und 2-Keto-3-desoxygluconat-6-phosphat-Aldolase, nach Wachstum der Mutante auf verschiedenen Substraten bestimmt. Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden der Wildtyp H16 und die Mutante HB72 heterotroph in NB-Komplexmedium und in Mineralmedium mit Fructose, N-Acetylglucosamin, Gluconat, Pyruvat oder Succinat als Substrat angezogen sowie zusätzlich unter lithoautotrophen Bedingungen.

Die Enzyme des ED-Weges zeigten weitgehend gleiche Aktivitäten im Wildtyp H16 und der Mutante HB72 nach Anzucht auf Fructose (Tab. 10). Relativ niedrig waren die Aktivitäten nach Wachstum auf N-Acetylglucosamin. Sie erreichten im Wildtyp nur etwa ein Drittel der in Fructose-Zellen bestimmten Werte. Die Aktivitäten der Enzyme in der Mutante waren in den Zellen, die auf Gluconat oder N-Acetylglucosamin gewachsen waren, im Vergleich zum Wildtyp etwa verdoppelt.

Substrat	Enzymaktivität in mU/mg Protein		
	H16	HB72	
$CO_2 + H_2$	5	7	
Fructose	112	112	
N-Acetylglucosamin	36	65	
Gluconat	126	218	
Succinat	17	12	
Pyruvat	12	8	
NB	5	5	

Tab. 10. Kombinierte Aktivität der Enzyme des ED-Weges, Gluconat-6-phosphat-<br/>Dehydratase und 2-Keto-3-desoxygluconat-6-phosphat-Aldolase, in R. eutropha<br/>H16 und HB72 ( $\Delta frcR$ )

Die niedrige Aktivität in N-Acetylglucosamin-Zellen überraschte, da dieser Zucker ebenso wie Fructose und Gluconat in *R. eutropha* H16 über den ED-Weg abgebaut wird. Dagegen ist dieser Stoffwechselweg beim Wachstum auf Pyruvat, Succinat, NB oder unter lithoautotrophen Bedingungen nicht aktiv. Die gemessenen Enzymaktivitäten bestätigten dies und wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp auf. Die gesteigerte Aktivität der Enzyme nach Wachstum auf Gluconat und N-Acetylglucosamin könnte zu dem beschleunigten Wachstum der Mutante HB72 auf diesen Substraten beitragen.

Für das Wachstum auf Gluconat, Pyruvat, Succinat oder NB sowie unter lithoautotrophen Bedingungen wird die Aktivität der G6PD nicht benötigt. Tatsächlich wurden in entsprechend kultivierten Zellen des Wildtyps auch nur niedrige Aktivitäten beobachtet (Tab. 11). Die Mutante HB72 zeigte jedoch bei heterotropher Anzucht eine vier- (Pyruvat) bis sechsfach (NB) erhöhte G6PD-Aktivität. Erstaunlicherweise wurde in der lithoautotroph angezogenen Mutante eine sehr hohe G6PD-Aktivität gefunden, die selbst die Aktivität in Fructose-Zellen deutlich übertraf und fast das Zehnfache der Aktivität des Wildtyps unter diesen Bedingungen betrug.

Die G6PD steht in *R. eutropha* H16 in engem Zusammenhang mit dem Abbau von Fructose und N-Acetylglucosamin, daher wurde nach Anzucht auf diesen Substraten eine hohe Aktivität dieses Enzyms erwartet. Tatsächlich enthielten mit Fructose angezogene Zellen von H16 und HB72 etwa das Zwanzigfache bzw. Fünffache der G6PD-Aktivität in den Pyruvat-Zellen (Tab.11). Dies entspricht der erwarteten Induktion durch Fructose.

Substrat	Enzymaktivität in mU/mg Protein			
	H16	HB72		
$CO_2 + H_2$	39	341		
Fructose	242	222		
N-Acetylglucosamin	83	199		
Gluconat	15	78		
Succinat	14	53		
Pyruvat	13	47		
NB	27	118		

Tab. 11. Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in R. eutropha H16 und HB72 ( $\Delta frcR$ )

Nach Wachstum von H16 auf N-Acetylglucosamin zeigte die G6PD aber nur ca. ein Drittel der Aktivität von Fructose-Zellen. Die Aktivität in der Mutante HB72 entsprach dagegen fast dem in Fructose-Zellen gemessenen Wert. Diese Befunde weisen auf eine starke Derepression des *frc*-Operons in der Mutante HB72 unter lithoautotrophen Bedingungen hin, die auf

N-Acetylglucosamin etwas, aber auf Gluconat, Succinat, Pyruvat oder NB deutlich schwächer ausgeprägt sind.

Die PGI-Aktivitäten in *R. eutropha* H16 und der Mutante HB72 zeigten prinzipiell ein ähnliches Muster wie die G6PD-Aktivitäten, allerdings war die Steigerung unter heterotrophen Wachstumsbedingungen nicht so stark. Diese Unterschiede beruhten wahrscheinlich auf der Aktivität zusätzlicher im Genom codierter G6PD.

Die PGI wird zum Abbau von Gluconat, Succinat, Pyruvat oder NB sowie während des Wachstums des Organismus unter lithoautotrophen Bedingungen nicht in hoher Aktivität benötigt. Dementsprechend wurden relativ geringe PGI-Aktivitäten unter diesen Bedingungen erwartet und im Wildtyp H16 auch gefunden (Tab. 12). In der Mutante war die Aktivität nach Wachstum auf Pyruvat oder Succinat nur leicht erhöht und auf NB oder Gluconat etwas mehr als doppelt so hoch wie im Wildtyp. Nach lithoautotropher Anzucht wurde aber in HB72, ähnlich wie für die G6PD eine Steigerung der PGI-Aktivität um das ca. Zehnfache gegenüber dem Wildtyp beobachtet.

Substrat	Enzymaktivität in mU/mg Protein		
	H16	HB72	
$CO_2 + H_2$	19	182	
Fructose	209	148	
N-Acetylglucosamin	31	112	
Gluconat	29	72	
Succinat	46	60	
Pyruvat	44	53	
NB	34	77	

Tab. 12. Aktivitäten der Phosphoglucose-Isomerase in R. *eutropha* H16 und HB72 ( $\Delta frcR$ )

Die PGI ist wie die G6PD für das Wachstum von *R. eutropha* H16 auf Fructose oder N-Acetylglucosamin erforderlich. Sowohl im Wildtyp H16 als auch in der Mutante HB72 wurde nach Anzucht auf Fructose eine gegenüber dem Grundniveau (Pyruvat, Succinat, NB) stark gesteigerte PGI-Aktivität gemessen. Dagegen blieb die PGI-Aktivität im Wildtyp nach Anzucht auf N-Acetylglucosamin auf dem gleichem Niveau wie nach Wachstum auf Gluconat, während sie in der Mutante HB72 gegenüber Gluconat-Zellen annähernd verdoppelt war (Tab. 12).

Die durchweg höheren Enzymaktivitäten in der Mutante weisen auf eine vom Substrat abhängige Derepression des *frc*-Operons hin. Demnach scheint FrcR ein Repressor des *frc*-Operons zu sein. Da das *frc*-Operon beim Wachstum auf Fructose in der Mutante anscheinend im gleichen Maße wie im Wildtyp induziert wurde, muss die verringerte Wachstumsrate der Mutante auf Fructose eine andere Ursache haben.

Bei der *frcR*-Mutante HB72 wurde ein gegenüber dem Wildtyp leicht verlangsamtes Wachstum unter lithoautotrophen Bedingungen beobachtet. Dies könnte die Folge einer verminderten Expression des *cbb*-Operons sein, oder durch eine andere Veränderung des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus hervorgerufen werden. Um mögliche Veränderungen in der Aktivität des  $p_{cbbL}$ -Promotors zu untersuchen, wurde das Reporterplasmid pBK2241, das eine Fusion aus dem *cbb*-Operonpromotor und dem *lacZ* Gen trägt, per Konjugation in HB72 transferiert. Zur Kontrolle wurde auch der Operonfusionsvektor pBK3 als Basisreplikon von pBK2241 übertragen. Die Promotoraktivitäten wurden nach Anzucht der Transkonjuganten auf Fructose, N-Acetylglucosamin, Gluconat oder Pyruvat sowie unter lithoautotrophen Bedingungen über die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase bestimmt. Dabei zeigte die Mutante – außer in den Pyruvat-Zellen- sehr viel geringere Aktivitäten als der Wildtyp H16 (Tab. 13).

Substrat		Transkon	juganten	ganten			
	ŀ	I16	HB72				
	pBK3 <sup>a</sup>	pBK2241 <sup>b</sup>	pBK3 <sup>a</sup>	pBK2241			
$CO_2 + H_2$	8	756	7	572			
N-Acetylglucosamin	2	662	8	22			
Gluconat	7	235	8	38			
Fructose	7	106	5	49			
Pyruvat	5	7	8	9			

Tab. 13.  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten der  $p_{cbbL}$ -Operonfusion in Transkonjuganten der Mutante *R. eutropha* HB72 ( $\Delta frcR$ ) und des Wildtyps H16 nach Wachstum auf verschiedenen Substraten [mU/mg Protein]

<sup>a</sup> Negativkontrolle mit Operonfusionsvektor pBK3

<sup>b</sup>*cbb*-Operonfusionsvektor

Erreichte die Mutante nach lithoautotrophem Wachstum noch 75 % der Aktivität des Wildtyps, waren es nach Anzucht auf Fructose nur noch 46 % und auf Gluconat lediglich 16 %. Besonders niedrig war die Promotoraktivität in N-Acetylglucosamin-Zellen von HB72 (3 % des Wildtyps). Nach Wachstum auf Pyruvat konnte kein Unterschied zwischen den

*cbb*-Promotoraktivitäten im Wildtyp und Mutante festgestellt werden. In *R. eutropha* H16 ist der Promotor  $p_{cbbL}$  beim Wachstum mit Pyruvat als C-Quelle bekanntermaßen praktisch voll reprimiert. Es war daher keine über die Hintergrundaktivität hinausgehende Aktivität messbar.

Diese reduzierten Aktivitäten in der Mutante HB72 lassen auf eine gestörte heterotrophe Derepression des *cbb*-Operonpromotors schließen, dabei könnte dies eine Folge einer fehlenden direkten Interaktion mit FrcR oder indirekt einer Veränderung im Kohlenstoffwechsel auf Grund des Defekts des Transkriptionsregulators sein.

## 3.3 Mutationsanalyse des Transkriptionsregulators CbbR von *R. eutropha* H16

Die CbbR-Transkriptionsregulatoren sind in autotrophen Bakterien weit verbreitet und in die Familie der LTTR einzuordnen. In dieser bilden sie auf Grund ihrer hohen Homologie eine eigene Untergruppe (Bowien und Kusian, 2002). Die LTTR bestehen aus zwei funktionellen Domänen (Muraoka et al., 2003). Besonders auffällig bei CbbR ist die Homologie innerhalb der N-terminalen DNA-Bindedomäne mit ihrem Helix-Turn-Helix-Motiv, das für alle LTTR charakteristisch ist. Die den mittleren und C-terminalen Bereich umfassende Domäne dient der Effektorbindung und Oligomerisierung und kann in zwei Subdomänen (RDI und RDII) unterteilt werden. Dieser Teil der LTTR und auch von CbbR weist insgesamt eine höhere Diversität auf. Einzelne Bereiche darin sind dagegen hochkonserviert (Abb. 15). Die DNAund die Effektorbinde-Domäne sind über eine ,Linker-Helix' miteinander verbunden.

Um genauere Kenntnisse über die Funktion einzelner Bereiche der C-terminalen Domäne zu erhalten, wurden in den auffällig konservierten Regionen von CbbR aus *R. eutropha* H16 Punktmutationen gesetzt. Ein besonders konserviertes Motiv (-REXGSGTR-) ist um die Aminosäureposition 200 herum lokalisiert. Daher wurden in diesem die beiden Glycinreste ausgetauscht. Glycin 203 wurde durch Leucin (G203L), Glycin 205 durch Glutamat (G205E) substituiert. Das in CbbR H16 an Position 274 liegende Tryptophan ist in allen verglichenen CbbR-Proteinen an ähnlicher Position vorhanden (Abb. 15) und wurde durch Arginin ersetzt (W274R). Zwei weitere Reste im mittleren Bereich des Proteins, Arginin an Position 135 und Alanin an Position 175, wurden gegen Cystein (R135C) bzw. Glutamat (A175E) ausgetauscht. Das mutierte *cbbR* sollte unter anderem in Komplementationsanalysen mit der *cbbR*-Deletionsmutanten HB17 eingesetzt werden.

	DNA-bindende Domäne	
Thd	MNVTFROIRILEDVARHSSFTRASFELHLTODAVSTOTKOLEFETCMDLTF	51
Nie		52
Pat		51
RCI BmT		51
Rill		DT DT
	MIRHAPRHLRQMQIFDAVARHLSFSNAARELGLIQPAVSLQIKQIEALAGLPLFE	55
Rai	MSSFLRALTLRQLQIFVTVARHASFVRAAEELHLTQPAVSMQVKQLESVVGMALFE	50
Rhp	MSRQFKTVSI <mark>RQLR</mark> ALA <mark>A</mark> LAETG <mark>SITAAA</mark> GKLNLTQPAVTLQLRNLQALADLPLIQ	56
Oli	MAATG <mark>SVTGAA</mark> NR <mark>L</mark> HLTQPAVTLQLRSLQNLA <mark>G</mark> LPLLQ	38
Xan	MAPHW <mark>TLRQLR</mark> LVALAAASG <mark>S</mark> YAK <mark>AA</mark> QDMGLSPPAVTAQMKALEEDIGVPMFE	53
Rhs	MVRLDAI <mark>TL</mark> KQLRALVAVAGSA <mark>S</mark> LTGGATRLGLTPPAIHSQIRNLEEAFGVPLLH	55
RcII	MVRLDGI <mark>T</mark> MK <mark>QLR</mark> ALR <mark>AVA</mark> KWG <mark>SLTAA</mark> GQALGLTTPAIHTQIKGLEDAVQVRLLQ	55
Hyt	MKHV <mark>TMRQLRIFVTVA</mark> KEG <mark>SITKAA</mark> ER <mark>LFLTPPAV</mark> SMQIKE <mark>LE</mark> TQLGMVLFE	52
RmII	MQI <mark>TFRQLR</mark> VVSE <mark>VA</mark> RYS <mark>S</mark> VIR <mark>AA</mark> EA <mark>LHLTAPAV</mark> SLQI <mark>K</mark> EA <mark>E</mark> RQV <mark>G</mark> LT <mark>LF</mark> D	51
Нуv	MPEKIAQLARNA <mark>TLRQL</mark> QV <mark>F</mark> ECIANNQ <mark>S</mark> FSK <mark>AA</mark> EQ <mark>LHLT</mark> QPT <mark>V</mark> SMQV <mark>K</mark> KLSDILEV <mark>PLFE</mark>	60
	RDIRDI	
Thd	QMGKKIF <mark>LTE</mark> AGKEVYAFS <mark>R</mark> NLAQQFRDIESVLDDMK <mark>G</mark> VKRGTLSLT <mark>VTST</mark> GKYFAPY	114
Nie	QIGKRVH <mark>LTEA</mark> GKELFHYS <mark>R</mark> GITRQLADM <mark>E</mark> LA <mark>L</mark> DELK <mark>G</mark> LERGK <mark>L</mark> SISVVSTANYFVPN	114
RcI	RIGKRLF <mark>LTEA</mark> GQAV <mark>L</mark> ATA <mark>R</mark> ETLEGIERL <mark>E</mark> MQ <mark>L</mark> ADLQ <mark>G</mark> LRRGR <mark>L</mark> RLAI <mark>VSTA</mark> QYFLPR	114
RmI	RIGKOIYLTDAGREVLATCRETIKGLDCLEMRLADMOGLKRGRLRLAMVTTAEYLLPR	114
Rhr	OMGRVLLLTOAGTILLGHVRTILAAVTDADKAMDALKGKRAGALRIGVVSTAKYFAPR	114
Ral	<b>R</b> VKGOLTLTEPGDRLLHHASRILGEVKDAEEGLOAVKDVEOGSITIGLISTSKYFAPK	114
Rhp	RSNDGMRLTDAGREVIALSERTEAATAACETSLEMTAGKTAGRISTGAVSTAKVEVPE	114
oli	$\mathbf{R}$ T SDGMT TTGAGOEVIGUUER TFAAVANOTTSLOMTAGHTGGEVATGAVSTAKVEVDE	114
Van		111
Dha	RVDGRURPTARGQEDDSAQERTARALSEAERATAALKSPERGSVVVGVVSTARTFAPM	116
RIIS		110
RCII	RAADGAGSDLIDAGHAMLAAAKRIEDALSQAGADLAALSRGKIGRVILGVVSIAKIFAPR	110
Hyt	RNARRFELTTVGEYFLLYAKKILDLVTEAEELAKRLQEGAVGELKIGMVSTAQYFVPQ	114
Rmll	RAGRRMTLTTTGEYFLVYARRLLATLKDAEDMMARFKRLESGRLTTGMVGAASYFLPQ	114
Hyv	QIGRKVY <mark>LTEAG</mark> KILYDAC <mark>R</mark> V <mark>I</mark> LSQLSTV <mark>E</mark> QKINHLK <mark>G</mark> FSGGSVKMS <mark>V</mark> I <mark>STA</mark> QYFVPE	114
Thd Nie	LLAAFLKRYPGTQVHLE <mark>VTNRE</mark> EVVQQLHD <mark>NTPDMAIMGTPPEHIELHSQAFMQNPLV</mark> II LLAAFCQRYPGITISLHVSNRENVLKQLSDNIMDLAIMGQPPEGLDITSESFMENPLVII	174 174
RCI	LLGAFCTENPGIEVALTVTNRQTVIARLAANEDDLCILGQPPEGLDVVARPIARNAILVL	174
RmI	LLGEFCAHYPGIEAKLIVSNREQLLARIANNEDDLTILGAPPEGMDVAAIPIADNPLVVI	174
Rhr	LLSVFTAGYPGVELGLTVANREQILGMIQENALDLFIMGRPP-TEPAVRAELAPNPMVMV	174
Ral	LLAGFTALHPGVDLRIAEGNRETLLRLLQDNAIDLALMGRPPRELDAVSEPIAAHPHVLV	174
Rhp	AISG <mark>F</mark> LKRHPKIDVH <mark>L</mark> SI <mark>GNR</mark> QEIGAE <mark>L</mark> RNYEL <mark>DIAIMGRPP</mark> VDLE <mark>V</mark> DVHLIGDH <mark>PHV</mark> II	174
Oli	VIAG <mark>F</mark> SKLYPQVEIT <mark>L</mark> KI <mark>GNR</mark> QELREA <mark>L</mark> RGYEL <mark>DIAIMGR</mark> TPAEIQ <mark>V</mark> ETHLIGD <mark>NP</mark> HIII	174
Xan	ALAAFRRRRPEIELRLIIGNREDIIRGIVSLDFDVAIMGRPPPALEAETRLIGDHPHIVV	174
Rhs	LVKMLSLACPEIRIALRVGNREQLIDDLARHMVDLAVMGRPPRQPEVASVALGPHPHGIV	176
RcII	LVKALSLSHPDIEVALRVGNRETTIEGLERGAFEIAIMGRPPRRPPVLAEPLGPHPHTLL	176
Hvt	MLGDFRREHPGISLSLRVGNRAOVVAMLESREIDIAVMGRPPEGFAVRAEAFAGHPSGFV	174
RmTT	LLAK FHAEHPAVDVRLRLASREKLGVMMOGNDVDLCTMGRPPODPPTRAEPFASHPHVLV	174
Hvv	VIHKESOAYPDVTVI.MRVCNKENIJERI.NENKDDFYLLCOPPEDI.NVNSSRIAI.NPLAFV	174
	RDII	1,1
Thd	APPDHPLVGVSR-VPLSRLVEENFILRERGSGTRNAVERFFEQR-GIKLNTSMEMSRNEA	232
Nie	APPEHPLCGQKQ-IPVKRLEQEIFLVREPGSGTRNAMERFFAHE-KISIQKGMEADTAEA	232
RcI	APPGHPLAGVTA-VPFAALAEAPFILREPGSGTRAAAEKFEAEN-GIRPOVRMELGSNEA	232
RmI	ARNDHPLAGEKA-IPMARIAEEPFVFREPGSGTRLATERHEAEH-GHKLKVRLELGSNEA	232
Rhr	AASDH-LVRRKI, TFHDLSGETFI, MREPOSGTRII, MEKI, MTDH-GVI, PHRMIEMSSNET	230
Ral	SPRH-DI.HDAKGEDI.OFT.RHETELI.DEDCCTTTLINELDITUM GVERINUTIT	220
Php		202 222
	AFIAHINDARADIN-TAFAEDANEIPVIREPOOGIRSDINEQFFGGA-GISPFIGMEMSSNET	434 222
VII	APROMULEQUE G-LAIADLSHEITELIKEQGSGTKLLMEQLEEAN-KEQPIIGMEMSSNET	232
xan D	APVDHPLFKRKKTTPADLTRESLLVREPGSGTRILMERVFEEAGAPNPPIAMEIGSNET	∠34 005
KUS	APPDHPLAGLAEVPVPDLLS-QTFLARAEGSGTRVLMSRYLDRLGEGQVVDLIEMDSNET	235
RCII	VPPGHRLLGQGVS-ADALLD-EVFLTREPGSGTRILMERWLDRVADGRAFETMEMESNET	234
Hyt	APPDHPLADETRSIDPKVIRREPLIVREAGSGTRAAMDLFFAER-RVTPTVAMQMESNEA	233
RmII	VS <mark>P</mark> QHRFARAEAVPAVALAN- <mark>E</mark> P <mark>F</mark> IV <mark>REP</mark> DSGTREALQKYLDAH-RIQPTFV <mark>MEM</mark> PSNEA	232
Hyv	ANSSH <mark>PL</mark> VGKKLRIQDLTD <mark>E</mark> ALLMR <mark>E</mark> TGSGIRAQIDNVFKQF-DFQPKVK <mark>M</mark> VLGG <mark>NEA</mark>	231

	/ <b>KDI</b>
Thd	IKH <mark>AV</mark> MAGLGLGIVSLHTLEFELALS <mark>RI</mark> ALLS <mark>V</mark> ESFPIMKEWYL <mark>V</mark> HRNG <mark>K</mark> RM <mark>SP</mark> IAQAFH 292
Nie	IKQAIQAGMGLGIMSLHTIRLELEAGRLKILDIQGLPIMRYWNVVHQKNKRLSNISSVFK 292
RCI	IKAAVAAGLGLAILSQDTITLEAETGRLAVLDVQGFPLLRVWNVAYPRGKHLSVAARAFL 292
RmI	IKQAIAG <mark>GLG</mark> VSV <mark>LS</mark> GY <mark>T</mark> LALEGLS <mark>G</mark> LVQP <mark>LDVQG</mark> FPLM <mark>R</mark> KWY <mark>V</mark> AYPKG <mark>KHLS</mark> AV <mark>A</mark> EAFL 292
Rhr	IKQAVMAGMGISLLSRNTMSLELSVGRLVILDVEGLPIQRDWYVVIREGKHLAPVAEAMV 290
Ral	IKQAVMAGMGISLLSLHTLGLELRTGEIGLLDVAGTPIERIMHVAHMSSKRLSPASESCR 292
Rhp	IKQAVIAGLGVAFISAHTVATELDER <mark>RL</mark> VILDVEGLPVVRQWFVVSRRDKVLLPPARAML 292
Oli	IKQAVTAGLGIAFISAHTVATEIEDGRLVMLDIAGLPVIRQWFVVRRYDKTLLPPAQAML 292
Xan	IKQSVMAGLGLAFISAHTVAAEVADGRLRVLEVEGLPVVRQWLAVRARDKRLLPAGQALM 294
Rhs	I <mark>KQ</mark> S <mark>VIAGLGLAFLSLH</mark> VVMDELRF <mark>G</mark> QLVQLAAPGLPIE <mark>R</mark> HWFL <mark>V</mark> HPVDRPLN <mark>PAA</mark> LRVQ 295
RcII	I <mark>KQAVMAGL</mark> GIAF <mark>LSLHT</mark> VTEELGS <mark>GRL</mark> VE <mark>L</mark> SAP <mark>GL</mark> PIV <mark>R</mark> NWFM <mark>V</mark> RREDEVPR <mark>PVA</mark> ERLW 294
Hyt	I <mark>KQAVIAGL</mark> GVAF <mark>LSLHT</mark> VGGELAR <mark>GEL</mark> KVIP <mark>V</mark> RGTPVV <mark>R</mark> SWY <mark>VV</mark> HRTSQFVA <mark>P</mark> TVE <mark>A</mark> FR 293
RmII	IKQAVMAGMGVSLLSLHTIALEWSNGLIAVPH <mark>VEGL</mark> PLERRWNVVNIAAKQLSPAAEAFR 292
Hyv	IRLGLLQN <mark>L</mark> GITVASIPTLMKEIET <mark>G</mark> EISI <mark>LNV</mark> KGFPIN <mark>R</mark> HWYLTYPKGKD <mark>LS</mark> IA <mark>A</mark> EKMI 291

Thd	Q <mark>F</mark> VLNEADRIMKLPQPKPVTRSRRRVTRS	321
Nie	Q <mark>F</mark> L <mark>L</mark> NEAADLVALEYPHRNTT	313
RcI	AHLAAGSAGPS	303
RmI	GHL <mark>L</mark> GK	298
Rhr	A <mark>F</mark> LKAAARTC	302
Ral	AYL <mark>L</mark> EHTAEFLGREYGGLMPGRRVA	317
Rhp	E <mark>F</mark> IKAEGSHFLPRTHGRMRLTRPSPRGKRG	322
Oli	D <mark>F</mark> FAAEGAKYLPKAPQKRL	311
Xan	D <mark>F</mark> LEREGASFLPQMPGGEGGRCYLPDHVSGSTPAKAVARDPV	436
Rhs	GEIVKLKGAYLPGAPA	311
RcII	EAI <mark>L</mark> ALRGSYFPTIPMIDAS	314
Hyt	Y <mark>F</mark> L <mark>L</mark> ERGQSFLQQHFPHVAAICERLGAA	321
RmII	Y <mark>F</mark> V <mark>L</mark> EHGESHLAAMMSHDAS	312
Hyv	ELLKVEGQKMSDKAFGLFS	310

## Abb. 15. Vergleich der Aminosäuresequenzen von CbbR-Transkriptionsregulatoren aus verschiedenen Organismen.

Oberhalb der Sequenz sind die Bereiche der funktionellen Domänen markiert. In allen Proteinen konservierte Aminosäuren sind dunkelgrau, in mindestens 8 der Proteine identische Aminosäuren sind gelb unterlegt. Die Aminosäuresequenz des CbbR von *R. eutropha* H16 ist fett gedruckt. Die Aminosäuren, die experimentell ausgetauscht wurden, sind rot markiert. Hyv: *Hydrogenovibrio marinus* CbbR (BAD15325); Hyt: *Hydrogenophilus thermoluteolus* CbbR (BAA95688); Nie: *Nitrosomonas europaea* CbbR (NP841944); Oli: *Oligotropha carboxydovorans* CbbR (Y015613); Ral: *Ralstonia eutropha* H16 CbbR (S18583); RCI: *Rhodobacter capsulatus* CbbR<sub>I</sub> (AAC32308); RCII: *Rhodobacter capsulatus* CbbR<sub>I</sub> (AAC32304); Rhp *Rhodopseudomonas palustris* CbbR (NP946901); Rhr: *Rhodospirillum rubrum* CbbR (B53305); Rhs: *Rhodobacter sphaeroides* CbbR (A48485); RmI: *Ralstonia metallidurans* CH34 CbbR<sub>I</sub> (ZP\_00271303); RmII: *Ralstonia metallidurans* CH34 CbbR<sub>I</sub> (AAG925).

## 3.3.1 Ortspezifische Mutagenese von *cbbR*

Für die gezielte Einführung von Mutationen in das Gen des Trankriptionsregulators CbbR wurde die Sequenz durch PCR verändert. Zunächst wurden der 5'-seitige und der 3'-seitige Teil des Gens in zwei PCR-Reaktionen getrennt amplifiziert. Als Matrize diente das vollständige, in pUC18 klonierte *cbbR* (Plasmid pAECR7). Dieses hatte den Vorteil einer bereits vorhandenen multiplen Klonierungsstelle und einer vor dem Gen eingefügten optimierten Ribosomenbindestelle. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass jeweils einer

innerhalb des Vektors (Abi\_for und Abi\_rev) und der zweite an der Position der gewünschten Mutation in *cbbR* anlagerte (Tab. 14).

Primer	Mutation	Sequenz <sup>a</sup>
Abi_for	-	5'-ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG-3'
Abi_rev	-	5'-TTCACACAGGAAACAGCTATGACC-3'
CbbRmutR135C_for	R135C	5'-CGAAGGCAAC <u>TGC</u> GAAACGCTGC-3'
CbbRmutR135C_rev	R135C	5'-GCAGCGTTTC <u>GCA</u> GTTGCCTTCG-3'
CbbRmutA175E_for	A175E	5'-ACGTGCTGGTGGAATCGCCG-3'
CbbRmutA175E_rev	A175E	5'-CGGCGA <u>TTC</u> CACCAGCACGT-3'
CbbRmutG203L_for	G203L	5'-TGCGCGAACCG <u>CTT</u> TCAGGCA-3'
CbbRmutG203L_rev	G203L	5'-TGCCTGAAAGCGGTTCGCGCA-3'
CbbRmutG205E_for	G205E	5'-GAACCGGGTTCA <u>GAA</u> ACCCGCACC-3'
CbbRmutG205E_rev	G205E	5'-GGTGCGGGT <u>TTC</u> TGAACCCGGTTC-3'
CbbRmutW274R_for	W274R	5'-CGATCGAGCGAATT <u>CGG</u> CATGTTG-3'
CbbRmutW274R_rev	W274R	5'-CAACATG <u>CCG</u> AATTCGCTCGATCG-3'

Tab. 14. Primer für die Einführung von Mutationen in *cbbR*.

<sup>a</sup>Veränderte Codon-Tripletts sind unterstrichen und die jeweiligen veränderten Nucleotide fett gedruckt.

Die Sequenzen der im Gen lokalisierten Primer enthielten die gewünschte Mutation und waren zueinander komplementär. So konnten in einer weiteren PCR-Reaktion die Fragmente wieder zu dem vollständigen Gen zusammengefügt werden. Dieses trug nun die jeweils gewünschte Mutation. Über die aus der multiplen Klonierungsstelle von pUC18 stammenden Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Hin*dIII konnte das 1015 bp große Fragment dann in das Plasmid pUC18 eingefügt werden (Abb. 16). Die resultierenden Plasmide pAECRG203L, pAECRA175E, pAECRW274R, pAECRG205E und pAECRR135C wurden durch Sequenzierung verifiziert.



Abb. 16. Schematische Darstellung der Einführung von Mutationen in *cbbR* mit Hilfe der PCR. rbs, Ribosomenbindestelle; *p*<sub>cbbR</sub>, *cbbR*-Promotor
#### **3.3.2** Komplementationsanalyse mit dem mutierten *cbbR*

Für die Komplementationstudien wurde das Plasmid pBBR1MCS2 gewählt, da es mit dem Reporterplasmid pBK3 kompatibel ist. So konnten die phänotypische Komplementation und die Promoteraktivitäten von  $p_{cbbL}$  parallel untersucht werden. Um eine dem Wildtyp ähnliche Expression der mutierten cbbR-Gene zu gewährleisten, wurde in pBBR1MCS2 die cbb-Kontrollregion von R. eutropha H16 eingefügt. Die Amplifikation der cbb-Kontrollregion erfolgte mit dem Plasmid pBH2241 als Matrize durch die Primer H16cbbigrX und H16cbbigfS (s. 3.2.1.1, Abb. 4). Das erzeugte 198 bp-Fragment wurde anschließend über die mit den Primern eingefügten Schnittstellen XbaI und SacI in das Plasmid kloniert. Das Fragment wurde dabei so orientiert, dass der Promoter  $p_{cbbR}$  colinear zu dem jeweils kloniertem cbbR-Gen lag. Das resultierende Plasmid pDSCH wurde anschließend zur Klonierung der cbbR-Gene für die Komplementationsanalyse verwendet. Die mutierten cbbR-Gene wurden in einer ortspezifischen Mutagenese erstellt (s. 3.3.1, Abb. 16). Die cbbR-Fragmente aus pAECRG203L, pAECRA175E, pAECRW274R, pAECRG205E und pAECRR135C wurden über die Restriktionschnittstellen XbaI und HindIII in pDSCH umkloniert. Die so erhaltenen Plasmide pDSCHR 203, pDSCHR 175, pDSCHR 274, pDSCHR 135 und pDSCHR 205 wurden in den Komplementationsanalysen eingesetzt.

Die mutierten CbbR-Proteine wurden auf ihre Aktivität in vivo in der cbbR/phcA-Doppelnullmutante R. eutropha HB17 untersucht. Diese Mutante wurde gewählt, um eine eventuelle Selektion von Revertanten unter autotrophen Bedingungen auszuschließen. In vorhergehenden Arbeiten mit der einfachen cbbR-Nullmutante HB15 war das Auftreten von phänotypischen Revertanten beobachtet worden. Die Suppression der cbbR-Deletion beruhte auf einer Punktmutation in phcA (Jeffke, 2001). Um das Wachstum und die cbb-Operon-Promotoraktivität parallel verfolgen zu können, wurde ein Stamm von HB17 verwendet, der bereits das Reporterplasmid mit der cbb-Kontrollregion (pBK2241, s. 3.2.4.3.2) trug. Als Kontrolle wurde das Plasmid pDSCHR mit dem analog zu den mutierten Genen klonierten Wildtypgen konjugativ in den Stamm HB17 (pBK2241) übertragen. Als zusätzliche Kontrolle diente der Wildtypstamm R. eutropha H16 mit dem Reporterplasmid pBK2241. Die Hintergrundaktivitäten wurden in einer Transkonjuganten von HB17 bestimmt, die nur die Plasmide pBK3 und pDSCH ohne inserierte Fragmente trug. Alle Transkonjuganten von HB17 und dem Wildtyp H16 wurden für die Bestimmung der Aktivität von  $p_{cbbL}$  in Mineralmedium mit Pyruvat angezogen. Alternativ wurden die Zellen unter mixotrophen Bedingungen mit Fructose und Formiat kultiviert.

Wie erwartet war in der mit dem Wildtyp-*cbbR* komplementierten Mutante HB17 nach Anzucht auf Fructose und der Induktion mit Formiat die ursprüngliche Promoteraktivität wiederhergestellt. Tatsächlich überstieg sie die Aktivität im Wildtypstamm geringfügig (Tab. 15). Da das Plasmid pDSCH in *R. eutropha* in mehrfacher Kopienzahl vorliegt, könnte dieses die Folge einer etwas erhöhten CbbR-Synthese sein. Die Komplementation mit dem CbbRR135C führte unter den gleichen Wachstumsbedingungen ebenfalls zu einer dem Wildtyp vergleichbaren Promoteraktivität. Eine leicht erhöhte Aktivität war auch bei der Komplementation mit CbbG205E nach der Induktion mit Formiat zu beobachten. Mit dem CbbRG203L, in dem das nur zwei Reste weiter benachbarte Glycin gegen Leucin ausgetauscht war, erreichte die Aktivität aber nur noch ca. 30 % des im Wildtyp serfolgte bei Komplementation mit CbbRA175E. Bei CbbRW274R sank die Promotoraktivität sogar auf nur noch 8 %.

Stamm und Plasmide	Spezifische Aktivität der β-Galactosidase [mI]/mg Protein]	
-	Fructose/Formiat	Pyruvat
H16 Wildtyp pBK3	5	7
H16 Wildtyp pBK2241	644	8
HB17 pBK3 pDSCHR	8	7
HB17 pBK3 pDSCHR <i>cbbR</i> WT	5	9
HB17 pBK2241 pDSCHR cbbR WT	705	9
HB17 pBK2241 pDSCHR cbbR A175E	346	14
HB17 pBK2241 pDSCHR cbbR G203L	193	14
HB17 pBK2241 pDSCHR <i>cbbR</i> W274R	52	16
HB17 pBK2241 pDSCHR cbbR R135C	650	26
HB17 pBK2241 pDSCHR <i>cbbR</i> G205E	749	144

Tab. 15. Aktivitäten des cbb-Operonpromotors in der cbbR-Deletionsmutante<br/>R. eutropha HB17 nach Komplementation mit mutierten cbbR-Genen und<br/>Wachstum auf verschiedenen Substraten

Dagegen verursachten alle mutierten CbbR-Proteine unterschiedlich erhöhte  $p_{cbbL}$ -Aktivitäten nach Anzucht der HB17-Transkonjuganten auf Pyruvat. Unter diesen Bedingungen zeigte  $p_{cbbL}$  im Wildtyp erwartungsgemäß keine vom Hintergrund unterscheidbare Aktivität (vollständige Repression). Mit CbbRA175E, G203L oder W274R verdoppelte sich die Aktivität, während CbbRR135C zu einer Verdreifachung führte. Bei CbbR G205E kam es immerhin zu einer ca. 18-fachen Steigerung der Aktivität, die damit sogar höher lag als in Wildtypzellen, die mit Fructose gewachsen waren (Tab. 15). Die G205E-Mutation verursachte damit eine signifikante partielle Derepression des *cbb*-Operonpromotors unter normalerweise streng reprimierenden Bedingungen.

Um zu überprüfen, ob sich die ermittelten Promotoraktivitäten im Phänotyp der komplementierten Transkonjuganten von HB17 widerspiegelten, wurde deren lithoautotrophes Wachstum untersucht (Tab. 16).

Stamm und Plasmide	Verdopplungszeit t <sub>d</sub> [h]	
H16 Wildtyp	3.8	_
H16 Wildtyp pBK2241	5.5	
HB17 pBK2241 pDSCHR cbbR WT	5.9	
HB17 pBK2241 pDSCHR cbbR A175E	11.0	
HB17 pBK2241 pDSCHR cbbR G203L	15.7	
HB17 pBK2241 pDSCHR cbbR W274R	21.6	
HB17 pBK2241 pDSCHR cbbR R135C	5.8	
HB17 pBK2241 pDSCHR cbbR G205E	5.7	

Tab. 16. Verdopplungszeiten der *cbbR*-Deletionsmutanten *R. eutropha* HB17 nachKomplementation mit mutierten *cbbR*-Genen bei lithoautotrophem Wachstum

Trotz vergleichbarer Promotoraktivitäten wuchs die mit Wildtyp-*cbbR* komplementierte Transkonjugante zwar langsamer als der Wildtyp H16, der Vergleich mit einem plasmidtragenden Wildtyp von H16 (Kontrollexperiment) zeigte aber, dass diese Verlangsamung anscheinend eine Folge des Antibiotikazusatzes im Medium war. Wie zu erwarten, wuchsen die mit CbbRA175E, G203L oder W274R komplementierten Transkonjuganten sehr viel langsamer in Relation zu ihren verringerten Promotoraktivitäten. Die Verdopplung der Verdopplungszeit (t<sub>d</sub>) mit CbbR A175E entsprach in etwa der um die Hälfte verringerten Promotoraktivität. Im Fall von CbbRG203L entsprach die auf ein Drittel verringerte Promoteraktivität einer etwa um das Dreifache verlängerten Verdopplungszeit. Für CbbRW274R war die Korrelation nicht ganz so exakt. Keine signifikanten Veränderungen des Wachstums zeigten die mit CbbRR135C und G205E komplementierten Transkonjuganten (Tab. 16). Diese Befunde unterstreichen die primäre Bedeutung von CbbR als Regulator des *cbb*-Operons und zeigten die enge Korrelation zwischen der *cbb*-Genexpression und der autotrophen CO<sub>2</sub>-Assimilation in *R. eutropha* H16.

#### 3.3.3 Bindungsaktivität der mutierten CbbR-Proteine

Für den Einsatz der verschiedenen CbbR in Bindungsstudien mit der intergenen *cbb*-Kontrollregion aus *R. eutropha* wurden die *cbbR*-Gene von Wildtyp H16 und den *cbbR*-Mutanten in *E. coli* überexprimiert. Die Expression des Wildtypgens erfolgte mit den Plasmiden pAECR5 oder pAECR8 (Abb. 17). Für die Expression der mutierten *cbbR* wurden die Plasmide pAECRG203L, pAECRA175E, pAECRW274R, pAECRG205E und pAECRR135C verwendet. Im Allgemeinen war die Expression relativ schwach, aber ausreichend für Bindungstudien in der Gelretardation.

Da nach der Expression der in pUC18 klonierten, mutierten *cbbR*-Gene A175E und W274R in der Gelretardation keine CbbR-DNA-Komplexe zu beobachten waren, wurde angenommen, dass die Expression nicht ausreichend war, weshalb die beiden Gene in den Vektor pT7-7 umkloniert wurden. Das Plasmid pT7-7 trägt einen starken T7-Polymerasespezifischen Promotor. Die Geneexpression in den resultierenden Plasmiden pAECR9 (CbbRA175E) und pAECR10 (CbbRW274R) führte jedoch nicht zur Bildung von aktiven Proteinen. Die Analyse von Zellrohextrakten und von Zelllysaten der betreffenden Klone von *E. coli* in der SDS-PAGE ergab, dass die CbbR-Proteine zwar produziert wurden, aber anscheinend unlösliche Einschlusskörper (,Inclusion bodies') bildeten (Abb. 17A). Was sich auch in Western-Blot (Immuno-Blot) mit CbbR-spezifischen Antikörpern bestätigte (Abb. 17B). So konnte das überproduzierte CbbR (34.5 kDa) nur in den Lysaten ganzer Zellen, aber nicht im Rohextrakt (lösliche Fraktion) nachgewiesen werden.



#### Abb. 17. SDS-PAGE (12 % [w/v] Acrylamid) und Immuno-Blot mit heterolog überproduziertem CbbR aus dem Wildtyp *R. eutropha* H16 und einem mutierten CbbR (CbbRA175E).

**A**, SDS-PAGE: a, Negativkontrolle Zelllysat von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7); b, Rohextrakt aus *E. coli* BL21DE3 (pAECR9); c, Zelllysat von *E. coli* BL21DE3 (pAECR9).

**B**, Immuno-Blot: d, Negativkontrolle Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7); e, Rohextrakt aus *E. coli* BL21DE3 (pAECR5); f, Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pAECR9); g, Zelllysat von *E. coli* BL21DE3 (pAECR9). Es wurden jeweils 30 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Die Größe von Referenzproteinen ist links (in kDa) angegeben.

Um die Bildung von Einschlusskörpern zu vermindern, wurden die Proteine simultan mit verschiedenen Chaperonen überproduziert. Von CbbRW274R wurde dennoch kein aktives Protein gebildet. Die Bindungsaktivität dieses Proteins war anscheinend so gering, dass nicht genug aktives Protein für die Bindung gebildet wurde. Dies steht mit den geringen *cbb*-Promotoraktivitäten und Wachstumsraten der mit CbbRW274R komplementierten CbbR-Defektmutanten HB17 im Einklang. Bei der Co-Produktion von CbbRA175E mit den Chaperoninen GroEL (60 kDa) und GroES (10 kDa) (Plasmid pGro7) wurde dagegen offenbar mehr aktives CbbR gebildet.

Bis auf CbbRW274R zeigten alle Mutantenproteine eine dem Wildtyp CbbR grundsätzlich vergleichbare Bindungsaktivität an die *cbb*-Kontrollregion (Abb. 18). Dieser Befund legte nahe, dass die eingebrachten Mutationen in der C-terminalen Domäne von CbbR keine dramatisch veränderte Bindung von CbbR an den Operator des *cbb*-Operons bewirken, aber möglicherweise die Interaktion von CbbR mit dem bekannten negativen Effektor PEP und/oder weiteren an der Regulation beteiligten Proteinen beeinflussen.



# Abb. 18. Gelretardationen (native PAGE, 5 % [w/v] Acrylamid) der *cbb*-Kontrollregion von *R. eutropha* H16 mit heterolog in *E. coli* überproduziertem Wildtyp- und mutierten CbbR.

Als DNA-Fragment (243 bp) wurde die vollständige *cbb*-Kontrollregion aus *R. eutropha* H16 verwendet. a, Negativkontrolle: Rohextrakt aus *E. coli* BL21DE3; b und c, *E. coli* BL21DE3 (pAECR5), 0.4  $\mu$ g bzw. 0.2  $\mu$ g Protein; d und e, Rohextrakt von *E. coli* JW1 (pAECRG203L); f und g, *E. coli* BL21DE3 (pAECR9, pGro7); h und j, *E. coli* JW1 (pAECRR135C); k und l; *E. coli* JW1 (pAECRG205E). Es wurden von den Rohextrakten mit den überproduzierten Proteinen jeweils 2  $\mu$ g (Spuren d, f, h, k) oder 1  $\mu$ g (Spuren e, g, j, l) Protein eingesetzt. 0, freie DNA, 1, CbbR-DNA-Komplex.

#### 3.4 Charakterisierung der CbbR-Proteine in *R. metallidurans* CH34

Die Gene der CO<sub>2</sub>-Assimilation sind in *R. metallidurans* CH34 in zwei *cbb*-Operonen, *cbb<sub>I</sub>* und *cbb<sub>II</sub>*, lokalisiert. Jedem Operon ist ein LTTR, ähnlich dem CbbR aus *R. eutropha* H16, zugeordnet. Es sollte nun geklärt werden, ob die Transkriptionsregulatoren nur das ihnen zugehörige Operon regulieren oder ob auch eine Form des regulatorischen ,cross-talks' zwischen den beiden *cbb*-Operonen stattfindet.

#### 3.4.1 Bindungsstudien mit CbbR aus *R. eutropha* H16 und *R. metallidurans* CH34

#### 3.4.1.1 Plasmidkonstruktion zur heterologen Expression von *cbbR*<sub>II</sub>

Transkriptionsregulatoren liegen in der Zelle meist in sehr geringen Konzentrationen vor. Dies ist ausreichend für die Regulation *in vivo*, führt aber dazu, dass *in vitro* die Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften mit Rohextrakten des untersuchten Stammes nicht möglich ist. Um die Bindungseigenschaften dieser Proteine zu untersuchen, ist es daher von Vorteil, diese in einem heterologen Wirt zu produzieren. Für die Expressionen von  $cbbR_I$  und  $cbbR_{II}$  wurde das Plasmid pT7-7 (s. 3.3.3) verwendet.

Das *cbbR<sub>I</sub>*-Gen lag bereits im Plasmid pT7-7 vor und konnte direkt für die Überexpression eingesetzt werden. Für *cbbR<sub>II</sub>* wurde zunächst ein 929 bp großes Fragment mit Hilfe der Primer ExCbbRIIfN und ExCbbRIIrS amplifiziert (Anhang I: Tab. 1.). Über das Startcodon des Gens wurde dabei eine *Nde*I-Schnittstelle gelegt, kurz hinter dem Stopcodon eine *Sal*I-Schnittstelle eingeführt. Das Fragment wurde dann in das mit *Nde*I- und *Sal*I-geschnittene pT7-7 gebracht und das resultierende Plasmid pT7-7::*cbbR<sub>II</sub>* durch Sequenzierung überprüft. Die Produktion der Proteine CbbR<sub>I</sub> und CbbR<sub>II</sub> in *E. coli* war sehr schwach, aber ausreichend, um in DNA-Bindungstudien die Bildung von DNA-Protein-Komplexen beobachten zu können.

#### 3.4.1.2 Bindung der CbbR-Proteine an die *cbb*-Kontrollregionen aus *R. metallidurans* CH34 und *R. eutropha* H16

Die heterolog überproduzierten CbbR-Proteine aus R. metallidurans CH34 und R. eutropha H16 wurden zur Untersuchung ihrer Bindung an homologe und heterologe cbb-Kontrollregionen verwendet. Als DNA wurden PCR-Fragmente der intergenen *cbb*-Regionen zwischen den *cbbR*-Genen und *cbbL*<sub>H16/CH341</sub> sowie *cbbE*<sub>CH3411</sub> eingesetzt. Das 243 bp-Fragment der cbb-Kontrollregion aus H16 wurde mit dem Plasmid pBH2241 und den Primern F1 und R1 amplifiziert (s. 3.2.1, Abb. 4). Für die Vermehrung der korrespondierenden Regionen aus CH34, cbb<sub>I</sub> (cbb-Kontrollregion I) und cbb<sub>II</sub> (cbb-Kontrollregion II), wurden die Primer Cbbligf und Cbbligr sowie Cbblligf und Cbbligr benutzt (Anhang I: Tab. 1.). Als Matrizen dienten die Plasmide pSK+::igRL und pSK+::igRE mit den klonierten intergenen cbb-Regionen aus R. metallidurans CH34. Die beiden amplifizierten Fragmente von Region I (274 bp) und Region II (259 bp) wurden radioaktiv markiert und in den Gelretardationsexperimenten eingesetzt.

Wie zu erwarten, wurde für alle drei CbbR-Proteine eine Bindung an die jeweilige homologe cbb-Kontrollregion gefunden. Der Komplex aus CbbR<sub>II</sub> und der Region II wies dabei in der Retardation eine deutlich höhere Mobilität auf als die Komplexe von CbbRI mit der Region I Zur Identifikation möglicher Effektoren der CbbR-Proteine (Abb. 19). aus R. metallidurans CH34 wurden den Protein-DNA-Bindungsreaktionen potentielle Metabolite aus dem Energie- und dem Kohlenstoffwechsel (PEP, NADH, NADPH, Fructose-6-phosphat, Ribose-5-phosphat, Ribulose-1,5-bisphosphat) zugesetzt. Keines der Metabolite verursachte jedoch eine Veränderung in der Gelretardation der Komplexe. In den heterologen Experimenten wurde sowohl für CbbR<sub>I</sub> als auch für CbbR<sub>II</sub> eine Bindung an die Regionen I bzw. II beobachtet. Die Ausprägung der Komplexe war in diesen Fällen allerdings schwächer als die der Komplexe mit den homologen Zielregionen von CH34. Ein gegenseitiger Austausch der beiden Regulatoren war also denkbar. Die geringe Effizienz der Bindung ließ aber vermuten, dass die Funktion des jeweils anderen Regulators nur eingeschränkt erfüllt werden kann.



Abb. 19. Gelretardationen (native PAGE, 5 % [w/v] Acrylamid) der *cbb*-Kontrollregionen I und II aus *R metallidurans* CH34 mit CbbR<sub>I</sub> und CbbR<sub>II</sub> aus *R. metallidurans* CH34. Als DNA-Fragmente wurden die *cbb*-Kontrollregionen I (274 bp) und II (259 bp) aus

*R. metallidurans* CH34 verwendet.

a, Negativkontrolle: Region II mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7) 0.6 µg Protein; b, Negativkontrolle: Region I mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7) 0.6 µg Protein; c, d und e; Region II mit Rohextrakt aus *E. coli* BL21DE3 (pT7-7) 0.6 µg Protein; d und e; Region II mit Rohextrakt aus *E. coli* BL21DE3 (pT7-7):*cbbR<sub>II</sub>*), 3.7, 1.9 bzw. 0.93 µg Protein; f, g und h, Region I mit Rohextrakt aus *E. coli* BL21DE3 (pT7-7):*cbbR<sub>II</sub>*), 3.7, 1.9 bzw. 0.93 µg Protein; i und j, Region I mit Rohextrakt aus *E. coli* BL21DE3 (pT7-7):*cbbR<sub>I</sub>*), 1.7 bzw. 0.4 µg Protein; k, 1 und m, Region II mit Rohextrakt aus *E. coli* BL21DE3 (pT7-7):*cbbR<sub>I</sub>*), 3.4, 1.7 bzw. 0.4 µg Protein; 0, freie DNA; 1, Komplex aus CbbR<sub>II</sub> und Region II; 2, Komplex aus CbbR<sub>II</sub> und Region I; 3, Komplex aus CbbR<sub>I</sub> und Region II; 4, Komplex aus CbbR<sub>I</sub> und Region I.

Die Bindung von CbbR ist essentiell für die Expression der *cbb*-Operone in *R. eutropha* H16 und wahrscheinlich auch in *R. metallidurans* CH34, daher kann eine Bindung *in vitro* auf eine Fähigkeit zur Komplementation *in vivo* hindeuten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass CbbR<sub>H16</sub> an die Regionen I und II von CH34 bindet. Während der Komplex aus CbbR<sub>H16</sub> und der Region II nur eine geringfügig erhöhte Mobilität verglichen mit dem homologen Komplex aufwies (Abb. 20A), war die Mobilität des Komplexes aus CbbR<sub>H16</sub> mit der Region I deutlich höher als die des homologen Komplexes (Abb. 20B). Dies deutet auf eine andersartige Bindung von CbbR<sub>H16</sub> und eine damit einhergehende veränderte Krümmung der Region I-DNA hin als sie bei der Bindung des homologen CbbR erfolgt. CbbR-Proteine aus CH34 bildeten mit der *cbb*-Kontrollregion aus H16 jeweils nur schwach ausgeprägte Komplexe. Vor allem bei CbbR<sub>I</sub> war auffällig, dass die Affinität zu der heterologen Kontrollregion sehr viel niedriger war als zur homologen. (Abb. 20B). Sowohl der CbbR<sub>I</sub>- als auch der CbbR<sub>II</sub>-Komplex hatten dabei eine verminderte Mobilität im Vergleich zu dem jeweils homologen Komplex. Dies könnte auf eine relativ stärkere DNA-Krümmung bei der Proteinbindung deuten. Die Fähigkeit der CbbR-Proteine an die heterologen *cbb*-Kontrollregionen zu binden, könnte auf eine gegenseitige Substituierbarkeit der Regulatoren hinweisen. Jedoch deuten die veränderten Mobilitäten der heterologen DNA-CbbR-Komplexe auf eine veränderte Topologie innerhalb dieser Komplexe hin. Inwiefern dies bei der Regulation eine Rolle spielt, kann nicht vorausgesagt werden.



Abb. 20. Gelretardationen (native PAGE, 5 % [w/v] Acrylamid) von *cbb*-Kontrollregionen aus *R metallidurans* CH34 und *R. eutropha* H16 mit CbbR aus *R. eutropha* H16 sowie CbbR<sub>I</sub> und CbbR<sub>II</sub> aus *R. metallidurans* CH34.

Als DNA-Fragmente wurden die Region I (274 bp) und Region II (259 bp) aus *R. metallidurans* CH34 und die vollständige *cbb*-Kontrollregion (243 bp) aus *R. eutropha* H16 und verwendet.

A: a, Negativkontrolle: Region II mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (0.5  $\mu$ g Protein); b, Region II mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7::*cbbR<sub>II</sub>*), 0.95  $\mu$ g Protein; c, *cbb*-Kontrollregion aus H16 mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7::*cbbR<sub>II</sub>*), 0.95  $\mu$ g Protein; d, Region II mit Rohextrakt aus *E. coli* BL21DE3 (pAECR5), 0.9  $\mu$ g Protein; e, *cbb*-Kontrollregion aus H16 mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pAECR5), 0.9  $\mu$ g Protein; f, Negativkontrolle: *cbb*-Kontrollregion aus H16 mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pAECR5) 0.5  $\mu$ g Protein; f, Negativkontrolle: *cbb*-Kontrollregion aus H16 mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (0.5  $\mu$ g Protein); 0, freie DNA; 1, Komplex aus CbbR<sub>H16</sub> und Region II; 2, Komplex aus CbbR<sub>II</sub> und Region II; 3, Komplex aus CbbR<sub>H16</sub> und *cbb*-Kontrollregion aus H16; 4, Komplex aus CbbR<sub>II</sub> und *cbb*-Kontrollregion aus H16.

**B**: a, Negativkontrolle: Region I mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (0.5  $\mu$ g Protein); b, Region I mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7::*cbbR<sub>I</sub>*), 0.2  $\mu$ g Protein; c, Region I mit Rohextrakt aus *E. coli* BL21DE3 (pAECR5), 0,5  $\mu$ g Protein; d, Region I mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7::*cbbR<sub>I</sub>*), 0.8  $\mu$ g Protein; e, *cbb*-Kontrollregion aus H16 mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7::*cbbR<sub>I</sub>*), 0.8  $\mu$ g Protein; f, *cbb*-Kontrollregion aus H16 mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7::*cbbR<sub>I</sub>*), 0.8  $\mu$ g Protein; f, *cbb*-Kontrollregion aus H16 mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7::*cbbR<sub>I</sub>*), 0.8  $\mu$ g Protein; f, *cbb*-Kontrollregion aus H16 mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pT7-7::*cbbR<sub>I</sub>*), 0.8  $\mu$ g Protein; f, *cbb*-Kontrollregion aus H16 mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pAECR5), 0.3  $\mu$ g Protein; g, Negativkontrolle: *cbb*-Kontrollregion aus H16 mit Rohextrakt von *E. coli* BL21DE3 (pAECR5), 0.3  $\mu$ g Protein; d, Region I; 0, freie DNA; 1, Komplex aus CbbR<sub>H16</sub> und Region I; 2, Komplex aus CbbR<sub>H16</sub> und *cbb*-Kontrollregion aus H16; 3, Komplex aus CbbR<sub>I</sub> und *cbb*-Kontrollregion aus H16; 4, Komplex aus CbbR<sub>I</sub> und Region I.

## 3.4.2 Herstellung und Charakterisierung einer *cbbR<sub>II</sub>* Deletionsmutante von *R. metallidurans* CH34

Bisher ist nichts weiter über die Regulation der *cbb*-Gene in *R. metallidurans* CH34 bekannt. Um zu untersuchen, ob die CbbR in *R. metallidurans* CH34 substituierbar sind und CbbR<sub>II</sub> essentiell für die *cbb*-Genexpression ist, wurde eine *cbb<sub>II</sub>*-Deletionsmutante hergestellt.

#### 3.4.2.1 Konstruktion der Deletionsplasmide und Isolierung von Homogenoten

Die Konstruktion des Suizidplasmids für die Deletion von cbbR<sub>II</sub> erfolgte im Prinzip wie unter 3.2.4.1 bereits beschrieben. Am 5'-Ende des Gens wurde mit den PCR-Primern CbbRII1fX und CbbRII1rP ein 308 bp großes Fragment amplifiziert. Die Primer CbbRII2fP und CbbRII2rB wurden verwendet, um ein 310 bp großes Fragment am 3'-Ende des Gens zu erhalten (Anhang I: Tab. 1.). Aus der Ligation der Fragmente mit der über die Primer eingeführten PstI-Schnittstelle resultierte ein Fragment, das die codierende Sequenz des 5'und 3'-Endes von cbbR<sub>II</sub> enthielt. Ein 861 bp umfassender Teil des 921 bp langen Gens war entfernt worden. Das Fragment wurde über die außen eingefügten XbaI- und SacI-Schnittstellen zunächst in pUC19 kloniert und in dem gebildeten Plasmid pUC19::cbbR<sub>II</sub> durch Sequenzierung verifiziert. Anschließend wurde das Deletionsfragment über Verdau mit XbaI und SacI aus pUC19::cbbR<sub>II</sub> in pNHG1 umkloniert. Das hergestellte Suizidplasmid pNHG::*cbbR*<sub>II</sub> wurde analog zu *R. eutropha* H16 durch Konjugation in R. metallidurans CH34 übertragen. Im Unterschied zu H16 erfolgte die Selektion der Heterogenoten aber nicht auf Mineralmedium mit Fructose sondern mit Gluconat als Kohlenstoff- und Energiequelle, da CH34 nicht in der Lage ist Fructose zu verwerten. Nach der Isolation von Heterogenoten und deren Verifikation durch PCR erfolgte die Isolation von Homogenoten durch ein modifiziertes Protokoll, da die zweite homologe Rekombination in R. metallidurans CH34 nur mit sehr geringer Effizienz stattfindet. Dazu wurden die Heterogenoten unter nicht selektiven Bedingungen in NB-Medium über Nacht angezogen und mindestens zweimal in neues NB-Medium überimpft. Aus den NB-Kulturen wurden nach 9 und 24 h jeweils 100  $\mu$ l entnommen, verdünnt (10<sup>-2</sup>-10<sup>-4</sup>) und auf NB-Platten mit 20 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Die Saccharose-resistenten Klone wurden daraufhin auf ihren Tetracyclin-sensitiven Phänotyp hin untersucht. Tetracyclin-sensitive Klone sollten das Suizidplasmid wieder durch eine homologe Rekombination verloren haben und nur noch das deletierte oder das Wildtypallel von  $cbbR_{II}$  im Genom tragen. Der Genotyp der Homogenoten wurde mit den Primern TestcbbRII\_f und TestcbbRII\_r durch PCR überprüft. Mit genomischer DNA der Homogenote CHM1 von *R. metallidurans* CH34, die das deletierte  $cbbR_{II}$  trug, wurde erwartungsgemäß nur ein 369 bp Fragment amplifiziert. Dagegen erbrachte der Wildtyp mit dem intakten Gen ein 1230 bp großes Fragment. Mit den Heterogenoten wurden beide Fragmente amplifiziert (Abb. 21).

Eine *cbbR<sub>I</sub>*-Deletionsmutante zu isolieren, ist nicht gelungen. Möglicherweise hat dieser Transkriptionsregulator eine weitreichendere Rolle im Stoffwechsel von CH34 und ist daher essentiell für das Überleben des Stammes.



Abb. 21. Agarose-Gelelektrophorese (1 % [w/v] Agarose) von PCR-Amplifikaten zum Nachweis von  $cbbR_{II}$  in einer Heterogenote und in einer  $cbbR_{II}$ -Deletionsmutante von *R. metallidurans* CH34.

M, Größenstandard: 100 bp-Ladder Plus; a, 1230 bp-Fragment des  $cbbR_{II}$ -Wildtypgens von CH34; b, 1230 bp- und 369 bp-Fragmente des Wildtyp- bzw. des deletierten  $cbbR_{II}$ -Gens einer Heterogenote; c, 369 bp-Fragment des deletierten  $cbbR_{II}$ -Gens einer Homogenote CHM1 (Primer TestcbbRII\_f und TestcbbRII\_r), Fragmentgrößen des Größenstandards sind in bp angegeben.

### **3.4.2.2** Charakterisierung des lithoautotrophen Wachstums der *cbbR<sub>II</sub>*-Deletionsmutante *R. metallidurans* CHM1

Vorausgesetzt, dass die CbbR-Proteine aus CH34 ihr jeweils zugehöriges Operon spezifisch regulieren, war zu erwarten, dass die Deletion von *cbbR*<sub>II</sub> zu einem weitgehenden Verlust der Fähigkeit zum lithoautotrophen Wachstum führt. Die Bindungstudien mit CbbR<sub>I</sub> und CbbR<sub>II</sub> wiesen darauf hin, dass die beiden *cbb*-Operone in CH34 wahrscheinlich hauptsächlich durch die benachbart lokalisierten LTTR reguliert werden. Das *cbb*<sub>II</sub>–Operon codiert ein Großteil der Enzyme des CBB-Cyclus einschließlich der Phosphoribulokinase, einem Schlüsselenzym

des Cyclus, von dem es, soweit bekannt, keine weitere Kopie im Genom von CH34 gibt. Außerdem enthält es die Gene der löslichen Hydrogenase. Daher ist die Expression dieses Operons essentiell für das lithoautotrophe Wachstum von CH34. Tatsächlich war das Wachstum der Mutante CHM1 ( $t_d = 46$  h) unter lithoautotrophen Bedingungen extrem langsamer im Vergleich zum Wildtyp CH34 ( $t_d = 6.6$  h). Dies deutet auf eine sehr schwache Aktivierung des *cbbR<sub>II</sub>*-Operons durch CbbR<sub>I</sub> oder einen anderen Regulator hin.

#### 3.4.2.3 Komplementationsstudien mit *R. metallidurans* CHM1 und *R. eutropha* HB17

Die CbbR-Proteine sind in einzelnen Bereichen relativ hoch konserviert (s. 3.3, Abb. 15). Diese Ähnlichkeit könnte Grundlage für einen funktionellen Austausch der Regulatoren in nahe verwandten Organismen sein.

In den Bindungstudien wurde eine Bindung von  $CbbR_{H16}$  an die  $cbb_{I}$ - und  $cbbR_{II}$ -Kontrollregionen aus *R. metallidurans* CH34 beobachtet. Ebenso zeigten  $CbbR_{I}$  und  $CbbR_{II}$ eine, wenn auch schwache Bindung an die *cbb*-Kontrollregion aus *R. eutropha* H16 (s. 3.4.2.1). Die Bindung von CbbR an den *cbb*-Operator ist Voraussetzung für die Expression des *cbb*-Operons. Es wäre daher denkbar, dass CbbR aus H16 CbbR<sub>II</sub> aus CH34 ersetzten könnte. In gleicher Weise wäre ein Austausch von CbbR<sub>H16</sub> durch die CbbR-Regulatoren aus CH34 möglich. Ein mutiertes PhcA\* aus *R. eutropha* HB14R kann CbbR von H16 ersetzen. In CH34 liegt ein homologes Protein mit 97 % Ähnlichkeit zu PhcA aus H16 vor. Daher sollte auch getestet werden, ob das mutierte PhcA\* aus H16 die *cbbR<sub>II</sub>*-Mutante CHM1 von CH34 phänotypisch komplementieren kann. Im Fall von *R. eutropha* wurde die *cbbR-phcA*-Doppelmutante für die Komplementationen verwendet, um die Selektion von autotroph positiven Revertanten zu vermeiden.

Die *cbbR*-Gene von CH34 wurden in das Plasmid mit breiten Wirtsbereich pMP921 kloniert.

Die *cbbR-* und *phcA\*-*Gene aus H16 bzw. HB14R lagen bereits kloniert in den Vektoren pUW5 bzw. pBBR1MCS2 vor. Um die höhere Effizienz der Selektion auf Tetracyclin auszunutzen, wurde das 3.3 kb-Fragment mit dem *phcA\** Gen als *KpnI-* und *Bam*HI-Fragment aus pBBR1MCS2::*phcA\** herausgeschnitten und in pMP921 umkloniert. Für die Komplementation mit *cbbR<sub>II</sub>* wurde ein 1183 bp großes Fragment aus der Gesamt-DNA von CH34 amplifiziert und über die mit den Primern eingefügten Schnittstellen *Sal*I und *Pst*I (Primer CbbIIigPf und ExCbbRIIrS, s. Anhang I: Tab. 1.) in pMP921 kloniert. Das Fragment in dem resultierenden Plasmid pMP921::*cbbR<sub>II</sub>* trug das Gen und die zugehörige Promoterregion und wurde durch Sequenzierung verifiziert. Das Gen des zweiten Regulators CbbR<sub>I</sub> aus CH34 lag bereits in dem Plasmid pMP921::*cbbR<sub>I</sub>* vor.

Beide *cbbR*-Gene aus *R. metallidurans* CH34 konnten *R. eutropha* HB17 phänotypisch komplementieren. Das Wachstum der HB17-Transkonjuganten war allerdings gegenüber dem Wildtyp H16 um etwa das Doppelte verlangsamt. Umgekehrt wurde die Fähigkeit zu lithoautotrophem Wachstum von *R. metallidurans* CHM1 durch *cbbR* aus *R. eutropha* H16 nicht wieder hergestellt. Durch *phcA*\* wurde ein äußerst langsames Wachstum der Mutante CHM1 unter lithoautotrophen Bedingungen ermöglicht. Die Bindung von CbbR<sub>H16</sub> an den *cbbR*<sub>II</sub>-Operator scheint sich daher signifikant von der des homologen Proteins zu unterscheiden, so dass das *cbbR*<sub>II</sub>-Operon in CHM1 nicht aktiviert wird. Schon in den Gelretardationsanalysen war eine verringerte Mobilität des CbbR<sub>H16</sub>-*cbb*<sub>II</sub>-Operator-Komplexes beobachtet worden, die auf eine veränderte Bindung des Proteins an die DNA hinweist (s 3.4.1.2). Eine anders geartete Interaktion mit weiteren beteiligten Proteinen und/oder potentiellen Effektoren in CH34 könnte allerdings auch die Komplementation durch CbbR<sub>H16</sub> verhindern.

Wie zu erwarten, führte die Komplementation von CHM1 mit dem stammeigenen CbbR<sub>II</sub> zu einem dem Wildtyp gegenüber allerdings etwas verlangsamten lithoautotrophen Wachstum. Dies könnte eine Folge der Gegenwart eines Antibiotikums sein, das für die Selektion notwendig war. Ein ähnliches Phänomen wurde schon bei den Komplementationsanalysen von *R. eutropha* HB17 mit dem homologen CbbR beobachtet (s. 3.3.2).

#### 4. Diskussion

#### 4.1 Die *cbb*-Gene und ihre Regulation

## 4.1.1 Organisation der *cbb*-Operone in *Ralstonia* spp. und anderen Organismen

Phylogenetische Analysen legen nahe, dass Ausbreitung und Organisation der *cbb*-Gene in autotrophen Organismen durch laterale Gentransfer-Ereignisse bestimmt sind (Watson und Tabita, 1997). Übereinstimmend mit der Hypothese, dass ein Gentransfer die Clusterbildung von Genen fördert, die funktionell zusammenhängen (Lawrence und Roth, 1996), sind die *cbb*-Gene ganz überwiegend in Operonen organisiert. Dabei ist die Organisation einiger Gengruppen sehr konserviert (Abb. 22). Besonders auffällig ist in vielen bekannten *cbb*-Operonen die Konservierung der Genanordnung für die RubisCO und von *cbbX* oder *cbbQ* (*cbbLSX*, *cbbLSQO*) sowie von *cbbF*, *cbbP* und *cbbT* (*cbbFPT*; Kusian und Bowien, 1997; Shively et al., 1998).

R. eutropha H16 hat zwei cbb-Operone, die weitgehend identisch sind (Bowien und Kusian, 2002). In R. metallidurans CH34 sind die cbb-Gene ebenfalls in zwei Operonen organisiert, die aber nicht zueinander homolog sind. Eine Organisation der cbb-Gene in zwei Operonen (cbb<sub>1</sub> und cbb<sub>11</sub>) ist auch von R. capsulatus, R. sphaeroides, Rhodopseudomonas palustris und H. thermoluteolus bekannt (Chen et al., 1991; Gibson et al., 1991; Terazono et al., 2001; Dubbs und Tabita, 2004). In den drei zuerst genannten Organismen ist neben den Genen für eine Form I-RubisCO (L<sub>8</sub>S<sub>8</sub>) auch das Gen für eine Form II-RubisCO (L<sub>2</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>8</sub>) vorhanden. Die beiden Formen der RubisCO sind häufig in getrennten Operonen codiert (Form I-RubisCO im *cbb<sub>l</sub>*-Operon, Form II-RubisCO im *cbb<sub>ll</sub>*-Operon; Chen et al., 1991; Gibson et al., 1991; Dubbs und Tabita, 2004). Die Form II-RubisCO wird als die ursprünglichere Form des Enzyms angesehen, da sie eine höhere Affinität als die Form I-RubisCO zum Sauerstoff besitzt, der in der frühen Erdatmosphäre kaum oder nur in sehr geringer Konzentration vorhanden war (Shively et al., 1998). In Hydrogenovibrio marinus MH-110 sind sogar drei cbb-Operone zu finden, von denen zwei eine Form I und eines eine Form II-RubisCO enthalten (Yoshizawa et al., 2004). Die im cbb<sub>1</sub>-Operon von R. metallidurans CH34 codierte Form I-RubisCO gehört zu der ,grünen' Form I-Untergruppe, die in Cyanobakterien, pflanzlichen Plastiden, grünen Algen sowie vielen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien vorkommt (Shively et al., 1998; Tabita, 1999; T. Mahlmann und B. Bowien, persönliche Mitteilungen). Die in R. eutropha H16 vorhandene Form I-RubisCO ist ein Enzym der ,roten' Form I-

Untergruppe, die nach neueren Erkentnissen sehr weit verbreitet ist (Shively et al., 1998; Tabita, 1999, Selesi et al., 2005). Die Existenz verschiedener Untergruppen der Form I-RubisCO in nahe verwandten Arten wurde bereits bei R. sphaeroides und R. capsulatus sowie bei Ammonium oxidierenden Bakterien gefunden (Paoli et al., 1998; Utaker et al., 2002). Alle untersuchten autotrophen Ammoniumoxidierer enthalten eine Form I-RubisCO der ,roten' mit Ausnahme von Nitrosomonas europaea. Das Untergruppe  $\alpha$ -Proteobakterium *R. sphaeroides* besitzt ebenfalls eine Form I-RubisCO der ,roten' Untergruppe. Dagegen liegt in dem nahe Verwandten R. capsulatus und in N. europaea eine ,grüne' Form I-RubisCO vor. Aufgrund dieser Diskrepanz zwischen phylogenetischer Verwandschaft und Verteilung der RubisCO-Untergruppen wird eine Verbreitung der RubisCO codierenden Gene durch horizontalen Gentransfer angenommen (Paoli et al., 1998; Tabita, 1999; Utaker et al., 2002). Aufällig ist, dass die ,rote' Form I-RubisCO in den Operonen meist mit dem Gen cbbX und die ,grüne' Form I-RubisCO meist mit den Genen cbbQ und cbbO assoziiert ist. Die Co-Expression von cbbQ und cbbQ mit der RubisCO fördert ihre Aktivität. Eine cbbX-Deletionsmutante von R. eutropha H16 ist nicht mehr in der Lage CO<sub>2</sub> zu assimilieren. Daher wird für diese Gene eine Funktion bei der Aktivierung der RubisCO angenommen (Hayashi et al., 1997, 1999; Bowien und Kusian, 2002; Hayashi und Igarashi, 2002). Die Gengruppe cbbLSX und ihre Homologen (rbcLSX) sind weit verbreitet und auch in Plastiden von Rotalgen sowie in Bakterien wie R. eutropha H16 und R. sphaeroides zu finden (Abb. 22). Die Gengruppe *cbbLSQO* tritt unter anderem in R. capsulatus, N. europaea, H. thermoluteolus, H. marinus und R. metallidurans CH34 auf (Paoli et al., 1998; Terazono et al., 2001; Chain et al., 2003; Yoshizawa et al., 2004). In H. marinus sind cbbQ und cbbO jedoch auch mit dem Gen der Form II-RubisCO (cbbM) assoziiert (Shively et al., 1998; Yoshizawa et al., 2004). Eine weitere konservierte Genfolge, *cbbFPT*, ist unter anderem in den cbb-Operonen von R. eutropha H16 und im cbb<sub>II</sub>-Operon von R. metallidurans CH34 anzutreffen, wie auch in den cbb-Operonen von den Rhodobacter spp., Rhododspirillum rubrum, R. palustris, H. thermoluteolus und X. flavus (Chen et al., 1991; Gibson et al., 1991; van Keulen et al., 1998; Terazono et al., 2001; Dubbs und Tabita, 2004).

R. sphaeroides	
bb <sub>1</sub> -Operon	
cbbR <sub>I</sub>	$cbbF_{1}cbbP_{1}cbbA_{1}cbbL_{1}cbbS_{1}cbbX_{1}cbbY_{1}cbbZ_{1}$
bb <sub>II</sub> -Operon	
	$cbbF_{II} cbbP_{II} cbbT_{II} cbbG_{II} cbbA_{II} cbbA_{II}$
R. palustris	
bb <sub>I</sub> -Operon	
cbbR	RR1 RR2 PAS cbbL cbbS
bb <sub>11</sub> -Operon	
	cbbF cbbP cbbT cbbA cbbM
R. capsulatus	
bb <sub>1</sub> -Operon	
cbbR <sub>I</sub>	$cbbL_{I}cbbS_{I}cbbQ_{I}cbbO_{I}$
bb <sub>11</sub> -Operon	
cbbR <sub>II</sub>	$cbbF_{Ii} cbbP_{II} cbbT_{II} cbbG_{II} cbbA_{II} cbbM_{II} cbbE_{II} orfl cbbZ_{II} cbbY_{II}$
R. rubrum	
cbbM	cbbR cbbE cbbF cbbP cbbT cbbA
K. flavus	
110	abbl abbS abbV abbE abbD abbT abbA abbE

p-Proteoba	<u>kterien</u>			
R. eutropha H	16			
cbb <sub>c</sub> -Operon				
cbbR	cbbL <sub>c</sub> cbbS <sub>c</sub> cbbX <sub>c</sub> cbbY <sub>c</sub> cbbE <sub>c</sub>	cbbF <sub>c</sub> cbbP <sub>c</sub> c	$bbT_c cbbZ_c cbbG_c cbbK_c cbbA_c c$	bbB <sub>c</sub> ClpC
<i>cbb<sub>p</sub></i> -Operon				
cbbR'	$cbbL_p cbbS_p cbbX_p cbbY_p cbbE_p$	$cbbF_p cbbP_p$	$cbbT_p cbbZ_p cbbG_p cbbK_p cbbA_p$	
P motallidura	me CH3/			-
cbb <sub>r</sub> -Operon	1110 VIIJ7			
cbbR.	cbbL, cbbS, cbbO, cbbO,			
00010	1 1 21 1			
<i>cbb</i> <sub>u</sub> -Operon	>			
$cbb_{II}$ -Operon	u cbbF <sub>11</sub> cbbP <sub>11</sub> cbbT <sub>11</sub> cbbZ <sub>11</sub> cbbG <sub>11</sub> cb	obK <sub>11</sub> cbbY <sub>11</sub> cbb	A <sub>11</sub> pyhA cbbJ <sub>11</sub> cbbI <sub>11</sub> hoxF hoxU hoxY	hoxH hoxW hox
$cbb_{II}$ -Operon $cbbR_{II}$	n cbbF <sub>11</sub> cbbP <sub>11</sub> cbbT <sub>11</sub> cbbZ <sub>11</sub> cbbG <sub>11</sub> cb	bbK <sub>11</sub> cbbY <sub>11</sub> cbb.	A <sub>II</sub> pyhA cbbJ <sub>II</sub> cbbI <sub>II</sub> hoxF hoxU hoxY	' hoxH hoxW hox.
$cbb_{II}$ -Operon $cbbR_{II}$ $cbbE_{I}$ H. thermolute	$_{II} cbbF_{II} cbbP_{II} cbbT_{II} cbbZ_{II} cbbG_{II} cb$	bbK <sub>11</sub> cbbY <sub>11</sub> cbb	A <sub>II</sub> pyhA cbbJ <sub>II</sub> cbbI <sub>II</sub> hoxF hoxU hoxY	' hoxH hoxW hox.
$cbb_{II}$ -Operon $cbbR_{II}$ $cbbE_{I}$ H. thermolute	n cbbF <sub>II</sub> cbbP <sub>II</sub> cbbT <sub>II</sub> cbbZ <sub>II</sub> cbbG <sub>II</sub> cb olus cbbQ cbbQ cbbY cbbA myk orfD8	obK <sub>II</sub> cbbY <sub>II</sub> cbb.	A <sub>II</sub> pyhA cbbJ <sub>II</sub> cbbI <sub>II</sub> hoxF hoxU hoxY	' hoxH hoxW hox
<i>cbb<sub>II</sub>-Operon</i> <i>cbbR<sub>II</sub> <sup>cbbE<sub>I</sub></sup> <b>H. thermolute</b> <i>cbbL cbbS o</i></i>	n cbbF <sub>11</sub> cbbP <sub>11</sub> cbbT <sub>11</sub> cbbZ <sub>11</sub> cbbG <sub>11</sub> cb olus cbbQ cbbO cbbY cbbA pyk orfD8	obK <sub>II</sub> cbbY <sub>II</sub> cbb.	A <sub>II</sub> pyhA cbbJ <sub>II</sub> cbbI <sub>II</sub> hoxF hoxU hoxY	( hoxH hoxW hox
cbb <sub>II</sub> -Operon cbbR <sub>II</sub> <sup>cbbE<sub>I</sub></sup> H. thermolute cbbL cbbS of	n cbbF <sub>11</sub> cbbP <sub>11</sub> cbbT <sub>11</sub> cbbZ <sub>11</sub> cbbG <sub>11</sub> cb <b>olus</b> cbbQ cbbO cbbY cbbA pyk orfD8	obK <sub>II</sub> cbbY <sub>II</sub> cbb	A <sub>11</sub> pyhA cbbJ <sub>11</sub> cbbI <sub>11</sub> hoxF hoxU hoxY	' hoxH hoxW hox
<i>cbb<sub>II</sub>-Operon</i> <i>cbbR<sub>II</sub> <sup>cbbE</sup> <b>H. thermolute</b> <i>cbbL cbbS</i></i>	n cbbF <sub>11</sub> cbbP <sub>11</sub> cbbT <sub>11</sub> cbbZ <sub>11</sub> cbbG <sub>11</sub> cb olus cbbQ cbbO cbbY cbbA pyk orfD8	obK <sub>II</sub> cbbY <sub>II</sub> cbb.	A <sub>II</sub> pyhA cbbJ <sub>II</sub> cbbI <sub>II</sub> hoxF hoxU hoxY	' hoxH hoxW hox
cbb <sub>II</sub> -Operon cbbR <sub>II</sub> cbbE <sub>1</sub> H. thermolute cbbL cbbS of N. europaea cbbR	n cbbF <sub>11</sub> cbbP <sub>11</sub> cbbT <sub>11</sub> cbbZ <sub>11</sub> cbbG <sub>11</sub> cb olus cbbQ cbbO cbbY cbbA pyk orfD8 cbbL cbbS cbbQ cbbO cbbN	obK <sub>II</sub> cbbY <sub>II</sub> cbb	A <sub>II</sub> pyhA cbbJ <sub>II</sub> cbbI <sub>II</sub> hoxF hoxU hoxY	' hoxH hoxW hox
cbb <sub>II</sub> -Operon cbbR <sub>II</sub> cbbE <sub>1</sub> H. thermolute cbbL cbbS of N. europaea cbbR	n cbbF <sub>11</sub> cbbP <sub>11</sub> cbbT <sub>11</sub> cbbZ <sub>11</sub> cbbG <sub>11</sub> cb olus cbbQ cbbO cbbY cbbA pyk orfD8 cbbL cbbS cbbQ cbbO cbbN	obK <sub>II</sub> cbbY <sub>II</sub> cbb.	A <sub>II</sub> pyhA cbbJ <sub>II</sub> cbbI <sub>II</sub> hoxF hoxU hoxY	' hoxH hoxW hox
cbb <sub>II</sub> -Operon cbbR <sub>II</sub> cbbE <sub>1</sub> H. thermolute cbbL cbbS of N. europaea cbbR	n cbbF <sub>11</sub> cbbP <sub>11</sub> cbbT <sub>11</sub> cbbZ <sub>11</sub> cbbG <sub>11</sub> cb olus cbbQ cbbO cbbY cbbA pyk orfD8 cbbL cbbS cbbQ cbbO cbbN	obK <sub>II</sub> cbbY <sub>II</sub> cbb.	A <sub>II</sub> pyhA cbbJ <sub>II</sub> cbbI <sub>II</sub> hoxF hoxU hoxY	' hoxH hoxW hox.

Legende (s. nächste Seite)

<u>γ-Proteoba</u>	kterien	
C. vinosum		
cbbR	$cbbL_{1}cbbS_{1}cbbQ$	cbbL <sub>II</sub> cbbS <sub>II</sub>
H. marinus M	H-110	
<i>cbb</i> <sub>I</sub> -Operon <i>cbbR</i> <sub>I</sub>	cbbL <sub>1</sub> cbbS <sub>1</sub> cbbQ <sub>1</sub> cbbO	1
cbb <sub>II</sub> -Operon	cbbL <sub>II</sub> cbbS <sub>II</sub> csoS2 csoS	3 orf csoS1 bfr
<i>cbb</i> <sub>m</sub> -Operon		
$cbbR_m$	cbbM cbbQ_ cbbO_ can	

### Abb. 22. Organisation von *cbb*-Operonen aus photo- und chemoautotrophen $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Proteobakterien.

α-Proteobakterien: *R. sphaeroides*, *R. palustris*, *R. capsulatus*, *R. rubrum*, *X. flavus*; β-Proteobakterien: *R. eutropha* H16, *R. metallidurans* CH34, *H. thermoluteolus*, *N. europaea*, *T. denitrificans*; γ-Proteobakterien: *C. vinosum* und *H. marinus* MH-110 (nach Kusian und Bowien, 1997; Shively et al., 1998; Terazono et al., 2001; Chain et al., 2003; Dubbs und Tabita, 2004; Wei et al., 2004; Yoshizawa et al, 2004; Sequenz von *R. metallidurans* CH34, http://genome.jgi-psf.org/mic\_home.html).

Gene und Genprodukte: cbbA, Fructose-1,6-bisphosphat-/Sedoheptulose-1,7-bisphosphat-Aldolase; cbbB, Genprodukt ähnelt der Formiat-Dehydrogenase; cbbE, Pentose-5-phosphat-Fructose-1,6-bisphosphatase/Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; 3-epimerase; cbbF, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; *cbbI*, Triosephosphat-Isomerase; cbbG. *cbbJ*, Ribose-5-phosphat-Isomerase; *cbbK*, Phosphoglycerat-Kinase; *cbbL* und *cbbS*, große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase; bzw. kleine cbbN, hypothetisches Protein; cbbP, Phosphoribulokinase; cbbO und cbbQ, Genprodukte mit unbekannter Funktion; cbbT, Transketolase; cbbX und cbbY, Genprodukte mit unbekannter Funktion; *cbbZ*, 2-Phosphoglycolat-Phosphatase; *cbbR*, Aktivatorgen; clpC, Clp-Protease; pykA, Pyruvat-Kinase; pntAA, NAD(P)-Transhydrogenase; RR1 und 2 potentielle ,Response'-Regulatoren; PAS, potentielle Hybrid-Sensor-Kinase mit PAS-Domäne; bfr, Bakterioferritin; can, Carboanhydrase; cso, carboxysomale Genprodukte; hox-Gene, Gene der löslichen NAD-abhängigen Hydrogenase: hoxF, α-Untereinheit; hoxU, γ-Untereinheit; *hoxY*,  $\delta$ -Untereinheit; *hoxH*,  $\beta$ -Untereinheit; *hoxW*, Hydrogenase-spezifische Endopeptidase und hoxI, aktivierende Untereinheit der löslichen Hydrogenase. Indices c, I, II und m bezeichnen chromosomal bzw. im cbb-Operon I, cbb-Operon II oder zusammen mit cbbM lokalisiert. Die Orientierung der Gene ist mit hellblauen Pfeilen dargestellt. Die Größenverhältnisse entsprechen nicht den realen. Die potentiellen oder bekannten Promotorregionen sind als schwarze Abschnitte dargestellt.

Den meisten bisher untersuchten cbb-Operonen geht ein stromaufwärts lokalisiertes, divergent orientiertes Gen des LysR-Typ-Transkriptionsregulators (LTTR) cbbR voraus. In einigen Fällen ist nur ein cbbR vorhanden, dessen Genprodukt beide cbb-Operone reguliert wie in R. sphaeroides und H. thermoluteolus (Chen et al., 1991; Gibson et al., 1991; Terazono et al., 2001). In anderen ist vor jedem Operon ein CbbR-Protein codiert wie bei R. capsulatus und R. metallidurans CH34 (Paoli et al., 1998). Da eine direkte Nachbarschaft des in trans wirkenden cbbR-Genprodukts für die Regulation der Operone nicht notwendig ist, könnte cbbR auch an einer anderen Position im Genom codiert sein. Ein besonderer Fall ist R. palustris, in dessen cbbLS-codierendem Operon zusätzlich zwei "Response'-Regulatoren eines Zwei-Komponenten-Systems zusammen mit einer Sensor-Kinase, die zwei potentielle PAS-Motive (Period, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator [ARNT] and singleminded; Hoffman et al., 1991) sowie eine potentielle PAC-Domäne (PAS-associated Cterminal motif) enthält, codiert sind (Dubbs und Tabita, 2004). In R. metallidurans CH34 sind die cbb-Gene anscheinend zusammen mit den hox-Genen der lösliche Hydrogenase in einem Operon organisiert, wodurch die Gene der CO<sub>2</sub>-Assimilation und der H<sub>2</sub>-Oxidation direkt gekoppelt sind. Dies wäre eine neuartige Organisation, obwohl eine enge Nachbarschaft von cbb-Operonen und hox-Genen bereits in R. eutropha H16 und Oligotropha carboxidovorans gefunden wurde. In diesen Organismen sind die Gene der löslichen Hydrogenase jeweils auf den Megaplasmiden pHG1 bzw. pHCG3 codiert und bilden zusammen mit den Genen der CO<sub>2</sub>-Assimilation sogenannte `Chemolithoautotrophie-Module' (Schwartz und Friedrich, 2001; Fuhrmann et al., 2003). Dies schließt im Fall von O. caboxidovorans zusätzlich die Gene der Kohlenmonooxid-Dehydrogenase (cox) mit ein (Fuhrmann et al., 2003). Im Gegensatz zu R. metallidurans CH34 sind die hox-Gene in R. eutropha H16 aber nicht Teil des cbb-Operons. Die Existenz eines weiteren Promotors in der intergenen, 126 bp umfassenden Region des cbb<sub>ll</sub>-Operons von R. metallidurans CH34 zwischen cbbI und hoxF wäre möglich, konnte aber aufgrund der Sequenz nicht bestätigt werden. Die Anordnung der hox-Gene (hoxFUYHW) ist relativ konserviert und in dieser Reihenfolge in R. eutropha H16, Rhodococcus opacus MR11 und R. metallidurans CH34 zu finden (Grzeszik et al., 1997; Burgdorf et al., 2005).

#### 4.1.2 Die *cbb*-Kontrollregionen

Der LTTR CbbR wurde in vielen chemoautotrophen und photosynthetischen Bakterien als Regulator der *cbb*-Gene identifiziert (Windhövel und Bowien, 1991; van den Bergh, 1993; Gibson und Tabita, 1993). LTTR binden im Allgemeinen an das Consensusmotiv T-N<sub>11</sub>-A, das häufig in einem Bereich 100 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes des Zieloperons lokalisiert ist (Goethals et al., 1992). Nach einem Vergleich der DNA-Sequenzen von CbbR-Bindebereichen in den *cbb*-Kontrollregionen von *X. flavus*, *T. ferrooxidans* und *R. eutropha* H16 wurde das alternative Bindemotiv TNA-N<sub>7</sub>-TNA vorgeschlagen (Abb. 23; Shively et al., 1998; van Keulen et al., 2003).

In X. flavus wurden drei CbbR-Bindemotive (IR1-3) festgestellt, von denen zwei sich gegenseitig überlappen (Abb. 23). Für alle drei Bindemotive wurde ihre Funktionalität bestätigt (van Keulen et al., 2003). Auch in R. eutropha H16 und T. ferrooxidans sind drei Bindemotive zu erkennen, die in der Sequenz von H16 innerhalb der nachgewiesenen zentralen Binderegionen von CbbR liegen. Dabei liegt IR1 innerhalb der ,Recognition'-Region (R-Region), die der initialen Bindung des Regulators dient. Die Binderegionen IR2 und IR3 sind im Bereich der ,Activation'-Region (A-Region) lokalisiert. Diese überlappt mit der `-35' des cbb-Promotors, weshalb eine direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase bei der Transkriptionsaktivierung angenommen wird (Kusian und Bowien, 1995). In der cbb-Kontrollregion von N. europaea wurden ebenfalls drei potentielle CbbR-Bindemotive gefunden (Abb. 23). R. capsulatus besitzt sowohl in der cbb<sub>l</sub>- als auch in der cbb<sub>l</sub>-Kontrollregion drei CbbR Bindemotive (Dubbs et al., 2004; Wei et al., 2004). Diese sind nach Ergebnissen von DNA-Bindungsexperimenten und "Footprint'-Analysen alle funktionell (Dubbs et al., 2004). Nach dem Vergleich der DNA-Sequenzen scheinen in der Region I zwischen cbbR<sub>1</sub> und cbbL des cbb<sub>1</sub>-Operons aus R. metallidurans CH34 ebenfalls drei potentielle CbbR Bindemotive vorzuliegen (T. Mahlmann und B. Bowien, persönliche Mitteilung). Von diesen liegt eines in einer potentiellen R-Region und die anderen beiden sich gegenseitig und den potentiellen Promotor überlappend in einer Region, die der A-Region aus *R. eutropha* H16 entsprechen würde (Abb. 23).



# Abb. 23. CbbR-Binderegionen verschiedener autotropher Organismen (Kusian und Bowien, 1995; Dubbs und Tabita, 1998; Terazono et al., 2001; van Keulen et al., 2003; Dubbs et al., 2004; Wei et al., 2004).

Gegenübergestellt sind die CbbR-Binderegionen stromaufwärts des cbbL-Gens (R. eutropha H16: chromosomales Operon, R. metallidurans CH34: cbb<sub>I</sub>-Operon; R. capsulatus: cbb<sub>I</sub>-Operon, H. thermoluteolus, N. europaea, X. flavus) sowie des  $cbbE_{H^{-}}$  (R. metallidurans CH34: *cbb<sub>II</sub>*-Operon) und *cbbF<sub>I</sub>*-Gens (*R. sphaeroides*: *cbb<sub>I</sub>*-Operon). Die konservierten Nucleotide des potentiellen oder bestätigten CbbR-Bindemotivs TNA-N7-TNA sind fett hervorgehoben. Die `-10' und `-35' Regionen der potentiellen oder verifizierten Promotoren sind umrahmt. Die CbbR-Binderegionen IR1, 2 und IR3 (X. flavus), EBR (Erweiterte CbbR-Binderegion) sowie R- und A-Region (R. eutropha H16) sind über der Sequenz eingezeichnet. Die für einige Organismen nachgewiesenen und einige potentielle Transkriptionsstartpunkte sind fett und kursiv gedruckt. Sequenzen von ,direct' oder ,inverted X. flavus; repeats' sind unterstrichen. Xf, Ht, *H. thermoluteolus*; Tf, T. ferrooxidans; Ne, N europaea; Ra, R. eutropha H16; Rs, R. sphaeroides; Rc I und II, *R. capsulatus* und Rm I und II, *R. metallidurans* CH34: *cbb<sub>I</sub>*- bzw. *cbb<sub>II</sub>*-Operon.

Nur zwei CbbR-Bindemotive scheinen dagegen in den *cbb*-Kontrollregionen von *H. thermolutoelus* und in der Region II von *R. metallidurans* CH34 vorhanden zu sein (Abb. 23). Diese überlappen wiederum mit der `-35' Region des potentiellen Promotors (Dubbs und Tabita, 1998; Terazono et al., 2001). Die LTTR OccR aus *Agrobacterium tumefaciens* und GltR aus *Bacillus subtilis* binden ebenfalls an zwei LTTR-Bindemotive in ihren jeweiligen Operatorregionen (Wang und Winans, 1995; Belitsky und Sonenshein,

1997). Eine Regulation, die durch die Bindung an nur ein LTTR-Bindemotiv vermittelt wird, zeigen dagegen SalR aus *Pseudomonas putida* und AmpR aus *Citrobacter freundii* (Bartowsky und Normark, 1993; Sato et al., 2001). Die unterschiedliche Lokalisation und Anzahl von LTTR-Bindemotiven gibt erste Hinweise für die Diversität der auf LTTR basierenden Genregulationen.

Die Struktur der  $\sigma^{70}$ -abhängigen Promotoren der *cbb*-Operone ist realtiv divers. Eine gewisse Konservierung ist in der `-35'-Region mit dem Sequenzmotiv TTTAC zu beobachten, von dem vor allem die drei Thyminreste in allen dargestellten Organismen wiederzufinden sind (Abb. 23). Die beiden distal gelegenen Thyminreste sind für die Aktivität des Promotors kritisch, wie die Analyse von Promotormutanten des *cbb*-Promotors aus *R. eutropha* H16 ergab. Ein Austausch dieser Thyminreste gegen Cytosin führte zu einem weitgehenden Verlust der Promotoraktivität (Jeffke et al., 1999). Die `-10'-Region der Promotoren weist dagegen keine auffälligen Gemeinsamkeiten auf. Die Sequenzen aller verglichenen Organismen haben im potentiellen CbbR-Bindebereich einen hohen A+T-Anteil. In *R. eutropha* H16 sinkt der G+C-Gehalt auf 52 mol% und ist damit deutlich geringer als der durchschnittliche G+C-Gehalt von 66.3 mol% (Windhövel und Bowien, 1991). Die Regulation der Expression durch LTTR umschließt im Allgemeinen auch eine Krümmung der DNA ein, die durch einen hohen A+T-Anteil der Sequenz erleichtert wird (Schell, 1993; Kusano und Sugawara, 1993).

#### 4.1.3 Interaktion von CbbR mit *cbb*-Kontrollregionen

Die CbbR-DNA-Interaktion und die Regulation der *cbb*-Genexpression wurden in einigen Organismen in den letzten Jahren intensiv studiert. Ein gemeinsamer Aspekt, der in allen näher untersuchten Organismen auftritt, ist die Krümmung der DNA aufgrund der CbbR-Bindung (Kusian und Bowien, 1995; Dubbs et al., 2000; Jeffke, 2001; van Keulen et al., 2003; Dubbs et al., 2004). Dies ist ein allgemeines Charakteristikum der LTTR, das neben einer reinen Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktion weitere Möglichkeiten der Regulation durch die Veränderung der DNA-Struktur eröffnet (Schell, 1993; Perez-Martin und de Lorenzo, 1997). Die Struktur-Veränderung wird bei LTTR durch ein Effektormolekül ausgelöst, das mit dem LTTR interagiert und eine positive oder negative Wirkung vermitteln kann (Schell, 1993). Ein Beispiel ist die Regulation des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters NhaA in *E. coli*, der unter anderem die Adaption an osmotischen Stress vermittelt. Die Expression des *nha*-Genes wird durch den LTTR NhaR reguliert. NhaR bindet an die Promotorregion von *nhaA*,

122

aber erst durch die Bindung von Na<sup>+</sup> als Induktor von NahR wird die Transkription induziert. Dabei wird eine Konformationsänderung des Proteins als Reaktion auf die Effektorbindung postuliert (Dover et al., 1996; Carmel et al., 1997).

Der einzige negative Effektor, der bisher für CbbR identifiziert wurde, ist Phosphenolpyruvat (PEP) im Fall von CbbR aus R. eutropha H16 (Grzesik et al., 2000). Als positive Effektoren wurden RuBP für den Regulator aus R. capsulatus und R. sphaeroides sowie NADPH für X. flavus und H. thermoluteolus vorgeschlagen (van Keulen, 1998; Terazono et al., 2001; Dubbs et al., 2004). In X. flavus bindet CbbR mit hoher Affinität an eine Region von -75 bis -50 und mit niedriger Affinität an eine Region von -44 bis -29 Nukleotide relativ zum Transkriptionstartpunkt des cbb-Operons. Es wird postuliert, dass in Gegenwart von NADPH die DNA-Bindung von CbbR auch an die Region mit niedriger Affinität gefördert wird. Die erste Region enthält ein CbbR-Bindemotiv (IR1). In der zweiten Region sind zwei überlappende CbbR-Bindemotive lokalisiert (IR2 und IR3; s. 4.1.2, Abb. 23). Analysen von mutierten Bindemotiven der CbbR-Binderegionen in X. flavus zeigten, dass für die Bindung an IR3 zunächst die Bindung eines CbbR-Dimers an IR1 nötig ist. Wurde IR3 so verändert, das keine CbbR-Bindung erfolgte, war die cbb-Promotoraktivität erhöht. Anhand dieser Ergebnisse wurde die Regulation der *cbb*-Gene in X. *flavus* nach dem ,sliding dimer<sup>-</sup>-Modell vorgeschlagen. Nach diesem Modell bindet in X. flavus ein CbbR-Dimer an die IR1 in der R-Region und ein zweites Dimer an IR3 in der A-Region und verursachen eine Krümmung der DNA um 64°. IR3 überlappt mit der `-35'-Region des Promotors und könnte so die Bindung der RNA-Polymerase verhindern. Die Zugabe von NADPH verursacht eine Translokation des einen CbbR-Dimers von IR3 nach IR2 und eine Relaxation der DNA-Krümmung um 9°. Nun wäre der Promotor für die RNA-Polymerase zugänglich und CbbR in der richtigen Position um möglichweise durch direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase die Transkription zu aktivieren (van Keulen et al., 2003). Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Regulation des cbb<sub>l</sub>-Operon aus R. capsulatus angenommen. Hier verursachte die Gegenwart von RuBP in ,Footprinting'-Analysen eine Reduktion des von CbbR<sub>I</sub> geschützten Bereiches der *cbb<sub>l</sub>*-Kontrollregion und den Verlust von zwei hypersensitiven Positionen. Dies deutet auf eine Veränderung der DNA-Krümmung und eine Translokation von CbbRI durch die Interaktion mit dem Effektor RuBP hin. CbbR<sub>II</sub> reagiert ähnlich in "Footprinting"-Analysen mit der cbb<sub>II</sub>-Kontrollregion. Allerdings war der RuBP-Effekt nur sehr gering. Mit 3-Phosphoglycerat, Fructose-1,6-bisphosphat oder HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup> als Effektoren war dagegen eine deutliche Reduktion der geschützten Region zu beobachten. Die beiden CbbR Proteine in *R. capsulatus* erkennen daher anscheinend unterschiedliche positive Effektoren. Beide reagieren mit einer gesteigerten DNA-Bindeaffinität in der Gegenwart von PEP, ohne dass die geschützten Bereiche im ,Footprint' verändert sind, was als eine Funktion von PEP als negativer Effektor interpretiert wird (Dubbs et al., 2004). Eine erhöhte DNA-Bindeaktivität in Gegenwart von PEP wurde auch für CbbR aus *R. eutropha* H16 nachgewiesen (Grzeszik et al., 2000). In *R. eutropha* H16 bindet CbbR an einen Bereich von ,-74' bis ,-29' relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Dieser Bereich umfasst die potentielle R- und A-Region und erweitert sich bei hohen CbbR Konzentrationen bis Position ,+13' (EBR; s. 4.1.2 Abb. 23). Die Bindung von CbbR an die A- und die R-Region verursacht eine DNA Krümmung von 48°. Bisher konnte außer PEP noch kein Effektor identifiziert werden, der einen sichtbaren Effekt auf die CbbR-DNA-Bindung *in vitro* hat. Die A-Region des CbbR-Bindebereiches überlappt auch in *R. eutropha* H16 mit dem Promotor und lässt so eine direkte Interaktion zwischen RNA-Polymerase und CbbR zu, wie sie bereits für den LTTR CysB aus *E. coli* nachgewiesen wurde (Kusian und Bowien, 1995; Lochowska et al., 2004).

Für CbbR<sub>I</sub> und CbbR<sub>II</sub> aus *R. metallidurans* CH34 konnte eine Bindung an die zugehörigen Binderegionen in Gelretardationsanalysen gezeigt werden (s. 3.3.1.2). Allerdings wurde mit keinem der getesteten potentiellen Effektoren eine Veränderung der Protein-DNA-Komplexe beobachtet. Möglicherweise ist ein weiterer Faktor an der Regulation beteiligt, wie er für R. eutropha H16 postuliert wird. Bei der Betrachtung der DNA-Protein-Komplexe in Gelretardationen fällt die hohe Mobilität des CbbR<sub>II</sub>-Komplexes von R. metallidurans CH34 im Vergleich zum CbbR<sub>I</sub>-Komplex auf. In einer vergleichenden Analyse der Regionen I und II aus R. metallidurans CH34 mit bekannten cbb-Kontrollregionen wurden in Region I drei, in Region II aber nur zwei potentielle CbbR-Bindemotive entdeckt (s. 4.1.2). Es wäre daher denkbar, dass unter anderem die Anzahl der gebundenen CbbR-Dimere diese Unterschiede in der Mobilität verursachten. Die Beobachtung, dass die Bindung von CbbRI und CbbRII an die jeweils andere Binderegion einen Komplex mit ähnlicher Mobilität verursacht, unterstützt die Hypothese, dass die Zahl der Bindemotive einen Einfluß auf die Mobilität der Komplexe hat. Die ,Über-Kreuz'-Bindung erfolgte mit deutlich reduzierter Affinität, was auf eine überwiegende Regulation des jeweils zugehörigen Operons schließen lässt. Die nahezu identischen Mobilitäten der Komplexe von CbbRI mit Region II und von CbbRII mit Region I in der Gelretardation im Vergleich zu den CbbR-DNA-Komplexen der homologen Regionen weist auf eine ähnliche Bindung und eine Fähigkeit zur kreuzweisen Regulation durch die beiden CbbRs hin.

Eine Bindung an die zum jeweils anderen *cbb*-Operon gehörige Promotorregion wurde auch mit CbbR<sub>I</sub> und CbbR<sub>II</sub> aus *R. capsulatus* nachgewiesen. Auch hier erfolgte die Bindung mit geringerer Affinität als an die homologe Promotorregion (Dubbs et al., 2004). Eine Bindung an zwei verschiedene *cbb*-Kontrollregionen zeigten auch die CbbR aus *H. thermoluteolus* und *R. sphaeroides* (Dubbs et al., 2000; Terazono et al., 2001; Dubbs und Tabita, 2003).

Die Mobilität von Protein-DNA-Komplexen in der Gelretardation wird durch die Masse der gebundenen Proteine und durch die von ihnen verursachte Krümmung der DNA bestimmt. Veränderungen in der Mobilität von Komplexen können daher Aufschluß über eine Veränderung der Struktur der Protein-DNA-Komplexe geben (Lane et al., 1992). Der heterologe Komplex von CbbR<sub>H16</sub> mit Region II aus *R. metallidurans* CH34 zeigte im Vergleich zu dem homologen Komplex nur eine leicht veränderte Mobilität. Dies könnte auf eine zu CbbR<sub>II</sub> ähnliche Bindung und eine ähnliche Struktur des Protein-DNA-Komplexes hindeuten, so dass eine Regulation des *cbb*<sub>II</sub>-Operons durch CbbR<sub>H16</sub> denkbar wäre. Der Komplex von CbbR<sub>H16</sub> und Region I hat dagegen eine deutlich veränderte Mobilität und daher wahrscheinlich auch eine andersartige Struktur als der homologe Komplex. Eine deutliche Veränderung der Mobilität war ebenfalls bei den DNA-Protein-Komplexen von CbbR<sub>I</sub> und CbbR<sub>II</sub> mit der *cbb*-Kontrollregion aus H16 zu beobachten. Diese Abweichung deutet auf eine modifizierte Topologie der Protein-DNA-Komplexe hin. Diese kann sowohl positive als auch negative Effekte auf die Regulation der *cbb*-Gene im heterologen Wirt haben.

#### 4.1.4 Die Regulation von *cbb*-Genen

Die Modulation der *cbb*-Genexpression ist in den einzelnen Organismen ganz unterschiedlich. Den meisten Organismen gemeinsam ist aber eine zusätzliche Induktion der Expression unter CO<sub>2</sub>-limitierenden Bedingungen, wie sie bei *R. eutropha* H16, *N. europaea* und *H. marinus* MH-110 zu beobachten ist (Friedrich, 1982; Wei et al., 2004; Yoshizawa et al., 2004).

Sekundäre Strukturen innerhalb einiger Operone sorgen für eine den Bedürfnissen des Organismus entsprechende Expression der einzelnen *cbb*-Gene. Eine Haarnadelstruktur stromabwärts von *cbbS* in *R. eutropha* H16 und *N. europaea* führt zu einer vorzeitigen Termination der Transkription und verursacht so eine verstärkte Expression von *cbbLS* relativ zu den anderen Genen (Schäferjohann et al., 1996; Wei et al., 2004). Der hohe Energiebedarf des CBB-Cyclus macht eine enge Kopplung der Regulation mit dem Energiestatus der Zelle notwendig. In *N. europaea* werden die Gene daher auch nur exprimiert, wenn eine externe

Energiequelle angeboten wird (Wei et al., 2004). Als Signal, das den Energiestatus der Zelle an den Transkriptionsregulator weitergibt, wird NADPH in *H. thermoluteolus* und *X. flavus* interpretiert, das bei den CbbR aus diesen Organismen eine Veränderung der Protein-DNA-Interaktion verursacht (s. 4.2.2). Ist keine Kohlenstoffquelle verfügbar, wird weniger NADPH in biosynthetischen Reaktionen verbraucht, so dass dessen Spiegel in den Zellen steigt. Dies induziert schließlich die Expression der *cbb*-Gene (Shively et al., 1998). Der direkte Einfluss von NADPH auf die *cbb*-Genexpression *in vivo* wurde aber bisher noch nicht nachgewiesen.

Eine starke Induktion der Expression der *cbb*-Operone erfolgt in *R. eutropha* H16 unter lithound organoautotrophen Wachstumsbedingungen. Bei Wachstum auf manchen heterotrophen Substraten wie Fructose oder Gluconat findet eine partielle Derepression der Operone statt, während auf Pyruvat das Operon vollkommen reprimiert wird. Diese Repression wird zumindest teilweise auf die Wirkung von PEP auf CbbR zurückgeführt, das *in vitro* zu einer völligen Repression der Transkription führte (Grzeszik et al., 2000). Auf welche Weise PEP mit CbbR interagiert, ist noch unklar, aber Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit mit mutierten CbbR lassen auf eine direkte Bindung des Effektors an den Regulator schließen (s. 3.3 und 4.2). Eine Phosphorylierung von CbbR durch PEP wurde dagegen weitgehend ausgeschlossen (B. Kusian und B. Bowien, persönliche Mitteilung). PEP als zentraler Metabolit des Kohlenstoffwechsels und indirektes Produkt des CBB-Cyclus dient daher wahrscheinlich als Signal für die Verfügbarkeit einer C-Quelle. Die vermehrte Bildung von PEP beim Wechsel der Zellen von autotrophem zu heterotrophem Wachstum signalisiert der Zelle eine ausreichende Kohlenstoffversorgung und führt zur Repression der *cbb*-Gene.

Die in *R. eutropha* H16 beobachtete heterotrophe Derepression wird auf eine vom Substrat abhängige, verminderte PEP-Konzentration in der Zelle zurückgeführt (Grzeszik et al., 2000, Jeffke, 2001). Diese Hypothese wird von der Beobachtung unterstützt, dass die heterotrophe Derepression in Zellen, die mit N-Acetylglucosamin wachsen, besonders ausgeprägt ist. Zur Aufnahme von N-Acetylglucosamin in die Zelle wird ein spezielles Phosphotransferase-System (PTS) benötigt, das von *E. coli* bekannt ist (Plumbridge, 2001a) und zu dem ein ähnliches System im Genom von *R. eutropha* H16 codiert ist. Bei der Aufnahme von Zuckern über das PTS wird PEP als Donor der Phosphatgruppe benötigt (Postma et al., 1993). Die PEP-Konzentration in der Zelle dürfte beim Wachstum von *R. eutropha* auf N-Acetylglucosamin daher relativ niedrig sein und zu dieser deutlichen heterotrophen Derepression führen (s. 3.2.4.3.2). Eine reprimierende Wirkung von PEP auf die

*cbb*-Genexpression wird auch für *R. capsulatus* angenommen. Daneben wurde für eine Reihe weitere Metabolite ein Effekt auf die DNA-Bindung der beiden CbbR-Proteine aus *R. capsulatus* beobachtet (s. 4.1.3). Als physiologisch relevant für die Regulation des *cbb<sub>1</sub>*-Operons wird der Effekt von RuBP auf CbbR<sub>1</sub> betrachtet. In RubisCO-Mutanten wurde eine Induktion der *cbb*-Genexpression beobachtet. Dies war aber nur der Fall, wenn ein funktionelles Gen der Phosphoribulokinase (*cbbP*) vorhanden war. Unter dieser Voraussetzung konnte RuBP akkumuliert werden und die Expression induzieren. CbbR<sub>II</sub> scheint dagegen mit anderen Metaboliten stärker zu interagieren. Für CbbR<sub>II</sub> werden Fructose-1,6-bisphosphat und 3-Phosphoglycerat als Signal des Kohlenstoffwechsels vorgeschlagen. Dass die beiden CbbR-Proteine aus *R. capsulatus* auf unterschiedliche Effektoren reagieren, wird auf ihre unterschiedliche Herkunft durch lateralen Gentransfer zurückgeführt (Tichi und Tabita, 2002; Dubbs und Tabita, 2004; Dangel et al, 2005).

Alle in Bindungsstudien mit den beiden CbbR-Proteinen aus *R. metallidurans* CH34 getesteten potentiellen Effektoren, auch PEP, bewirkten keine Veränderungen der DNA-Protein-Komplexe und ihrer Mobilität (s. 3.4.1.2). Dies steht mit der Beobachtung im Einklang, das in *R. metallidurans* CH34 keine heterotrophe Derepression wie in *R. eutropha* H16 zu beobachten ist (Mergeay et al., 1985). Die *cbbR*<sub>11</sub>-Deletionsmutante von CH34 zeigte nur sehr langsames Wachstum unter lithoautotrophen Bedingungen. Dies deutet auf eine vorwiegende Regulation der beiden *cbb*-Operone durch die jeweils zugehörigen CbbR-Proteine hin. Da die Mutante aber noch zu einem geringfügigen Wachstum fähig war, scheint eine ,Cross'-Regulation zwischen den Operonen mit sehr geringer Effizienz möglich zu sein. Dies entspricht der *in vitro* beobachteten Bindung mit geringer Affinität an die jeweils ,nicht zugehörige' *cbb*-Kontrollregion. Eine ,Cross'-Regulation der beiden *cbb*-Operone mit geringer Effizienz wird auch für *R. capsulatus* postuliert, während in *R. sphaeroides* beide *cbb*-Operone von nur einem CbbR reguliert werden (Gibson und Tabita, 1993; Dubbs et al., 2004).

*R. capsulatus* und *R. sphaeroides* weisen ein differenziertes Muster der *cbb*-Genexpression auf. In diesen Organismen dient der CBB-Cyclus nicht nur der CO<sub>2</sub>-Assimilation, sondern auch der Aufrecherhaltung der Redox-Balance durch den Verbrauch überschüssiger Reduktionsäquivalente während des photoheterotrophen Wachstums. Bei letzterer spielt in *R. sphaeroides* vor allem die Form II-RubisCO eine Rolle, da in photoheterotroph wachsenden Zellen die Expression des *cbb*<sub>II</sub>-Operons gegenüber dem *cbb*<sub>I</sub>-Operon deutlich erhöht ist. Ebenso wird unter diesen Bedingungen, aber auch beim chemoautotrophen

Wachstum, in R. capsulatus nur das cbb<sub>II</sub>-Operon exprimiert. In R. sphaeroides wird dagegen unter chemoautotrophen Bedingungen -gemäß der Hauptfunktion der Form I-RubisCO bei der CO<sub>2</sub>-Assimilation in diesem Organismus- das *cbb<sub>I</sub>*-Operon stärker induziert. Beide Operone werden in *R. sphaeroides* unter anaeroben photoautotrophen Bedingungen voll exprimiert genauso wie die beiden Operone in R. capsulatus. Diese Regulation wird in R. sphaeroides durch das stromaufwärts vom cbb<sub>l</sub>-Operon codierte CbbR vermittelt. Dabei ist die Regulation der beiden Operone voneinander abhängig. Ist die Expression der RubisCO in einem der Operone unterbunden, wird dieses durch eine gesteigerte Expression des anderen Operons kompensiert. In R. capsulatus regulieren die CbbR-Proteine dagegen vorwiegend das jeweils zugehörige Operon (Dubbs und Tabita, 2004; Dubbs et al., 2004), wie es hier auch für die cbb-Operone von R. metallidurans CH34 postuliert wird. CbbR<sub>I</sub> von R. capsulatus ist jedoch in der Lage, in einer  $cbbR_{II}$ -Mutante die Expression des  $cbb_{II}$ -Operon zu induzieren (Vichivanives et al., 2000). Aber selbst in einer *cbbR*-Doppelmutante ist noch eine partielle Expression des cbb<sub>II</sub>-Operons zu beobachten. Dies lässt auf weitere an der cbb-Regulation in R. capsulatus beteiligte Proteine schließen. Das mag auch für das cbb<sub>ll</sub>-Operon von R. metallidurans CH34 gelten. Eines der beteiligten Proteine in R. capsulatus wurde bereits mit dem ,Response'-Regulator RegA des Zwei-Komponenten-Systems RegBA identifiziert. Von diesem System wird angenommen, dass es den Redox-Status der Zelle ermittelt und die Aktivität Energie verbrauchender Prozesse wie den CBB-Cyclus auf diesen abstimmt (Dubbs und Tabita, 2004). Auch in R. sphaeroides ist das homologe PrrBA-System an der Regulation der cbb-Gene beteiligt. Zusätzlich wurden aus diesem Organismus aber noch zwei weitere Proteine isoliert, die an die cbb<sub>II</sub>-Kontrollregion binden und bei der cbb-Genregulation eine Rolle spielen könnten (Dubbs und Tabita, 2003). Die Integration des CBB-Cyclus in den Zellstoffwechsel scheint daher neben CbbR noch mehr Faktoren zu benötigen, was auch für R. eutropha H16 postuliert wird (Jeffke et al., 1999). In R. palustris gibt es Hinweise, dass ein neuartiges Zwei-Komponenten-System (R1-R2/PAS), welches innerhalb des cbb1-Operons codiert ist, ebenfalls an der Regulation der *cbb*-Gene beteiligt ist (Dubbs und Tabita, 2004).

4.1.5

In phänotypischen Komplementationsstudien mit cbbR-Defektmutanten von R. eutropha H16 und R. metallidurans CH34 wurde überprüft, ob diese durch cbbR-Gene des jeweils anderen Organismus kompensiert werden können. Wie erwartet, stellte die Komplementation mit dem homologen cbbR<sub>II</sub> die Fähigkeit der cbbR<sub>II</sub>-Deletionsmutante von CH34 zum autotrophen Wachstum wieder her. Damit wird die Vermutung bestätigt, dass CbbR<sub>II</sub> für die Induktion der Expression des  $cbbR_{II}$ -Operons nötig ist. Die heterologe Komplementation mit cbbR aus H16 war dagegen nicht erfolgreich, obwohl in vitro eine Bindung von CbbR<sub>H16</sub> an die Region II von CH34 gefunden wurde. Dieser Komplex zeigte aber im Vergleich zum homologen CbbR<sub>II</sub>-Komplex eine leicht erhöhte Mobilität, was auf abweichende Bindung an den Operator und eine Veränderung der DNA-Krümmung hindeuten könnte, wodurch eine Induktion der Expression verhindert würde. Denkbar wäre aber auch, dass in CH34 andere CbbR-Effektoren die Expression des Operons kontrollieren als in R. eutropha H16 und diese mit CbbR<sub>H16</sub> nicht in der erforderlichen Weise interagieren, wie sie für eine positive Regulation notwendig ist. Dies würde allerdings überraschen, da sowohl CbbR<sub>ICH34</sub> als auch CbbR<sub>IICH34</sub> die *cbbR*-Deletionsmutante von H16 komplementieren konnten. Die Beobachtung unterstützt aber die Hypothese eines zusätzlichen *cbb*-Trankriptionsfaktors in R. eutropha H16, der mit einem positiven Effektor interagiert und die Induktion der Expression durch eine synergistische Interaktion mit CbbR vermittelt. Dieser Faktor würde dann mit den CbbR-Proteinen aus CH34 erfolgreich interagieren können, auch wenn der DNA-CbbR-Komplex in vitro nicht dem homologen Komplex entsprach. In CH34 mag dagegen dieser zusätzliche Faktor nicht vorhanden oder so verändert sein, dass keine erfolgreiche Interaktion mit CbbR aus H16 mehr möglich ist. Eine Induktion der cbb-Transkription in H16 durch die veränderte Struktur der heterologen CbbR<sub>CH34</sub>-Komplexe mit der cbb-Kontrollregion von H16 wäre allerdings auch denkbar. In Studien mit  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionen des *cbb<sub>l</sub>*-Promotors von *R. sphaeroides* in *R. capsulatus* wurde gezeigt, dass weder CbbR<sub>I</sub> noch CbbR<sub>II</sub> den fremden *cbb<sub>I</sub>*-Promotor aktivieren konnten (Tichi und Tabita, 2002). Die nahe Verwandtschaft der Organismen bedeutet anscheinend nicht, dass ein Austausch der Regulatoren immer möglich ist.

#### 4.2 Effekte von Mutationen in *cbbR*

Die LTTR sind weit verbreitet und in Bakterien, Archaeen und Chloroplasten zu finden (Schell, 1993). Sie werden als eine der größten Familie DNA-bindender Proteine mit inzwischen bis zu 800 Mitgliedern angesehen (Zaim und Kierzek, 2003). In *E. coli* K12 sind 15 % der als Regulatoren identifizierten Proteine LTTR (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000). LTTR aktivieren in der Regel die Transkription von Operonen oder Regulonen. Die von LTTR regulierten Gene sind sehr divers und reichen von der CO<sub>2</sub>- und N<sub>2</sub>-Fixierung über katabolische Systeme bis zum oxidativen Stress und der Virulenz (Schell, 1993, 2000).

Funktion und Identität des konservierten, N-terminal lokalisierten, DNA-bindenden Helix-Turn-Helix-Motivs der LTTR sind durch Analyse von Mutanten und der Struktur einiger Proteine bestätigt worden. OxyR ist ein Transkriptionsfaktor in E. coli, der durch Oxidation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert wird und die Gene für den Schutz vor oxidativen Stress induziert (Choi et al., 2001). Nach einer anhand der Ähnlichkeit mit ModE aus E. coli erstellten Modellstruktur von OxyR enthält die DNA-Binderegion drei α-Helices (Zaim und Kierzek, 2003). Dies wurde durch die Strukturanalyse von CbnR bestätigt (Muraoka et al., 2003). CbnR vermittelt in Ralstonia eutropha NH9 die Expression der Gene zum Abbau von Chlorocatechol in Gegenwart des positiven Effektors cis, cis-Muconat (Ogawa et al., 1999). Die Kristallstruktur von CbnR ist die erste eines vollständigen LTTR. CbnR liegt in dem Kristall als Tetramer vor, das aus zwei Homodimeren gebildet wird. In jedem Dimer nehmen die Untereinheiten zwei unterschiedliche Konformationen, kompakt und gestreckt, ein. Über eine "Linker'-Helix ist die DNA-bindende Domäne mit der regulatorischen Domäne verbunden (Muraoka et al., 2003). Die geringere Konservierung der regulatorischen C-terminalen Domäne der LTTR wird auf die spezifische Effektorbindung zurückgeführt. Die LTTR-Effektoren sind sehr divers und stehen häufig in einem engen Zusammenhang mit der Funktion der regulierten Gene. Meist ist die Anwesenheit der Effektoren nicht für die DNA-Bindung notwendig, bewirkt aber eine Konformationsänderung der LTTR, die zu einer Aktivierung der Transkription führt (Akakura und Winans, 2002a; Schell, 1993). So haben die β-Lactam-Antibiotika eine aktivierende Wirkung auf AmpR aus Citrobacter freundii, der daraufhin die Expression der β-Lactamase induziert (Bartowsky und Normark, 1993). Bisweilen wirken nicht nur ein, sondern mehrere Effektoren auf den Transkriptionsregulator. Effektoren können bei der Modulation der Regulation eine induzierende oder reprimierende Aktivität des LTTR vermitteln. Als Effektor mit reprimierenderWirkung auf die cbb-Genexpression wurde für CbbR aus R. eutropha H16 PEP identifiziert (Grzeszik et al., 2000). Eine aktivierende

130

Wirkung auf die Expression der *cbb*-Gene in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* hat Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) (Tichi und Tabita, 2002). In *X. flavus* und *H. thermoluteolus* gibt es entsprechende Hinweise auf NADPH (van Keulen et al., 2003; Terazono et al., 2001).

Ebenso wie die Effektoren selbst sind die Reaktionen der LTTR auf die Effektorbindung sehr unterschiedlich. OccR aus Agrobacterium tumefaciens induziert bei der Bindung an den Promotor des occ-Operons, das zur Aufnahme und Abbau von Octopin benötigt wird, eine Krümmung der DNA. Diese wird in Gegenwart des Signalmoleküls Octopin verringert, wodurch ein produktiver Kontakt mit der RNA-Polymerase ermöglicht wird (Akakura und Winan, 2002a). Eine Relaxation der DNA-Krümmung durch die Interaktion mit einem Effektor wurde auch für CatR am Promotor des catBCA-Operons beobachtet, dass für den Abbau von Catechol benötigt wird (McFall et al., 1997). Dagegen führt die Bindung von TrpI aus Pseudomonas spp. an den trpAB-Promotor zu einer Krümmung, die durch den Effektor Indolglycerolphosphat noch verstärkt wird (Pineiro et al., 1997). Bei einigen LTTR, wie TrpI und NahR, wird diese Veränderung der DNA-Topologie durch eine Vermehrung der gebundenen Protomere hervorgerufen (Pineiro et al., 1997; Schell und Poser, 1989). In anderen Fällen wie bei OccR verändert sich die Zahl der gebundenen Protomere nicht (Wang und Winans, 1995). Das bedeutet, dass die Strukturänderung durch eine Konformationsänderung der Transkriptionsregulatoren als Reaktion auf die Effektorbindung erfolgt. Eine Translokation der gebundenen Protomere hat einen ähnlichen Effekt und wurde für OxyR aus E. coli und CbbR aus X. flavus beobachtet (Choi et al., 2001; van Keulen et al., 2003).

Die Charakterisierung mutierter LTTR, die nicht mehr funktionell oder konstitutiv aktiv waren, zeigte eine Häufung der Mutationen im Helix-Turn-Helix-Motiv und im C-terminalen Bereich, für (Jorgensen und Dandanell, 1999; Kullik et al., 1995a; Schell et al., 1990). Diese C-terminale regulatorische Domäne kann in zwei Unterdomänen aufgeteilt werden, zwischen denen wahrscheinlich die Effektorbindung erfolgt (Muraoka et al., 2003). Zur Identifikation von an der Effektorbindung beteiligten Aminosäureresten in CbbR von *R. eutropha* H16 wurden in dieser Arbeit Punktmutationen in den Teil des Gens eingeführt, der die konservierten Bereiche der postulierten regulatorischen Domäne codiert (s. Abb. 24). Durch eine Analyse der Expression des *cbb*-Operons in einer mit den mutierten Genen komplementierten *cbbR*-Nullmutante und der DNA-Bindung der veränderten Proteine in Gelretardationen sollte die Rolle der einzelnen Aminosäuren aufgedeckt werden (s. 3.3).



#### Abb. 24. Positionen der gezielt mutierten Aminosäurereste in CbbR<sub>H16</sub>.

Mutationen, die eine konstitutive Aktivität vermitteln, sind mit ●, Mutationen, die zu einer reduzierten Induktion führten, mit ■ gekennzeichnet. Funktionelle Domänen sind als farbige Rechtecke dargestellt. H-T-H, Helix-Turn-Helix-Motiv; RDI und RDII, potentiell an der Effektorerkennung beteiligte Domänen I und II.

Alle mutierten CbbR<sub>H16</sub> verursachten eine verminderte Repression des *cbb*-Operons beim Wachstum von H16 auf Pyruvat, einem Substrat, das normalerweise zu einer vollständigen Repression des Operonpromotors  $p_{cbbL}$  führt. Die Repression von  $p_{cbbL}$  dürfte zumindest teilweise durch die verstärkte Bindung des Transkriptionsregulators CbbR vermittelt werden, die auf einer Interaktion von CbbR mit PEP beruht (Grzeszik et al., 2000; Jeffke, 2001). Unter Bedingungen der autotrophen CO<sub>2</sub>-Assimilation und des mixotrophen Wachstums wird die Expression des *cbb*-Operons induziert. Die Abschwächung der Repression könnte auf eine verringerte Bindung des negativen Effektors PEP an die mutierten CbbR<sub>H16</sub> hindeuten. Die verminderte Interaktion von CbbR<sub>H16</sub> mit PEP würde eine verstärkte DNA-Bindung des Transkriptionsregulators an den Operator verhindern. Damit bliebe der intensive Kontakt zwischen CbbR und der DNA aus, und die strikte Repression würde abgeschwächt.

Mit *cbbR*-Deletionsmutanten ist schon zuvor nachgewiesen worden, dass CbbR für die Expression der *cbb*-Gene essentiell ist (Windhövel und Bowien, 1991; Jeffke et al., 1999). CbbR von *R. eutropha* H16 muss daher neben dem negativen Effektor PEP direkt oder indirekt mit einem Induktor interagieren. Eine Interaktion mit mehreren Effektoren wurde bereits von anderen LTTR berichtet. So reguliert CysB in *E. coli* und *Salmonella thyphimurium* Gene des Schwefelmetabolismus. Für die Expression des *cys*-Regulons unter Schwefel-limitierenden Bedingungen sind CysB und der Induktor N-Acetyl-L-Serin notwendig. Ist genügend Schwefel vorhanden, wirkt Thiosulfat für die *cys*-Gene und 5'-Phosphosulfat auf die Gene des Transporters *ssu* über CysB reprimierend (Hryniewicz und Kredich, 1991, Bykowski et al., 2002). Die Wirkung mehrer Effektoren wurde auch für ClcR, dem Regulator der Gene des 3-Chlorocatechol-Abbaus in *Pseudomonas putida*, nachgewiesen. Führt 2-Chloro-*cis, cis*-muconat zu einer Steigerung der Transkription, wird

diese durch die Interaktion des Regulators mit Fumarat wieder herunterreguliert (McFall et al., 1997). Im Gegensatz dazu wirken in dem Bodenbakterium *Acinetobacter* Stamm ADP1 Benzoat und *cis,cis*-Muconat synergistisch aktivierend auf BenM, der neben anderen Genen des Aromatenabbaus die Expression des *ben*-Operons reguliert. Die Interaktion mit beiden Effektoren führt zu einer Steigerung der Expression (Bundy et al., 2002).

Konstitutive, aber auch zusätzlich induzierbare Aktivitäten nach Mutationen im C-terminalen Bereich von LTTR wurden schon zuvor bei OccR, NahR, CysB und CbbR aus R. sphaeroides beobachtet und als Folge einer veränderten Interaktion zwischen dem Protein und dem Effektor interpretiert (Lochowska et al., 2001; Akakura und Winan, 2002b; Dangel et al, 2005; Park et al., 2005). Modellstudien konstitutiver oder nicht mehr induzierbarer CysB-Varianten zeigten nur geringfügige Änderungen der Struktur aufgrund von Punktmutationen im Gen (Lochowska et al., 2001). Eine fundamentale Veränderung der Struktur duch die eingeführten Mutationen ist daher auch für CbbR<sub>H16</sub> unwahrscheinlich. Dafür spricht auch die unveränderte oder sogar verminderte Induktion der Expression unter induzierenden Bedingungen durch CbbRR135C, A175E, W274R und G203L. Nur die Mutation G205E führte zu einer leicht gesteigerten Expression des cbb-Operons. Dieses Protein könnte daher in seiner Konformation dem aktivierenden CbbR angenähert sein. Trotzdem zeigte aber das *cbb*-Operon auch bei der Komplementation mit CbbRG205E noch das Regulationsmuster des Wildtyps. Der Erhalt der Induzierbarkeit der Genexpression wurde auch bei konstitutiven Mutanten von OccR (R202P) beobachtet. Tatsächlich reagierten einige empfindlicher auf den positiven Effektor Octopin (Akakura und Winan, 2002b). Die zu R135C und G205E in CbbR<sub>H16</sub> analogen Mutationen in CbbR aus *R. sphaeroides* (R136C und G206E) vermittelten ebenfalls eine im Vergleich zum Wildtyp konstitutive Expression des cbb<sub>l</sub>-Operons. Allerdings wurde die Expression des *cbb<sub>l</sub>*-Operons durch CbbR<sub>Rs</sub>G206E unter photoheterotrophen Bedingungen nicht mehr zusätzlich induziert, während CbbRR136C eine starke Induktion hervorief (Dangel et al., 2005). In R. eutropha H16 präsentiert sich ein gegensätzliches Bild: CbbRG205E vermittelte eine deutlich höhere Expression als CbbRR135C, und bei beiden blieb die Induzierbarkeit der *cbb*-Expression erhalten. In beiden Organismen sind diese Reste daher anscheinend an der Interaktion mit einem Effektor beteiligt, in R. sphaeroides ist dies der positive Effektor RuBP, in R. eutropha H16 der negative Effektor PEP. Dieser Vermutung gemäß ist die Repression in H16 verringert, die Induktion der Expression aber kaum verändert.

Dass CbbR und ein weiterer bereits zuvor postulierter Faktor für die Induktion der cbb-Genexpression in R. eutropha H16 notwendig ist, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Mutationen A175E und G203L eine verminderte Repression vermitteln, aber auch in der Induktion der cbb-Expression gestört sind. Ein Sonderfall ist CbbRW274R bei dem die Verminderung der Induktion am deutlichsten ausgeprägt ist. Das mutierte Protein neigte bei der Überproduktion zur Bildung von Einschlusskörpern. Auch durch Co-Expression mit Chaperonen konnte es nicht soweit stabilisiert werden, dass es in Gelretardationsexprimenten einen Protein-DNA-Komplex mit der cbb-Kontrollregion bildete. Dieser Befund deutet auf eine Funktion dieses Aminosäurerestes bei der Oligomerisierung des Proteins hin. Gereinigtes CbbR<sub>H16</sub> liegt bei Raumtemperatur in Lösung als Dimer vor, bildet aber bei einer Erniedrigung der Temperatur Tetramere (Kusian, 1994). Es wurde bisher vermutet, dass CbbR als Dimer an die DNA bindet. Nach dem Strukturmodell von CbnR wird die Dimerisierung allerdings nicht von Resten im C-Terminus, sondern von Aminosäuren in der Helix, welche die DNA-bindende und die regulatorische Domäne verbindet, vermittelt. Die Tetramerisierung beruht dagegen auf einer Interaktion der C-terminalen Aminosäuren (Muraoka et al., 2003). Dass der C-Terminus bei der Oligomerisierung eine Rolle spielt, zeigen verkürzte Varianten von CysB und NahR, in denen die C-terminale Region entfernt wurde und die ihre Fähigkeit zur Oligomerisierung verloren (Lochowska et al., 2001; Schell et al. 1990). Die essentielle Rolle von proximal zur C-terminalen Region positionierten Aminosäuren für die DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung durch LTTR, zeigt auch die Isolierung von AmpR-(Y264N), NahR-(Bereich 239-246), OxyR-(E225K) und CysB (N309Ter)-Mutanten, welche die Transkription nicht mehr induzieren konnten. Bei NahR und AmpR gingen die Mutationen wie bei CbbRW274R mit einem Verlust der DNA-Bindeaktivität einher, während CysB noch als Dimer binden, aber eine cysB-Mutante nicht mehr komplementieren konnte (Schell et al., 1990; Bartowsky und Normark, 1991; Kullik et al., 1995a; Lochowska et al., 2001). In Anlehnung an die Struktur von CbnR wäre daher eine Bindung von CbbR<sub>H16</sub> als Tetramer möglich. Die Bildung des Tetramers oder Dimers ist in CbbR<sub>H16</sub>W274R wahrscheinlich so behindert, dass in vitro keine und in vivo nur eine geringfügige Bindung an die DNA und damit eine Induktion auf sehr niedrigem Niveau erfolgt.

Alle Mutationen in Cbb $R_{H16}$  liegen bis auf W274R und A175E, in Anlehnung an die Struktur von CbnR und einem Modell von CbbR aus *R. sphaeroides*, in einer Tasche, die von den beiden Subdomänen der regulatorischen Domäne gebildet wird (Muraoka et al, 2003; Dangel

et al., 2005). Dort sind sie auf den beiden gegenüberliegenden Schlaufen (,loops') 15 (G203, G205) und 13 (R135) lokalisiert. Bei CbbR<sub>Rs</sub> wird für diesen Bereich die Bindung des Induktors RuBP angenommen (Dangel et al., 2005). Aufgrund der Kristallstruktur von DntR und CysB wird auch für diese LTTR eine Bindung des Effektors zwischen den Schlaufen 13 und 15 postuliert (Tyrell et al., 1997; Smirnova et al., 2004). Nach dem Modell sind die Mutationen W274R und A175E auf den beiden Verbindungregionen (,cross-over regions') zwischen den Subdomänen I und II der regulatorischen Domäne lokalisiert. W274R liegt auf der Verbindung 3b, die den Boden der postulierten Effektor-bindenden Tasche bildet, und könnte daher ebenfalls noch mit dem Effektor interagieren. A175E ist auf der Verbindung 3a lokalisiert. Da diese durch die Verbindung 3b von der Effektor-bindenden Tasche abgeschirmt wird, ist es wahrscheinlich, dass die verringerte Induktion der Expression der cbb-Gene durch CbbR<sub>H16</sub>A175E auf einer Veränderung der Struktur beruht. Diese könnte indirekt auf die Effektorbindung wirken oder Einfluss auf Stabilität oder Oligomerisierung des Proteins haben. Für letzteres spricht die Instabilität des Proteins nach der heterologen Überproduktion in *E. coli* (s. 3.3.3). CbbR<sub>H16</sub>A175E konnte erst nach der Co-Produktion mit den Chaperoninen GroES und GroEL soweit stabilisiert werden, dass eine DNA-Bindung des Proteins erfolgte. Chaperone sind weit verbreitete essentielle Proteine, welche die Faltung anderer Proteine unterstützen. Die Chaperonine GroES und GroEL aus E. coli wirken dabei zusammen. Das Substratprotein wird von GroEL umschlossen, dessen zentraler Hohlraum von GroES abgedichtet wird. Durch einen noch nicht völlig aufgeklärten Mechanismus wird unter ATP-Verbrauch die korrekte Faltung des gebundenen Proteins unterstützt und dieses anschließend wieder entfernt (Taguchi, 2005). Einen Hinweis, dass GroEL die Expression eines korrekt gefalteten CbbR unterstützen kann, lieferte die gleichzeitige Elution von GroEL, CbbR<sub>I</sub> und CbbR<sub>II</sub> bei deren Reinigung aus *R. capsulatus* (Dubbs et al., 2004).

Basierend auf der Analyse in der Gelretardation bildeten die mutierten CbbR<sub>H16</sub>G203L, G205E, R135C und A175E zum Wildtyp Protein nahezu identische Protein-DNA-Komplexe. Demnach scheint die DNA-Bindung durch die Mutationen nicht direkt betroffen zu sein. Die verminderte *cbb*-Transkription unter induzierenden und die erhöhte Transkription unter reprimierenden Bedingungen muss daher auf einer Strukturveränderung und/oder Interaktion mit mindestens einem weiteren Effektor oder Transkriptionsfaktor beruhen. Die Rolle von CbbR bei der Transkriptionsaktivierung mag daher nicht in einer Veränderung der DNA-Topologie bestehen, die über eine durch die Bindung induzierte Krümmung hinausgeht. Eine solche wird möglicherweise durch ein weiteres Protein vermittelt. Ein Beispiel für die *cbb*-Genregulation durch mehrere Proteine ist die Regulation der *cbb*-Gene in *R. sphaeroides*. Das CbbR in diesem Organismus bildet *in vitro* einen Komplex mit gesteigerter Gelmobilität in Gegenwart des Induktors RuBP (Dangel et al., 2005). Für eine vollständige Induktion während des phototrophen Wachstums ist aber ein weiterer Transkriptionsregulator, RegA, notwendig (Dubbs und Tabita, 2004). Bei CbbR<sub>H16</sub> ist aber auch nicht auszuschließen, dass die Mutationen die Interaktion mit der RNA-Polymerase so abwandeln, dass die Aktivierung der Transkription gefördert oder behindert wird. Allerdings wurde durch die Analyse von CysB-Mutanten in *E.coli* festgestellt, dass die Interaktion mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase über die Schlaufe zwischen den  $\alpha$ -Helices 2 und 3 des Helix-Turn-Helix-Motivs stattfindet (Lochowska et al., 2001, 2004). Für CbbR<sub>H16</sub> kann aufgrund der Befunde eine direkte Beteiligung der Aminosäurereste R135, G203, G205 und möglicherweise W274 an der Effektor-Protein-Interaktion angenommen werden. Bei W274 und A175 liegt eine strukturelle Rolle näher.

#### 4.3 Zusätzliche Regulatoren der *cbb*-Gene

#### 4.3.1 Das Zwei-Komponenten-System RegBA

Das Zwei-Komponenten-System RegBA (PrrBA) der α-Proteobakterien R. capsulatus und R. sphaeroides reguliert eine Reihe von Stoffwechselvorgängen (Dubbs und Tabita, 2004). Zwei-Komponenten-Systeme sind bei Prokaryonten weit verbreitet und auch bei Eukaryonten zu finden (Brown und Firtel, 1998; Grebe und Stock, 1999). Sie bestehen aus einer Sensor-Kinase, die im Allgemeinen ein Signal aufnimmt und daraufhin einer Autophosphorylierung unterliegt, sowie einem ,Response'-Regulator. Das Signal wird durch die Übertragung der Phosphatgruppe vom Sensor auf den Regulator weitergeleitet (Stock et al., 2000). Eine Erweiterung der Zwei-Komponenten-Systeme stellen die sogenannten ,phosphorelay'-Systeme dar. Sie treten meist bei der Regulation von Prozessen auf, die zu tiefgreifenden Sporulation Veränderungen führen, wie die in Bacillus subtilis. In dieser Signaltransduktionskaskade wird eine Phosphatgruppe von der Sensor-Kinase (KinA, KinB oder KinC) auf den Response-Regulator SpoOF übertragen. Dieser wiederum phosphoryliert Spo0B, das die Phosphatgruppe schließlich auf den DNA bindenden ,Response'-Regulator Spo0A überträgt. Das phosphorylierte Spo0A wirkt aktivierend oder reprimierend auf Gene, die mit der Sporulation zusammenhängen (Appleby et al., 1996; Marahiel und Zuber, 1999). Eine typische Sensor-Kinase hat zwei funktionell und strukturell unterschiedliche Domänen. Eine N-terminale Sensor-Domäne mit variabler Sequenz, abhängig vom aufgenommenen Signal, und eine C-terminale Kinase-Domäne mit stärker konservierter Sequenz (Grebe und
Stock, 1999). Manche Sensor-Kinasen sind mit ihrer N-terminalen Domäne in der Membran verankert, andere sind cytoplasmatische Proteine. Die Sensor-Kinase RegB trägt sechs Transmembran-Helices, über die sie in der Membran verankert ist (Dubbs und Tabita, 2004). Die Phosphorylierung der Sensor-Kinasen erfolgt im Allgemeinen an einem Histidin, das innerhalb eines sehr konservierten Bereiches, der sogenannten H-Box, liegt.

Die H-Box ist eine der sogenannten Homologie-Boxen (H-, N-, D-, F-, X- und G-Boxen), die in Sensor-Kinasen sehr ähnliche Bereiche bezeichnen und zur Unterscheidung der Kinase-Unterfamilien verwendet werden. Die flankierenden Sequenzen sind dagegen auch innerhalb der Unterfamilien bisweilen sehr unterschiedlich (Grebe und Stock, 1999). Die D-Box ist Teil einer nucleotidbindenden Domäne, während die G-Boxen eine wichtige Rolle bei der Übertragung der Phosphatgruppe haben (Stewart et al., 1998). Die X-Box wurde zunächst als wichtiges strukturelles Motiv charakterisiert (Hsing et al., 1998). Innerhalb dieser Region liegt jedoch in der Sensor-Kinase RegB ein redox-reaktiver Cysteinrest, der eine Funktion als Rezeptor des Redox-Status der Zelle haben könnte. Unter oxidierenden Bedingungen bildet dieses Cystein bei einigen RegB-Sensor-Kinasen eine intermolekulare Disulfidbrücke, wodurch ein inaktives Tetramer entsteht. Diese Brückenbildung ist wahrscheinlich von Kupfer abhängig, von dem eine strukturelle Rolle angenommen wird (Swem et al., 2003). Dieses Cystein ist aber nur in Sensor-Kinasen vorhanden, die zur Unterfamilie HPK<sub>3e</sub> gehören. Teil dieser Untergruppe sind RegB aus R. capsulatus, PrrB aus R. sphaeroides, RegS aus Bradyrhizobium japonicum, ActS aus Sinorhizobium meliloti und weitere Sensor-Kinasen (Grebe und Stock, 1999; Elsen et al., 2004). Die Unterfamilie ist durch eine ungewöhnliche H-Box charakterisiert, die vier oder mehr Alaninreste proximal und ein Glycin zwei Reste hinter dem konservierten Histidin enthält, eine Position, an der gewöhnlich ein Arginin- oder Lysinrest vorliegt (Grebe und Stock, 1999). Die genannten Sensor-Kinasen sind Teil der Zwei-Komponenten-Systeme RegBA, PrrBA, RegSR und ActSR. Ihre Sequenzen sind so stark konserviert, dass sie sich teilweise gegenseitig ersetzten können. So ist RegS in der Lage, den Response-Regulator RegA zu phosphorylieren. Der ,Response'-Regulator RegR kann in vitro an RegA-Bindemotive des fixR-nifA-Operons aus R. capsulatus binden und die Expression von dessen puc-Operon induzieren. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass actR und regA eine regR-Mutante von B. japonicum komplementieren können (Emmerich et al., 2000a).

,Response'-Regulatoren besitzen meist zwei Domänen, eine N-terminale Empfänger-Domäne, die mit der Kinase-Domäne der zugehörigen Sensor-Kinase interagiert, und eine C-terminale regulatorische Domäne. Letztere ist in der Regel eine DNA-bindende Domäne mit regulatorischer Funktion in der Gentranskription, kann aber auch enzymatische Funktion haben wie bei CheB aus dem Chemotaxissystem von *E. coli*, das eine Methylesterase ist (Grebe und Stock, 1999; Banno et al., 2004). Auffällig an dem Response-Regulator RegA und seinen Homologen ist die fast vollständige Konservierung der DNA-Binderegion, die über einige Prolinreste mit der Empfänger-Domäne verbunden ist. In letzterer befindet sich das konservierte Aspartat, auf das die Phosphatgruppe von der Sensor-Kinase übertragen wird. Außerdem enthält sie proximal zum N-Terminus eine sogenannte ,acid'-Box von bis zu drei aufeinanderfolgenden Aspartatresten und proximal zum C-Terminus ein konserviertes Lysin. Für diese Aminosäuren wird eine Funktion bei der Übertragung des Phosphatrestes postuliert (Grebe und Stock, 1999; Masuda et al., 1999; Elsen et al., 2004). Aufgrund der Sequenzen ihrer Empfänger-Domänen werden die Response-Regulatoren RegA, PrrA, RegR und ActR in der ActR-Gruppe zusammengefasst (Grebe und Stock, 1999).

Bei einem Sequenzvergleich der Response-Regulatoren RegA aus R. capsulatus (Acc. Nr. P42508), PrrA aus R. sphaeroides (Acc. Nr.: Q53228), RegR aus B. japonicum (Acc. Nr. CAA06859), ActR aus S. meliloti (Acc. Nr.: NP384171) mit homologen Proteinen aus Rhodovulum sulfidophilum (Acc. Nr.: O82868) und Roseobacter denitrificans (Acc. Nr.: BAA33888) sowie aus R. eutropha H16 (RREX06744), R. metallidurans CH34 (Acc. Nr.: ZP\_005994181), R. solanacearum (Acc. Nr.: NP518161) und Ralstonia eutropha JMP134 (Acc. Nr.: AAZ59554) fällt das sehr ähnliche Helix-Turn-Helix-Motiv am C-Terminus der Proteine auf. Die sogenannte 'acid'-Box und die wahrscheinlich katalytisch wichtigen Reste Aspartat und Lysin sind ebenfalls in allen Proteinen wiederzufinden (Abb. 25). Die Prolinreste, welche die DNA-bindende Domäne mit der Empfänger-Domäne verbinden, sind allerdings in den Proteinen von Ralstonia spp. auf einen Rest reduziert, was auch bei RegR aus B. japonicum der Fall ist. Bei genauerer Betrachtung können die Regulatoren in zwei Untergruppen geteilt werden, von denen die erste die RegA-Proteine der α-Proteobakterien R. sphaeroides, R. capsulatus, R. denitrificans, R. sulfidophilum, B. japonicum und S. meliloti umfasst und die zweite die Proteine der *Ralstonia* spp., die zu den β-Proteobakterien gehören, enthält. Aufgrund der Verwandtschaft der Organismen war dies zu erwarten. Die leichten Unterschiede der Proteine spiegeln wahrscheinlich eine Anpassung an die physiologischen Bedürfnisse der einzelnen Organismen wieder. So weicht gemäß der entfernteren Verwandtschaft die Sequenz des RegA-Homologen aus dem pflanzenpathogenen

	##	
Rhs	<mark>m</mark> aedlvf <mark>e</mark> lgadrsl <b>l</b> lvd <mark>ddepe</mark> lkr <b>l</b> ak <mark>a</mark> me <mark>krg</mark> fvletaqsvaegka 5(	0
Rhc	<mark>m</mark> aeeefa <mark>e</mark> lgsdrsl <b>l</b> vdddnafltrLarame <mark>kr</mark> gfqteiaetvsagka 5(	0
Rsu	MAEQ <mark>E</mark> YEIGEDPSLLIVDDDEPELRRLARAME <mark>KR</mark> GFQPEMAETVAAGKA 49	9
Rde	<mark>m</mark> pdtnpi <mark>e</mark> lgedksilllddde <mark>pe</mark> lrrLakame <mark>kr</mark> gfovetagsvaagra 5(	0
Sin	MIEKSMPAQNTHAADADLIGPDKSLL <mark>I</mark> VDDDTA <mark>F</mark> LRRLARAMEA <mark>RGFA</mark> VEIAESVAEGIA 6(	0
Bra	<mark>m</mark> naia <mark>e</mark> lneqtdrsll <mark>iveddkP</mark> flerLsrametrgfavtscdtvsdgla 5(	0
Ral	MTDTLTPVP <mark>E</mark> ATAPAGT <mark>PF</mark> LVIDDDEVBAG <mark>TLARALTR</mark> RGY <mark>AVQ</mark> VAHDGRT <mark>AL</mark> A 54	4
JMP	MTVMTVTHHPVP <mark>E</mark> STAPAGT <mark>PFL</mark> VIDDDA <mark>VF</mark> SG <mark>TLARALTR</mark> RGY <mark>AVQ</mark> VAHNSST <mark>AL</mark> A 5	7
Rme	MTDVTASNDAM <mark>PFL</mark> VIDDDEVFSGTLARALTRRGYAVQVAHNGAEALA 48	8
Rso	MQQPA <mark>PFLI</mark> LDDDD <mark>VF</mark> AQ <mark>TLARALTRRGFAPQ</mark> IAHTGGE <mark>AL</mark> S 42	2
Dh e		~ ^
RIIS		99
RIIC		99 00
RSU		90 00
Rue		99
SIII		79
BIA		99 1 2
TMD		16
J MP Bmo		10
Rille		0.2
RSO	LARQIPFAIVIVDDDDDDAASDRGLMPHGGIDSGDHWIAPLKQALPEARMLVLIGIASLAIA I(	JZ
Dha		
RIIS	VAAVAIGAIDYLSKPADANEVIHALLAKGESLPPPENENSADVIKWEHIQRIYEMII	22
RIIC	VAAVMGAIDYLSKPADANDIINALLAKGEALPPPENNSADVIKWEHIQRVIKLII	22
RSU		54 F F
Rde		22
Dro.		55
DIA Dal		
TMD		76
DMP		67
Rille		ວາ ເວ
RSO	VQAVADGA <mark>DETTA</mark> KPA <mark>NVDSTIDADQVGVSE</mark> AVAEQTMENPAP <mark>DSVARDEWEHTQAVD</mark> SE 10	52
	-Helix-Turn-Helix-Motiv-	
Rhs	C <mark>DRNVSETARRLNMHRRTLQR</mark> ILAKR <mark>S</mark> PR- 184	
Rhc	C <mark>DRNVSETARRLNMHRRTLQR</mark> ILAKR <mark>S</mark> PR- 184	
Rsu	C <mark>DRNVSETARRLNMHRRTLQRI</mark> LAKR <mark>S</mark> PR- 183	
Rde	C <mark>D</mark> RNVSETARRLNMHRRTLQRILAKR <mark>S</mark> PR- 184	
Sin	CERNVSE <mark>TAR</mark> RLNMHRRTLQRILAKRAPK- 194	
Bra	CNRNVSETARRLNMHRRTLQRILAKRAPR- 184	
Ral	HD <mark>GNISATARALNMHRRTLQR<mark>KLG</mark>KR<mark>PV</mark>SR 203</mark>	
JMP	<mark>HG<mark>GNIS</mark>ATAR<mark>A</mark>LNMHRRTLQR<mark>KLG</mark>KR<mark>PV</mark>SR 206</mark>	
Rme	<mark>hg<mark>gnisa</mark>tar<mark>alnmhrrtlqrklg</mark>kr<mark>pv</mark>sr 197</mark>	
Rso	<mark>HGG<mark>NIS</mark>ATARALNMHRRTLQRK<mark>LG</mark>KR<mark>PV</mark>AK 192</mark>	

*R. solanacearum* auch stärker von denen der anderen *Ralstonia* spp. ab als diese untereinander.

# Abb. 25. Vergleich der Aminosäuresequenzen des ,Response'-Regulators RegA und homologer ,Response'-Regulatoren aus verschiedenen α- und β-Proteobakterien.

,Response'-Regulatoren von α-Proteobakterien: Rhc, *R. capsulatus* RegA (P42508); Rhs, *R. sphaeroides* PrrA (Q53228); Bra, *B. japonicum* RegR (CAA06859); Sin, *S. meliloti* ActR (NP384171); Rsu, *R. sulfidophilum* RegA-homologes Protein (O82868); Rde, *R. denitrificans* RegA-homologes Protein (BAA33888); ,Response'-Regulatoren der β-Proteobakterien: Ral, *R. eutropha* H16 RegA-homologes Protein (RREX06744); Rme, *R. metallidurans* CH34 RegA-homologes Protein (ZP\_005994181); Rso, *R. solanacearum* RegA-homologes Protein (NP518161); JMP, *R. eutropha* JMP134 RegA-homologes Protein (AAZ59554). In allen Proteinen identische Aminosäuren sind schwarz, in mindestens sechs der Proteine identische Aminosäuren sind dunkelgrau und in mindesten vier der Proteine identische Aminosäuren sind gelb unterlegt. Das Helix-Turn-Helix-Motiv ist markiert. Das konservierte Aspartat, an dem die Phosphorylierung erfolgt, ist mit einem Sternchen und die ,acid'-Box mit zwei Rauten gekennzeichnet. Die Sequenzen der Sensor-Kinasen sind nicht so stark konserviert. In einem Sequenzvergleich können aber dennoch wieder zwei Gruppen gebildet werden (Abb. 26). Die eine enthält die Sensor-Kinasen RegB aus R. capsulatus (Acc. Nr.: A55542), PrrB aus R. sphaeroides (Acc. Nr.:Q53068), RegS aus B. japonicum (Acc. Nr.: CAA06858), ActS aus S. meliloti (Acc. Nr.: NP384172) und RegB-homologe Proteine aus R. denitrificans (Acc. Nr.: BAA31475) und R. sulfidophilum (Acc. Nr.: NP945925). In der zweiten Gruppe sind die homologen Proteine aus R. solanacearum (Acc. Nr.: NP518160), R. eutropha H16 (Acc. Nr.:RRX06743), R. metallidurans CH34 (Acc. Nr.: ZP 00594182) und R. eutropha JMP134 (Acc. Nr.: AAZ59555) zusammengefasst. Auch hier scheint die enge Verwandtschaft eine Rolle zu spielen. Die Homologie-Boxen der Sensor-Kinasen zeigen einen hohen Anteil an konservierten Aminosäuren in der H- und in etwas geringerem Maße in der X-Box. In letzterer ist das redox-reaktive Cystein in allen Proteinen vorhanden. Nur in den RegB-Homologen von Ralstonia spp. ist das eine der beiden flankierenden Arginine gegen Leucin ausgetauscht. Die Sequenzen der N-, G1- und F-Boxen sind dagegen deutlich verändert und nur innerhalb der zuvor genannten Gruppen ähnlich. Eine etwas stärkere Ähnlichkeit ist wieder in der G2-Box zu erkennen. Alle verglichenen Sensor-Kinasen haben aber die charakteristische Sequenz der HPK<sub>3e</sub>-Unterfamilie.

Rsu	MSDIATGLLPPTERSNWIRL <mark>RTL</mark> ILLRWT <mark>A</mark> IAGQVV <mark>A</mark> IA <mark>V</mark> ANLYFHI 47
Rde	MFEGQCNSTTGDILADLNLRPFSDDRRANWIRLRTLILLRWFAIAGQLAAIT <mark>V</mark> AQKMYGL 60
Rhc	<mark>A</mark> GGADCAYGYYDI 31
Rhs	MILGPDGILNRDTRGDW <mark>VRLRTL</mark> ILLRWM <mark>A</mark> VAGQLA <mark>A</mark> IV <mark>V</mark> TDWYLGV 47
Sin	Maaatlyndlnsnrsl <mark>rlqtl</mark> vrlrwl <mark>a</mark> vggqs <mark>la</mark> vi <mark>v</mark> talwlqf 45
Bra	MTEIAASDFRPAQRHIRLD <mark>T</mark> ILRLRWL <mark>A</mark> VLGQLA <mark>A</mark> IFIVAQGLEF 45
JMP	-mhaapavshppaftaspplpagpaarpsl <mark>v</mark> slrrlfwlrwa <mark>llaggal</mark> Cllscepii <mark>g</mark> v 59
Rme	MHPPIVMSTLPPSVAPPIGTAPQRHSL <mark>V</mark> SLRRLS <mark>W</mark> LRWA <mark>LLAGQAL</mark> LLVSCESLA <mark>G</mark> I 57
Ral	-MTTAAAVTRLPDLPFLSPLPAGTSARHGQ <mark>V</mark> TLRRLF <mark>W</mark> LRWA <mark>LLA</mark> GQALTVLSCEPIAGI 59
Rso	MLSTLPLAAPPLDTSSLRRLFWLRWS <mark>LLA</mark> TQLILMLLAPLIF <mark>G</mark> V 44
Rsu	QLDL <mark>G</mark> LCLL <mark>VIC</mark> ASVL <mark>ANVIA</mark> VAIH <mark>P</mark> ENR <mark>R</mark> LS <mark>E</mark> KE <mark>AM</mark> LTLLFDVV <mark>QL</mark> SALLFLTGG 103
Rde	QLEL <mark>G</mark> LCYLA <mark>I</mark> GASAI <mark>AN</mark> LV <mark>A</mark> TFIF <mark>P</mark> ENK <mark>RLTE</mark> SQN <mark>M</mark> LTVLFDLLQ <mark>L</mark> SFLLFLTGG 116
Rhc	ALNLPMCIGTIGFAVA <mark>AN</mark> IA <mark>A</mark> IYLY <mark>P</mark> ESR <mark>R</mark> LSQAEVTATLLFDTA <mark>Q</mark> LALLLS <mark>LTGG</mark> 87
Rhs	RLPM <mark>G</mark> LCFMAVGASVI <mark>ANV</mark> IATFVF <mark>P</mark> QNR <mark>R</mark> LT <mark>E</mark> FQ <mark>A</mark> LMILLFDLT <mark>QLS</mark> FL <mark>LFL</mark> TGG 103
Sin	PLPVV <mark>PC</mark> SVL <mark>IA</mark> CLALL <mark>N</mark> VFLTL <mark>RFP</mark> PTQ <mark>R</mark> LTPPAAFTLLGIDLA <mark>Q</mark> LTALLFITGG 101
Bra	NVEIVPCVSI <mark>IA</mark> LSASL <mark>NL</mark> ALQTVSNPLQRLEPMQAAGLLALNIVELAGLLFFTGG 101
JMP	TLPT <mark>GPLLVVFA</mark> LQALF <mark>NVLT</mark> GLRLRLHTRHGSLPGEAELMGQLLVDLTALSAILFYTGG 119
Rme	alpyk <mark>pllFlFa</mark> vQTVF <mark>N</mark> VFTVARLHWHTRHGTAPSDAELMVQMMVDLTALSAILFYTGG 117
Ral	RLPY <mark>GPLLVV</mark> FGLQALF <mark>NLLT</mark> GL <mark>R</mark> LRQHT <mark>R</mark> RNSAPGEA <mark>ELM</mark> G <mark>QLLVDLTALSAI</mark> LFYTGG 119
Rso	QLPVAV <mark>LLSV</mark> MGVHALFNLL <mark>T</mark> GWQVRRDRPVRHIEITVQLLVDLTALSALLYFTGG 100
Rsu	ln <mark>npfal</mark> mlltpvt <mark>u</mark> satalgrms <mark>t</mark> lfiahtafalitmmtfy <mark>y</mark> v <mark>pl</mark> vdas <mark>g</mark> eiqqlphlf 163
Rde	lh <mark>ndfall</mark> mlgpv <mark>ti</mark> saavltlrs <mark>tv</mark> flggtaiilvslla <mark>qf</mark> nf <mark>pl</mark> rteq <mark>g</mark> filaipdvf 176
Rhc	ln <mark>ndf</mark> allilvpvt <mark>t</mark> aatalklrp <mark>t</mark> lllggatiami <mark>t</mark> fv <mark>avf</mark> ne <mark>pl</mark> qtrd <mark>g</mark> ahiglppmi 147
Rhs	l <mark>tndfall</mark> ilapv <mark>tis</mark> alalelrt <mark>tv</mark> ilgaiaigll <mark>t</mark> ftayfhl <mark>pl</mark> i <mark>l</mark> adgsslsvprmf 163
Sin	la <mark>ndfapl</mark> lcvpvii <mark>s</mark> sasqpkpqsivl <mark>a</mark> glavlgv <mark>talaf</mark> spf <mark>pl</mark> pwyp <mark>g</mark> tlllmprvl 161
Bra	londesflflapvli <mark>s</mark> atalparftfglgvlav <mark>ac</mark> asvlfffhlplpwdsd <mark>d</mark> plvlppiy 161
JMP	ATNPF <mark>VSFYLPGLAIAAAILPWRQV</mark> IALACFALACYTVLLFEYLPLDLHDPDKAVNYH177
Rme	ATNPE <mark>VSFYLP</mark> GLA <mark>IA</mark> SAILPWRL <mark>VV</mark> TLAAYALACYSMLLLE <mark>Y</mark> I <mark>PLDL</mark> HNPDNAVNYH 175
Ral	ATNPEVSFYLPGLATAAAILPWRQ <mark>VIALA</mark> LYALVCYTLLLFE <mark>Y</mark> VPL <mark>DL</mark> HNPDNAVNYH 177
Rso	ATNPE <mark>VSFYLP</mark> ALA <mark>I</mark> AAAMLPIAH <mark>VV</mark> GLTLYALAAYSVMLGN <mark>YIPLDL</mark> LDQAD <mark>AV</mark> PYH 159

	H-Box	
Deu		
RSU Pdo	IF GE WAALVIGISFIGUIADAIISEMUANSDALLAIQMALAAEQALIDIGGVVHAAAHEL 2	223
Pha		230
Pha		207
Sin	TACIMEATVICIDE ICHISKAVATEIKSHODAHLAIQHADKEQKHISOLOGUVAAAAHEL 2	223
Bra		221 221
JIA		521 727
DMP		237
Pal	LACMMENEVASAVMIATEVADI.SCULPOPEAOINI.APEOILPEAPVEDINCOAAAVAHET	233
Rso	LAGMWIDFVASSAMIAGETARLSAALREREAELADARERILEBORIEAUVSOGASVAHEM 2	219
1.00		
	Redox-Box (X-Box)	
Pau		775
RSU Pdo		2/5
Pha		200
Pha		200
Cin		273
Bro		57 <del>1</del>
TMD		2/2
DMP		
Pal	GIPHATLAVIAGELKADAENINKSDIPVADIQADIKIMEQQLELOKSILAKLKADHETLA 2	290
RSO	GTPLATILAVIAGE I RADASDAGRGI SALINSI LEDI QI MEQQUALGRI I FARLREDPAI LA Z	276
1.50	GTFHSTV <mark>AV</mark> TIGELQIIDA <mark>KQFDSFLAF</mark> IKEDIKA <mark>TEQQLELGN</mark> AA <mark>AKU</mark> QKKFNDGI Z	270
	N-Box	
Rsu	L <mark>H</mark> MHTAPLK <mark>AVIDEAAEPH</mark> LDRGKEIIFSFEPIHGGSPRMPVIYRRPEVIHGLRNLIQNA 3	335
Rde	L <mark>H</mark> LHQAPLR <mark>AVLEEAAEPHMDRGKEIIF</mark> QIVGPEITQPT <mark>I</mark> LRKP <mark>E</mark> II <mark>HG</mark> VRNLIQNA 3	345
Rhc	V <mark>H</mark> LRTAP <mark>LLAVLREAAEPH</mark> L <mark>DRGKMI</mark> YFDVVPGEGGSERQPTIYRYPELVHAL <mark>RNLIQ</mark> NA 3	320
Rhs	LQMRQAPLGE <mark>VL</mark> REAAEPHVG <mark>RGK</mark> RVE <mark>F</mark> DLYPSRGGDERQPV <mark>I</mark> LRRPEVIHGLRNLIQNA 3	335
Sin	E <mark>H</mark> MRLLPLSSLIEEVMAPHREFGIE <mark>I</mark> ELKEQGDRASEPVGIRNAGILY <mark>G</mark> LGNLLENA 3	331
Bra	APFDRMKLSELIEEVVAPHRDFGVD <mark>i</mark> kvriava <mark>a</mark> faepVGSRNPAILY <mark>G</mark> VGNIVENA 3	329
JMP	PERIDAMLGSFAERWQLRHPNATLQANATAQAG <mark>A</mark> LAIEPARVGQILTILLDNA <mark>A</mark> RSQQSA 3	357
Rme	PQRIDAWLAPFVHRWQLRHPQASLQAGAAPDAA <mark>A</mark> QAVDTARISQILTIALDNA <mark>A</mark> RSQQAA 3	355
Ral	PQRIDGWIPAFAERWQLR:PKRQPAGQRHAGRRRAGGGNRARGPDPDHPAGQRRAQ	353
Rso	PEPLGLWEPAFTQTWQLRHPDTRLHTESSPAAQAVELDAVVVGQ1LTILLDNAARSQQQA	336
	G1-Box F-Box	
Dere		
Rdo	ADEAKAUIMANGAMADDAI COULOU A AND CAREADAI TO TO DAMADDAGAODD 3	707
Pha		<i>ו כ</i> כ דרכ
Pha	VDFAQIIVWUDALWIDKSIIVKVIDDGKGISEKVINKIGDEFISIKSADAK- 3	287
Sin	VDIAKUTVTTEHTAFRURVTTEDCOCESDDIIARICFDVVTPROKDS- 3	282
Bra	VDFAHTTVEVNAWWNKDTTEI.I.I.SDDGPGTPPDII.NRIGEPYI.SRRRTPDD-	380
JTMP	GHAORPLOLETAFEOGNTAFRVSDHGDGTPPELRSOLGETPVSPHGGO 4	109
Rme	GHDHROGPPLRIDIAREADALVYRVTDHGHGI,PPGLRARIGESPVASAHGGO 4	107
Ral	PASRRPRPGAAAAAADRHGAROYRAVAVVPHRRPRRHSRDAARPAGRNPGGOP-	106
Rso	GRDQVPLLLTARIDANADTVREAPRQIVLSVVDTGLGVPDDLRTALGRTPVPSRHGGH 3	394
	G2-Box	
	G2-B0X	
Rsu	KKRPE <mark>YEGM</mark> CLGLFI <mark>A</mark> KTMLER <mark>S</mark> GATL <mark>SFANG</mark> RDPMLTSERSDQ-RCAVVE <mark>V</mark> EWPASKIG 4	146
Rde	GARPG <mark>YEGM</mark> CLGLFI <mark>A</mark> KTLLER <mark>S</mark> GAEL <mark>SFANG</mark> REESSTQGSG-ICAVVE <mark>V</mark> KWLRR <mark>R</mark> ID 4	154
Rhc	E <mark>YEGM</mark> CLGLFI <mark>A</mark> KTLLERTGAKLRF <mark>ANG</mark> SEPYQKNAPVRG-SCAVVELRWHIG <mark>R</mark> LI 4	126
Rhs	SRRPG <mark>YEGM</mark> GLGLFI <mark>A</mark> KTLLER <mark>S</mark> GAEL <mark>SFANA</mark> ADPFLRSHERPERC <mark>G</mark> AIVE <mark>V</mark> IWPVD <mark>R</mark> LV 4	147
Sin	-AGGL <mark>G</mark> LFI <mark>A</mark> KTLLER <mark>S</mark> GARLRFEN <mark>G</mark> GSKHP <mark>G</mark> ARVS <mark>V</mark> EWPRVLMD 4	128
Bra	-AGGERRGL <mark>GUFIA</mark> RTLLERTGAKV <mark>S</mark> FTNRIFPEHGAVVQITWPRQ <mark>R</mark> FE 4	130
JMP	C <mark>IGLYLA</mark> QSG <mark>AR</mark> QMG <mark>G</mark> GLAWRDRPGGCTIAEL <mark>R</mark> VPSSPSL 4	149
Rme	C <mark>IGLYLA</mark> QSA <mark>AR</mark> QLG <mark>G</mark> QI <mark>S</mark> WHDNPAGCTVLEL <mark>R</mark> LPLTAAS 4	147
Ral	ARRPC <mark>IGLYL</mark> AQSA <mark>AR</mark> QMD <mark>G</mark> ELAWHDRAGGCTVAEL <mark>R</mark> LPALSTL 4	<b>1</b> 50
Rso	<mark>GIGLYLA</mark> ATT <mark>AR</mark> RLG <mark>G</mark> TVELRSNPPQGAIAEL <mark>R</mark> LPAAGPN 4	134

Rsu	VSAE <mark>A</mark> QLAAL <mark>GEN</mark> TLIEA	464
Rde	AVEGDRPVAS <mark>GEN</mark> QRFAV	472
Rhc	APETGPL <mark>GEN</mark> VPITA	441
Rhs	VVRN <mark>A</mark> PL <mark>GEN</mark> VLIQT	462
Sin	TKLAK	433
Bra	AIETLEETIG	440
JMP	AVNPS	454
Rme	ERAI <mark>A</mark> AQPDFQP	459
Ral	SASA <mark>A</mark> ATAPRTP	462
Rso	AQPA <mark>A</mark> PAIGAPTLLT	449

#### Abb. 26. Vergleich der Aminosäuresequenzen der Sensor-Kinase RegB und homologer Sensor-Kinasen aus verschiedenen α- und β-Proteobakterien.

Sensor-Kinasen von α-Proteobakterien: Rhc. *R*. capsulatus RegB (P55542): Rhs, R. sphaeroides PrrB (Q53068); Bra, B. japonicum RegS (CAA06858); Sin, S. meliloti (NP384172); Rsu, R. sulfidophilum RegB-homologes Protein (O82868); ActS Rde, R. denitrificans RegB-homologes Protein (BAA31475); Sensor-Kinasen von β-Proteobakterien: Ral, R. eutropha H16 RegB-homologes Protein (RREX06743); Rme, R. metallidurans CH34 RegB-homologes Protein (ZP\_005994182); Rso, R. solanacearum RegB-homologes Protein (NP518160); JMP, R. eutropha JMP134 RegB-homologes Protein (AAZ59555). In allen Proteinen identische Aminosäuren sind schwarz, in mindestens sechs der Proteine identische Aminosäuren sind dunkelgrau und in mindesten vier der Proteine identische Aminosäuren sind gelb unterlegt. Die G-, F-, N-, H- und Redox-Box sind markiert. Das konservierte Histidin in der H-Box, an dem die Phosphorylierung erfolgt, ist mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Die hohe Ähnlichkeit im Bereich der H- und X-Box ist wahrscheinlich auf die katalytische Bedeutung dieser Sequenzen zurückzuführen. Die Konservierung des redox-reaktiven Cysteins könnte auf einen ähnlichen Sensor-Mechanismus in diesen Kinasen hindeuten. Es wird angenommen, dass in den *Rhodobacter* spp. der Elektronenfluss durch die  $cbb_3$ -Oxidase ein Signal erzeugt, das möglicherweise über SenC die Phosphorylierung von RegB fördert. SenC ist ein membrangebundenes Protein mit einem Metallbindemotiv, das mit *regA* in einem Operon codiert ist und in einem polycystronischen Transkript mit regA cotranskribiert wird (Masuda et al., 1999; Eraso und Kaplan, 2000; Dubbs und Tabita, 2004). Die hochaffine *cbb*<sub>3</sub>-Cytochrom-Oxidase wird bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen gebildet und überträgt die Elektronen der Atmungskette auf Sauerstoff oder einen anderen postulierten Akzeptor unter anaeroben Bedingungen. Eine Inaktivierung dieser Oxidase führt zu einer erhöhten Expression von Genen, die sonst nur unter anaeroben Bedingungen voll exprimiert werden, wie die Gene der Photosynthese und der CO<sub>2</sub>-Fixierung (Oh und Kaplan, 2000; Gibson et al., 2002). Auf diese Weise wirkt RegB über die Oxidase indirekt als O2-Sensor und Sensor des Elektronenflusses. Die Ähnlichkeit in den katalytisch wichtigen Bereichen könnte ein Hinweis sein, dass auch das RegB-Homologe aus R. eutropha H16 in der Lage ist, direkt oder indirekt auf den Redox-Status seiner Umgebung zu reagieren. So könnte es über das RegA-Homologe die Verbindung zu CbbR herstellen und damit die postulierte Verknüpfung zwischen der Regulation der CO<sub>2</sub>-Assimilation und dem Redox-Status der Zelle darstellen.

Das Zwei-Komponenten-System RegBA und seine Rolle bei der Regulation der CO2-Fixierung in den Pupurbakterien R. capsulatus und R. sphaeroides ist detailliert untersucht worden. Beide Organismen besitzen zwei *cbb*-Operone (*cbb<sub>I</sub>* und *cbb<sub>II</sub>*). In *R. sphaeroides* werden beide Operone unabhängig voneinander reguliert (Dubbs und Tabita, 1998; Paoli et al., 1998; Vichivanives et al., 2000). Bei anaerobem photoautotrophem Wachstum werden beide voll exprimiert, dabei werden sowohl CbbR als auch RegA für eine vollständige Induktion benötigt (Quian und Tabita, 1996). Ebenso ist unter anaeroben photoheterotrophen Bedingungen, unter denen die CO2-Fixierung zur Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts genutzt wird, RegA für die Expression des  $cbb_{II}$ -Operons wichtig (Tichi und Tabita, 2000, 2001). RegA wirkt aber negativ auf die Expression dieses Operons bei aeroben chemoautotrophen Wachstum, während unter diesen Bedingungen die Expression des cbb<sub>l</sub>-Operons RegA-unabhängig ist (Gibson et al., 2002). In R. capsulatus hat das cbb<sub>II</sub>-Operon eine größere Bedeutung und wird bei photo- und chemoautotrophen Bedingungen voll exprimiert. Das cbb<sub>l</sub>-Operon wird nur bei reduzierten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen während des photoautotrophen Wachstums induziert. RegA fördert die Induktion beider Operone, ist aber für eine Expression auf niedrigem Niveau nicht essentiell. Eine regA- und ebenso eine regB-Deletionsmutante von R. capsulatus war immer noch zu verlangsamtem photo- und chemoautotrophen Wachstum fähig (Vichivanives et al., 2000). Neben den Genen der CO<sub>2</sub>-Fixierung reguliert das RegBA System in R. capsulatus und R. sphaeroides auch Gene der Stickstofffixierung, der Photosynthese, der Aerotaxis, des Wasserstoffmetabolismus und von Elementen der Elektronentransportkette. Durch die Modulation der Regulation sorgt es für einen ausbalancierten Redox-Status der Zelle (Elsen et al., 2004; Kovacs et al., 2005). Steht ein Überschuss an Reduktionskraft zur Verfügung, werden Reduktionskraft verbrauchenden Systeme induziert, während Hydrogenase-Gene reprimiert werden. Auf diese Weise bleibt das Redox-Gleichgewicht der Zellen erhalten. Eine Feinregulation der Gene erfolgt über jeweils Operon-spezifische Transkriptionsregulatoren wie CbbR bei der CO<sub>2</sub>-Fixierung (Dubbs und Tabita, 2004).

Ein ähnliches von RegBA vermitteltes System, das für eine Integration der Regulation des Energie- und Kohlenstoffwechsel unter autotrophen Bedingungen sorgen könnte, wurde auch für *R. eutropha* H16 in Erwägung gezogen. Die *regA*- und *regB*- Mutanten zeigten jedoch keine Veränderungen des autotrophen Wachstums gegenüber dem Wildtyp, so dass eine direkte Kontrolle der *cbb*-Genexpression ausgeschlossen werden kann. Eine Übernahme der

Funktion von RegB durch eine andere Sensor-Kinase, ähnlich dem ,phosphorelay'-System aus B. subtilis, in dem der Response-Regulator SpoOF durch die Sensor-Kinasen KinA und KinB sowie weitere phosphoryliert werden kann (Jiang et al., 2000), wäre zwar denkbar In diesem Fall sollte aber zumindest die regA-Mutante von H16 ein verändertes autotrophes Wachstum aufweisen, da eine Übernahme der Rolle von RegA durch andere Regulatoren unwahrscheinlich ist. Die Lokalisation der regBA-Gene in Ralstonia spp. ist ein weiteres Indiz dafür, dass das System in diesen Organismen auch keine Verbindung zur Aufrechterhaltung der Redox-Balance hat, die in respiratorischen Organismen ohnehin generell kein physiologisches Problem darstellt. Die Gene in den Rhodobacter spp. sowie in R. sulfidophilum und R. denitrificans sind zusammen mit Genen codiert, für die eine Rolle bei der Assemblierung von Elementen der Atmungskette (senC) und/oder regulatorische Funktionen (senC und hvrA) auf die vom RegB/A-Systems regulierten Gene angenommen wird (Masuda et al., 1999). Die regBA-Gene in H16 und den anderen Ralstonia spp. hingegen liegen in der Nähe hypothetischer Gene und solcher, die am Abbau denaturierter Proteine (clpY) und DNA-Reperaturmechansimen beteiligt sind. Dies kann, muss aber nicht auf eine völlig andere Funktion des RegBA Systems in H16 und den anderen Ralstonia spp. hindeuten.

#### 4.3.3 DNA-Bindung von RegA

Für RegA wurde anhand eines Consensus-Motivs in der DNA-Binderegion von RegR und bekannten RegA-Bindestellen das Consensus-Bindemotiv 5'-G C/T G G/C G/C G/A NN T/A T/A NNC G/A C-3' vorgeschlagen (Emmerich et al., 2000b und c; Swem et al., 2001). Bis zu sechs RegA-Bindestellen vom Transkriptionsstartpunkt bis zu 900 bp stromaufwärts wurden in den Promotorregionen der *cbb*-Operone von *R. sphaeroides* entdeckt. Dabei haben die Bindestellen abhängig von den Wachstumsbedingungen eine unterschiedliche Bedeutung. So fördert zum Beispiel die Bindung von RegA an die Bindestelle 1 des *cbb<sub>II</sub>*-Promotors bei photoheterotrophem, photoautotrophem und chemoautotrophem Wachstum die Expression. Die Bindebereiche 4, 5, 6 und 7 steigern die Expression bei photoheterotrophem und chemoautotrophem Wachstums (Dubbs und Tabita, 2003; Dubbs und Tabita, 2004). In *R. capsulatus* wurden in DNA-,Footprinting'-Analysen zwei RegA-Bindestellen am *cbb<sub>II</sub>*-Promotor und vier RegA-Bindestellen zwischen den Positionen ,-61' und ,-100' sowie ,-301' und ,-415' bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes des *cbb<sub>I</sub>*-Operons entdeckt (Dubbs et al., 2000; Vichivanives et al., 2000). In Promotoranalysen wurde gezeigt, dass eine Phasengleichheit

dieser distal gelegenen RegA-Bindestellen und des CbbR-Bindebereichs zwischen den Positionen, -10' und, -70' für eine vollständige Aktivierung des *cbb*-Operons notwendig ist. Die Überlappung der Binderegionen von CbbR und den proximal gelegenen RegA-Bindestellen deutet auf eine direkte Interaktion von CbbR mit dem distal und proximal gebundenen RegA hin. Für diese Interaktion ist eine Krümmung der DNA und die Bildung einer Schlaufe (,loop') zu fordern (Dubbs et al., 2000). In der Promotorregion und stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes des cbb-Operons von R. eutropha H16 konnten keine RegA-Bindemotive nach dem Muster der Rhodobacter spp. entdeckt werden. Möglicherweise sind sie nicht so deutlich konserviert, wenn auch das konservierte HTH-Motiv von RegA<sub>H16</sub> auf ein ähnliches Bindemotiv hindeuten würde. Übereinstimmend mit diesem Befund konnte auch in Gelretardationsanalysen keine Bindung von RegA<sub>H16</sub> an die cbb-Kontrollregion festgestellt werden (s. 3.2.3.2). Für die Bindung dieses Proteins könnte jedoch eine vorausgehende Phosphorylierung notwendig sein. Auch wenn Hemschemeier et al. (2000) vorschlagen, dass eine Phosphorylierung nicht für die DNA-Bindung von RegA notwendig ist, soll aber eine Phosphorylierung die DNA-Bindeaffinität von RegA deutlich erhöhen (Bird et al., 1999). Der unveränderte Phänotyp der regA Mutante macht aber eine Beteiligung von RegA an der Regulation des cbb-Operons unwahrscheinlich und erklärt die fehlende Bindungsaktivität.

#### 4.3.4 Zur Identität von OrfR

Bei der Analyse der verfügbaren Gensequenzen von *R. eutropha* H16 wurde ein Gen identifiziert, dessen Produkt OrfR zu CbbR homolog ist (s. 3.2.3). Beim Sequenzvergleich von OrfR mit verschiedenen CbbR fällt zunächst die hohe Homologie im N-terminalen Bereich der DNA-Bindenden Domäne auf, wie sie für LTTR üblich ist (Abb. 27; Schell, 1993). OrfR weist aber auch eine über die N-terminale Domäne hinausgehende hohe Homologie zu CbbR auf. Die meisten bisher identifizierten CbbR-ähnlichen Proteine spielen eine regulatorische Rolle bei der CO<sub>2</sub>-Assimilation oder dem C<sub>1</sub>-Stoffwechsel. Zu dieser Gruppe gehört QscR aus *Methylobacterium extorquens* AM1. QscR reguliert die Gene des Serin-Weges, deren Produkte dem Organismus Wachstum auf C<sub>1</sub>-Verbindungen erlauben. Die Inaktivierung von *qscR* führte zum Verlust der Fähigkeit zur Assimilation von C<sub>1</sub>-Verbindungen (Kalyuzhnaya und Lidstrom, 2003).

Thd	<mark>M</mark> NVTFRQLRLLEAVARHSSFTRASEELHLTQPAVSTOIKQLEEEIGMPLFEQMGK 55
Chr	MHVSLRQLRVFEAVARHNSYTRAAEELHLSQPAVSMOVRQLEDEIGLSLFERLGK 55
RmI	MHLSLRQIRIFEAVARHRSYTRAAEELRLTQPAVFTOAKQLEEGVGHPLLERIGK 55
orR	MRNATLRQLKVFETVARHNSFSRAAEELHLTQPAVSTOVRQLEHHVGLPLFEQLGK 56
Ral	MSSFLRALTLRQLQIFVTVARHASFVRAAEELHLTQPAVSMOVKQLESVVGMALFERVKG 60
RmII	MQITFRQLRVVSEVARYSSVIRAAEELHLTAPAVSLOIKEAERQVGLTLFDRAGR 55
Thd	KIFLTEAGKEVYAFSRNLAQQFRDIESVLDDMKGVKRGTLSLTVT <mark>ST</mark> GKYFAPYLLAAEL 115
Chr	QVVLTEAGREVFHYSRAIGQSLREMEEVLESLKGVSRGSLRIAVA <mark>ST</mark> VNYFAPRLMAIFQ 115
RmI	QIYLTDAGREVLATCRETIKGLDCLEMRLADMQGLKRGRLRLAMVTTAEYLLPRLLGEEC 115
orR	KIYLTPAGHEMLHYSRSIIQQFREAEDAMSQLKGISGGRLNVAVISAGDYFFPRLLAEEM 116
Ral	QLTLTEPGDRLLHHASRILGEVKDAEEGLQAVKDVEQGSITIGLI <mark>ST</mark> SKYFAPKLLAGET 120
RmII	RMTLTTTGEYFLVYARRLLATLKDAEDMMARFKRLESGRLTIGMVGAASYFLPQLLAKEH 115
Thd	KRYPGTQVHLEVTNREEVVQQLHDNTPDMAIMGTPPEHIELHSQAFMQNPLVIIAPPDHP 175
Chr	QRHSGIGLRLDVTNRESLVQMLDSNSVDLVLMGVPPRNVEVEAEAFMDNPLVVIAPPDHP 175
RmI	AHYPGIEAKLIVSNREQLLARIANNEDDLTILGAPPEGMDVAAIPIADNPLVVIARNDHP 175
orR	NRHEGVTLNLAVHNREELLHQLAGNLTDLAVMVRPPEGMDTINEAFAPHPYVIVAAPTHP 176
Ral	ALHPGVDLRIAEGNRETLLRLLQDNAIDLALMGRPPRELDAVSEPIAAHPHVLVASPRHP 180
RmII	AEHPAVDVRLRLASREKLGVMMQGNDVDLCIMGRPPQDPPTRAEPFASHPHVLVVSPQHR 175
Thd Chr RmI orR Ral RmII Thd Chr	****** LVGVSRVPLSRLVEBNFILRERGSGTRNAVERFFEQRGIKLNTSMEMSRNEAIKHAVMAG LAGERAISLARLAEBTFVMRBEGSGTRQAMERFFSERGQTIRHGMQMTRNEAVKQAVRSG LAGEKAIPMARIAEBPFVFRBPGSGTRLATERHFAEHGHKLKVRLELGSNEAIKQAIAGG LVGQRNIPLAELADBAFVSREKGSDTWNSMQEGFAGRLSNMRIAMEIKSTETIKQAVIAN 236 LHDAKGFDLQELRHETFLLREPGSGTRTVAEYMFRDHLFTPAKVITLGSNETIKQAVMAG FARAEAVPAVALANBPFIVREPDSGTREALQKYLDAHRIQPTFVMEMPSNEAIKQAVMAG LGLGIVSLHTLEFELALSRIALLSVESFPIMKEWYLVHRNGKRMSPIAQAFHQFVLNEAD 295 LGLSVVSLHTIELELETRRLVTLDVEGFPDRRQWYLVYRRGKRLSPAAGAFREFVLSEAA 295
RmI	LGV <mark>SVL</mark> SGYTLALBGLSGLVQPLDVQGFPLMRKWYVAYPKGKHLSAVAEAFLGHLLGK 293
orR	MGIAFLSAHTVGLBLQAGKLAVLDIEGFPVMLNWYVVHRKNKRLPPVALAFKQFLMEEGA 296
Ral	MGISLLSLHTLGIBLRTGEIGLLDVAGTPIERIWHVAHMSSKRLSPASESCRAYLLEHTA 300
RmII	MGVSLLSLHTIALBWSNGLIAVPHVEGLPLERRWNVVNIAAKQLSPAAEAFRYFVLEHGE 295
Thd Chr RmI orR Ral RmII	RIMKLPQPKPVTRSRRRVTRS 316 RMHCRLG 302 

#### Helix-Turn-Helix-Motiv

## Abb. 27. Vergleich von Aminsosäuresequenzen verschiedener CbbR-ähnlicher Transkriptionsregulatoren

orR, *R. eutropha* H16 CbbR-Homolog OrfR; Ral, *R. eutropha* H16 CbbR (S18583); RmI, *R. metallidurans* CH34 CbbR<sub>I</sub> (ZP\_00271303); RmII, *R. metallidurans* CH34 CbbR<sub>II</sub> (ZP\_00271466); Thd, *T. denitrificans* CbbR (AF307090); Chr, *Chromatium vinosum* RbcR (P25544); In allen Proteinen identische Aminosäuren sind schwarz, in mindestens fünf der Proteine identische Aminosäuren sind dunkelgrau und in mindesten vier der Proteine identische Aminosäuren sind gelb unterlegt. Das Helix-Turn-Helix-Motiv ist markiert. Ein konserviertes Sequenzmotiv ist mit Sternchen gekennzeichnet.

Es wurde nun zunächst angenommen, dass auch OrfR zusammen mit CbbR bei der Regulation der CO<sub>2</sub>-Assimilation in *R. eutropha* H16 eine Funktion haben könnte. Eine gemeinsame Regulation von Genen durch zwei LTTR wurde für die Gene des Aromatenabbaus in *Acinetobacter* sp. ADP1 entdeckt. Die LTTR CatM und BenM kontrollieren ein Regulon, das 16 Gene des Aromatenabbaus umfasst. Sie haben eine Sequenzähnlichkeit von 59 %, werden beide von Muconat induziert und können sich bis zu einem gewissen Grad gegenseitig ersetzten (Clark et al., 2002). Die Bedeutung der beiden Regulatoren für die einzelnen Gene variiert dabei. So sind sie für die Expression von *catA* und benP gleich wichtig, während catB vor allem von CatM reguliert wird (Bundy et al., 2002). Das Operon benABCDE wird hauptsächlich durch BenM reguliert. In einer BenM-Nullmutante kann CatM immer noch eine Expression von benABCDE auf niedrigem Level vermitteln, diese ist aber nicht ausreichend für ein Wachstum auf Benzoat (Cosper et al., 2000). Die beiden Transkriptionsregulatoren XylR und DmpR aus der NtrC-Familie in Pseudomonas putida können, wenn sie simultan exprimiert werden, gemeinsam den Pu-Promotor aktivieren, unter dessen Kontrolle die Gene der Toluol- sowie m- und p-Xylol-Oxidation stehen (Fernandez et al., 1994). Es wäre daher denkbar, dass die in CbbR-Nullmutanten von R. eutropha H16 beobachtete Aktivierung von  $p_{cbbL}$ -Varianten auf niedrigem Niveau in CbbR-Nullmutanten auf der Aktivierung durch OrfR beruht. Tatsächlich wurde in der Gelretardation von OrfR mit der cbb-Kontrollregion aus R. eutropha H16 eine Bindung des Proteins beobachtet (s. 3.2.3.2). Der resultierende Komplex wies allerdings eine sehr viel höhere Mobilität als der CbbR-DNA-Komplex auf. Dies deutet auf eine anders geartete Bindung von OrfR an die Kontrollregion hin. Ausgehend von der höheren Mobilität des Komplexes in der Gelretardation verursacht OrfR wahrscheinlich eine verminderte Krümmung der DNA. Diese Beobachtung und vor allem der unveränderte Phänotyp der orfR-Deletionsmutante machen eine Beteiligung von OrfR an der cbb-Genregulation unwahrscheinlich. Möglich ist aber, dass OrfR aus einer Duplikation von cbbR hervorgegangen ist und anschließend als Transkriptionsregulator für andere Aufgaben rekrutiert und den Bedürfnissen entsprechend verändert wurde. Als Folge von Gendulikationen wird auch das Auftreten mehrerer Kopien des Arginin-Repressors argR in den Genomen Gram-positiver Organismen wie Lactobacillus und Staphylococcus ausgelegt. Die zwei Kopien des Arginin-Repressors argR1 und argR2 in Lactobacillus plantarum sind beide für die Repression der Gene der Arginin-Biosynthese notwendig. Es wird vermutet, dass ein Heterohexamer aus den zwei Unterformen die Repression vermittelt (Nicoloff et al., 2004). In L. lactis ist nur eine Kopie von argR an der Arginin-Regulation beteiligt. Die zweite, leicht veränderte Kopie spielt eine Rolle in der Säureresistenz des Organismus (Rallu et al., 2000; Larsen et al., 2004). Für eine entsprechende Modifikation von OrfR aus R. eutropha H16 spricht die unvollständige Konservierung des in CbbR konservierten Motivs -REXGSGTR- (s. 3.3; Abb. 15). So ist das zweite Glycin gegen Aspartat und das zweite Arginin gegen Tryptophan ausgetauscht (Abb. 27). Ein Austausch des ersten Glycins gegen Aspartat liegt aber auch in  $CbbR_{II}$  aus *R. metallidurans* CH34 vor und zeigt, dass die strenge Konservierung dieses Motivs für die Funktion nicht unbedingt notwendig ist. Unabhängig davon scheint OrfR aber keine Funktion im Stoffwechsel von *R. eutropha* H16 zu erfüllen, die unter den überprüften Bedingungen für das Wachstum essentiell ist, wie der unveränderte Phänotyp der Deletionsmutante zeigte.

# 4.4 Potentielle Faktoren der *cbb*-Genregulation in *R. eutropha* H16

In einer *cbbR*-Deletionsmutante von *R. eutropha* H16 ist der *cbb*-Operonpromotor nicht aktiv, was seine Abhängigkeit von dem Transkriptionsaktivator CbbR beweist. In Untersuchungen zur Betätigung des *cbb*-Operonpromotors,  $p_{cbbL}$ , war dessen Sequenz dem  $\sigma^{70}$ -Consensus-Motiv von *E. coli* angenähert worden. Einige dieser Promotormutanten zeigten eine hohe Basalaktivität, waren aber immer noch unter den gleichen Wachstumsbedingungen wie der Wildtyp-Promotor induzierbar. Diese prinzipielle Fähigkeit zur Induktion blieb auch in der *cbbR*-Deletionsmutante erhalten und deutet auf die Aktivierung des Promotors durch (einen) zusätzliche(n) Faktor(en) hin (Jeffke et al., 1999). Zur Identifizierung dieses potentiellen Faktors wurden zwei methodische Ansätze gewählt, da nicht bekannt war, ob der Faktor nur direkt mit der *cbb*-Kontrollregion und/oder mit CbbR interagiert.

Die Arbeitshypothese war, dass der postulierte Faktor das induzierende Signal aus dem Energie- oder Kohlenstoffwechsel aufnimmt und es durch Interaktion mit der *cbb*-Kontrollregion und/oder mit CbbR umsetzt. Mit einem Zwei-Hybrid-System sollten daher Proteine identifiziert werden, die mit CbbR direkt interagieren. Nur ein potentieller Transkriptionsregulator, (AepA), der anscheinend mit dem  $\lambda$ cI-CbbR-Fusionsprotein interagierte, wurde isoliert. Dieser ist aber, aus den Eigenschaften der *aepA*-Deletionsmutante zu schließen, nicht an der *cbb*-Genregulation beteiligt. Es ist möglich, dass auf diese Weise deshalb nicht mehr potentielle Faktoren der *cbb*-Genregulation isoliert wurden, weil für die Interaktion mit CbbR ein Co-Faktor nötig ist oder die Interaktion der Proteine erst während oder nach der DNA-Bindung erfolgt. So interagieren CbbR und RegA in *R. sphaeroides* wahrscheinlich erst während der DNA-Bindung (Dubbs et al., 2000). Die beiden Transkriptionsregulatoren der Arginin-Biosynthese und des Arginin-Abbaus, ArgR und AhrC, in *Lactococcus lactis* binden erst in der Gegenwart des Effektors Arginin effektiv an den *arcA*-Promotor (Larsen et al., 2005). Die Interaktion des postulierten Transkriptionsfaktors mit CbbR bei der *cbb*-Transkriptionsaktivierung könnte natürlich aber auch indirekt über den Einfluß auf die DNA-Topologie erfolgen. Ein weiterer kritischer Punkt, der die Isolierung mit CbbR interagierender Proteine behindern könnte, ist die Struktur der im Zwei-Hybrid-System interagierenden Fusionsproteine. Wie die Bindungsstudien mit einer C-terminalen Fusion von CbbR mit einem Intein-CBD-,Tag' (Chitin bindende Domäne) und dem gereinigtem Protein, das am C-Terminus zwei zusätzlich Aminosäuren trug, gezeigt haben, reagiert CbbR recht empfindlich auf Modifikation seines C-Terminus (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher könnte die  $\lambda$ cI-Fusion die Struktur und damit die Funktion eines Proteins beeinflussen und eine Interaktion mit anderen Proteinen stören (s. 3.2.2).

Dass nicht nur eine Deletion, sondern auch das Hinzufügen von Aminosäuren die Eigenschaften eines Proteins verändern kann, zeigten Wu und Filutowicz (1999) mit dem Protein Pi das zur Reinigung an einer Affinitätssäule mit sechs Histidinresten (,His-tag') fusioniert wurde. Pi ist ein vom Plasmid R6K codiertes Protein, das die Plasmidreplikation reprimiert. Es liegt ursprünglich als Dimer vor und bindet auch als Dimer an die DNA. Das Genprodukt eines mutierten Pi (F107S) bildet keine Dimere mehr in Lösung. Die Fusion dieses Proteins mit sechs Histidinresten stellte aber die Fähigkeit zur Dimerbildung und DNA-Bindung wieder her. Ebenso wie die Wiederherstellung einer Funktion könnte aber das Hinzufügen von Aminosäuren, wie bei dem C-terminalen Fusionsprotein von CbbR, die Oligomerisierung eines Proteins behindern. Eine nur partielle Wiederherstellung der Funktion wurde auch bei dem Oncoprotein Bcr-Abl, das bei der humanen Leukämie eine Rolle spielt, nach dem Austausch der Domäne zur Oligomerisierung gegen eine Glutathion-S-Transferase beobachtet (Maru et al., 1996).

In einem zweiten Ansatz wurden Proteine angereichert, die an die *cbb*-Kontrollregion binden. In einer vorhergehenden Arbeit war ein potentieller Transkriptionsregulator, P1, isoliert und identifiziert worden, der spezifisch an ein symmetrisches Sequenzmotiv stromaufwärts der CbbR-Binderegionen bindet. Die Charakterisierung der P1-Deletionsmutante zeigte jedoch, dass P1 keine Funktion bei der Regulation der *cbb*-Genexpression besitzt. In Studien von Promotorfusionen mit Subfragmenten der *cbb*-Kontrollregion aus *R. eutropha* H16 verursachte die Deletion dieses symmetrischen Sequenzmotives eine deutliche Verringerung der Promotoraktivität (Jeffke, 2001). Ausgehend von diesem Befund wurde daher angenommen, dass dieses Sequenzmotiv bei der Regulation der *cbb*-Genexpression eine Rolle spielt. Tatsächlich konnten aber mit der DNA-Affinitätschromatographie keine DNA- bindenden Proteine isoliert werden, wenn ein DNA-Fragment der *cbb*-Kontrollregion verwendet wurde, welches nur noch dieses symmetrische Sequenzmotiv ohne die CbbR-Binderegion trug. Ebenso wurden mit einem nur die CbbR-Binderegionen enthaltenden Fragment keine DNA-bindenden Proteine isoliert. Nur beim Einsatz eines vollständigen Fragments der *cbb*-Kontrollregion konnten DNA-bindende Proteine gewonnen werden. Abgesehen von einer möglichen sterischen Behinderung der Bindung an die kleineren Fragmente, scheint daher die vollständige *cbb*-Kontrollregion für eine erfolgreiche Bindung von Proteinen erforderlich zu sein (s. 3.2.1). Trotz des Zusatzes von Lachsspermien-DNA zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen wurde eine ganze Reihe von DNA-bindenden Proteinen isoliert. Auffällig ist dabei die hohe Anzahl von hypothetischen LTTR (s. Anhang II), die wahrscheinlich aufgrund des konservierten LysR-Bindemotivs (T-N<sub>11</sub>-A) an die *cbb*-Kontrollregion banden.

#### 4.4.1 Identität potentieller Transkriptionsregulatoren

Während der Suche nach Transkriptionsfaktoren, die synergistisch mit CbbR die Transkription der *cbb*-Gene in *R. eutropha* H16 aktivieren würden, wurden eine Reihe von potentiell beteiligten Proteinen isoliert (s. 3.2.1 und 3.2.2). Von diesen wurden einige ausgewählt und Deletionsmutanten der korrespondierenden Gene in *R. eutropha* H16 hergestellt (s. 3.2.4). Diese wurden anschließend auf eine Veränderung des Phänotyps hin überprüft. Da bei *R. eutropha* H16 eine deutliche Korrelation zwischen der *cbb*-Genexpression und dem Wachstum unter autotrophen Bedingungen besteht (s. 3.3.2), sollte sich eine Rolle der entsprechenden Genprodukte bei der *cbb*-Regulation zumindest in einem verlangsamten autotrophen Wachstum äußern. Bis auf eine hatte keine der Deletionsmutanten einen im Vergleich zum Wildtyp veränderten Phänotyp. Nur die *frcR*-Deletionsmutante zeigte einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp und wird daher gesondert diskutiert (s. 4.4.2).

Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems wurde als potentiell mit CbbR interagierendes Protein ein Transkriptionsregulator isoliert, der Ähnlichkeit zu dem Transkriptionsregulator AepA aus *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* hat. AepA ist in *E. carotovora* subsp. *carotovora* ein Aktivator für die Produktion extrazellulärer Enzyme, die Zellwände von Pflanzenzellen angreifen und so zu den Symptomen der Schwarzbeinigkeit und der Nassfäule unter anderem bei der Kartoffel führen (Murata et al., 1994). Die Expression dieser Enzyme benötigt zur Aktivierung neben Signalen pflanzlichen Ursprungs, noch Signale, welche die Zelldichte anzeigen (,Quorum-sensing<sup>4</sup>) sowie die drei Transkriptionsfaktoren AepA, AepB und AepH. Wie diese Regulation der Gene im Detail erfolgt, ist nicht bekannt. Allerdings gibt es Hinweise auf eine synergistische Regulation durch die drei Transkriptionsfaktoren, die durch Signalmoleküle wie ein Zelldichte abhängiges Homoserinlacton-Derivat aktiviert wird (Murata et al., 1994). Eine synergistische Funktion bei der Aktivierung der *cbb*-Gene schien auch für AepA und CbbR denkbar. Dies konnte bei der Charakterisierung der *aepA*-Deletionsmutante aber nicht bestätigt werden. Es muß dabei jedoch in Betracht gezogen werden, dass die mit dem Zwei-Hybrid-System beobachtete Interaktion von CbbR und dem AepA-Homologen nicht mit dem vollständigen AepA erfolgte, sondern nur mit einem Teil des Proteins. Da die Induktion der *cbb*-Genexpression in der Deletionsmutante nicht beeinflußt zu sein scheint, findet wahrscheinlich *in vivo* keine Interaktion von CbbR und dem AepA-Homologen statt.

Das von *orfV* codierte Protein hat nur Ähnlichkeit zu nicht näher charakterisierten hypothetischen Proteinen anderer Organismen. Da nichts über den oder die weiteren Faktoren der *cbb*-Genregulation in *R. eutropha* H16 bekannt ist und es sich auch um einen völlig neuartigen Regulator handeln könnte, wurde OrfV ebenfalls bearbeitet. Wie der Phänotyp der *orfV*-Deletionsmutante aber zeigte, hat OrfV unter den getesteten Bedingungen keinen detektierbaren Einfluß auf das autotrophe Wachstum und somit auf die *cbb*-Genregulation.

Ein weiteres Protein, das durch die DNA-Affinitätschromatographie isoliert wurde und in die Familie der LTTR einzuordnen ist, wird durch *orfG* codiert. Eine gemeinsame Regulation von Operonen durch zwei LTTR wurde bereits unter 4.3.4 beschrieben. Das Gen war außerdem insofern interressant, als es stromaufwärts und divergent orientiert zu einem Gen liegt, das für ein dem Pirin ähnliches Protein codiert. Pirin ist ein sehr konserviertes Protein in Eu- und Prokaryonten, von dem eine Funktion in der Modulation der Transkription angenommen wird (Wendler et al., 1997; Pang et al., 2004). In *Synechocystis* sp. PCC6803 liegt die Expression eines Pirin-Orthologs unter der Kontrolle des LTTR PirR (Hihara et al., 2004). Aufgrund der für LTTR-Gene typischen Lokalisation von *orfG* stromaufwärts und divergent orientiert zum Gen eines Pirin-Orthologs kann von einer Regulation des Pirin-Gens durch OrfG ausgegangen werden. Jedenfalls spielt OrfG keine Rolle bei der *cbb*-Regulation, da der autotrophe Phänotyp der Deletionsmutante unaufällig war. Ein Defekt in der Pirin-Produktion dürfte sich wahrscheinlich nicht in einem veränderten Phänotyp unter den untersuchten Bedingungen äußern. Auch in *Synechocystis* sp. PCC6803 bewirkte eine Inaktivierung des Pirins keine Veränderungen des Phänotyps (Hihara et al., 2004).

Von den Genen sspA und cmk, deren Produkte ebenfalls per DNA-Affinitätschromatographie isoliert wurden, konnten keine Deletionsmutanten hergestellt werden. SspA und Cmk wiesen Ähnlichkeit zu SspA (, stringent starvation protein') bzw. einer Cytidylat-Kinase aus E. coli auf. Die Deletion dieser Gene ist für R. eutropha H16 wahrscheinlich letal. In E. coli wird sspA vor allem unter limitierenden Nähstoffbedingungen exprimiert. Eine sspA-Deletionsmutante von E. coli weist zwar eine verringerte Widerstandsfähigkeit bei Nährstoffmangel auf, ist aber durchaus lebensfähig. Eine Analyse des Proteoms dieser Zellen zeigte, dass die Bildung von mindestens elf Proteinen in dieser Mutante beeinflußt wurde (Williams et al., 1994). SspA scheint die Expression anderer Gene zu modulieren und wäre daher ein guter Kandidat für die Modulation der cbb-Genexpression in R. eutropha H16. Damit im Einklang würde auch die Rolle als Regulator von SspA unter nährstofflimitierenden Bedingungen stehen, da die cbb-Gene wahrscheinlich bei mangelnder Kohlenstoff- aber ausreichender Energieversorgung induziert werden. Des Weiteren erfüllen SspA-homologe Proteine in anderen Organismen ganz unterschiedliche Aufgaben. So reguliert ein SspAhomolog (RegF) in Neisseria gonorrhoeae die Expression von pilE, das ein Typ IV-Pilin codiert (Reuse und Taha, 1997). In Providencia stuartii kontrolliert ein SspA-Homolog, die Expression des Regulatorgens aarP (Ding et al., 2001). Auch der Einfluss von SspA auf die Genexpression ist unterschiedlich. Während es die Expression von *aarP* erhöht, reprimiert es die Expression von pilE (Reuse und Taha, 1997; Ding et al., 2001). Welche Funktion dieses Protein in *R. eutropha* H16 erfüllt, kann daher nicht vorhergesagt werden.

Cmk von *R. eutropha* H16 zeigt Ähnlichkeit zu CMP-Kinasen. Diese Enzyme katalysieren den Transfer von Phosphatgruppen von ATP auf CMP und dCMP. Hier wurde eine Verbindung zum Energiestoffwechsel vermutet, ähnlich der Signaltransduktion bei der Katabolitrepression in *E. coli*, die auf dem ,second messenger' cAMP beruht (Botsfold und Harman, 1992). Dass eine CMP-Kinase essentiell für das Wachstum ist, wurde auch für *Streptococcus pneumoniae* gezeigt. Von diesem Organismus gelang es ebenfalls nicht, lebensfähige CMP-Kinase-Defektmutanten zu isolieren (Yu et al., 2003). Sowohl *S. pneumoniae* als auch *R. eutropha* H16 scheinen daher nur eine Kopie dieses Gens zu besitzen.

In der DNA-Affinitätschromatographie mit der *cbb*-Kontrollregion aus *R. eutropha* H16 wurde ein vorläufig OrfP genanntes Protein isoliert, das eine potentielle PAS/PAC-Domäne trägt. Eines der *cbb*-Operone aus *R. palustris* enthält neben den Genen der Form I-RubisCO

Gene von zwei potentiellen ,Response'-Regulatoren und einer Sensor-Kinase, die PAS/PAC-Domänen aufweist (Dubbs und Tabita, 2004). Diese spezifische Lokalisation legt eine regulatorische Funktion dieser Gene in R. palustris nahe (Dubbs und Tabita, 2004). Proteine mit PAS-Domänen sind in Eu- und Prokaryonten weit verbreitet (Alda et al., 2004). Die Domäne als solche wurde erstmals 1991 in drei eukaryontischen Proteinen beschrieben und dafür die Bezeichnung PAS vorgeschlagen (Period, arvl hydrocarbon receptor nuclear translocator [ARNT], and Single-minded; Hoffman et al., 1991). Die PAS-Domäne selbst umfasst bis zu 130 Aminosäurereste, zeigt allerdings nur eine Identität von ca. 12 % zwischen den verschiedenen Mitgliedern der Familie (Zhulin et al., 1997). Unabhängig von der gering konservierten Sequenz ist die Struktur der PAS-Domäne sehr konserviert. Sie besteht aus einem von fünf Strängen gebildeten β-Faltblatt, das durch eine lange helicalen Struktur mit dem übrigen Teil des Proteins verbunden ist, und drei kurzen  $\alpha$ -Helices (Pandini und Bonati, 2005). Die PAS-Domäne ist häufig mit einem PAC-Motiv (PAS-associated C-terminal motif) assoziiert, das auf der C-terminalen Seite der PAS-Domäne liegt. Proteine mit PAS-Domäne haben im Allgemeinen eine Funktion als Sensoren und bei der Weiterleitung von Umweltsignalen (Alda et al., 2004). Zu den Proteinen mit PAS-Domäne gehören unter anderem FixL aus S. meliloti, das als Sauerstoffsensor dient (Soupene et al., 1995) sowie KinC aus B. subtilis, das an der Regulation der Sporulation beteiligt ist (Ledeaux und Grossman, 1995). In dem aktuellen Modell der cbb-Genregulation von R. eutropha H16 wird eine Verbindung der Regulation zum Redox-Status der Zelle gefordert. Einige Proteine mit PAS-Domäne enthalten Co-Faktoren zur Detektion von Redox-Signalen wie der Aerotaxis-Rezeptor Aer aus E. coli (Watts et al., 2004). OrfP hätte daher das gesuchte Bindeglied zwischen dem Energiestatus der Zelle und der cbb-Genexpression darstellen können. Diese Funktion scheint es aber nicht zu erfüllen, da keine Veränderungen des autotrophen Wachstums und des allgemeinen Phänotyps bei der orfP-Deletionsmutante erkennbar waren.

## 4.4.2 Identität und Funktion von FrcR

#### 4.4.2.1 Der potentielle Repressor FrcR

Im Zuge der DNA-Affinitätschromatographie wurde auch ein Protein isoliert, das Ähnlichkeit zu Mitgliedern der "Repressor-ORF-Kinase'-Familie (ROK) aufwies. Diese Proteinfamilie umschließt zwei Klassen von Proteinen. Die eine Klasse wird von Glucose- und Fructose-Kinasen verschiedener Organismen, die zweite Klasse von Transkriptionsregulatoren gebildet. Zu letzterer werden unter anderem Xylose-abhängige Repressoren (XylR) aus Bacillus spp. und die beiden Regulatoren NagC und Mlc aus E. coli gezählt (Dahl et al., 1995; Plumbridge, 2001a). Die Transkriptionsregulatoren besitzen ein N-terminales Helix-Turn-Helix-Motiv, das in den Kinasen nicht vorhanden ist. In den Kinasen sind die an ATP-Bindung und Phosphotransfer beteiligten Aminosäuren am deutlichsten konserviert. In den Transkriptionsregulatoren sind Sequenzen und Strukturen, die wahrscheinlich der Bindung der Zucker dienen, stärker erhalten (Titgemeyer et al., 1994). Da von den Transkriptionsregulatoren der ROK-Familie eine Interaktion mit Zuckern bekannt war (Dahl et al., 1995; Plumbridge und Pellegrini, 2004), wurde zunächst angenommen, dass FrcR möglicherweise mit einem Intermediat des CBB-Cyclus reagiert und die Expression der cbb-Gene in R. eutropha H16 moduliert. Eine aktivierende Wirkung von Intermediaten des CBB-Cyclus wurde für CbbR<sub>I</sub> und CbbR<sub>II</sub> aus R. capsulatus nachgewiesen (Dubbs et al., 2004). Das Protein wies aber neben der Ähnlichkeit von 41 % zu NagC (Acc. Nr.: AAG54998) aus E. coli, auch eine Ähnlichkeit von 49 % zu FrcR aus S. meliloti auf (s. Anhang II).

Das Gen *frcR* in *S. meliloti* codiert ebenfalls einen potentiellen Transkriptionsregulator der ROK-Familie. Es liegt stromaufwärts, divergent orientiert zu einem Operon, welches die Gene eines Fructose-Transporters der ABC-Superfamilie enthält. Die Gene *frcBCA* des *frc*-Operons von *S. meliloti* codieren die Komponenten des Transporters. Dieser besteht aus einem periplasmatischen, Substrat bindenden Protein (FrcB), einer transmembranen Permease (FrcC) und einem cytoplasmatischen ATP-bindenden Protein (FrcA). Zusätzlich befindet sich noch das Gen *frcK* in dem Operon, dessen Genprodukt Ähnlichkeit zu anderen Kinasen zeigt. Anhand einer Insertionsmutante wurde der Transporter als ein hochaffiner Transporter für Fructose, Ribose und Mannose charakterisiert (Lambert et al., 2001). Eine Untersuchung der *frcR*-flankierenden Sequenzen in *R. eutropha* H16 deckte ebenfalls die Gene eines potentiellen Fructosetransporters auf (Abb. 28; B. Kusian und B. Bowien, persönliche Mitteilung).



Abb. 28. Schematische Wiedergabe des *frc*-Operons aus *R. eutropha* H16. Bezeichnung der Gene und ihrer potentiellen Produkte: *frcR*, Repressor der ROK-Familie; *frcA*, cytoplasmatisches, ATP-bindendes Protein; *frcC*, transmembranale Permease; *frcB*, periplasmatisches Substratbindendes Protein; *zwfB*, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; *pgiB*, Phosphoglucose-Isomerase; *frcK*, Zucker-Kinase.

Analog zu *S. meliloti* erhielten die Gene daher die Bezeichnung *frcR* für den Transkriptionsregulator, *frcB*, *frcC* und *frcA* für die Komponenten des Transporters sowie *frcK* für die Zucker-Kinase. Zwei weitere Gene, eines für eine Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD; *zwfB*) und eines für eine Phosphoglucose-Isomerase (PGI; *pgiB*), sind in diesem Operon codiert. Diese Enzyme spielen eine Rolle beim Abbau von Fructose über den Entner-Doudoroff-Weg (ED-Weg; Bowien und Schlegel, 1981). Für den Transporter wurde daher eine Funktion bei der Fructose-Aufnahme in *R. eutropha* H16 postuliert, dessen Expression durch FrcR reguliert wird.

#### 4.4.2.2 Einfluß von FrcR auf den Kohlenstoffwechsel in *R. eutropha* H16

Die Transkriptionsregulatoren der ROK-Familie sind meist Repressoren, können aber auch die Expression von Genen induzieren. Diese Regulation ist bei Mlc und NagC aus E. coli nicht nur auf ein Operon beschränkt. Mlc reprimiert Gene der Glucose- und Mannosespezifischen Phosphotransferase-Systeme und die Transkription des globalen Transkriptionsregulators MalT des mal-Regulons. NagC vermittelt nicht nur die Repression der Gene des N-Acetylglucosamin- und Chitobiose-Abbaus (nagE-BACD, chbBCARFG), es aktiviert auch Gene der Glucosamin- und N-Acetylglucosamin Biosynthese (glmUS) und sorgt auf diese Weise für eine koordinierte Degradation und Biosynthese dieser Aminozucker. Diese Regulation erfolgt im Zusammenspiel mit CAP, auch bekannt als CRP (cAMP receptor protein) (Plumbridge und Kolb, 1998; Plumbridge, 2001b; Schiefner et al., 2005).

FrcR könnte daher in *R. eutropha* H16 durchaus als Repressor und/oder Aktivator von Genen des Zuckerstoffwechsels wirken. Der Abbau von Fructose erfolgt in *R. eutropha* H16 über

den ED-Weg. Für den Abbau der Fructose wird diese zuerst zu Fructose-6-phophat phosphoryliert, dann durch PGI isomerisiert und anschließend durch die G6PD oxidiert (Bowien und Schlegel, 1981). Die Existenz der Gene einer G6PD und einer PGI im *frc*-Operon boten eine relativ einfache und schnelle Methode, die Expression des Operons anhand der PGI- und G6PD-Aktivitäten indirekt zu bestimmen (s. 3.2.4.3.2). Die *frcR*-Deletionsmutante war interessanterweise immer noch in der Lage, mit Fructose als Substrat zu wachsen, wenn auch deutlich verlangsamt. Dies schien zunächst auf eine (partielle) Inaktivierung des Operons durch den Defekt des Transkriptionsregulators FrcR und einen weniger affinen Fructosetransport durch alternative Transporter in die Zelle hin zu deuten.

Die Enzymaktivitäten von PGI und G6PD indes widerlegten dies und zeigten die gleichen Aktivitäten wie im Wildtyp. FrcR stellt demzufolge wahrscheinlich einen Repressor des frcR-Operons dar. Im Wildtyp H16 sind nur nach Wachstum mit Fructose stark erhöhte PGI- und G6PD-Aktivitäten vorhanden. Dies spricht für eine Funktion von Fructose als Induktor von FrcR. Entsprechend ist in E. coli N-Acetylglocosamin-6-phosphat der Induktor von NagC und Xylose der Induktor von XylR (Dahl et al., 1995; Plumbridge und Pellegrini, 2004). Nach Wachstum von R. eutropha H16 auf Gluconat, Succinat, Pyruvat oder NB wurden im Wildtyp deutlich geringere Enzymaktivitäten gefunden, die besonders niedrig waren, wenn die Zellen unter lithoautotrophen Bedingungen wuchsen. Unter all diesen Bedingungen wird die Expression des frc-Operons durch FrcR reprimiert, da weder der Fructose-spezifische Transporter zum Transport noch G6PD und PGI für den Abbau dieser Substrate benötigt werden. Eine gewisse Hintergrundaktivität bleibt aber erhalten und beruht wahrscheinlich auf der Aktivität weiterer Genkopien von PGI und G6PD, die im Genom von R. eutropha H16 vorhanden sind (B. Kusian und B. Bowien, persönliche Mitteilung). Für die Repression des frc-Operons unter diesen Bedingungen ist aber anscheinend noch ein weiteres Protein erforderlich, da auf einigen Substraten (Pyruvat, Succinat, NB, Gluconat) in der frcR-Deletionsmutante HB72 keine vollständige Derepression der Enzyme zu beobachten war. Diese Repression war allerdings nicht mehr so streng und war beim Wachstum der Mutante auf N-Acetylglucosamin und unter autotrophen Bedingungen anscheinend völlig aufgehoben.

Von anderen Transkriptionsregulatoren der ROK-Familie ist bekannt, dass sie gemeinsam mit globalen Regulatoren der Katabolitrepression (,Carbon Catabolite Repression' [CCR]) agieren. Die CCR erfolgt in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien durch globale Transkriptionsregulatoren, die unterschiedlichen Mechanismen folgen und nicht miteinander verwandt sind (Warner und Lolkema, 2003). Beim Wachstum von B. subtilis auf Glucose plus Xylose erfolgt zunächst die Verwertung des bevorzugten Substrats Glucose. Erst wenn Glucose als C-Quelle erschöpft ist, wird Xylose abgebaut. Dieses Phänomen der Diauxie wird durch die Repression des xyl-Operons durch den Transkriptionsregulator XylR und den globalen Transkriptionsregulator der CCR, CcpA, vermittelt (Rygus und Hillen, 1992; Schmiedel und Hillen, 1996; Rodionov et al., 2001). Analog wird eine Repression des frcR-Operons von R. eutropha H16 durch FrcR zusammen mit einem noch nicht identifizierten Transkriptionsregulator der CCR vermutet. In der gleichen Weise, wie eine Inaktivierung von xylR in B. subtilis nur zu einer partiellen Derepression des xyl-Operons führt (Schmiedel und Hillen, 1996), verursacht eine Deletion von frcR nur eine partielle Derepression des frcR-Operons. Das Ausmaß der von dem potentiellen globalen Tanskriptionregulator vermittelten Repression ist dabei vom Wachstumssubstrat abhängig. Eine vollständige Induktion des frcR-Operons erfolgt im Wildtyp H16 nur in Gegenwart des Induktors Fructose als C-Quelle. Dagegen zeigte die frcR-Mutante auch eine Derepression mit N-Acetylglucosamin oder CO<sub>2</sub> als C-Quellen. Unter diesen Bedingungen wird die Repression des Operons im Wildtyp in erster Linie vermutlich durch FrcR vermittelt. Erst mit den bevorzugten Substraten Pyruvat, Succinat und Gluconat wird die CCR zunehmend wirksam. Dies ist im geringeren Maße auch mit NB der Fall.

Eine veränderte Regulation durch Interaktion mit verschiedenen Signalmolekülen wurde bereits für das Crc-Protein (,catabolite repression control') in P. putida postuliert (Küster et al., 1999; Ruiz-Manzano et al., 2005). Crc ist an der CCR verschiedener Wege des Zuckerkatabolismus und des Abbaus aromatischer Substrate beteiligt. Anhand der Analyse von Crc-Mutanten und der Überproduktion des Proteins in P. putida konnte gezeigt werden, dass die Menge ebenso wie die Aktivität von Crc für die Crc-vermittelte Repression entscheidend sind. Dabei ist die Modulation der Crc-Aktivität von den Wachstumsbedingungen abhängig (Ruiz-Manzano et al., 2005). Die CCR in R. eutropha H16 scheint ebenfalls von dem zur Verfügung stehenden Substrat abhängig zu sein. Im Fall von Crc werden Intermediate des ED-Weges 6-Phosphogluconolacton oder 2-Keto-3-desoxy-6phosphogluconat als Signalmoleküle für die Repression des pu-Promotors angenommen (Velazquez et al., 2004). Diese Metabolite sind aber wahrscheinlich nicht die Signalmoleküle in R. eutropha H16, da die CCR gerade mit Substraten wie Pyruvat, die nicht über den ED-Weg abgebaut werden, besonders aktiv ist.

Die frcR-Mutante HB72 von R. eutropha H16 wies mit Fructose und unter lithoautotrophen Bedingungen ein gegenüber dem Wildtyp verlangsamtes Wachstum auf. Da ein eingeschränkter Fructosetransport in der Mutante aber wenig wahrscheinlich ist, wäre denkbar, dass FrcR neben der Repression des frcR-Operons auch noch andere Bereiche des Zuckermetabolismus in R. eutropha H16 beeinflusst. Das Wachstum von R. eutropha H16 auf Fructose oder Guconat beruht auf dem Abbau der Zucker über den ED-Weg, daher wurde die Aktivität der Enzyme des ED-Weges, Gluconat-6-phosphat-Dehydratase und 2-Keto-3desoxygluconat-6-phosphat-Aldolase, bestimmt. Die Mutante zeigte analog zum Wildtyp eine erhöhte Enzymaktivität und damit eine Induktion des ED-Weges bei Wachstum auf Fructose oder Gluconat. Keine Induktion erfogte in Wildtyp H16 und Mutante HB72 auf Substraten wie Pyruvat, Succinat oder NB die nicht über den ED-Weg abgebaut werden, sowie autotroph mit CO<sub>2</sub> als C-Quelle. Die Genregulation des ED-Weges ist daher wahrscheinlich von FrcR unabhängig. Eine gesteigerte Induktion war in HB72 allerdings mit Gluconat oder N-Acetylglucosamin zu beobachten. Diese erhöhte Induktion in der Mutante und deren verlangsamtes Wachstum mit Fructose könnte auf einer Veränderung der Balance des Kohlenstoffmetabolismus beruhen. Die Vorstellung einer veränderten Stoffwechsellage wird durch die Analyse der Promotoraktivitäten des cbb-Operonpromotors in der Deletionsmutante HB72 unterstützt. Dieser zeigte nur eine leicht reduzierte Aktivität unter lithoautotrophen Bedingungen. Beim Wachstum der Mutante auf Substraten, die eine heterotrophe cbb-Derepression hervorrufen, war die Promotoraktivität gegenüber dem Wildtyp aber stark verringert. Der geringe Effekt auf die Promotoraktivität unter lithoautotrophen Bedingungen macht eine Funktion von FrcR bei der Regulation des cbb-Operons unwahrscheinlich. Die reduzierte Aktivität des Promotors während des heterotrophen Wachstums könnte auf einen indirekten Effekt über die Veränderung der intrazellulären PEP-Konzentration zurückgeführt werden. PEP wirkt über CbbR auf die cbb-Genexpression reprimierend (Grzeszik et al., 2000). Es erscheint daher möglich, dass FrcR ein über das frc-Operon hinaus wirksamer Transkriptionsregulator ist. Welche Gene davon betroffen wären, kann aber anhand der vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden.

Eine besondere Situation ergibt sich beim Wachstum von *R. eutropha* H16 auf N-Acetylglucosamin. Dieser modifizierte Zucker scheint über ein spezifisches PTS-System aufgenommen zu werden. Das N-Acetylglucosamin-6-phosphat wird dann deacetyliert und desaminiert, das resultierende Fructose-6-phosphat durch PGI zu Glucose-6-phosphat isomerisiert und schließlich über den ED-Weg abgebaut. Das Wachstum von *R. eutropha* H16

auf N-Acetylglucosamin ist relativ langsam (t<sub>d</sub>= 5.9 h). Dies wird auf eine nur sehr geringe induzierende Wirkung dieses Substrates auf die PGI und die Enzyme des ED-Weges zurückgeführt. Überraschend war dabei die deutlich erhöhte Aktivität der G6PD, obwohl die PGI Aktivität niedrig blieb. Tatsächlich war im Wildtyp H16 die PGI-Aktivität so niedrig wie beim Wachstum auf Substraten, für deren Abbau das Enzym nicht benötigt wird. Da nur Fructose das frcR-Operon zu induzieren scheint, kann vermutet werden dass die niedrige PGI-Aktivität durch die zweite im Genom von H16 codierte PGI (B. Bowien, persönliche Mitteilung), verursacht wird. Diese erfüllt im Stoffwechsel wahrscheinlich die Funktion eines ,housekeeping'-Enzyms. Eine Analyse der Genomsequenz von H16 offenbarte eine weitere G6PD-Genkopie innerhalb eines Operons, welches die Gene des potentiellen N-Acetylglucosamin-spezifischen PTS sowie der ersten beiden Schritte des Abbaus von N-Acetylglucosamin codiert. Ein ähnliches PTS-System wurde bereits in E. coli beschrieben (Vogler und Lengeler, 1989). Da dieses Operon vermutlich beim Wachstum auf N-Acetylglucosamin induziert wird, führt die zusätzliche G6PD Kopie dieses Operons anscheinend zu der erhöhten G6PD-Aktivität im Wildtyp. Die geringe Induktion von Enzymen, die für einen effizienten Abbau des Substrats erforderlich sind, scheint die Wachstumsrate von H16 auf N-Acetylglucosamin zu begrenzen. In der frcR-Deletionsmutante HB72 ist aber die Repression der im frcR-Operon codierten PGI und G6PD verringert. Demzufolge kann N-Acetylglucosamin schneller über den ED-Weg abgebaut werden, dessen Induktor möglicherweise 6-Phosphogluconat ist. Weder Fructose noch Fructose-6-phosphat kommen als Induktoren des ED-Weges in Frage, da auch mit Gluconat, das beim Abbau direkt in 6-Phosphogluconat umgewandelt wird, eine Induktion der ED-Enzymbildung stattfindet. Entsprechend der gesteigerten Enzymaktivitäten zeigte HB72 ein deutlich beschleunigtes Wachstum auf N-Acetylglucosamin (t<sub>d</sub>= 3.4 h). Die relativ geringe Induktion des ED-Systems, vor allem im Wildtyp von R. eutropha, dürfte mit einer niedrigen Induktorkonzentration beim Wachstum auf N-Acetylglucosamin zusammen hängen.

# 4.5 Ausblick

Einer der Schwerpunkte zukünftiger Arbeiten zur Globalregulation in *R. eutropha* H16 sollte die weitere Charakterisierung des Repressors FrcR sein. Zunächst wäre zu klären, ob der vom *frc*-Operon codierte ABC-Transporter tatsächlich einen Fructosetransporter darstellt. Diese Frage wäre durch die Isolierung von Deletionsmutanten der Gene des Transporters (*frcA*, *frcB* und *frcC*) zu lösen. Die *frcR*-Deletionsmutante eröffnet auch einen Weg zur Identifikation des globalen Regulators der CCR in *R. eutropha* H16. Eine solche CCR-Mutante liefert möglicherweise wertvolle Hinweise auf den oder die weiteren Regulator(en) der *cbb*-Genexpression. Eine direkte Beteiligung eines globalen Regulators an der *cbb*-Genregulation ist ebenfalls denkbar.

Die sehr bald verfügbare Genomsequenz von *R. eutropha* H16 eröffnet außerdem die Möglichkeit, in Transkriptom- und Proteomuntersuchungen mit dem Wildtyp H16 und verschiedenen Mutanten sehr viel detaillierte Informationen über regulatorische Regelkreise zu erhalten, die in autotroph oder heterotroph wachsenden Zellen wirksam sind. Im Hinblick auf die *cbb*-Regulation sollte auch die Wirkungsweise des Haupttranskriptionsregulators CbbR weiter aufgeklärt werden.

# 5. Zusammenfassung

In den fakultativ chemoautotrophen β-Proteobakterien Ralstonia eutropha H16 und Ralstonia metallidurans CH34 erfolgt die Assimilation von CO<sub>2</sub> über den Calvin-Benson-Bassham-Cyclus (CBB-Cyclus). In R. eutropha H16 liegen die cbb-Gene in zwei weitgehend homologen Operonen vor. Die cbb-Gene in R. metallidurans CH34 sind in zwei heterologen Operonen (cbb<sub>1</sub> und cbb<sub>11</sub>) zusammen mit den Strukturgenen einer löslichen Hydrogenase organisiert. Allen Operonen ist stromaufwärts, und divergent orientiert, ein Gen des LysR-Typ-Transkriptionsregulators (LTTR) CbbR vorgelagert. Innerhalb der intergenen cbb-Kontrollregion liegen die -für R. eutropha H16 bekannten- Promotoren des Regulatorgens *cbbR*,  $p_{cbbR}$ , und des *cbb*-Operons,  $p_{cbbL}$ , sowie die CbbR-Binderegionen (Operator). In Bindungstudien wurde nun gezeigt, dass CbbR<sub>I</sub> und CbbR<sub>II</sub> aus R. metallidurans CH34 an die jeweils stromaufwärts der beiden cbb-Operone liegenden cbb-Kontrollregionen I und II binden. Eine Bindung der beiden Regulatoren an die heterologe cbb-Kontrollregion aus R. eutropha H16 wurde ebenfalls beobachtet. Umgekehrt konnte auch eine Bindung von CbbR aus R. eutropha H16 an die Kontollregionen I und II aus R. metallidurans CH34 nachgewiesen werden. Eine cbbR<sub>II</sub>-Deletionsmutante von R. metallidurans CH34 zeigte ein drastisch verlangsamtes autotrophes Wachstum, was auf eine präferentielle Regulation der cbb-Operone von R. metallidurans CH34 durch das jeweils assoziierte cbbR-Gen hindeutet. Beide cbbR-Gene von R. metallidurans CH34 waren in der Lage, eine cbbR-Deletionsmutante von R. eutropha H16 phänotypisch zu komplementieren.

In *R. eutropha* H16 wird die Regulation beider *cbb*-Operone primär durch das chromosomal codierte CbbR als Aktivator vermittelt. Sie ist durch eine starke Expression der Operone unter litho- oder organoautotrophen und Repression unter heterotrophen Wachstumsbedingungen gekennzeichnet. Ein Metabolit des zentralen Kohlenstoffmetabolismus, Phosphoenolpyruvat (PEP), hat über CbbR eine reprimierende Wirkung auf die *cbb*-Genexpression. Die hier vorgenommene Analyse der *cbb*-Genregulation durch CbbR, das durch gezielte Mutationen verändert wurde, lässt auf eine strukturelle Funktion der Aminosäurereste A175 und W274 sowie auf eine Beteiligung von G203, G205 und R135 an der Effektorbindung schließen.

Verschiedene Vorbefunde hatten indirekt auf eine Beteiligung weiterer Faktoren der *cbb*-Genregulation in *R. eutropha* H16 hingewiesen. In der Genomsequenz von *R. eutropha* H16 wurden Gene eines CbbR-homologen LTTR (OrfR) und eines zu RegBA aus *R. capsulatus* homologen Zwei-Komponenten-Systems identifiziert. Für OrfR wurde eine Bindung an die cbb-Kontrollregion von R. eutropha H16 nachgewiesen. Die Deletion der Gene verursachte jedoch keine Veränderung des autotrophen Wachstums der betreffenden Mutanten gegenüber dem Wildtyp, so dass OrfR und das RegBA-homologe System nicht direkt an der cbb-Genregulation beteiligt sein können. Weitere potentiell an der cbb-Regulation beteiligte Proteine wurden durch DNA-Affinitätschromatographie mit der cbb-Kontrollregion aus R. eutropha H16 und mit Hilfe eines Zwei-Hybrid-Systems isoliert. Letzteres führte zur Isolierung eines Proteins, das Ähnlichkeit zu dem Transkriptionsregulator AepA aus Erwinia carotovora spp. carotovora hatte. Von den mittels DNA-Affinitätschromatographie isolierten Proteinen wurden ein hypothetischer LTTR (OrfG), ein hypothetisches Protein (OrfV) und ein hypothetischer Transkriptionsregulator mit potentieller PAS/PAC-Domäne (OrfP) ausgewählt und Deletionsmutanten der korrespondierenden Gene hergestellt. Eine Funktion dieser Proteine bei der cbb-Regulation konnte weitgehend ausgeschlossen werden, weil keine der Deletionsmutanten einen veränderten Phänotyp unter autotrophen Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Von zwei weiteren Genen, deren Produkte Homologie zum ,stringent starvation' Protein (SspA) und einer Cytidylat-Kinase aus Escherichia coli zeigten, konnten keine Mutanten isoliert werden. Daraus ist zu schließen, dass eine Deletion dieser Gene für den Organismus vermutlich letal ist.

Ein weiteres in der DNA-Affinitätschromatographie isoliertes Protein FrcR wies eine Ähnlichkeit zu Trankriptionsregulatoren der ROK-Familie auf. Das frcR-Gen in R. eutropha H16 ist Teil eines Operons, das die Gene eines mutmaßlichen Fructosespezifischen Transporters der ABC-Superfamilie codiert. Zusätzlich enthält das frc-Operon die Gene einer Zucker-Kinase, einer Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und einer Phosphoglucose-Isomerase (PGI). Die Aktivitäten der beiden letzteren Enzyme waren in der *frcR*-Deletionsmutante HB72 konstitutiv erhöht. aber abhängig von den Wachstumsbedingungen. Dies deutet auf eine Funktion von FrcR als Repressor des frc-Operons und eine zusätzliche Regulation des Operons durch einen noch unbekannten Transkriptionsregulator hin. FrcR hat keine entscheidende Bedeutung für die cbb-Genregulation, obwohl die Mutante HB72 eine reduzierte Aktivität des cbb-Operonpromotors vor allem unter Bedingungen der heterotrophen Derepression der cbb-Genexpression zeigte. Darüber hinaus wuchs die Mutante deutlich langsamer auf Fructose als der Wildtypstamm. Basierend auf diesen Befunden ist ein globaler Einfluss von FrcR auf den zentralen Kohlenstoffmetabolismus und somit eine indirekte Wirkung über die intrazelluläre PEP-Konzentration auf die Aktivität des cbb-Operonpromotors in R. eutropha H16 denkbar.

# 6. Literaturverzeichnis

Adhya S. (1999): Regulation of gene expression: Operons & Regulons. In: Lengeler J.W., Drews G., Schlegel H.G. : Biology of the prokaryotes. S. 437-468, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Akakura R., Winans S. (2002a): Mutations in the *occQ* Operator that decreases OccRinduced DNA bending do not cause constitutive promotor activity. J. Biol. Chem. 277, 15773-15780.

Akakura R., Winans S. (2002b): Constitutive mutations of the OccR regulatory protein affect DNA bending in response to metabolites released from plant tumors. J. Biol. Chem. 277, 5866-5874.

Alda M., Gonzalez G., Gonzalez G. (2004): Signal transduction by heme containing PASdomain proteins. J. Appl. Physiol. 96, 774-783.

**Appleby J.L., Parkinson J.S., Bourret R.B.** (1996): Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. Cell **86**, 845-848.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (1988): Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, NY.

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.

**Bartowsky E., Normark S.** (1991): Purification and mutant analysis of *Citrobacter freundii* AmpR, the regulator for chromosomal AmpC beta-lactamase. Mol. Microbiol. **5**, 1715-1725.

**Bartowsky E., Normark S.** (1993): Interactions of wild-type and mutant AmpR of *Citrobacter freundii* with target DNA. Mol. Microbiol. **10**, 555-565.

Bassham J.A., Benson A.A., Kay L.D., Harris A.Z., Wilson A.T., Calvin M. (1954): The path of carbon in photosynthesis XXI. The cyclic regeneration of carbon dioxide acceptor. J. Am. Chem. Soc. **76**, 1760-1770.

**Belitsky B.R., Sonenshein A.L.** (1997): Altered transcription activation specificity of a mutant form of *Bacillus subtilis* GltR, a LysR family member. J. Bacteriol. **179**, 1035-1043.

Bergh van den E.R., Dijkhuizen L., Meijer W.G. (1993): CbbR, a LysR-type transcriptional activator, is required for expression of the autotrophic  $CO_2$  fixation enzymes of *Xanthobacter flavus*. J. Bacteriol. **175**, 6097-6104.

**Bird T.H., Du S., Bauer C.E.** (1999): Autophosphorylation, phospho-transfer and DNA binding properties of the RegB/RegA two-component regulatory system in *Rhodobacter capsulatus*. J. Biol. Chem. **274**, 16343-16348.

**Birnboim H.C., Doly J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523.

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

**Bömmer D., Schäferjohann J., Bowien B.** (1996): Identification of  $cbbB_c$  as an additional distal gene of the chromosomal cbb CO<sub>2</sub> fixation Operon from *Ralstonia eutropha*. Arch. Microbiol. **166**, 245-251.

Botsford J.L., Harman J.G. (1992): Cyclic AMP in prokaryotes. Microbiol. Rev. 56, 100-122.

**Bowien B., Mayer F., Cod G.A., Schlegel H.G.** (1976): Purification some properties and quarternary structure of the D-ribulose-1,5-diphosphat carboxylase of *Alcaligenes eutrophus*. Arch. Microbiol. **110**, 157-166.

**Bowien B., Schlegel H.G.** (1981): Physiology and biochemistry of aerobic hydrogenoxidizing bacteria. Ann. Rev. Microbiol. **35**, 405-452.

**Bowien B., Friedrich B., Friedrich C.G.** (1984): Involvement of megaplasmids in heterotrophic derepression of the carbon-dioxide assimilating enzyme system in *Alcaligenes* ssp.. Arch. Microbiol. **139**, 305-310.

**Bowien B., Bednarski R., Kusian B., Windhövel U., Freter A., Schäferjohann J., Yoo J.-G.** (1993): Genetic regulation of CO<sub>2</sub> assimilation in chemoautotrophs. In: Murrel J.C., Kelly D.P., Hrsg.: Microbial growth on C<sub>1</sub> compounds. S. 437-459; Intercept, Andover.

**Bowien B., Kusian B.** (2002): Genetics and control of CO<sub>2</sub> assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. Arch. Microbiol. **178**, 85-93.

**Bradford M.** (1976): A rapid and sensitive method for quantifikation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254.

**Brown J.M., Firtel J.A.** (1998): Phosphorelay signalling: new tricks for an ancient pathway. Curr. Biol. **8**, 662-665.

**Bruckner R., Titgemeyer F.** (2002): Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. FEMS Microbiol. **209**, 141-148.

**Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M.** (1987): XL1blue a high efficiency plasmid transforming *recA<sup>-</sup> Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection. BioTechniques **5**, 376-378.

**Bundy B.M., Collier L.S., Hoover T.R., Neidle E.L.** (2002): Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites. PNAS **99**, 7693-7698.

**Burgdorf T., Bömmer D., Bowien B.** (2001): Involvement of an unusual *mol* Operon in Molybdopterin Cofactor Biosynthesis in *Ralstonia eutropha*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **3**, 619-629.

Burgdorf T., van der Linden E., Bernhard M., Yin Q.Y., Back J.W., Hartog A.F., Muijsers A.O., de Koster C.G., Albracht S.P., Friedrich B. (2005): The soluble NAD+-Reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. J. Bacteriol. **187**, 3122-3132.

**Bykowski T., van der Pleog J.R., Iwanicka-Nowicka R., Hryniewicz M.M.** (2002): The switch from inorganic to organic sulfur assimilation in *Escherichia coli*: adenosine 5'-Phosphosulfate (APS) as a signalling molecule for sulphate excess. Mol. Microbiol. **43**, 1347-1358.

**Carmel O., Rahav-Manor O., Dover N., Shaanan B., Padan E.** (1997): The Na<sup>+</sup>-specific interaction between the LysR-type regulator, NhaR, and the *nah*A gene encoding he Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli*. EMBO Journal **16**, 5922-5929.

Chain P., Lamerdin J., Larimer F., Regala W., Lao V., Land M., Hauser L., Hooper A., Klotz M., Norton J., Sayavedra-Soto L., Arciero D., Hommes N., Whittaker M., Arp D. (2003): Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. J. Bacteriol. **185**, 2759-2773.

**Chen J.H., Gibson J.L., McClue L.A., Tabita F.R.** (1991): Identification, expression, and deduced primary structure of transketolase and other enzymes encoded within the form II CO<sub>2</sub> fixation operon of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Biol. Chem. **266**, 20447-20452.

**Chester N., Marshak D.R.** (1993): Dimethyl sulfoxid-mediated primer Tm reduction: a method for analysing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. Anal. Biochem. **209**, 284-290.

Choi H.-J., Kim S.-J., Mukhopadhyay P., Cho S., Woo J.-R., Storz G., Ryu S.-E. (2001): Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. Cell **105**, 103-113.

Clarke L., Carbon J. (1992): A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. Biotechnology **24**, 179-187.

**Clark T.J., Momany C., Neidle E.L.** (2002): The *benPK* operon, proposed to play a role in transport, is part of a regulon for benzoate catabolism in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. Microbiology **148**, 1213-1223.

**Cosper N.J., Collier L.S., Clark T.J., Scott R.A., Neidle E.L.** (2000): Mutations in *catB*, the gene encoding muconate cycloisomerase, activate transcription of the distal *ben* genes and contribute to a complex regulatory circuit in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. J. Bacteriol. **182**, 7044-7052.

**Dahl M.K., Schmiedel D., Hillen W.** (1995): Glucose and glucose-6-phosphate interaction with Xyl repressor proteins from *Bacillus* spp. may contribute to regulation of xylose utilization. J. Bacteriol. **177**, 5467-5472.

**Dangel A.W., Gibson J.L., Janssen A.P., Tabita F.R.** (2005): Residues that influence *in vivo* and *in vitro* CbbR function in *Rhodobacter sphaeroides* and identification of a specific region critical for co-inducer recognition. Mol. Microbiol. **57**, 1397-1414.

**Dawson R.M.C., Elliot D.C., Elliot W.H., Jones K.** (1986): Data for biochemical research, S. 366-367. Third Edition, Oxford University Press, Oxford.

**Deghmane A.-E., Taha M.-K.** (2003): The *Neisseria meningitidis* adhesion regulatory protein CrgA acts through oligomerization and interaction with RNA polymerase. Mol. Microbiol. **47**, 135-143.

**Ding X., Baca-DeLancey R.R., Rather P.N.** (2001): Role of SspA in the density-dependent expression of the transcriptional activator AarP in *Providencia stuartii*. FEMS Microbiol. Lett. **196**, 25-29.

**Dover N., Higgins C.F., Carmel O., Rimon A., Pinner E., Padan E.** (1996): Na+-induced transcription of *nhaA*, which encodes an Na+/H+ antiporter in *Escherichia coli*, is positively regulated by *nhaR* and affected by *hns*. J. Bacteriol. **178**, 6508-6517.

**Du S., Bird T.H., Bauer C.E.** (1998): DNA binding characteristics of RegA<sup>\*</sup> a constitutively active anearobic activator of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. **273**, 18509-18513.

**Dubbs J.M., Tabita F.R.** (1998): Two functionally distinct regions upstream of the  $cbb_I$  operon of *Rhodobacter sphaeroides* regulate gene expression. J. Bacteriol. **180**, 4903-4911.

**Dubbs J.M., Bird T.H., Bauer C.E., Tabita F.R.** (2000): Interaction of CbbR and RegA<sup>\*</sup> transcription regulators with the *Rhodobacter sphaeroides cbb*<sub>I</sub> Promotor-operator region. J. Bacteriol. **275**, 19224-19230.

**Dubbs J.M., Tabita F.R.** (2003): Interactions of the  $cbb_{II}$  promoter-operator region with CbbR and RegA (PrrA) regulators indicate distinct mechanisms to control expression of the two *cbb* operons of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Biol. Chem. **278**, 16443-16450.

**Dubbs P., Dubbs J.M., Tabita F.R.** (2004): Effector-mediated interaction of CbbR<sub>I</sub> and CbbR<sub>II</sub> Regulators with target sequences in *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. **186**, 8026-8035.

**Dubbs J.M., Tabita F.R.** (2004): Regulators of nonsulfur purple phototrophic bacteria and the interactive control of  $CO_2$  assimilation, nitrogen fixation, hydrogen metabolism and energy generation. FEMS Microbiology Reviews **28**, 353-376.

**Eisenreich W., Strauss G., Werz U., Fuchs G., Bacher A.** (1993): Retrobiosynthetic analysis of carbon fixation in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. Eur. J. Biochem. **215**, 619-632.

Emmerich R., Hennecke H., Fischer H.-M (2000a): Evidence for a functional similarity between the two-component regulatory systems RegSR, ActSR and RegAB (PrrBA) in  $\alpha$ -Proteobacteria. Arch. Microbiol. **174**, 307-313.

Emmerich R., Strehler P., Bauer E., Hennecke H., Fischer H.-M. (2000b): In vitro selection of a DNA binding site for RegR, the global regulator controlling expression of  $N_2$  and  $CO_2$  fixation genes. ETH Zürich Schweiz

Emmerich R., Strehler P., Bauer E., Hennecke H., Fischer H.-M. (2000c): An imperfect inverted repeat is critical for DNA binding of the response regulator RegR of *Bradyrhizobium japonicum*. Nucl. Acid Res. **28**, 4166-4171.

Elsen S., Swem L.R., Swem D.L., Bazer C.E. (2004): RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component system. Microbiol. Mol. Biol. Reviews 68, 263-279.

**Eraso J.M., Kaplan S.** (2000): From redox flow to gene regulation: role of the PrrC protein of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Biochemistry **39**, 2052-2062.

**Evans M.C.W., Buchanan B.B., Arnon D.I.** (1966): A new ferredoxin-dependent carbon reducing cycle in a photosynthetic bacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **55**, 928-934.

**Fernandez S., Shingler V., de Lorenzo V.** (1994): Cross-regulation by XylR and DmpR activators of *Pseudomonas putida* suggests the transcriptional control of biodegradative operons evolves independently of catabolic genes. J. Bacteriol. **176**, 5052-5058.

**Finn M.W., Tabita F.R.** (2003): Synthesis of catalytically active form III ribulose-1,5bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in *Archaea*. J. Bacteriol. **185**, 3049-3059.

**Finn M.W., Tabita F.R.** (2004): Modified pathway to synthesize ribulose-1,5-bisphosphate in methanogenic *Archaea*. J. Bacteriol. **186**, 6360-6366.

Freter A., Bowien B. (1994): Identification of a novel gene, *aut*, involved in autotrophic growth of *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. **176**, 5401-5408.

Friedebold J., Bowien B. (1993): Physiological and biochemical characterization of the soluble format dehydrogenase, a molybdoenzyme from *Alcaligenes eutophus*. J. Bacteriol. 175, 4719-4728.

Friedrich C.G., Friedrich B., Bowien B. (1981a): Formation of enzymes of autotrophic metabolism during heterotrophic growth of *Alcaligenes eutrophus*. J. Gen. Microbiol. **122**, 69-78.

Friedrich C.G., Hogrefe C., Schlegel H.G. (1981b): Naturally occuring genetic transfer of hydrogen-oxidizing ability between strains of *Alcaligenes eutrophus*.J. Bacteriol. 147, 198-205.

**Friedrich C.G.** (1982): Depression of hydrogenase during limitation of electron donors and derepression of ribulosebisphosphat carboxylase during carbon limitation of *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. **149**, 203-210.

Friedrich B., Schwartz E. (1993): Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithoautotrophs. Ann. Rev. Microbiol. 47, 351-383.

**Fuhrmann S., Ferner M., Jeffke T., Henne A., Gottschalk G., Meyer O.** (2003): Complete nucleotide sequence of the circular megaplasmid pHCG3 of *Oligotropha carboxidovorans*: function in the chemolithoautotrophic utilization of CO, H(2) and CO(2).Gene. **322**, 67-75.

Gadgil H., Jurado L.A., Jarrett H.W. (2001): DNA affinity chromatography of transcription factors. Anal. Biochem. 290, 147-178.

Gay P., Le Coq D., Steinmetz M., Berkelman T. and Kado C.I. (1985): Positiv selection procedure for intrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 164, 918-921.

**Gibson J.L.**, **Tabita F.R.** (1988): Localization and mapping of CO<sub>2</sub> fixation genes within two gene clusters in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. **170**, 2153-2158.

Gibson J.L., Falcone D.L., Tabita F.R. (1991): Nucleotide sequence, transcriptional analysis, and expression of genes encoded within the form I  $CO_2$  fixation operon of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Biol. Chem. **266**, 14646-14653.

**Gibson JL**, **Tabita F.R.** (1993): Nucleotide sequence and functional analysis of *cbbR*, a positive regulator of the Calvin cycle operons of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol **175**, 5778-5784.

**Gibson J.L, Dubbs J.M, Tabita F.R.** (2002): Differential expression of the  $CO_2$  fixation operons of *Rhodobacter sphaeroides* by the Prr/Reg two-component system during chemoautotrophic growth. J. Bacteriol. **184**, 6654-6664.

Goethals K., Van Montagu M., Holsters M. (1992): Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **89**, 1646-1650.

Goris J., De Vos P., Coenye T., Hoste B., Janssens D., Brim H., Diels L., Mergeay M., Kersters K., Vandamme P. (2001): Classification of metall-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**, 1773-1782.

Grebe W.T., Stock J.B. (1999): The histidine protein kinase superfamily. Ad. Microbiol. Phys. 41, 139-227.

Grzeszik C., Lubbers M., Reh M., Schlegel H.G. (1997): Genes encoding the NAD-reducing hydrogenase of *Rhodococcus opacus* MR11. Microbiology. **143**, 1271-1286.

Grzeszik C., Jeffke T., Schäferjohann J., Kusian B., Bowien B. (2000): Phosphoenolpyruvate is a signal metabolite in transcriptional control of the *cbb*  $CO_2$  fixation operons in *Ralstonia eutropha*. J. Microbiol. Biotechnol. **2**, 311-320.

Hanahan D. (1983): Studies on transformation of *E. coli* with plasmids.J. Mol. Biol. 166, 557-580.

Hanahan D. (1985): Frozen storage of competent cells, protocol 3. In: DNA cloning: a practical approach Vol.1 (Glover D.M.; Hrsg.), S.121, IRL Press, Oxford.

Hayashi N.R., Arai H., Kodama T., Igarashi Y. (1997): The novel genes, *cbbQ* and *cbbO*, located downstream from the RubisCO genes of *Pseudomonas hydrogenothermophila*, affect the conformational states and activity of RubisCO. Biochem. Biophys. Res. Commun. 241, 565-569.

Hayashi N.R., Arai H., Kodama T., Igarashi Y. (1999): The *cbbQ* genes, located downstream of the form I and form II RubisCO genes, affect the activity of both RubisCOs. Biochem. Biophys. Res. Commun. **265**, 177-183.

Hayashi N.R., Terazono K., Kodama T., Igarashi Y. (2000): Structure of Ribulose-1,5bisphophat Carboxylase/Oxygenase gene cluster from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenophilus thermoluteolus*, and phylogenie of the fructose-1,6-bisphosphat aldolase encoded by *cbbA* in the cluster. Biosci. Biotechnol. Biochem. **64**, 61-71.

**Hayashi N.R., Igarashi Y.** (2002): ATP binding and hydrolysis and autophosphorylation of CbbQ encoded by the gene located downstream of RubisCO genes. Biochem. Biophys. Res. Commun. **290**, 1434-1440.

Hemschemeier S.K., Kirndorfer M., Hebermehl M. Klug G. (2000): DNA binding of wild type RegA protein and its differential effect on the expression of pigment binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **2**, 235-243.

Henkin T.M. (1996): The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. **135**, 9-15.

Herter S., Farfsing J., Gad'on N. (2001): Autotrophic  $CO_2$  fixation by *Chloroflexus aurantiacus*: study of glyoxylate formation and assimilation via the 3-hydroxypropionat cycle. J. Bacteriol. **183**, 4305-4316.

Hihara Y., Muramatsu M., Nakamura K., Sonoike K. (2004): A cyanobacterial gene encoding an ortholog of pirin is induced under stress conditions. FEBS Lett. **574**, 101-105.

Hoffman E.C., Reyes H., Chu F.F., Sander F., Conley L.H., Brooks B.A., Hankinson O. (1991): Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. Science 252, 954-958.

Holmes D.S., Quigley M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114, 193-197.
Hügler M., Huber H., Stetter K.O., Fuchs G. (2003): Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathways in *archaea (Crenarchaeota)*. Arch. Microbiol. **179**, 160-173.

Hügler M., Wirsen C.O., Fuchs G., Taylor C.D., Sievert S.M. (2005): Evidence for autotrophic  $CO_2$  fixation via the reductive tricaroxylic acid cycle by members of the  $\varepsilon$  subdivision of proteobacteria. J. Bacteriol. **187**, 3020-3027.

**Hryniewicz M.M., Kredich N.M.** (1991): The *cysP* promotor of *Salmonella typhimurium*: Characterization of two binding sites for CysB protein, studies of in vivo transcription initiation, and demonstration of the anti-inducer effects of thiosulfate. J. Bacteriol. **173**, 5876-5886.

Ishii M., Chuakrut S., Arai H., Igarashi Y. (2004): Occurrence, biochemistry and possible biotechnological application of the 3-hydroxypropionate cycle. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 605-610.

Jeffke T. (2001): Zur Struktur und Funktion regulatorischer Elemente des *cbb*-Regulons in *Ralstonia eutropha*. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen.

Jeffke T., Gropp N.-H., Kaiser C., Grzeszik C., Kusian B., Bowien B. (1999): Mutational analysis of the *cbb* Operon (CO<sub>2</sub> Assimilation) promotor of *Ralstonia eutropha*.
J. Bacteriol. 14, 4374-4380.

Jiang M., Shao W., Perego M., Hoch J.A. (2000): Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol., **38**, 535-542.

Jorgensen C., Dandanell G. (1999): Isolation and characterisation of mutations in the *Escherichia coli* regulatory protein XapR. J. Bacteriol. **181**, 4397-4403.

**Joshi H.M., Tabita R.F.** (1996): A global two component transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxid assimilation, and nitrogen fixation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**, 14515-14520.

**Kalyuzhnaya M.G., Lidstrom M.E.** (2003): QscR, a LysR-type transcriptional regulator and CbbR homolog, is involved in regulation of the serine cycle genes in *Methylobacterium extorquens* AM1. J. Bacteriol. **185**, 1229-1235.

**Keulen van G., Girbal L., Bergh van den E.R.E., Dijkhuizen L., Meijer W.G.** (1998): The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO<sub>2</sub> fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH sensor. J. Bacteriol. **180**, 1411-1417.

Keulen van G., Ridder A.N., Dijkhuizen L., Meijer W.G. (2003): Analysis of DNA binding and transcriptional activation by the LysR-type transcriptional regulator CbbR of *Xanthobacter flavus*. J. Bacteriol. **185**, 1245-1252.

**Knauf V. C., Nester E.W.** (1982): Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti Plasmid. Plasmid **8**, 45-54.

Kolmar H., Friedrich K., Pschorr J., Fritz H.-J. (1990): Hybrids of circular DNA single strands as intermediates in DNA cloning, sequence analysis and directet mutagenesis. Technique 2, 237-245.

Kossman J., Klintworth R., Bowien B. (1989): Sequenz analysis of the chromosomal and plasmid genes encoding phosphoribulokinase from *Alcaligenes eutrophus*. Gene **85**, 247-252.

Kovach M.E., Elzer P.H., Hill D.S., Robertson G.T. Farris M.A., Roop II R.M., Peterson K.M. (1995): Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene **166**, 175-176.

Kullik I., Stevens J., Toledano M.B., Storz G. (1995a): Mutational analysis of the redoxsensitive transcriptional regulator OxyR: Regions important for DNA binding and multimerization. J. Bacteriol. **177**, 1285-1291.

Kullik I., Toledano M.B., Tartaglia L.A., Storz G. (1995b): Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: Regions important for oxidation and transcriptional activation. J. Bacteriol. **177**, 1275-1284.

Kusano T., Sugawara K. (1993): Specific binding of *Thiobacillus ferroxidans* RbcR to the intergenic sequence between the *rbc* operon and the *rbcR* gene. J. Bacteriol. **175**, 1019-1025.

Kusian B. (1994): CO<sub>2</sub>-Assimilation in *Alcaligenes eutrophus*: Genetische Charakterisierung der *cbb*-Kontrollregion. 1. Auflage 1995, Cuvillier Verlag, Göttingen.

Kusian B., Bowien B. (1995): Operator Binding of the CbbR Protein, wich activates the duplicate *cbb* CO<sub>2</sub> assimilation Operons of *Alcaligenes eutrophus*.J. Bacteriol. 177, 6568-6574.

Kusian B., Bednarski R., Husemann M., Bowien B. (1995): Characterization of the duplicate Ribulose-5-bisphosphat Carboxylase genes and *cbb* Promotors of *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. **177**, 4442-4450.

**Kusian B., Bowien B.** (1997): Organisation and regulation of *cbb* CO<sub>2</sub> assimilation genes in autotrophic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **21**, 135-155.

Küster E., Hilbich T., Dahl M.K., Hillen W. (1999): Mutations in catabolite control protein CcpA separating growth effects from catabolite repression. J. Bacteriol. **181**, 4125-4128.

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lambert A., Ostera M., Mandon K., Poggi M.C., Le Rudulier D. (2001): Fructose uptake in *Sinorhizobium meliloti* is mediated by a high-affinity ATP-binding cassette transport system. J. Bacteriol. **183**, 4709-4717.

Lane D., Prentki P., Chandler M. (1992): Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. Microbiol. Rev. 56, 509-528.

Larsen R., Buist G., Kuipers O.P., Kok J. (2004): ArgR and AhrC are both required for regulation of arginin metabolism in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. **186**, 1147-1157.

Larsen R., Kok J., Kuipers O.P. (2005): Interaction between ArgR and AhrC controls regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*. J. Biol. Chem. **280**, 19319-19330.

Lawrence J.G., Roth J.R. (1996): Selfish Operons: horizontal gentransfer may drive the evlution of gene clusters. Genetics 143, 1843-1860.

Leadbeater L., Siebert K., Schobert P., Bowien B. (1982): Relationship between activities and protein levels of ribulosebisphosphate carboxylase and phosphoribulokinase in *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. Lett. **14**, 263-266.

Ledeaux J.R., Grossman A.D. (1995): Isolation and characterization of kinC, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **177**, 166-175.

Lenz O., Schwartz E., Dernedde J., Eitinger M. and Friedrich B. (1994): The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hox* gene participates in hydrogenase regulation. J. Bacteriol. 176, 4385-4393.

Liu Y., Murata H., Chatterjee A., Chatterjee A.K. (1993): Characterization of a novel regulatory gene *aepA* that controls extracellular enzyme production in the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Mol. Plant Microbe Interact. **6**, 299-308.

Lochowska A., Iwanicka-Nowicka R., Plochocka D., Hryniewicz M.M. (2001): Functional dissection of the LysR-type CysB transcriptional regulator. J. Biol. Biochem. **276**, 2098-2107.

Lochowska A., Iwanicka-Nowicka R., Zaim J., Zimny M.W., Bolewska K., Hryniewicz M.M. (2004): Identification of activating region (AR) of *Escherichia coli* LysR-type transcription factor CysB and CysB contact site on RNA polymerase alpha subunit at the *cysP* promoter. Mol. Microbiol. **53**, 791-798.

**Marahiel M.A., Zuber P.** (1999): Sporulation and cell differentiation. In: Lengeler J.W., Drews G., Schlegel H.G. : Biology of the prokaryotes. S. 586-626, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Maru Y., Afar D.E., Witte O.N., Shibuya M. (1996): The dimerization property of glutathione S-transferase partially reactivates Bcr-Abl lacking the oligomerization domain. J. Biol. Chem. 271, 15353-15357.

Masuda S., Masimoto Y., Nagashima K.V.P., Shimada K., Inoue K., Bauer C.E., Matsuura K. (1999): Structural and functional analysis of photosynthetic regulatory genes *regA* and *regB* from *Rhodovulum sulfidophilum*, *Roseobacter denitrificans* and *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. **181**, 4205-4215.

**McFall S.M., Abraham B., Narsolis C.G., Chakrabarty A.M.** (1997): A tricarboxylic acid cycle intermediate regulating transcription of a chloroaromatic biodegradative pathway: fumarate-mediated repression of the *clcABD* Operon. J. Bacteriol. **179**, 6729-6735.

Meijer W.G., Arnberg A.C., Enequist H.G., Terpstra P., Lidstrom M.E., Dijkhuizen L. (1991): Identification and organisation of carbon dioxide fixation genes in *Xanthobacter flavus* H4-14. Mol. Gen. Genet. **225**, 320-330.

Mergeay M., Nies D., Schlegel H.G., Gerits J., Charles P. Van Gijsegem F. (1985): *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. J. Bacteriol. **162**, 328-334.

Merz A.J., So M. (2000): Interactions of pathogenic *Neisseriae* with epithelial cell membranes. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16, 423-457.

**Miller J.H.** (1972): Assay of β-galactosidase. In: Experiments in molecular genetics. (Platt T. Miller-Hill B. and Miller J.H.; Hrsg.), S. 319-353; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Morales G., Linares J.F., Beloso A., Albar J.P., Martinez J.L., Rojo F. (2004): The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. J. Bacteriol. **186**, 1337-1344.

**Mullis H.G., Faloona F.A.** (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerasecatalyzed chain reaction. Methods in Enzymologie, Acad. Press, San Diego **155**, 335-350. Muraoka S., Okumura R., Ogawa N., Nonaka T., Miyashita K., Senda T. (2003): Crystal structure of a full-length lysR-type transcriptional regulator, CbnR: Unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. JMB **328**, 555-566.

**Murata H., Chatterjee A., Liu Y., Chatterjee A.K.** (1994): Regulation of the production of extracellular pectinase, cellulase, and protease in the soft rot bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: evidence that *aepH* of *E. carotovora* subsp. *carotovora* 71 activates gene expression in *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, and *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **60**, 3150-3159.

**Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W.** (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis **9**, 255-262.

**Neuhoff V., Stamm R., Eibl H.** (1985): Clear background and highly sensitive protein staining with Comassie blue dyes in polyacrylamid gels: a systemic analysis. Electrophoresis, **6**, 427-436.

**Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V.** (1999): AAA<sup>+</sup>: A class of chaperonelike ATPases associated with the assembly, operation and disassembly of protein complexes. Genom Res. **9**, 27-43.

Nicoloff H., Arsene-Ploetze F., Malamdain C., Kleerebezem M., Bringel F. (2004): Two arginine repressors regulate arginine biosynthesis in *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. **186**, 6059-6069.

**Oh J.I., Kaplan S.** (2000): Redox signaling: globalization of gene expression. EMBO J. **19**, 4237-4247.

**O'Farrell P.H.** (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**, 4007-4021.

**Ogawa N., McFall S.M., Klem T.J., Miyashita K., Chakrabarty A.M.** (1999): Transcriptional activation of the chlorocatechol degradation genes of *Ralstonia eutropha* NH9. J. Bacteriol. **181**, 6697-6705.

Pandini A., Bonati L. (2005): Conservation and specialization in PAS domain dynamics.Protein Eng. Des. Sel. 18, 127-137.

Pang H., Bartlam M., Zeng Q., Miyatake H., Hisano T., Miki K., Wong L.L., Gao G.F.,
Rao Z. (2004): Crystal structure of human pirin: an iron-binding nuclear protein and transcription cofactor. J. Biol. Chem. 279, 1491-1498.

**Paoli G.C., Soyer F., Shively J., Tabita F.R.** (1998): *Rhodobacter capsulatus* genes encoding form I ribulose-1,5-bisphosphat caboxylase/oxygenase (*cbbLS*) and neighbouring genes were aquired by a horizontal gene transfer. Microbiol. **188**, 219-227.

**Paoli G.C., Morgan N.S., Tabita F.R., Shively J.M**. (1995): Expression of the *cbbL cbbS* and *cbbM* genes and distinct organization of the *cbb* Calvin cycle structural genes of *Rhodobacter capsulatus*. Arch. Microbiol. **164**, 396-405.

**Park H.H., Lee H.Y., Lim W.K., Shin H.J.** (2005): NahR: Effects of replacements at Asn 169 and Arg 248 on promoter binding and inducer recognition. Arch. Biochem. Biophys. **434**, 67-74.

**Pereto J.G., Velasco A.M., Becerra A., Lazcano A.** (1999): Comparative biochemistry of CO<sub>2</sub> fixation and the evolution of autotrophy. Int. Microbiol. **2**, 3-10.

Pérez-Martin J., de Lorenzo V. (1997): Clues and consequences of DNA bending in transkription. Annu. Rev. Microbiol. 51, 593-628.

**Perez-Rueda E., Collado-Vides J.** (2000): The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. Nucleic Acids Res. **28**, 1838-1847.

**Pfennig N., Trüper H.G.** (1981): Isolation of members of the families *Chromatiaceae* and *Chlorobiaceae*. In: The Prokaryotes (Starr M.P., Trüper H.G., Bellows A., Schlegel H.G.; Hrsg.), S.279-29; Springer Verlag, Berlin.

Pineiro S., Olekhinovich I., Gussin G.N. (1997): DNA bending by the TrpI protein of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **179**, 5407-5413.

**Plumbridge J., Kolb A.** (1998): DNA bending and expression of the divergent *nagE-B* operons. Nucleic Acids Res. **26**, 1254-1260.

**Plumbridge J.** (2001a): DNA binding sites for the Mlc and NagC proteins: regulation of nagE, encoding the N-acetylglucosamine-specific transporter in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. **29**, 506-514.

**Plumbridge J.** (2001b): Regulation of PTS gene expression by the homologous transcriptional regulators, Mlc and NagC, in *Escherichia coli* (or how two similar repressors can behave differently). J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **3**, 371-380.

Plumbridge J., Pellegrini O. (2004): Expression of the chitobiose operon of *Escherichia coli* is regulated by three transcription factors: NagC, ChbR and CAP.Mol. Microbiol. 52, 437-449.

**Postma P.W., Lengeler J.W., Jacobson G.R.** (1993): Phosphoenolpyruvat: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol. Rev. **57**, 543-594.

Qian Y., Tabita R. F. (1996): A global signal transduction system regulates aerobic and anaerobic  $CO_2$  fixation in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. **178**, 12-18.

Rallu F.A., Gruss S., Ehrlich D., Maguin E. (2000): Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals.
Mol. Microbiol. 35, 517-528.

**Reuse de H., Taha M.K.** (1997): RegF, an SspA homologue, regulates the expression of the *Neisseria gonorrhoeae pilE* gene. Res. Microbiol. **148**, 289-303.

**Rhee K.Y., Opel M., Ito E., Hung S.-P., Arfin S., Hatfield G.** (1998): Transcriptional coupling between the divergent promotors of a prototypic LysR-type regulatory system, the *ilvYC* operon of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. **96**, 14294-14299.

**Riggs M.G., McLachlan A.** (1986): A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation. Bio Techniques **4**, 310-311.

Rodionov D.A., Mirovov A.A., Gelfand M.S. (2001): Transcriptional regulation of pentose utilisation systems in the *Bacillus/Clostridium* group of bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 205, 305-314.

Ruiz-Manzano A., Yuste L., Rojo F. (2005): Levels and activity of the *Pseudomonas putida* global regulatory protein Crc vary according to growth conditions.J. Bacteriol. 187, 3678-3686.

**Rygus T., Hillen W.** (1992): Catabolite repression of the *xyl* operon in *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol. **174**, 3049-3055.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463-7.

Sanger F., Coulsen A.R., Hong G.F., Petersen G.B. (1982): Nucleotide sequence of bacteriophage  $\lambda$  DNA. J. Mol. Biol. 162,729-773.

Sato H., Kudo S., Ohnishi K., Mizuguchi M., Goto E., Suzuki K. (2001): Nucleotide sequence analysis of 5'-flanking region of salicylate hydroxylase gene, and identification and purification of a LysR-type regulator, SalR. Eur. J. Biochem. **268**, 2229-2238.

Schäferjohann J., Bednarski R., Bowien B. (1996): Regulation of CO<sub>2</sub> assimilation in *Alcaligenes eutrophus*: premature transcription termination within the *cbb*-Operon. J. Bacteriol. **178**, 6714-6719.

Schell M.A., Poser E.F. (1989): Demonstration, characterization, and mutational analysis of NahR protein binding to *nah* and *sal* promoters. J. Bacteriol. **171**, 837-846.

Schell M.A., Brown P.H., Raju S. (1990): Use of saturation mutagenesis to localize probable functional domains in the NahR protein, a LysR-type transcription activator.
J. Biol. Chem. 265, 3848-3850.

Schell M.A. (1993): Molecular biology of the LysR familiy of transcriptional regulators. Annu. Rev. Microbiol. 47, 597-626.

Schell M.A (2000): Control of virulence and phatogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. Annu. Rev. Phytophatol. **38**, 263-292.

Schiefner A., Gerber K., Seitz S., Welte W., Diederichs K., Boos W. (2005): The crystal structure of Mlc, a global regulator of sugar metabolism in *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. 280, 29073-29079.

Schlegel H.G., Kaltwasser H., Gottschalk G. (1961): Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxidierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch. Microbol. **38**, 209-222.

Schmiedel D., Hillen W. (1996): Contributions of XylR CcpA and *cre* to diauxic growth of *Bacillus megaterium* and to xylose isomerase expression in the presence of glucose and xylose. Mol. Gen. Genet. 250, 259-266.

Schwartz E., Friedrich B. (2001): A physical map of the megaplasmid pHG1, one of the three genomic replicons in *Ralstonia eutropha* H16. FEMS Microbiol. Lett. **201**, 213-219.

Selesi D., Schmid M., Hartmann A. (2005): Diversity of green-like and red-like ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes (*cbbL*) in differently managed agricultural soils. Appl. Envir. Microbiol. **71**, 175-184. Shively J.M., Keulen van G., Meijer W.G. (1998): Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. Annu. Rev. Microbiol. **52**, 191-230.

Simon R., Priefer U., Pühler A. (1983): Abroad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negativ bacteria.
Bio/Technology 1, 784-791.

Smirnova I.A., Dian C., Leonard G.A., McSweeney S., Birse D., Brzezinski P. (2004): Development of a bacterial biosensor for nitrotoluenes: the crystal structure of the transcriptional regulator DntR. J. Mol. Biol. **340**, 405-418.

Smith S.A., Tabita F.R. (2002): Up-regulated expression of the  $cbb_I$  and  $cbb_{II}$  operons during photoheterotrophic growth of a ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase deletion mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. **184**, 6721-6724.

**Soupene E., Foussard M., Boistard P., Truchet G., Batut J.** (1995): Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N<sub>2</sub>-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**, 3759-3763.

Spanning van R.J.M., Wansell C.W., Reijnders W.N., Harms N., Ras J., Oltman F. Stouthamer A.H. (1991): A method for introduction of unmarked mutations in the genome of *Paracoccus denitrificans* : Construction of strains with multiple mutations in the genes encoding periplasmic cytochromes  $c_{550}$ ,  $c_{551}$ ,  $c_{553}$ . J. Bacteriol. **173**, 6962-6970.

**Stackebrand E., Murray R.G.E., Trüper H.G.** (1988): *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". Int. J. Syst. Bacteriol. **38**, 321-325.

**Stewart R.C., VanBruggen R., Ellefson D.D., Wolfe A.J.** (1998): TNP-ATP and TNP-ADP as probes of the nucleotid binding site of CheA, the histidine protein kinase in the chemotaxis signal transduction pathway of *Escherichia coli*. Biochemistry, **37**, 12269-12279.

Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N. (2000): Two-component signal transduction. Annu. Rev. Biochem. 69, 183-215.

**Studier F.W., Moffat B.A.** (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. Mol. Biol. **189**, 113-130.

Suquet C., Savenkova M., Satterlee J.D. (2005): Recombinant PAS-heme domains of oxygen sensing proteins: high level production and physical characterization.Protein Expr. Purif. 42, 182-193.

Swem L.R., Elsen S., Bird T.H., Swem D.L., Koch H-G., Myllykallio H., Daldal F., Bauer C.E. (2001): The RegA/RegB two-component regulatory system controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in *Rhodobacter capsulatus*. J. Mol. Biol. **309**, 121-138.

Swem L.R., Kraft B.J., Swem D.L., Setterdahl A.T., Masuda S., Knaff D.B., Zaleski J.M., Bauer C.E. (2003): Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine. EMBO J. 22, 4699-4708.

**Tabita F.R.** (1999): Microbial ribulose1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: A different perspective. Photosynthesis Res. **60**, 1-28.

**Tabor S., Richardson C.C.** (1985): A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**, 1074-1078.

**Taguchi H.** (2005): Chaperonin GroEL meets the substrate protein as a ,Load' of the ring. J. Biochem. **137**, 543-549.

**Terazono K., Hayashi N.R., Igarashi Y.** (2001): CbbR, a LysR-type transcriptional regulator from *Hydrogenophilus thermoluteolus*, binds two *cbb* promoter regions. FEMS Microbiol. Lett. **198**, 151-157.

**Tichi M.A., Tabita F.R.** (2000): Maintenance and control of redox poise in *Rhodobacter capsulatus* strains deficient in the Calvin-Benson-Bassham pathway. Arch. Microbiol. **174**, 322-333.

Tichi M.A., Tabita F.R. (2001): Interactive control of *Rhodobacter capsulatus* redox balancing systems during phototrophic metabolism. J. Bacteriol. **183**, 6344-6354.

Tichi M.A., Tabita F.R. (2002): Metabolic signals that lead to control of *cbb* gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. **184**, 1905-1915.

Titgemeyer F., Reizer J., Reizer A., Saier M.H. Jr. (1994): Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria.
Microbiology 140, 2349-2354.

**Tobisch S., Zühlke D., Bernhardt J., Stülke J., Hecker M.** (1999): Role of CcpA of the Central Pathways of Carbon Catabolism in *Baciullus subtilis*. J. Bacteriol. **181**, 6996-7004.

Trach K., Burbulys M., Strauch J.-J., Wu N., Dhillon R., Jonas C., Hanstein P., Kallio M., Peregro T., Bird G., Spiegelman G., Fogher C., Hoch J.A. (**1991**): Control of the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* by a phosphorelay. Res. Microbiol. 142, 815-823.

Tyrrell R., Verschueren K.H., Dodson E.J., Murshudov G.N., Addy C., Wilkinson A.J. (1997): The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. Structure 5, 1017-1032.

**Utaker J.B., Andersen K., Aakra A., Moen B., Nes I.F.** (2002): Phylogeny and functional expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the autotrophic ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira* sp. isolate 40KI. J. Bacteriol. **184**, 468-478.

Vandamme P., Coenye P. (2004): Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54**, 2285-2289.

Vaneechoutte M., Kampfer P., De Baere T., Falsen E., Verschraegen G. (2004): *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 317-327.

Velazquez F., di Bartolo I., de Lorenzo V. (2004): Genetic evidence that catabolites of the Entner-Doudoroff pathway signal C source repression of the sigma54 *Pu* promoter of *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **186**, 8267-8275.

Vichivanives P., Bird T.H., Bauer C.E., Tabita F. (2000): Multiple regulators and their interactions *in vivo* and *in vitro* with the *cbb* regulons of *Rhodobacter capsulatus*. J. Mol. Biol. **300**, 1079-1099.

**Vieira J., Messing J.** (1982): The pUC plasmids, an M13mp-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19**, 259-268.

**Wang L., Winans S.C.** (1995): The sixty nucleotide OccR operator contains a subsite essential and sufficient for OccR binding and a secon subsite required for ligand-responsive DNA bending. J. Mol. Biol. **253**, 691-702.

Warner J.B., Lolkema J.S. (2003): CcpA-Dependent Carbon Catabolite Repression in Bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 475-490.

Watts K.J., Ma O., Johnson M.S., Taylor B.L. (2004): Interactions between the PAS and HAMP domains of the *Escherichia coli* aerotaxis receptor Aer. J. Bacteriol. **186**, 7440-7449.

Watson G.M., Tabita F.R. (1997): Microbial ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a molecule for phylogenetic and enzymological investigation. FEMS Microbiol. Lett. 146, 13-22.

Watson G.M.F., Yu J.-P., Tabita F.R. (1999): Unusual ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase of anoxic *Archaea*. J. Bacteriol. **181**, 1569-1575.

Weber K., Osborn N. (1969): The reliability of the molecular weight determination by dodecylsulfat-polyacrylamid gel electrophoresis. J. Biol. Chem. **244**, 4006-4012.

Wei X., Sayavedra-Soto L.A., Arp D.J. (2004): The transcription of the *cbb* operon in *Nitrosomonas europaea*. Microbiology. **150**, 1869-1879.

Wendler W.M., Kremmer E., Forster R., Winnacker E.L. (1997): Identification of pirin, a novel highly conserved nuclear protein. J. Biol. Chem. 272, 8482-8489.

**Wessel D., Flügge U.I.** (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Anal. Biochem. **138**, 141-143.

Williams M.D., Ouyang T.X., Flickinger M.C. (1994): Starvation-induced expression of SspA and SspB: the effects of a null mutation in *sspA* on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation. Mol. Microbiol. **11**, 1029-1043.

Windhövel U., Bowien B. (1990): On the Operon structure of the cfx gene clusters in Alcaligenes eutrophus. Arch. Microbiol. 154, 85-91.

Windhövel U., Bowien B. (1991): Identification of *cfxR*, an activator gene of autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Alcaligenes eutrophus*. Mol. Microbiol. **5**, 2695-2705.

**Windhövel U.** (1989): Untersuchungen zur Genetischen Regulation der CO<sub>2</sub>-Assimilation in *Alcaligenes eutrophus*. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen

Wood H.G., Ragsdale S.W., Pezacka E. (1986): The acetyl-CoA pathway: a newly discovered pathway for autotrophic growth. Trends Biochem. Sci. 11, 14-18.

Wu J., Filutowicz M. (1999): Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. Acta Biochim. Pol. 46, 591-599.

Yabuuchi E., Kosako Y., Yano I., Hotta H., Nishiuchi Y. (1995): Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia picketii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov. *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) com. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) com. Nov..
Microbiol. Immunol. **39**, 897-904.

**Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J.** (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33**, 103-119.

Yu L., Mack J., Hajduk P.J., Kakavas S.J., Saiki A.Y., Lerner C.G., Olejniczak E.T. (2003): Solution structure and function of an essential CMP kinase of *Streptococcus pneumoniae*. Protein Sci. **12**, 2613-2621.

**Yoshizawa Y., Toyoda K. Arai H., Ishii M Igarashi Y.** (2004): CO<sub>2</sub>-responsive expression and gene organization of three ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase enzymes and carboxysomes in *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110. J. Bacteriol. **186**, 5685-5691.

**Yoo J.G.**, **Bowien B.** (1995): Analysis of the *cbbF* genes from *Alcaligenes eutrophus* that encode fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase. Curr. Microbiol. **31**, 55-61.

Zaim J., Kierzek A.M. (2003): The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full length OxyR transcription factor dimer. Nucl. Acids Research 31, 1444-1454.

Zhulin I.B., Taylor B.L., Dixon R. (1997): PAS domain S-boxes in *Archaea*, *Bacteria* and sensors for oxygen and redox. Trends Biochem. Sci. 22, 331-333.

## Tab. 1. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA von<br/>Ralstonia spp. und zur Sequenzierung verwendete Primer

Eingefügte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Der letzte Buchstabe der Primerbezeichnung entspricht bei den Primern, die zur Klonierung von DNA-Fragmenten dienten, jeweils dem verwendeten Restriktionsenzym (X, *Xba*I; E, *Eco*RI; B, *Bam*HI; S, *Sac*I; Sl, *Sal*I; P, *Pst*I). Bei der Herstellung von Deletionen dienten die Primer mit der Nummer 1 zur Amplifikation des 5'-seitigen Teils der Gene (Deletionsfragment 1), die Primer mit der Nummer 2 zur Amplifikation des 3'-seitigen Teils der Gene (Deletionsfragment 2; s. 3.2.4.1, Abb. 13).

Amplifikation von DNA-Fragmenten aus <i>R. eutropha</i> H16			
Primer	Sequenz		
Intergene Region des cbb-Op	perons		
H16cbbigrX	5'-ATCTGCAAC <u>TCTAGA</u> AGGGTAAGG-3'		
H16cbbigfS	5'-TGCGTTC <u>GAGCTC</u> GTCTCCTTG-3'		
Herstellung und Sequenzieru	ng von CbbR-Fusionen im Zwei-Hybrid-System		
CbbRFus_8forE	5'-GCCAGTTGC <u>GAATTC</u> TCGTCACCG-3'		
CbbRFus_3revX	5'-AGCCAACC <u>CTCGAG</u> GAACCTCA-3'		
CbbRFus_2forE	5'-ACCGCCCAT <u>GAATTC</u> CTTCCTGCG-3'		
pBTf	5'-TTCGTTGTGGGGAAAGTTATC-3'		
pBTr	5'-GGGTAGCCAGCAGCATCC-3'		
pTRGf	5'-CAGCCTGAAGTGAAAGAA-3'		
pTRGr	5'-ATTCGTCGCCCGCCATAA-3'		

Amplifikation von Genen zur Klonierung in Expressionsplasmiden

ExOrfRrP	5'-CGGTTGG <u>CTGCAG</u> ACAAGCATA-3'
ExOrfRfX	5'-CCAATCGTT <u>TCTAGA</u> TTGCACGGG-3'
RegA2rB	5'-CTTCCTTT <u>GGATCC</u> GTCCCGC-3'
ExRegAfN	5'-CACTCGC <u>CATATG</u> ACCACCGC-3'

Fortsetzung, Tab. 1 nächste Seite

OrfR2rB

TestorfR\_f<sup>b</sup>

TestorfR\_r<sup>b</sup>

1049

269

Amplifikation v	on DNA-Fragm	enten aus <i>R. 6</i>	eutropha H16
Primer	Nachweisfra	gmente [bp]	Sequenz
	WT <sup>a</sup>	Deletion	
Herstellung und	Verifikation der	regB-Deletion	
RegB1fX			5'-GAGGCAG <u>TCTAGA</u> TCGGCACCG-3'
RegB1rE			5'-GACAGGAAGGG <u>GAATTC</u> GGGCA-3'
RegB2fE			5'-ACCCTTTCC <u>GAATTC</u> GCCGCC-3'
RegB2rB			5'-CAGGATGCGT <u>GGATCC</u> GGCAA-3'
TestregBf <sup>b</sup>	1965	654	5'-TTGCTGACATCGAGCTCGGCCA-3'
RegB2rB <sup>b</sup>			5'-CAGGATGCGTGGATCCGGCAA-3'
RegB1fX <sup>b</sup>	1739	428	5'-GAGGCAGTCTAGATCGGCACCG-3'
RegA1rE <sup>b</sup>			5'-GTGCGGTGAATTCGGGTACCG-3'
Herstellung und	Verifikation der	regA-Deletion	
RegA1fX			5'-GGCTGTCGT <u>TCTAGA</u> TCGCCGA-3'
RegA1rE			5'-GTGCGGT <u>GAATTC</u> GGGTACCG-3'
RegA2fE			5'-CAAGCTG <u>GAATTC</u> CGGCCGGTG-3'
RegA2rB			5'-CTTCCTTT <u>GGATCC</u> GTCCCGC-3'
RegA1fX <sup>b</sup>	1142	587	5'-GGCTGTCGTTCTAGATCGCCGA-3'
RegA2rB <sup>b</sup>			5'-CTTCCTTTGGATCCGTCCCGC-3'
TestregA_f <sup>b</sup>	939	384	5'-CGCTGGAGCTCCAGATCGCCAT-3'
TestregA_r <sup>b</sup>			5'-GGCAGCAGTTGCCACCGGAA-3'
Herstellung und	Verifikation der	orfR-Deletion	
OrfR1fX			5'-ACCGTTGCA <u>TCTAGA</u> CCGGTCA-3'
OrfR1rE			5'-TCAGGTG <u>GAATTC</u> CTCGGCAGC-3'
OrfR2fE			5'-GCGTTCAAG <u>GAATTC</u> CTGATGGAG-3'

# Tab. 1. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA vonRalstonia spp. und zur Sequenzierung verwendete Primer (Fortsetzung)

Fortsetzung, Tab. 1 nächste Seite

5'-CCGCACAGGGATCCATACATCT-3'

5'-CGGTTGGCTGCAGACAAGCATA-3'

5'-CCAATCGTTTCTAGATTGCACGGG-3'

Amplifikation von DNA-Fragmenten aus <i>R. eutropha</i> H16				
Primer	Nachweisfra	gmente [bp]	Sequenz	
	WT <sup>a</sup>	Deletion	··· 1	
Herstellung und	Verifikation der	orfG-Deletion		
OrfG1fX			5'-GCGGGTCATTCTAGACGGCGAAC-3'	
OrfG1rE			5'-GCGGAAGGAATTCTGCCCATCTCG-3'	
OrfG2fE			5'-TGGCGCAGGGAATTCTGCAGCAAC-3'	
OrfG2rS			5'-GCATAGAAGAGCTCACGCCGGCT-3'	
TestorfG f <sup>b</sup>	1104	306	5'-GGCCCTCTCTCTAGAATCCCTCGA-3'	
– TestorfG r <sup>b</sup>			5'-ATGTCCTGGATCCGCACCAGCCA-3'	
_				
Herstellung und	Verifikation der	orfP-Deletion		
OrfP1fX <sup>b</sup>	1598	611	5'-TCCTGCGAGG <u>TCTAGA</u> AGTGGGCC-3'	
OrfP1rE			5'-CAAAAGT <u>GAATTCC</u> GTCATGGGCATCC-3'	
OrfP2fE			5'-GCCTCGCAG <u>GAATTC</u> ACCGGGC-3'	
OrfP2rS <sup>b</sup>			5'-CCAGGGACATGATGGAGCTCCTCC-3'	
Herstellung und	Verifikation der	frcR-Deletion		
FrcR1fX			5'-GCAGCATCA <u>TCTAGA</u> GCAGCAGCA-3'	
FrcR1rE			5'-GGCTGGCG <u>GAATTC</u> ACGCCA-3'	
FrcR2fE			5'-CATCGTTCCGAATTCCGGCCATG-3'	
FrcR2rS			5'-TATTCTCGGCC <u>GAGCTC</u> AGGTTG-3'	
TestfrcR_f <sup>b</sup>	1550	341	5'-TCCCCGCGGTCTAGATCTGCGCA-3'	
TestfrcR_r <sup>b</sup>			5'-GCCGGACAGGATCCTCATCAGCG-3'	
			Fortsetzung, Tab. 1 nächste Seite	

# Tab. 1. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA vonRalstonia spp. und zur Sequenzierung verwendete Primer (Fortsetzung)

Kalston	nia spp. und zui	r Sequenzie	rung verwendete Primer (Fortsetzung)
Amplifikation	von DNA-Fragm	enten aus <i>R</i> .	eutropha H16
Primer	Nachweisfrag	gmente [bp]	Sequenz
	WT <sup>a</sup>	Deletion	
Herstellung und	Verifikation der a	aepA-Deletion	n
AepA1fX			5'-GCCA <u>TCTAGA</u> TCGGCATCCCGAT-3'
AepA1rP			5'-CGCCAAG <u>CTGCAG</u> CATGCTCAT-3'
AepA2fP			5'-AAGACCCAGGTG <u>CTGCAG</u> ACCT-3'
AepA2rB			5'-ACTGGTTTG <u>GGATCC</u> TGACTGCCT-3'
TestaepA_f <sup>b</sup>	1849	259	5'-CAGCAGTACTCTAGAGCAAGAAAGC-3'
TestaepA_r <sup>b</sup>			5'-ATGTAACGCGAATTCCAGACCGCC-3'
Herstellung und	Verifikation der a	cmk-Deletion	
Cmk1fX			5'-GGTCGAAGA <u>TCTAGA</u> GGGCCACGG-3'
Cmk1rSl			5'-CAATGGCGATGACGTCGACGATAGTCAT-3'
Cmk2fSl			5'-TGCGGCCC <u>GTCGAC</u> TGAGATGCAT-3'
Cmk2rS			5'-CCACGAAATTGAGCTCGATGCGCAC-3'
Testcmk_f <sup>b</sup>	915	270	5'-GTAAGGTGGGATCCGCAATACGC-3'
Testcmk_r <sup>b</sup>			5'-CGACTGCGGTCTAGAGCCATGAAT-3'
Herstellung und	Verifikation der s	sspA-Deletion	1
SspA1fSm			5'-GCCGGCTTCGAGCAACTGAG-3'
SspA1rH			5'-ACCCGAATACAAAAGCTTCATGGTTG-3'

# Tab. 1. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA von Ralstonia spp. und zur Sequenzierung verwendete Primer (Fortsetzung)

			Fortsetzung, Tab. 1 nächste Seite
TestsspA_r <sup>b</sup>			5'-GTACGGCGTGGATCCGTTGTCCGT-3'
$TestsspA_f^b$	1001	416	5'-TGTCCGACCCTGCAGCGGCTAAG-3'
SspA2rS			5'-GTAGATGGC <u>GAGCTC</u> GTTCTCGA-3'
SspA2fH			5'-TCCGAA <u>AAGCTT</u> ATGCGCCGCTAA-3'
SspA1rH			5'-ACCCGAATACAA <u>AAGCTT</u> CATGGTTG-3'
Soprinsin			

# Tab. 1. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA vonRalstonia spp. und zur Sequenzierung verwendete Primer (Fortsetzung)

Primer	Nachweisfrag	gmente [bp]	Sequenz
	WT <sup>a</sup>	Deletion	
Amplifikation v	on <i>cbbR<sub>II</sub></i> für Ü	berexpressio	n und die Komplementation
ExCbbRIIfN			5'-CTTTTGCTAA <u>CATATG-</u> CAGATCACCTTC-3'
ExCbbRIIrS			5'-ATCGGCGAC <u>GTCGAC</u> GTCGT-3'
CbbIIigfP			5'-TTCAGTAGCG <u>CTGCAG</u> TTCGGC-3'
Amplifikation v	on intergenen c	bb-Regionen	n aus <i>R. metallidurans</i> CH34
Amplifikation v Cbbligf	on intergenen c	bb-Regionen	a aus <i>R. metallidurans</i> CH34 5`-TTCCTCAAGTTGCTTGGCCT-3`
Amplifikation v CbbIigf CbbIigr	on intergenen c	bb-Regionen	a aus <i>R. metallidurans</i> CH34 5`-TTCCTCAAGTTGCTTGGCCT-3` 5'-GTTGTATGTCTTTGCGGCCA-3'
Amplifikation v CbbIigf CbbIigr CbbIIigf	on intergenen c	bb-Regionen	aus <i>R. metallidurans</i> CH34 5`-TTCCTCAAGTTGCTTGGCCT-3` 5`-GTTGTATGTCTTTGCGGCCA-3' 5`-GCGGTCGGTCGCGCACGAAT-3`
Amplifikation v CbbIigf CbbIigr CbbIIigf CbbIIigf	on intergenen c	bb-Regionen	a aus <i>R. metallidurans</i> CH34 5`-TTCCTCAAGTTGCTTGGCCT-3` 5'-GTTGTATGTCTTTGCGGCCA-3' 5`-GCGGTCGGTCGCGCGCACGAAT-3` 5`-TGATCTGCATGATTTAGCAAAAGG-3`

Therstering and Vern	incution der et		
CbbRII2fX			5'-AGTCCTCG <u>TCTAGA</u> AGCGCTGC-3'
CbbRII2rP			5'-AACCCTGAGTTGC <u>CTGCAG</u> GTGAT-3'
CbbRII2fP			5'-TCGAGCA <u>CTGCAG</u> GTCTCATCTTG-3'
CbbRII2rS			5'-TAGGTTCTG <u>GAGCTC</u> AGGTACGC-3'
TestcbbRII_f <sup>b</sup>	1230	369	5'-AACGTCATGGCCTTGGTCGG-3'
TestcbbRII_r <sup>b</sup>			5'-TCCGTCGGCTGGTTGATCTG-3'

<sup>a</sup>WT, Wildtyp; <sup>b</sup> Zum Nachweis der Deletionen verwendete Primer.

Gen	Gengröße [bp]	Deletionsfragment 1 [bp]	Deletionsfragment 2 [bp]	Umfang der Deletion [bp]
regA	612	293	326	555
regB	1389	363	326	1311
orfR	939	332	351	780
orfG	843	348	225	798
orfV	1119	348	468	1089
frcR	1269	348	387	1209
aepA	1659	282	373	1590
cytK	669	298	303	645
sspA	612	456	351	585
orfP	1089	337	268	987

 Tab. 2. Größe der deletierten Gene aus R. eutropha H16, der zur Konstruktion von Deletionsplasmiden verwendeten Fragmente und Umfang der Deletionen.

### II. Anhang

#### 2D-**Protein ID** Annotation Ähnlich- Proteine mit der höchsten PAGE Ähnlichkeit keit (%) Spot-Nr. Transkriptionsregulatoren 7 RREX03769 H-NS ähnliches DNA-96 **DNA-bindendes Protein H-NS** bindendes Protein (H-NS, (Ralstonia metallidurans CH34, ZP\_00273602) COG2916) 10 Transkriptionsregulator, **RREX05765** 84 **Regulatorisches Protein**, LysR-Familie LysR-Familie (Burkholderia cenocepacia HI2424, ZP\_00458807) 52 16 **RREX02965** Zwei-Komponenten-Zwei-Komponenten-System, System, Hybrid aus Hybrid aus Sensor und Sensor und Regulator mit Regulator (Nostoc sp. Stamm PAS/PAC Domäne und PCC 7120, AD2103) Helix-Turn-Helix, XRE-Familie ähnlich 17 91 RREX06243 Transkriptionsregulator Potentieller Transkriptions-(cys-Regulon) regulator des Cystein **Biosynthese-Regulons** (Ralstonia solanacearum CAD16134) 19 Transkriptionsregulator **RREX11775** Transkriptionsregulator, 72 GntR-Familie (Burkholderia cepacia R18194, ZP\_00218221) 57 **Regulatorisches Protein, GntR** (Chromohalobacter salexigens DSM 3043, ZP\_00474006) 24 **RREX05230** Transkriptionsrepressor / 72 Potentieller Transkriptions-Potentieller Regulator regulator ROK-Familie FrcR der Fructose-(Burkholderia pseudomallei Aufnahme, ROK-Familie K96243, YP\_110164) 49 FrcR (Sinorhizobium meliloti, AAG28502) 26 **RREX05291** Transkriptionsregulator, 96 Transkriptionsregulator LysR-Familie (Ralstonia metallidurans CH34, ZP 00275252) 27 Transkriptionsregulator, 52 Potentieller Transkriptions-RREX09086 LysR-Familie regulator, LysR-Familie (Bordetella pertussis Tohama I. CAE42700)

### Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus der 2D-PAGE.

Fortsetzung nächste Seite

2D- PAGE Spot-Nr.	Protein ID	Annotation	Ähnlich- keit (%)	Proteine mit der höchsten Ähnlichkeit
Transkrij	ptionsregulator	en		
28	<u>RREX01489</u>	Transkriptionsregulator LysR-Familie	65	Transkriptionsregulator LysR- Typ ( <i>Bordetella pertussis</i> Tohama I, CAE41888)
29	<u>RREX10135</u>	Transkriptionsregulator IclR-Familie	59	Transkriptionsregulator IclR- Familie ( <i>Bacillus clausii</i> KSM-K16, YP_174072)
31	<u>RREX05291</u>	Transkriptionsregulator LysR-Familie	96	Transkriptionsregulator ( <i>Ralstonia metallidurans</i> CH34, ZP_00275252)
32	<u>RREX03402</u>	Transkriptionsregulator LysR-Familie	97	Transkriptionsregulator ( <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134, ZP_00167168)
33	<u>RREX07890</u>	Transkriptionsregulator RpiR-Familie	71	Transkriptionsregulator mit Helix-turn-Helix-Motiv, RpiR- Familie ( <i>Burkholderia</i> <i>cenocepacia</i> HI2424, ZP_00464659)
34	<u>RREX10958</u>	Transkriptionsregulator, MarR-Familie und Rrf2- Familie	73	Transkriptionsregulator mit Verbindung zur Assem- blierung von Eisen-Schwefel- Clustern, IscR ( <i>Azoarcus</i> sp. EbN1, CAI09789)
			71	Protein der Rrf2-Familie ( <i>Pseudomonas putida</i> KT2440, AAN66466)
Transkrij	ptions- und Tra	nslations-assoziierte Protein	ne	
2	<u>RREX03630</u>	Protein Translations- Elongationsfaktor TU	100	GTPase-Translations- Elongationsfaktor ( <i>Ralstonia</i> <i>metallidurans</i> CH34, ZP_00272225)
3	<u>RREX06785</u>	DNA-abhängige RNA Polymerase α- Untereinheit	99	DNA-abhängige RNA- Polymerase, α-Untereinheit ( <i>Ralstonia metallidurans</i> CH34, ZP_00272176)
5	<u>RREX02611</u>	Exonuclease III (EC 3.1.11.2) (COG0708, XthA)	95	Exonuclease III ( <i>Ralstonia</i> <i>eutropha</i> JMP134, ZP_00170714)

# Massenspektrometrisch identifizierte Proteine, aus der 2D-PAGE (Fortsetzung).

#### 2D-**Protein ID** Annotation Ähnlich-Proteine mit der höchsten PAGE keit (%) Ähnlichkeit Spot-Nr. **Transkriptions- und Translations-assoziierte Proteine** 18 **RREX04359** SSU Ribosomales Protein 98 **Ribosomales Protein S2** S2P (Ralstonia metallidurans CH34, ZP\_00272540) 20 97 rRNA-Methyltransferase **RREX10030** 23S rRNA-Methyltransferase (Ralstonia metallidurans CH34, ZP 00273913) 35 LSU Ribosomales Protein 97 **Ribosomales Protein L10 RREX06059** L10P (Ralstonia metallidurans CH34, ZP\_00272220) Protein L19 der 99 **Ribosomales Protein L19** 36 **RREX04629** ribosomalen 50S (Ralstonia metallidurans Untereinheit CH34, ZP 00275396) Enzyme 1 **RREX04104** Dihydrolipoamid-92 Pyruvat/2-Oxoglutarate succinyltransferase-Dehydrogenase-Komplex, Komponente (E2) des 2-Dihydrolipoamide-Oxoglutaratacyltransferase (E2)-Kompo-Dehydrogenasenente (Ralstonia eutropha Komplexes JMP134, ZP 00166999) Cysteine-Synthase (EC 4 **RREX08806** 95 Cystein-Synthase (Ralstonia 4.2.99.8metallidurans CH34. ZP\_00275415) 6 **RREX03322** Uracil-91 Uracil-Phosphoribosyltransferase Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.9) (Ralstonia metallidurans CH34, ZP\_00273517) 13 **RREX08395** NAD(P)-94 NAD(P)-Transhydrogenase, Transhydrogenase, Untereinheit a (Ralstonia Untereinheit $\alpha$ (EC metallidurans CH34, ZP\_00273014) 1.6.1.2) 14 **RREX07822** Ketol-Säure-98 Ketol-Säure-Redukto-Reduktoisomerase (EC isomerase (Ralstonia 1.1.1.86) metallidurans CH34, ZP\_00275233) 15 Dihydrolipoamid-98 Pyruvat/2-Oxoglutarat-**RREX04105** Dehydrogenase Dehydrogenase-Komplex, Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Komponente (E3) (Ralstonia eutropha JMP134, ZP 00166998)

### Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus der 2D-PAGE. (Fortsetzung)

Fortsetzung nächste Seite

2D- PAGE Spot-Nr.	Protein ID	Annotation	Ähnlich- keit (%)	Proteine mit der höchsten Ähnlichkeit
Enzyme				
22	<u>RREX07275</u>	Cytidylat Kinase	83	Cytidylat-Kinase (Cmk) (Cytidin Monophosphat Kinase) ( <i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i> , KCY_RALSO)
25	<u>RREX10516</u>	Methyl-Citratsynthase (EC 4.1.3.31)	100	Methyl-Citratsynthase ( <i>Ralstonia eutropha</i> H16, Q937N9)
Weitere				
8	<u>RREX08965</u>	Hypothetisches Protein	50	Hypothetisches Protein (Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-C, EAL78503)
12	<u>RREX03553</u>	Hypothetisches Protein	87	Protein der Phasin Familie ( <i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344, YP_103336)
21	<u>RREX07847</u>	SspA, ,Stringent starvation protein A'	98	,stringent starvation protein A' ( <i>Burkholderia mallei</i> ATCC AAU48263)
23	<u>RREX11584</u>	Protein der universellen Stressprotein Familie	90	Universelles Stressprotein UspA ( <i>Ralstonia</i> <i>metallidurans</i> CH34, ZP_00272266)

# Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus der 2D-PAGE (Fortsetzung).

## III. Anhang Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von *R. eutropha* H16

### A. Nucleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *sspA*.

Die codierende Nucleotidsequenz ist grau unterlegt, Start- und Stopcodon sind fett gedruckt. Die Aminosäuresequenz ist unter der Nucleotidsequenz im ,One-Letter-Code' angegeben.

1	TGTGGGAACTGCAGGGCCAGCGCCGCCAAGTTCACGGAAGTGGAAGAGCACGGCGAGAAGGTGCACAA	70
Ť	ACACCCTTGACGTCCCGGTCGCGCGGCGGTTCAAGTGCCTTCACCTTCTCGTGCCGCTCTTCCACGTGTT	, 0
71	GTTTGCCGGCTTCGAGCAACTGAGCCCGGGCAAGCTGAGCAAGGTCGAGTACGACCAGGCCGCCGCCGAC	140
/ 1	${\tt caaacggccgaagctcgttgactcgggcccgttcgactcgttccagctcatgctggtccggcggcgactg}$	110
141	CTGGTCAGCTTCCTGGACTGGATGGCCGAGCCGGCGCGCGC	210
	GACCAGTCGAAGGACCTGACCTACCGGCTCGGCCGCGTCTTGGTGGCGTTCGCGGACCCGCAGACCCACG	210
211	TGCTGTTCCTGGGCGTGTTCACTGTCTTTGCCTGGCGCCCCCACGCCGCGTACTGGAAGGACGTGAAGTA	280
211	eq:acgacccccccccccccccccccccccccccccccccc	200
281	AAGGCATGCCAGGGCCCGAATCCGGGCCCGGACAAGGCAAAGGCCAGGGGTGGCCGCTGCGAAAGCAGCA	350
201	TTCCGTACGGTCCCGGGCTTAGGCCCGGGCCTGTTCCGTTTCCGGTCCCCACCGGCGACGCTTTCGTCGT	550
351	CCGCCCCTGGCCTTTTCTCTTGGAAAACCTGCCGAAGCGGGCCAATAAAGTGCGTCATTTGCCACTAATT	420
331	GGCGGGGACCGGAAAAGAGAACCTTTTGGACGGCTTCGCCCGGTTATTTCACGCAGTAAACGGTGATTAA	120
421	TGCTTTCTGGTGGTCGACTTTGGCAGAATGGCAGACCTTACTGTCCGACCCTGCTTCGGCTAAGCCCAAG	490
721	ACGAAAGACCACCAGCTGAAACCGTCTTACCGTCTGGAATGACAGGCTGGGACGAAGCCGATTCGGGTTC	190
491		560
	M M V L Y S G T T C P F S Q R C R L V L	-
561	TTTGAAAAGGGCATGGATTTTGAAATCCGCGACGTCGACCTGTTCAACAAGCCCGAAGATATTTCGGTGA	630
501	AAACTTTTCCCGTACCTAAAACTTTAGGCGCTGCAGCTGGACAAGTTGTTCGGGCTTCTATAAAGCCACT F E K G M D F E I R D V D L F N K P E D I S V M	-
631	TGAACCCGTACGGCCAGGTGCCCATCCTGGTCGAGCGCGCGC	
	TGAACCCGTACGGCCAGGTGCCCATCCTGGTCGAGCGCGCGC	700
	TGAACCCGTACGGCCAGGTGCCCATCCTGGTCGAGCGCGCGC	700 -
701	TGAACCCGTACGGCCAGGTGCCCATCCTGGTCGAGCGCGACCTCATCCTGTATGAGTCGAACATCATCAA        +         ACTTGGGCATGCCGGTCCACGGGTAGGACCAGCTCGCGCTGGAGTAGGACATACTCAGCTTGTAGTAGTT         N P Y G Q V P I L V E R D L I L Y E S N I I N         CGAATACATCGACGAGCGCCTTCCCGCACCCGCAGCTGAGTGCGCCGGCCG	700 - 770
701	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	700 - 770 -
701	$\begin{tabular}{lllllllllllllllllllllllllllllllllll$	700 - 770 -
701 771	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	700 - 770 - 840
701 771	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	700 - 770 - 840 -
701 771 841	TGAACCCGTACGGCCAGGTGCCATCCTGGTCGAGCGCGCGC	700 - 770 - 840 -
701 771 841	TGAACCCGTACGGCCAGGTGCCATCCTGTCGGCGCCGCCCCCCCC	700 - 770 - 840 - 910 -
701 771 841	TGAACCCGTACGGCCAGGTGCCCATCCTGGTCGAGCGCGCGC	700 - 770 - 840 - 910 -
701 771 841 911	TGAACCCGTACGGCCAGGTGGCCATCCTGGTCGAGGCGCGCGC	700 - 7770 - 8400 - 9100 - 9800

981	TGGCGCCTGGACCACTACGGCATTGAGCTGTCGAAGAACGCCGCGCCGCCGCTGCTGAAGTATGCTGAACGCA +++++++	1050 -
1051	TTTTCAGCCGTCCCGCGTACATCGAAGCGCTCACCCCGTCCGAAAAGGTGATGCGCCGCCTAA         CCGGCACC         ++         AAAAGTCGGCAGGGCGCATGTAGCTTCGCGAGTGGGGGGGG	1120
1121	GGCCCGAAGGCATCCGCCCTCGGGCCACTACGGCGCCATTGGAAGCACAATGCCTGAAACCTCCACCAAG	1190
1191	CCCTACCTGATTCGCGCCATCTATGAATGGTGCACGGACAACGGCTTCACGCCGTACATCGCCGTCTTCG 	1260
1261	TCGACGCCAACACCAGCGTGCCGCGCGCGAGTTCGTCAAGAACAACGAGATCGTGCTCAACGTCAGCTTCGA 	1330
1331	CGCCACCAGCGGCCTGGACATGGGCAACGAGTGGATCACCTTCAGCGCACGCTTTGGCGGCGTCTCGCGC 	1400

### B. Nucleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von frcR

Die codierende Nucleotidsequenz ist gelb unterlegt, Start- und Stopcodon sind fett gedruckt. Die Aminosäuresequenz ist unter der Nucleotidsequenz im ,One-Letter-Code' angegeben.



1051	GATATCGCGATGATGCCGGTGCCGCCCAGCACCCTGCCCTCCGCGCCGGTTGCCACCGGCACGG ++	1120
	CTATAGCGCTACTACGGCCACGGCGGGGCGGGGCGGGGGGGG	-
1121	GGCGCGACATCCTGATCTCGCGCGCGCGCCGCCTCAACGCCCTGACCCGCCACCTGCGCCACCACGGCGTGGT	1190
	CCGCGCTGTAGGACTAGAGCGCGCGCGCGCGCGGGGGGGG	-
1191 1261	GGTCAACGGCCATGCCGACCTGCAGCGCCAGGTCGAGCTGGGCCACCCCGCGGTCGAGGAATGGATTGCC	1260 - 1330
	V N G H A D L Q R Q V E L G H P A V E E W I A	
	GACTGCGTCGATGCGCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCCGCCGCGCGCG	
	D C V D A L A P A L Q S A L A V L D V P L V I F	-
1331	TCGATGCCGATATCGACGGCGGCCTGGTCGCCACGCTGATTGCGCGCCCTGCAGCAGGTGCTGGATGAAAG	1400
	D A D I D G G L V A T L I A R L Q Q V L D E S	-
1401	CGCCCCCGAAGCCCGCGCGCCCCCCCCCCGCGTGGTGCGCGGCGCGCTGCT	1470
	A P E A R A P A T V V R G C F G A N A G A V G	-
1471	CCGCCGCGCGCCGCCGATGTTCATGAACTTCTCGCCGCGCCGCAACTGCTACGGGGCGCGCTCTGCCATCG ++++++	1540
	A A S L P M F M N F S P R A E L L R G A S A I V	-
1541	AGGCCTCCGGCCGGTACGGTACAGACTTCGTGGCGCATGGAGCGGGTACCGTCGCGTGGACGTACCGC	1610
1611	P E A G H A I V * GCCATGCGGGCCCAGCGCCGCTGCTTGAACTGCGCAATATCTCCCAAGACCTTCCCCGGCGTGAAGGCGCT	
	+ CGGTACGCCCGGGTCGCGGCGACGAACTTGACGCGTTATAGAGGTTCTGGAAGGGGCCCGCACTTCCGCGA	1680
1681 1751	CAGCAACATGGAGCTGACCGTCTACGCCGGCGAAGTCCATGCCCTGATGGGCGAGAATGGCGCCGGCAAA	1750
	GTCGTTGTACCTCGACTGGCAGATGCGGCCGCTTCAGGTACGGGACTACCCGCTCTTACCGCGGCCGTTT	
	AGGTGCGACTACTTCTAGGACAGGCCGCGGATGTAGCGGCCGCGCGCG	1820
1821	AGCCGGTGGCCATCGACGGCCCGGCCACGGCGCGCCCCACGGCGTGGCCGTGATCTACCAGGAGCTGAG	1890
	TCGGCCACCGGTAGCTGCCGGGCCGGTGCCGCGCGCGCGC	1090

C. Nucleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von cmk.

Die codierende Nucleotidsequenz ist gelb unterlegt, Start- und Stopcodon sind fett gedruckt. Die Aminosäuresequenz ist unter der Nucleotidsequenz im ,One-Letter-Code' angegeben



1051 -----+ 1120 ATGGGGCTGCCGTGGTCTACCGCGGTCGGGCCCGTTCTGAACACCGAACACAGTTTGGACTGGGGCC

CTGCACTGGCAGACTGAGCGCGATAGTCGCGCCGGCCAGCGTATTGCGGATTTCACCTTACGTTTATGTC

1121 -----+ 1190 GACGTGACCGTCTGACTCGCGCTATCAGCGCGGCCGGTCGCATAACGCCTAAAGTGGAATGCAAATACAG

CGACCTGCAAACTAACGAATCCTTTGCCGCACTGTTCGAGGAATCCGTCGCCCGCTCCAATATGAAGGCT

1191 -----+ 1260 GCTGGACGTTTGATTGCTTAGGAAACGGCGTGACAAGCTCCTTAGGCAGCGGGGCGAGGTTATACTTCCGA

 ${\tt GGCGAAGTGATCTCCGCTGAAGTCGTGCGCGCATCGACCACAATTTCGTGGTCGTCAATGCCGGCCTCAAGT}$ 

1261 -----+ 1330 CCGCTTCACTAGAGGCGACTTCAGCACGCGTAGCTGGTGTTAAAGCACCAGCAGTTACGGCCGGAGTTCA D. Nucleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von orfV.

Die codierende Nucleotidsequenz ist gelb unterlegt, Start- und Stopcodon sind fett gedruckt. Die Aminosäuresequenz ist unter der Nucleotidsequenz im ,One-Letter-Code' angegeben.



1051	GAACAGAGTGGAACGCATATAACGCCCTGTTGACAAACTTGGGTGGCCTGCGCATTCCAACTTTGGGGA	1100
	CTTGTCTCACCTTGCGTATATTGCGGGACAACTGTTTGAACCCACCGGACGCGTAAGGTTGAAAACCCCT T E W N A Y N A L L T N L G G L R I P T F G D	-
1121	CTACTCGGTTTCACACCCACAGACCGAGCTACTCGATCCGCGTGTGCTCGATCCAAACGCGAAGATCAAG	1190
	GATGAGCCAAAGTGTGGGTGTCTGGCTCGATGAGCTAGGCGCACACGAGCTAGGTTTGCGCTTCTAGTTC Y S V S H P Q T E L L D P R V L D P N A K I K	-
1101	TACACCGTTGATGGCGAATGGCTCGTTCACACTGGTGCCCAAGTGAAGAAGCATGGTAGGGGGTCAATTTC	1260
1191	ATGTGGCAACTACCGCTTACCGAGCAAGTGTGACCACGGGTTCACTTCTTCGTACCATCCCCAGTTAAAG Y T V D G E W L V H T G A Q V K K H G R G Q F Q	-
1261	AAGGACTATGCCAAGAACTGATTGCCAACCCGTCAGCAGCTTTCCCAGGACCGACTTACTCATGGGGTGA	1330
1201	TTCCTGATACGGTTCTTGACTAACGGTTGGGCAGTCGTCGAAAGGGTCCTGGCTGAATGAGTACCCCACT G L C Q E L I A N P S A A F P G P T Y S W G D	-
1221	TGCATATATCCATGGGTGCGCAAGTGGCACCGAAACGACGGGCGGCACATCGACATGGCCTTCGGTCGG	1400
1991	ACGTATATAGGTACCCACGCGTTCACCGTGGCTTTGCTGCCCGCCGTGTAGCTGTACCGGAAGCCAGCC	-
1401	AACAACCGACATATCACCAAGGTCATCAGGGATGTCGCCACGTTGTTCGGGTCTTCAACGATTCCC <b>TGA</b> C	1470
1101	TTGTTGGCTGTATAGTGGTTCCAGTAGTCCCTACAGCGGTGCAACAAGCCCAGAAGTTGCTAAGGGACTG N N R H I T K V I R D V A T L F G S S T I P * -	14/0
1 4 17 1	CAGCTGCCGAAGCTCACTAAGTGGCACCAAGGCCGCGGCAATCTCATACAATTCGCGACGGTTGCCGCGG	1540
14/1	GTCGACGGCTTCGAGTGATTCACCGTGGTTCCGGCGCCGTTAGAGTATGTTAAGCGCTGCCAACGGCGCC	1540
1541	AGCCTTCGTTTTTCAACGCCTCGCTCCTCCAGGATCTTGGTTACCTCCGGACGCCACAGTAGGTGGGCGA	1610
	TCGGAAGCAAAAAGTTGCGGAGCGAGGAGGGCCTAGAACCAATGGAGGCCTGCGGTGTCATCCACCCGCT	
1611	CATGAAAGGCCGACACCGAAGGATTTGCTCCAACTGCGCGGGTGTGTTTCGATTGATACCGCCCCTCGCTT	1680
	GTACTTTCCGGCTGTGGCTTCCTAAACGAGGTTGACGCGCCACACAAAGCTAACTATGGCGGGGAGCGAA	
1681	GCCCACGCTTGCCACCTTAATCCCCCACCATGGTGGCAATATTGACTCCGCCGACCCTAGGTGATGCTCT	1750
TOOT	CGGGTGCGAACGGTGGAATTAGGGGGTGGTACCACCGTTATAACTGAGGCGGCTGGGATCCACTACGAGA	
1751	CCCACCAAGGTCGCCCTATCCATTGCTTTCGAATAGGCTTCAACTTGCGCTGGTAAGCGTTCCAGCG	1820
T / JT	GGGTGGTGGTGCCAGCGGGATAGGTAACGAAAGCTTATCCGAAGTTGAACGCGACCATTCGCAAGGTCGC	1020
1821	TGTCAGCATCGCTTTTCAGTTCGTAGCCGTGCAGAAATCCATTCACTACTGCAATGTCAACACGGCACAA	1890
	${\tt ACAGTCGTAGCGAAAAGTCAAGCATCGGCACGTCTTTAGGTAAGTGATGACGTTACAGTTGTGCCGTGTT$	
1891	GCCGTGCTGCAGGCCGAGCTCTTCAACAACCAGCACATTGGGGTCAGCAACATGTTCGGCGAGCACCTTC	1960
	CGGCACGACGTCCGGCTCGAGAAGTTGTTGGTCGTGTAACCCCAGTCGTTGTACAAGCCGCTCGTGGAAG	00

E. Nucleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *orfG*.

Die codierende Nucleotidsequenz ist gelb unterlegt, Start- und Stopcodon sind fett gedruckt. Die Aminosäuresequenz ist unter der Nucleotidsequenz im ,One-Letter-Code' angegeben.

1	CTCCATGTCGCGGTGGCGTGCGTGCGTGCCAAAGCCCATGCCCGGCGCGACGCGGGTCCTCGTTGATCACTCGC	70
71		140
141	AGCCATGATCGGCGTAACCACGCTCTGCAGACTTTCTGATTCAATCATCTGCTTGCT	210
211	TGTTTGCCCGCAAGCACTGGCTTGGTAACCGTGTCGCGGGGCATACGTTTTCGCTTTGATGCTAGGAAGTTT	280
281	AGGGCTTGAGGCGTATATTTACGGGGATCGACTTAGAAGCAGTCATTCAGAATTTCTGAACATGGCCCTC	350
351	TCGCTAGAATCCCTCGAAGTCCTCGACGCCATCGAACGCAAGGGGCAGCTTTGCCGCCGGCGGCCACGAG	420
421	orfG ATGGCAGGGTCCCTTCCGCGCTGACCTACGTGGTGCGCAAGCTGGAAGAAGACCTGGACGTGCTGCTGT TACCCGTCCCAGGGAAGGCGCGACTGGATGCACCACGACGACTTCTTCTGGACCTGCACGACGACGACA M G R V P S A L T Y V V R K L E E D L D V L L F	490 -
491	TCGACCGGCGCCGCCGCGCGGAGCTGACGCCGGCCGGACGCGCCTGCTCGATGAGGGCCGCCACCT ++ AGCTGGCCGCGGCGGTGGCGCGGCTCGACTGCGGCCGGCC	560 -
561	CGACGTACGGCGGCTACGGCGCGCGCGCGCGCGGGGGGGG	630 -
631	ATCGTGGTCGACGACCTGATCAACTTCCGCGCGCTGCTGCCGGTGATCCACGACTTCTACGCCGAGAACA TAGCACCAGCTGCTGGACTAGTTGAAGGCGCGCGCGACGACGGCCACTAGGTGCTGAAGATGCGGCTCTTGT I V V D D L I N F R A L L P V I H D F Y A E N T	700
701	CCGCCACCCGGCTGCGCTTTTCCAAGGAAGTGCTGGGCGCGCGC	770 -
771	CGACCTGGTGATCGGCGGCGCCTACGATGCGCCCAGCACGCAGGGCTTCCAGATCCGGCCACTGGGCTCG GCTGGACCACTAGCCGCCGCGGGATGCTACGCGGGGTCGTGCGTCCCGAAGGTCTAGGCCGGTGACCCGAGC D L V I G G A Y D A P S T Q G F Q I R P L G S	840 -
841	ATGCCGTTCGTGTTCGCGGTTGCCGCGCGCCACCATCCGCTGGCCACCGAGGAAGGCCCGCTCACCACCATCC + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	910 -
911	AGATCGCCAGGCACCGCATCGTCGCGGGGGGGGGGCGACCCTCGCGGCACCCTGCCGGCGCGCATCGCCATGGGCG TCTAGCGGTCCGTGGCGTAGCAGCGCCCCCGCTGTGGACGGCGCGTTGGACGGCCGCGCATGGGTACCCGCA I A R H R I V A V G D T S R N L P A R T H G V	980 -

1051	GGCTGCGGCTGGCTGCCGGCGCCGATGGCGCAACCCCATATCGAAAGCGGCGTGCTGCAGGCGCGCGC	1120 -
1121	CCGTCGAGGTGCGCGCGCCCGGCAACTTCAAGGTAGCCTGGCGCACCAGCAACCGCGGCAAGGCGCTGCA GGCAGCTCCACGCGCGCGGGCCGTTGAAGTTCCATCGGACCGCGTGGTCGTTGGCGCCGTTCCGCGACGT V E V R A P G N F K V A W R T S N R G K A L Q	1190 -
1191	GTGGTGGGCCAGCAAGCTGGAAGACCCGCGCCTGGCGCAGGCACTGCTGCAGCAACCCGACTTCGCCGGC         CACCACCCGGTCGTTCGACCTTCTGGGCGCGGACCGCGTCCGTGACGACGTCGTTGGGCTGAAGCGGCCG         W       A       S       K       L       D       P       R       L       A       Q       P       D       F       A       G	1260 -
1261	TGA       GGGCAGGTCTCATGGCAGTGACAGCAACGACGGCAGCAACGACGGTTGCCGCGACCGGCTATCGCGG        +++++++	1330
1331	CCGCTTCGCCCCCTCGCCCACCGGGCCGCTGCATATGGGCTCGCTGGTCACCGCGCTGGCGAGCTGGCTG	1400
1401	GACGCGCGCGCGCGCGGCGGCCAGTGGCTGGTGCGCATCGAGGACATCGACATGCCGCGCGCG	1470
1471	GCGCGGACGACGACATCCTGCTCACGCTGGAACGCCTGGGCATGGCGCCGGACGAGCCGCCGGTATGGCA ++++++	1540
1541	GAGCCGGCGTGAGCCGTTCTATGCCGATGCGCTGCGCCGCCGCCGCGCGCG	1610
а

а

# F. Nucleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von orfP.

Die codierende Nucleotidsequenz ist gelb unterlegt, Start- und Stopcodon sind fett gedruckt. Die Aminosäuresequenz ist unter der Nucleotidsequenz im ,One-Letter-Code' angegeben.

1	actitcactgtggcgtactggttgttctcggccacctggctcttgtgcatcacacaca	70									
T	TGAAAGTGACACCGCATGACCAACAAGAGCCCGGTGGACCGAGAACACGTAGTGTGTGT	70									
71	CGAAGATGGTCTTCTTCTCCTGCTGGAAGACTTCCTGCGAGGTGTAGTAGTGGGCCGGCAGCGTATAGGC	140									
, 1	GCTTCTACCAGAAGAAGAAGAGGACGAGCTTCTGAAGGACGCTCCACATCATCACCCGGCCGTCGCATATCCG	110									
141	CAGCGGCGGGGTGGTGCCCCCAGGCGGGGGGGGGGGGGG	210									
	GTCGCCGCCCCACCACGGCGTCCGCCCCCGCCACCAGAGAACGTACCCCAACAGAGGAACAACCAGAGCAA										
211	GCCTTATCGATTCACTAACAGTTAATTAAATTACTGTTGGTGATGTGAAGTCAAGTCAAGTGAAGGAGCGC	280									
	CGGAATAGCTAAGTGATTGTCAATTAATTAATGACAACCACTACACTTCAGATCACTCCTCGCG										
281	AGGTGTATTGCAAATCCAAAAAACCGATGAAATTTGCTCGCTTGATGGTCCATGGCTATCAATTCGCGCGA	350									
	${\tt TCCACATAACGTTAAGTTTTTTGGCTACTTTAAACGAGCGAACTACCAGGTACCGATAGTTAAGCGCGCGC$	.GGTACCGATAGTTAAGCGCGCT									
351	TTTGCGGTGATGGTGTAAGGTTCGAGTTACTCAATTCACCATCGGTTGAAAAAAAGCGGAGGGGATGCCC	420									
	AAACGCCACTACCACATTCCAAGCTCAATGAGTTAAGTGGTAGCCAACTTTTTTCGCCTCCCCTACGGG										
421	++++++	490									
	M T E D T F A T R L K G V L E G K R I M L K Q V	-									
491	TGGCAGAGGCGCTGTCGGTATCGCCGTCGGCGGTGCACAAGTGGACCCGCGGCGGCGAGATCGAATACGA	560									
	ACCGTCTCCGCGACAGCCATAGCGGCAGCCGCCACGTGTTCACCTGGGCGCCGCCGCCTTAGCTTATGCT	_									
561		630									
	R L L A L A R F L G V N W L W L R Y G E Q A I	-									
631	GCCGACCTGGAGGCCAGCACCGCCTCTGACCCACACATCAAGGAACTGCGCCAGAAGCACCTGGCGGAGA	700									
(	CGGCTGGACCTCCGGTCGTGGCGGAGACTGGGTCTGGTGTGTGT	_									
-											
701		770									
	M E S E A R M K F A Q E V S G I V T W E W N V	-									
100	GCTGACCGATGGCCTGACCTACTCGTCCAACGACGTCACGCTGTTCGGCCGCCACATCCGCAACATGGAC	040									
//1	CGACTGGCTACCGGACTGGATGAGCAGGTTGCTGCAGTGCGACAAGCCGGCGTGTAGGCGTTGTACCTG	840									
		-									
841		910									
	CTGAAGACCCGGACGCACGTAGGCCGGCTACAGCGCGCGC	-									
	CGCAGGAGATGCACGAGTGGGAGTTCCGCGTCGTGCACGGGGACACCACGCGCTGGATCTCGTCGCGGGC										
911	GCGTCCTCTACGTGCTCACCCTCAAGGCGCAGCACGTGCCCCTGTGGTGCGCGCACCTAGAGCAGCGCCCCG	980									
	Q E M H E W E F R V V H G D T T R W I S S R A	-									
981	CACGCTGGTGCGCGACTTCGACCAGCGCCCGGTCAAGATGATCGGCGTCAGCCTGGACATCACCGAGCGG	1050									
201	++++++	1000									

1051	CGCCGCGCGAGGCTGCGCTGCGCCAGAACGAGGCGCTGCTGGCCAAGGCGCAGGAGATTGCCCACCTGG + GCGGCGCGGCGCCCGACGCGACGGGTCTTGCTCCGCGACGACGGGTTCCGCGTCCTCTAACGGGTGGACC R R A E A A L R Q N E A L L A K A Q E I A H L G	1120 -
1121	GCGGCTGGTACTGGAATATCCAGACCGACGACGACGCCTGGACCGACGAGGCCTACCGCATCTTCGGCTG 	1190 -
1191	GGCCCCGCAGGCGTTCAAGGTGACCATGGAGCGCTACCTGGCGTCGATCGTCGAGGAGGACCGCGCGCG	1260 -
1261	GTGCAGGCGGCCATCCGCGCGGCCATCGTCGACAAGGCGCCGTACAGTGTCAACTACCGCATCCAGCTGC 	1330 -
1331	CCGACGGCAGCCATCGCGACATCCATGAGGAAGGCGAGGTCACGCTGGACGAGCACGGCAACGCCCTGAC 	1400 -
1401	CATGGTCGGCGCCTCGCAGGATGTCACCGGGCCGGCAGCGCCGCCGGCAAGAGGCGGCGGCGGC	1470 -
1471	CGCAAGCGTGCGGCGGGACAAGCCGCGCGCGCACCAGCC <b>TGA</b> CAGCGCCACAGGGCGGCATGCATTGCCGCCC +++++	1540
1541	TTTTTCATTTGGCGGGTCTTCCGCGTCACGTGAAGGAATAAAACCGTTTGTTT	1610
1611	GAACGTTTGTTTCATACTCCGCTATGATGGCATCTCCATGGCGCCCGGATACCGCGCGCCCGTACAAGGAG ++++++	1680
1681	GAGATCCATCATGTCCCTGGCCAAGCCAGCCATCCCGCAGTCCCCGGGCCACGCCGCGGTGTTGCCGGAC	1750

### G. Nucleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von aepA.

Die codierende Nucleotidsequenz ist gelb unterlegt, Start- und Stopcodon sind fett gedruckt. Die Aminosäuresequenz ist unter der Nucleotidsequenz im ,One-Letter-Code' angegeben.





# H. Nucleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der Gene *regB* und *regA*.

Die codierende Nucleotidsequenz ist grau unterlegt, Start- und Stopcodon sind fett gedruckt. Die Aminosäuresequenz der Gene ist unter der Nucleotidsequenz im ,One-Letter-Code' angegeben.

1	CGACCAGCTTCGCGTTGTCGTGCGCGCGCGCGCAGCACCATGAAGGCGCCGGAGGCAGTCTGGGTCGGCACCGT	70
Ŧ	GCTGGTCGAAGCGCAACAGCACGCGCACGTCGTGGTACTTCCGCGGCCTCCGTCAGACCCAGCCGTGGCA	, 0
71	GCCGCGCACCCAGGCATTGCTGACATCGACCTGGGCCAGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGC	140
	CGGCGCGTGGGTCCGTAACGACTGTAGCTGGACCCGGTCGCGCCGCGCCGCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC	
141	GCGACCGATGCGGCCAGCGTGGCCGAGCGGAATTTGGCTTGCATGAAAGGCTCTCCTGAAAGCAGACATT	210
211		280
	GCAGCCCGACAAGCTCGGCGCCAATGCGGCAAGGTGTCGCACGCA	
281	CGTCGGGCTGTTCGAGCCGCGGGTTACGCCGTTCCACAGCGTGCCGCGGGCGCGCGGGGCGCGTAACTAT	350
	regB	
351	CACTCGCGCCCATGACCGCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCCGCCGCCGCCGCCGC	420
	M T T A A A V T R L P D L P F L S P L P	-
421	GCGGGCACCTCCGCCCGCCATGGCCAGGTGACGCTGCGCCGGCTGTTCTGGCTGCGCTGGGCACTGCTGG	490
	eq:cgccgtgggggggggggggggggggggggggggggggg	-
491	CGGGACAGGCGCTGACCGTGCTGAGCTGCGAGCCCATCGCCGGCATCCGCCTGCCCTACGGGCCGCTGCT	560
	GCCCTGTCCGCGACTGGCACGGACTCGACGCCTCGGGTAGCGGCCGTAGGCGGACGGA	- 00
	GGTGGTGTTCGGCCTGCAGGCGCTGTTCAACCTGCTGACCGGCCTGCGCCCGGCCAGCACGCGGCGC	
561	CCACCACAAGCCGGACGTCCGCGACAAGTTGGACGACTGGCCGGACGCGGACGCGGGCGG	630
	V V F G L Q A L F N L L T G L R L R Q H T R R	-
631		700
	N S A P G E A E L M G Q L L V D L T A L S A I L	-
701	TGTTCTACACCGGCGGCGCGACCAACCCCTTTGTCTCGTTCTACCTGCCGGGGCTGGCCATTGCCGCCGC	770
	ACAAGATGTGGCCGCCGCGCGCGGTGGTTGGGGAAACAGAGCAAGATGGACGGCCCCGACCGGTAACGGCGGCG F Y T G G A T N P F V S F Y L P G L A I A A A	-
771	CATCCTGCCGTGGCGCCAGGTGATCGCGCTGGCGCTGTACGCGCTCGTCTGCTACACGCTGCTGCTGTTC	840
	GTAGGACGGCACCGCGGTCCACTAGCGCGACCGCGACATGCGCGAGGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC	-
	GAATATGTGCCGCTGGACCTGCACAACCCGGACAACGCGGTGAACTACCACCTGGCCGGCATGTGGCTGA	
841	CTTATACACGGCGACCTGGACGTGTTGGGCCTGTTGCGCCACTTGATGGTGGACCGGCCGTACACCGACT	910
911	E Y V P L D L H N P D N A V N Y H L A G M W L N	-
	TGAAGCAACGGTCGCGCCACTACTAGCGCGCACAAGCACCGCGCGGACAGGCCGCACGACGCGGTCGCGCGT	980
	F V A S A V M I A L F V A R L S G V L R Q R E	-
981	GGCGCAGCTGAACCTGGCACGCGAGCAGCTGCTGCCGCGAGGCGCGCGC	1050
	A Q L N L A R E Q L L R E A R V E D L N G Q A	_



2101	AAGGCGCGGACGAATACCTGGCCAAGCCGGCCAATGTCGATTCGATCCTGACCGCGCGCG											
	TTCCGCGCCTGCTTATGGACCGGTTCGGCCGGTTACAGCTAAGCTAGGACTGGCGCGCGC	-										
2171	GTCCGAAGATGCGGCGCGGGGCGGCGGCGGCGGGGGGGGG	2240										
2241	S E D A A Q A A L E E P V P L S V A R L E W E	-										
	GTATAGGTCGCGCACCGGCTCGTACTGCCGTTATAGAGGCGGTGCCGTGCCCGCGACTTGTACGTGG	2310										
2311	HIQRVLAEHDGNISATARALNMHR GGCGCACCTTGCAGCGCAAGCTGGGAAAGCGGCCGGTGTCGCGGG <b>TAA</b> AGGAAAAAGGCCGCGCGCGCATTGCG											
	CCGCGTGGAACGTCGCGTTCGACCCTTTCGCCGGCCACAGCGCCATTCTTTTCCGGCGCGCGC	+ 2380 AACGC										
2381		2450										
2451 2521	GCCGGGAAGGCCACCGTTGACGACGGCCGCAATGTCCGCGTTGACCTGCATCAGGTCGGGCAGC GCGCTGCCCTGCGGCGTGCTGCCCTGCGCGACGATGCGCATGGCATCGCCGGCATGCCGGCCAGCG											
	CGCGACGGGACGCCGCACGACGGGACGCGCTGCTACGCGTACCGTACCGCCGTACGGCCAGCCGGTCGC	2520										
	TGAACAGGCCGCCAGAATCCAGCGCCAGCTTCGCGGCCGCGCGCG											
2591	CGCAGCCTCGGCGGCGGGGCACGGGCGGGGCGGGCGGCCAGCGCGGCCAGCGCGGCCAGCGCGGCCAGCCGGCCAGCGCCAGCGCCAGCGCCAGCGCCAGCGCCAGCCGGCCAGCGCCAGCGCCAGCGCCAGCGCCAGCGCCAGCGCCAGCCGGCCAGCGCCAGCGCCAGCGCCGC	2660										
		GCGTCGGGGCCGCCCGTGCCGCCCGCCTGCCTACGTTTCCTTCC										

### I. Nucleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von orfR.

Die codierende Nucleotidsequenz ist gelb unterlegt, Start- und Stopcodon sind fett gedruckt. Die Aminosäuresequenz ist unter der Nucleotidsequenz im ,One-Letter-Code' angegeben.



1051	TCAA  AGTI	CTC GAC	GGT <i>I</i> CCAT	ATG: + – – – FACI	<mark>FGGT</mark>  ACC <i>P</i>	I <mark>GC</mark> ACGI	ACCO - + rggo	GCAP GTT	AGAA  FCTT	<mark>CAA</mark> -+- GTT	GCC  CGC	GCT CCGZ	<mark>FGC(</mark>  ACG(	CACC + GTGG	GGT GCCF	r <mark>gg(</mark>  ACC(	<mark>CGC</mark> - + - GCG	<mark>FGG(</mark> ACC(	CGT GCA	<mark>FCA2</mark> + - AGT2	AGCI FCG	AGTT  FCAA	<mark>FCCT</mark> + AGGA	1120
	Ν	W	Y	V	V	Η	R	K	Ν	K	R	L	Ρ	Ρ	V	A	L	A	F	K	Q	F	L	-
1121	GATO  CTAC	GAC	GGAI	AGG( + – – – FCC(	GCGC	GGGI CCCT	ACTO - + FGAO	SATC	<mark>CGAG</mark>  GCTC	CGG -+- GCC	ATT  TAA	TGC	CGGC	GTG  CCAC	GAI	AGG:	TTT( -+- AAA(	GAT CTA	CAG GTC	<mark>FCA(</mark> +- AGT(	GAA  CTT2	<mark>FGC</mark>  ACG1	A <b>TAA</b> + FATT	1190
	М	Е	Е	G	А	G	L	Ι	Е	R	Ι	Т	G	V	Е	G	L	Ι	S	Q	Ν	A	*	-
1191	ACAA  TGTI	ATT(  TAA(	GATT  CTAR	ГАТ( + – – - АТА(	GGTI  CCAP	TTCC AAGC	GCTA -+ CGA1	ATGA  TACI	AAAC  TTTG	TTT -+- AAA	AAT  TTA	TAT  ATA	rcg:  Agc <i>i</i>	TAAA  ATTT	TCA  AG1	ATCO FAGO	CGC( -+- GCG(	GGT( CCA	CCC GGG2	ΓΑΤ( + · ΑΤΑ(	GCT	IGTO ACAO	CTCA + GAGT	1260
1261	ACCC			CTA( +	CAGO		ATCI	GAG	GAG	ACG	AGC	CATC	GAA( 	CCAG	GTC		GCA	GGA	AAG(			GGCI		1330
1331	ATCA	ACGO	GCC GTCC	GGCI	4CC0	GATA	ACC		CCCA	TTC	CGC	CGCC	GAC		CAG	CTC	GCC	GCC	TAC	AAC(	GCC	GCGI	TTTA	1400
	TAGTGCCAGCCGTGGCTATTGGTTGGGTAAGGCGCGCTGTGGGTCGAGCGGCGGATGTTGCGGCGCAAAT																							

#### Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bowien danke ich für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit, die anregenden Diskussionen und die gewährten Freiheiten bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. Bernhard Kusian bin ich dafür dankbar, dass er mir stets mit Rat beiseite stand und mir vor allem geholfen hat, die diversen Computerprobleme zu lösen.

Frau Gertrud Stahlhut und Frau Silke Wahlburg möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre und die Hilfe danken, wenn die Zeit wieder knapp war und die Tage nie genug Stunden hatten.

Meinen Eltern danke ich für ihre Geduld und dafür, dass sie mich immer wieder aufgerichtet haben, wenn das entscheidende Experiment einmal mehr missglückte.

Den Mitarbeitern des "Göttingen Genomics Laboratory" und vor allem Herrn Dr. Oliver Valerius danke ich für die Bearbeitung meiner Proben.

Besonders danken möchte ich Tanja Mahlmann und Patrick Olbermann, mit denen ich viel Spaß im und außerhalb des Labors hatte. Mein besonderer Dank gilt auch Yvonne Scharge, die so manchen Tequila mit mir getrunken hat, wenn nichts gelingen wollte wie geplant, Jessica Schmitz, die für mich Korrektur gelesen hat, obwohl sie von der Schule sehr beansprucht war, und Andrea Jäkel, die nach meinem Pony geschaut hat, wenn ich überhaupt nicht mehr aus dem Labor gekommen bin.

Mein Dank gilt auch meinen Schwestern, vor allem Wiebke Höfle, die mich immer wieder zum Lachen gebracht hat.

Dem Werkstatt-Team, Gerd Birke, Olaf Waase und Patrick Regin, möchte ich dafür danken, dass sie alle technischen Probleme gelöst haben.

Schließlich gilt mein Dank auch allen Angehörigen des Instituts für ihre freundliche Hilfe.

# Lebenslauf

Name:	Caroline Höfle								
Geburtsdatum:	03. 03. 1975								
Geburtsort:	Winterthur, Schweiz								
Schulausbildung:									
1981 – 1985	Grundschule in Hannover und Bovenden								
1985 – 1987	Orientierungsstufe in Bovenden								
1987 – 1994	Otto-Hahn-Gymnasium, Göttingen mit Erreichen der Hochschulreife im Juni 1994								
September 1994 - September 1993	5 Freiwilliges Ökologisches Jahr des Nieder-sächsischen Landesamtes für Ökologie beim Naturschutzbund Deutschland – Bund für Vogelschutz, Gruppe Göttingen e.V.								
Wissenschaftlicher Werdegang:									
Oktober 1995 - November 2001	Studium der Biologie (Diplom) an der Georg-August- Universität Göttingen Schwerpunkt: Mikrobiologie								
Oktober 1997	Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Botanik, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie								
November 2000	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Organische Chemie und Naturschutz								
Dezember 2000 - November 2001	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Bowien, Abteilung Molekularphysiologie, zum Thema: Klonierung und Charakterisierung eines potentiellen Regulatorgens der CO <sub>2</sub> -Assimilation in <i>Ralstonia eutropha</i>								
Dezember 2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bowien: Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation								