

**Die regulatorischen Funktionen des paralogen
Phosphotransferase Systems (PTS^{Ntr}) in
Escherichia coli.**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen**

**vorgelegt von:
Denise Lüttmann
aus Neu Kalib**

Göttingen, Dezember 2011

1. Betreuer: PD Dr. Boris Görke

2. Betreuer Prof. Dr. Jörg Stülke

Tag der Abgabe der Doktorarbeit: 16.12.2011

Tag der Disputation: 25.01.2012

Danksagung

Während meiner Doktorarbeit konnte ich Dank Dr. Boris Görke an diesem interessanten Thema, welches er mir zur Verfügung gestellt hat, arbeiten. Er gab mir die Möglichkeit, die Forschungen aus meiner Diplomarbeit fortzuführen. Er war immer für fachliche Diskussionen und die Entwicklung von neuen Ideen bereit. Er hatte großes Interesse am Fortschreiten der experimentellen Arbeiten und an der Übermittlung von praktischen Erfahrungen.

Bei Prof. Dr. Jörg Stülke möchte ich für die Unterstützung während und besonders zum Ende meiner Doktorarbeit danken. Des Weiteren möchte ich mich bei ihm für die Übernahme des Korreferats herzlich bedanken.

Prof. Dr. Botho Bowien danke ich für das Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die fachlichen und persönlichen Gespräche im und außerhalb des Labors. Besonders bei Jens, Ivy und Chris möchte ich mich für die Unterstützung während der Zeit der Doktorarbeit bedanken. Auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Stülke und Hoppert danke ich für eine nette Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit in der Abteilung.

Meinen Diplomanten, Master- und Bachelorstudenten und meinen Praktikanten Kerstin Voigt, Katja Karstens, Sabrina Galinski, Frank Drechsler, Karin Thole, sowie Andrea Karaman und Julia Newie möchte ich für die fantastische und engagierte Mitarbeit an meinem Projekt danken.

Mein besonderer Dank gilt Sabine Lentes, die mich durch ihren Einsatz und durch ihre Laborerfahrung sehr unterstützen konnte. Bei Bärbel möchte ich mich für ihre engagierte Arbeit in der Spülküche und die Erfüllung diverser Sonderwünsche bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, die mich in meinem Vorhaben fortlaufend begleitet haben. Sie hatten immer Vertrauen in mich und haben mich in jeder Hinsicht unterstützt.

Veröffentlichungen

Lüttmann, D., Heermann, R., Zimmer, B., Hillmann, A., Rampp, I.S., Jung, K., and Görke, B. (2009)

Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA^{Ntr} in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **72**: 978-994.

Bahr, T., Lüttmann, D., März, W., Rak, B., and Görke, B. (2011)

Insight into bacterial phosphotransferase system-mediated signaling by interspecies transplantation of a transcriptional regulator. *J Bacteriol* **193**: 2013-2026.

Göpel, Y., Lüttmann, D., Heroven, A.K., Reichenbach, B., Dersch, P., and Görke, B. (2011) Common and divergent features in transcriptional control of the homologous small RNAs GlnY and GlnZ in *Enterobacteriaceae*. *Nucleic Acids Res* **39**: 1294-1309.

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung.....	1
2.	Einleitung.....	2
2.1.	Posttranskriptionelle Regulation.....	4
2.2.	Posttranslationale Regulation.....	5
2.2.1.	Phosphorylierung von Proteinen an Serin, Threonin und Tyrosin Resten.....	5
2.2.2.	Signaltransduktion durch Zwei-Komponenten Systeme	6
2.2.2.1.	Das KdpD/KdpE Zwei-Komponenten System	8
2.2.2.2.	Das PhoR/PhoB Zwei-Komponenten System	11
2.2.2.3.	Modulatoren von Zwei-Komponenten Systemen.....	12
2.2.3.	Phosphotransferasesysteme.....	15
2.2.3.1.	Paraloge Phosphotransferasesysteme	18
2.2.3.2.	Das Stickstoff-PTS (PTS ^{Ntr}).....	19
2.2.3.3.	Regulation des Phosphorylierungsstatus der Proteinen des PTS ^{Ntr}	19
2.2.3.4.	Regulationsmechanismen des PTS ^{Ntr}	20
2.4.	Zielsetzung der Arbeit.....	22
3.	Material und Methoden.....	23
3.1.	Material	23
3.1.1.	Bakterienmedien und Nähragarplatten.....	23
3.2.	Methoden	27
3.2.1.	Anzucht von Escherichia coli-Kulturen.....	27
3.2.2.	Messung der optischen Dichte	27
3.2.3.	Konservierung von Stämmen.....	27
3.2.4.	Arbeiten mit DNA.....	27
3.2.4.1.	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	27
3.2.4.2.	Dephosphorylierung von 5'-Enden.....	28
3.2.4.3.	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	28
3.2.4.4.	Isolation von DNA aus Agarosegelen und Reinigung aus Lösungen...29	
3.2.4.5.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	29
3.2.4.6.	Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden	29
3.2.4.7.	Polymerase Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki et al., 1989)	29

3.2.4.8.	PCR-vermittelte ortsspezifische Mutagenese (CCR) und Multiple Mutation Reaktion (Bi and Stambrook, 1998; Hames <i>et al.</i> , 2005)	32
3.2.4.9.	Plasmidisolierung	34
3.2.4.10.	DNA-Sequenzanalyse	34
3.2.4.11.	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen (Lederberg and Cohen, 1974)	34
3.2.4.12.	Stammkonstruktion	35
3.2.4.12.1.	Generelle Transduktion mit dem Phagen T4-GT7	35
3.2.4.12.2.	Integration von DNA in die λ - <i>attB</i> -Stelle des <i>E. coli</i> -Chromosoms (Diederich <i>et al.</i> , 1992)	36
3.2.4.12.3.	Deletion chromosomaler Gene über homologe Rekombination (Datsenko and Wanner, 2000)	38
3.2.4.12.4.	Epitop tagging chromosomaler Gene über homologe Rekombination (Uzzau <i>et al.</i> , 2001)	41
3.2.5.	Arbeiten mit RNA	43
3.2.5.1.	RNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	43
3.2.5.2.	Agarosegelelektrophorese von RNA	44
3.2.5.3.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von RNA	44
3.2.5.4.	Northern-Blot von Agarosegelen (modifiziert nach (Engler-Blum <i>et al.</i> , 1993)	45
3.2.5.5.	Northern Blot von Polyacrylamidgelen	45
3.2.5.6.	Hybridisierung membrangebundener RNA mit DIG-markierten RNA Sonden	46
3.2.5.7.	Detektion von RNA-RNA-Hybriden	46
3.2.6.	Arbeiten mit Proteinen	48
3.2.6.1.	Proteinaufreinigung	48
3.2.6.1.1.	Überproduktion von Proteinen	48
3.2.6.1.2.	Quervernetzung von Proteinen: SPINE	49
3.2.6.1.3.	Zellaufschluss	49
3.2.6.1.4.	Aufreinigung von Proteinen über Ni ²⁺ -NTA Säulen	49
3.2.6.1.5.	Aufreinigung von Proteinen über Streptaktin Säulen	50
3.2.6.1.6.	Aufreinigung von Proteinen im BATCH Verfahren	50
3.2.6.1.7.	Dialyse	50
3.2.6.2.	Proteinmengenbestimmung (Bradford, 1976)	51

Gleichung 1: Berechnung der Proteinkonzentration nach Bradford	51
3.2.6.3. Gelelektrophoretische Untersuchungen.....	51
3.2.6.3.1. Herstellung von <i>E. coli</i> -Gesamtzellextrakten für die gelelektrophoretischen Untersuchungen	51
3.2.6.3.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE)	52
3.2.6.3.3. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)	53
3.2.6.3.4. Anfärben der Gele mit Coomassie R.....	54
3.2.6.3.5. Anfärben der Gele mit Silbernitrat	54
3.2.6.4. Das Bakterielle Two-Hybrid System (Karimova <i>et al.</i> , 1998)	57
3.2.6.5. Messungen der Alkalischen Phosphatase Aktivität	58
3.2.6.6. Enzymaktivitätsbestimmungen: β -Galaktosidase-Aktivitätstests	59
3.2.6.6.1. Phänotypischer β -Galaktosidase-Aktivitätstest.....	60
3.2.6.6.2. Quantitativer β -Galaktosidase-Aktivitätstest nach (Miller, 1972), leicht modifiziert).....	60
3.2.6.7. Immunodetektion von Proteinen: Western Blot	61
3.2.6.8. Far Western.....	63
3.2.6.8.1. Protein-Protein Interaktionen	63
3.2.6.8.2. Metaboliten-Protein Interaktion	64
3.2.6.9. <i>In vitro</i> Phosphorylierung von Proteinen mit [32 P]-ATP	65
3.2.6.9.1. Auswertung radioaktiver Gele mit dem Bio Imaging Analyzer ...	66
4. Ergebnisse	67
4.1. Regulation des Kaliumtransportsystems KdpFABC durch das PTS ^{Ntr} 67	
4.1.1. Das PTS ^{Ntr} moduliert die Mengen der Proteine KdpB und KdpC, Untereinheiten des Kaliumtransporters KdpFABC	67
4.1.2. Die Transkription des <i>kdpFABC</i> -Operons wird durch das PTS ^{Ntr} reguliert	68
4.1.3. Der Phosphorylierungszustand von EIIA ^{Ntr} ist entscheidend für die Regulation der Expression des <i>kdp</i> -Operons	71
4.1.3. Das kanonische PTS hat keinen Einfluss auf die Expression des <i>kdp</i> - Operons	75
4.1.4. EIIA ^{Ntr} interagiert mit der Sensorkinase KdpD des KdpD/KdpE Zwei- Komponenten Systems.....	77

4.1.5.	Die Bedeutung der Phosphorylierungsstelle Histidin73 in EIIA ^{Ntr} für die Interaktion mit KdpD	79
4.1.5.1.	Die Interaktion von EIIA ^{Ntr} und KdpD wird durch die Kaliumkonzentration beeinflusst	79
4.1.5.2.	Kalium hat keinen Einfluss auf die zelluläre Menge und den Phosphorylierungszustand von EIIA ^{Ntr}	83
4.1.5.3.	Beeinflussung der Interaktion zwischen EIIA ^{Ntr} und KdpD durch Kalium <i>in vitro</i>	85
4.1.6.	Interaktion von EIIA ^{Ntr} und EIIA ^{Ntr} H73A mit mutanten KdpD Proteinen und Auswirkungen auf die Expression des <i>kdp</i> -Operons	87
4.1.7.	EIIA ^{Ntr} interagiert mit der C-terminalen Domäne von KdpD.....	90
4.1.8.	Untersuchung der Interaktion von EIIA ^{Ntr} mit chimären KdpD Proteinen zur Eingrenzung der Interaktionsfläche	93
4.1.9.	Auswirkungen der Interaktion von KdpD mit EIIA ^{Ntr} und EIIA ^{Ntr} H73A auf die Aktivität der Sensorkinase	99
4.1.9.1.	Rekonstitution der KdpD/KdpE Phosphorylierungskaskade <i>in vitro</i> ...	99
4.1.9.2.	EIIA ^{Ntr} stimuliert die Kinase Aktivität von KdpD	101
4.1.9.3.	EIIA ^{Ntr} hat keinen Einfluss auf die Phosphatase Aktivität von KdpD	102
4.1.10.	Untersuchung zur Physiologischen Bedeutung der Steuerung der Aktivität der Sensorkinase KdpD durch EIIA ^{Ntr}	104
4.1.10.1.	Einfluss einer $\Delta ptsN$ Mutation auf die Expression des <i>kdp</i> -Operons bei einem Kalium-Downshift.....	104
4.1.10.2.	Einfluss einer $\Delta ptsN$ Mutation auf die Expression des <i>kdp</i> -Operons bei einer Veränderung der Osmolarität.....	106
4.2.	Regulation des Pho-Regulons durch das PTSNtr	108
4.2.1.	Die zellulären Mengen von Proteinen des Pho-Regulons werden von EIIANtr moduliert.....	108
4.2.2.	EIIANtr reguliert die Expression von Genen des Pho-Regulons.....	109
4.2.3.	Untersuchung des Einflusses des PTS ^{Ntr} auf das Pho-Regulon in einem geeignetem Stammhintergrund	115
4.2.3.1.	EIIA ^{Ntr} moduliert die Mengen der Proteine PhoB und PhoR	115
4.2.3.2.	EIIA ^{Ntr} wirkt sich auf weitere Komponenten des Pho-Regulons aus .	117

4.2.3.3.	EI ^{Ntr} und NPr reprimieren die Expression der Gene des Pho-Regulons	120
4.2.3.4.	Die Phosphatversorgung der Zelle hat keine Auswirkung auf die Stabilität oder Phosphorylierung von EIIA ^{Ntr}	122
4.2.3.5.	EIIA ^{Ntr} -vermittelte Regulation des PhoR/PhoB Zwei-Komponenten Systems	125
4.2.3.5.1.	Der Einfluss des PTS ^{Ntr} auf das Pho-Regulon ist unabhängig vom PhoQ/PhoP Zwei-Komponenten System und teilweise abhängig von RpoS	127
4.2.4.	Interaktionsanalysen von EIIA ^{Ntr} mit Regulatoren des Pho-Regulons	130
4.2.4.1.	Analyse der Interaktion von EIIA ^{Ntr} mit Regulatoren des Pho-Regulons durch Koaufräinigungen	130
4.2.4.2.1.	Funktionsüberprüfung von Strep-Fusionsproteinen	131
4.2.4.2.2.	Koaufräinigungen von Strep-EIIA ^{Ntr} mit PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG	132
4.2.4.2.3.	Reverse Ligand-fishing Experimente mit Strep-PhoR und Strep-PhoB als Köderproteine	140
4.2.4.3.	Analyse der Interaktion von EIIA ^{Ntr} mit PhoR und PhoB <i>in vitro</i>	143
4.2.4.4.	Einfluss von EIIA ^{Ntr} und EIIA ^{Ntr} H73A auf die PhoR-PhoB Phosphorylierungskaskade <i>in vitro</i>	145
4.2.5.	Auswirkungen einer <i>ptsN</i> Deletion auf die Anpassung an Phosphatmangel	148
4.3.	Identifikation weiterer Interaktionspartner von EIIA ^{Ntr}	149
4.3.1.	Ligand-fishing Experimente mit EIIA ^{Ntr} als Köderprotein zur Identifizierung unbekannter Interaktionspartner	149
4.3.2.	EIIA ^{Ntr} interagiert mit weiteren Sensorkinasen in <i>E. coli</i>	150
4.3.2.1.	EIIA ^{Ntr} interagiert mit der Sensorkinase NtrB und reguliert die Expression von Genen des Ntr-Regulons	150
4.3.2.2.	EIIA ^{Ntr} interagiert mit der Sensorkinase PhoQ und reguliert die Expression eines PhoQ/P-abhängigen Gens	157
4.3.2.3.	EIIA ^{Ntr} interagiert mit der Sensorkinase CpxA und reguliert die Expression von <i>cpxP</i>	162
4.3.2.4.	EIIA ^{Ntr} interagiert mit der Sensorkinase BaeS	168
4.3.2.5.	EIIA ^{Ntr} interagiert nicht mit der Sensorkinase AtoS	171

4.4.	Regulation des Phosphorylierungsstatus von EIIA ^{Ntr} in <i>E. coli</i>	173
4.4.1.	Untersuchungen zur Wechselwirkung des PTS ^{Ntr} mit dem Transport-PTS 174	
4.4.2.	Der Phosphorylierungszustand von EIIA ^{Ntr} wird durch die Wachstumsphase bestimmt	182
4.4.3.	Regulation des Phosphorylierungsstatus des PTS ^{Ntr} durch die N-terminale GAF Domäne von EI ^{Ntr}	185
4.4.3.1.	Die GAF Domäne von EI ^{Ntr} beeinflusst die Expression des <i>kdpFABC</i> - Operons	185
4.4.3.2.	Die GAF Domäne von EI ^{Ntr} ist für die KdpD-EIIA ^{Ntr} Interaktion essentiell.....	189
4.4.3.3.1.	Die GAF Domäne von EI ^{Ntr} hat einen positiven Einfluss auf die Regulation des Pho-Regulons	194
4.4.3.4.	Die Rolle der GAF Domäne in EI ^{Ntr} für die Phosphorylierung von EIIA ^{Ntr}	196
4.4.4.	Identifikation von Interaktionspartner und Liganden der GAF Domäne von EI ^{Ntr} 199	
4.4.4.1.	Konstruktion von Strep-EI ^{Ntr} -Varianten für Ligand-fishing Experimente	199
4.4.4.2.	Es gibt vermutlich keinen PTS ^{Ntr} Komplex in <i>E. coli</i>	202
4.4.4.3.	Identifikation niedermolekularer Liganden, die möglicherweise an die GAF Domäne von EI ^{Ntr} binden.....	203
4.4.4.3.1.	Bindung von EI ^{Ntr} an verschiedene Lipide.....	206
4.4.5.	Regulation der Phosphorylierung von EIIA ^{Ntr} durch Modulatoren des PTS ^{Ntr} 207	
5.	Diskussion.....	214
5.1.	Das PTS ^{Ntr} reguliert Kaliumtransporter in <i>E. coli</i>	214
5.2.	Regulation des Pho-Regulons durch das PTS ^{Ntr} in <i>E. coli</i>	217
5.3.	Regulation weiterer ZKS durch das PTS ^{Ntr} in <i>E. coli</i>	220
5.4.	Regulation des Phosphorylierungszustandes von EIIA ^{Ntr} in <i>E. coli</i> ..	222
5.5.	Ausblick	228
6.	Anhang	230
6.1.	Bakterienstämme.....	230
6.2.	Plasmide	247

6.3.	Oligonukleotide.....	271
6.4.	Weitere Experimente.....	281
6.4.1.	Massenspektrometrische Untersuchung von Liganden der Strep-EI ^{Ntr} und Strep-EI ^{Ntr} ΔGAF Proteine.....	281
6.4.1.1.	Untersuchung der ploaren Phase	281
6.4.1.2.	Untersuchung der unploaren Phase	281
6.4.2.	Identifikation von Interaktionspartner von YhbJ.....	285
6.4.2.1.	YhbJ interagiert scheinbar mit der Glukosamin-6-Phosphat Synthase (GlmS).....	288
6.4.3.	EIIA ^{Ntr} reguliert die Expression der kleinen RNA GlmY	290
6.4.3.1.	GlmY und GlmZ wirken sich nicht auf die Proteinmenge an EIIA ^{Ntr} aus	295
6.4.4.	Proteinaufreinigungen.....	296
6.4.5.	Ligand-fishing Experimente mit EIIA ^{Ntr} als Köderprotein zur Identifizierung unbekannter Interaktionspartner.....	300
6.5.	Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis	304
6.6.	Verwendete Internetangebote und Computerprogramme	306
6.7.	Materialien	308
6.7.1.	Häufig verwendete Chemikalien.....	308
6.7.2.	Im Labor verwendete Hilfsmittel.....	309
7.	Literaturverzeichnis	311
8.	Lebenslauf.....	331

1. Zusammenfassung

Das Phosphoenolpyruvat:Kohlenhydrat Phosphotransferase System (Transport-PTS) ist das bedeutendste System in Bakterien um organische Kohlenstoffverbindungen in die Zelle aufzunehmen. Ebenso koordiniert es die Aufnahme und Verwertung von Kohlenhydraten mit anderen physiologischen Prozessen. Das sogenannte Stickstoff-PTS (PTS^{Ntr}) ist homolog zum Transport-PTS und hochkonserviert in Proteobakterien. Es besteht wie das Transport-PTS aus zwei zytoplasmatischen Phosphotransferasen und einem Enzym IIA-Protein (EIIA^{Ntr}), die eine Phosphorylierungskaskade bilden. Ausgehend von dem metabolischen Intermediat Phosphoenolpyruvat autophosphoryliert sich EI^{Ntr} und die Phosphorylgruppe wird über NPr auf EIIA^{Ntr} übertragen. Die Proteine des PTS^{Ntr} haben strukturelle Besonderheiten, die die Proteine des Transport-PTS nicht besitzen. Das EI^{Ntr} besitzt zusätzlich zu der konservierten EI Domäne eine N-terminale GAF Domäne. Diese Domänen sind Signalwahrnehmungs-domänen, die eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden binden können. Im Gegensatz zu anderen Enzym IIA Domänen ist das EIIA^{Ntr} aufgrund seiner Struktur nicht fähig am Transport von Kohlenhydraten mitzuwirken, sondern übernimmt ausschließlich regulatorische Funktionen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das PTS^{Ntr} die Aktivitäten von Zwei-Komponenten Systemen (ZKS) moduliert. EIIA^{Ntr} interagiert spezifisch mit den Sensorkinasen KdpD und PhoR. Das KdpD/KdpE ZKS wird durch Kaliummangel und bei Salzstress induziert und aktiviert die Expression der Gene des Kaliumtransporters KdpFABC. Das PhoR/PhoB ZKS reguliert hauptsächlich die Expression von Genen, die bei Phosphatmangel benötigt werden. Die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit den Sensorkinasen stimuliert die Phosphorylierung der Response Regulatoren KdpE und PhoB durch ihre Kinasen und führt so zur verstärkten Expression der Gene, die unter Kontrolle des jeweiligen ZKS stehen. Es konnten vier weitere Sensorkinasen identifiziert werden, die spezifisch mit EIIA^{Ntr} interagieren. In drei Fällen moduliert EIIA^{Ntr} offensichtlich die Expression der, von diesen Kinasen, regulierten Gene. Soweit untersucht ist für die Regulation der ZKS die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} verantwortlich. In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} wird von dem Stringent Starvation Protein A (SspA) reguliert. Weiterhin konnte *in vivo* eine Kreuzphosphorylierung des PTS^{Ntr} mit dem Transport-PTS nachgewiesen werden. Dies wirkt sich auf EIIA^{Ntr}-regulierte Gene aus und koordiniert wahrscheinlich die Expression EIIA^{Ntr}-regulierter Gene mit dem metabolischen Status der Zelle. Außerdem moduliert die GAF Domäne von EI^{Ntr} den Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} und verändert so die Expression EIIA^{Ntr}-abhängiger Gene.

2. Einleitung

Ständiger Konkurrenzdruck mit anderen Lebewesen in der Umgebung fordert die schnelle Anpassung von Organismen an die bestehenden und die sich verändernden Bedingungen. Dies beinhaltet die Wahrnehmung von vielen verschiedenen Reizen, wie zum Beispiel eine Veränderung der Temperatur, der osmotischen Umgebung, der Zusammensetzung der Biosphäre in der Umgebung, aber auch die Verfügbarkeit von Nährstoffquellen. Die gezielte und spezifische Anpassung an die sich verbessernden oder verschlechternden Lebensbedingungen bedeutet für die Lebewesen einen ständigen Überlebenskampf. Ein wichtiger Punkt hierfür ist, dass die verschiedenen Signale aus der Umwelt sich in klaren, distinkten Antworten der Zelle auf diesen spezifischen Reiz widerspiegeln müssen. Dies bedeutet eine effektive Regulation von einem enormen Repertoire an zellulären Funktionen.

Die Reaktion von Zellen umfasst eine so hohe Variabilität an regulatorischen Mechanismen, die eines koordinierten Zusammenspiels bedürfen. Diese Komplexität der verschiedenen, molekularen Kontrollmechanismen erlaubt die Regulation auf verschiedenen Ebenen der Genexpression als auch die Anpassung von Proteinaktivitäten.

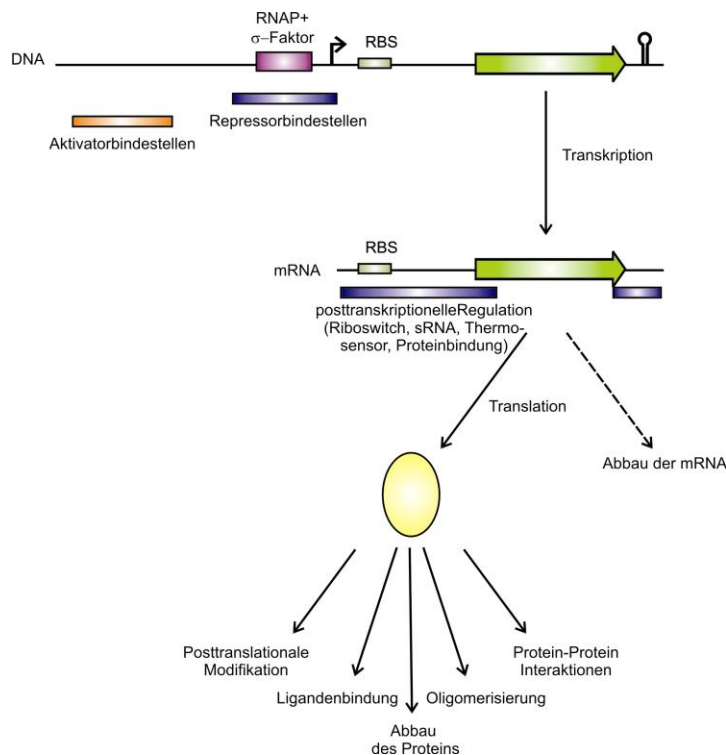


Abbildung 2.1: Übersicht über wichtige Regulationsmechanismen in Bakterien.
Nähere Beschreibungen im Text

2.1. Regulation der Transkription

Die Kontrolle der Genexpression auf der Ebene der Transkription ist schon seit langem untersucht und beinhaltet vor allem die Interaktion von verschiedenen Proteinen mit der DNA. Ein wichtiger Mechanismus dabei ist die Steuerung der Expression durch σ -Faktoren. σ -Faktoren sind die assessorischen und variablen Untereinheiten der RNA-Polymerase, welche Promotorsequenzen erkennen und zur Initiation der Transkription führen. Die Anzahl der σ -Faktoren ist dabei von Organismus zu Organismus verschieden (Gruber and Gross, 2003). In *E. coli* sind sieben verschiedene bekannt, die unterschiedliche Regulons von Genen mit spezifischen Funktionen besitzen (Ishihama, 2000). Der primäre σ -Faktor (RpoD) ist für die Expression von essentiellen Genen und die Transkription von vielen Genen notwendig die während des vegetativen Wachstums benötigt werden (Burgess and Anthony, 2001; Paget and Helmann, 2003). Dabei dirigiert der σ -Faktor die RNA Polymerase zur spezifischen Promotorerkennungssequenzen (Abbildung 1). RpoS ist der entscheidende Faktor in der stationären Phase aber auch bei Stressantworten (Dong and Schellhorn, 2009; Hengge, 2009). Die vier weiteren alternativen σ -Faktoren RpoH, RpoE, FecI und FliA sind verantwortlich für die Expression von Genen der Hitzeschockantwort, die Reaktion auf extrazytoplasmatischen Stress, Eisentransport und die Expression von Flagellengen (Ishihama, 2000). Eine Sonderstellung bei den alternativen Sigmafaktoren nimmt RpoN ein. Dieser kontrolliert hauptsächlich die Expression von Genen für die Stickstoffverwertung und unterscheidet sich sowohl in Sequenz als auch in seiner Struktur von den anderen σ -Faktoren. Für die Transkription wird zusätzlich zum σ -Faktor und dem RNAP Core Enzym ein Aktivatorprotein benötigt (Buck *et al.*, 2000; Doucleff *et al.*, 2007). Zusätzlich zu den unterschiedlichen Spezifitäten der σ -Faktoren unterliegen sie selbst auch einer Regulation. Diese besteht zuerst einmal aus der unterschiedlichen Affinität der RNA Polymerase zu den σ -Faktoren aber auch multipler Regulationsmechanismen durch das Alamon ppGpp, Antisigma Faktoren, den RNAP Regulator DksA, sowie die Modulation der Proteinmengen (posttranskriptionelle Regulation der Translation und Proteolyse) (Silva-Rocha and de Lorenzo, 2010). Eine weitere Möglichkeit auf innere oder äußere Reize zu reagieren ist die Expressionskontrolle durch verschiedene Arten von Transkriptionsfaktoren. Durch die Bindung der DNA an verschiedenen Stellen in der Promotorregion kann die

Transkription stimuliert oder reprimiert werden (Abbildung 1). Diese Regulatoren besitzen Domänen, die durch Metabolitenbindung, kovalente Modifikationen oder Interaktion mit anderen Proteinen ihre regulatorische Aktivität verändern. So kann die DNA-Bindfähigkeit der Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden (Seshasayee *et al.*, 2006). Ein sehr typischer Mechanismus ist die Regulation der Genexpression über Zwei-Komponenten-Systeme. Hier kann durch die Verwendung von 2 Proteinkomponenten ein externer Stimulus wahrgenommen werden und die spezifische Information über die Zytoplasmamembran auf einen zytoplasmatischen Transkriptionsregulator übertragen werden. Dieser kann das Verhalten oder die Genexpression als das externe Signal anpassen (Parkinson, 2010).

2.1. Posttranskriptionelle Regulation

Auch auf der Ebene der mRNA können viele Regulationsmechanismen involviert sein (siehe Abbildung 1). Hier kann die Stabilität der mRNA, die Translationseffizienz oder die Transkriptionsattenuation beeinflusst werden. Oft ist die Struktur der mRNA selbst für ihre Stabilität signifikant und variiert z.B. durch die Phosphorylierung am 5'-Ende der mRNA und die Polyadenylierung am 3' Bereich. Stamm-Schleifenstrukturen und transkriptionelle Terminatoren im Transkript sind ebenfalls wichtig für die mRNA-Stabilität (Joanny *et al.*, 2007; Sharp and Bechhofer, 2005). Ebenso kann durch die regulatorischen Bereiche in der mRNA die Translation durch Proteine und nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) beeinflusst werden. Hier unterscheidet man zwischen *cis*-regulatorischen Elementen wie RNA-Schalter und RNA-Thermometer. RNA-Schalter ändern durch Metabolitenbindung die Sekundärstruktur der mRNA und regulieren so die Transkriptionstermination oder die Translationsinitiation. So wird vorrangig die Expression von metabolischen Enzymen als Antwort auf die Endproduktkonzentration reguliert (Barrick and Breaker, 2007). RNA-Thermometer sind temperaturabhängig und durch Ausbildung alternativer Sekundärstrukturen wird die Genexpression beeinflusst. Auf der anderen Seite können *trans*-regulatorische Elemente (sowohl Proteine als auch kleine RNAs) regulatorisch einwirken. RNA-bindende Proteine können entweder die Initiation der Translation blockieren oder die Struktur der mRNA so beeinflussen, dass die Translation unterdrückt oder gefördert wird (Geissmann *et al.*, 2009). Des Weiteren kann durch effiziente Translation und ständige Bindung von Ribosomen an die mRNA,

diese vor Degradation durch RNasen geschützt werden (Deana and Belasco, 2005). Kleine RNAs (sRNAs) wirken über Basenpaarung mit der spezifischen mRNA. Sie interagieren nur partiell und über einen kurzen Sequenzbereich mit ihren Targets. Ihre Spezifität ergibt sich durch ihre Sequenz und durch ihre Struktur (Gottesman, 2004). Die Regulation vieler Targets wird durch eine imperfekte Basenpaarung erreicht (Geissmann *et al.*, 2009).

2.2. Posttranslationale Regulation

Die Anpassung von Proteinstabilität und –aktivität sind entscheidende Mechanismen sowohl in der Genregulation als auch im Metabolismus. Dabei kann durch eine signalinduzierte Proteolyse die Menge an aktivem Enzym reduziert werden und so die Aktivität angepasst werden. Des Weiteren können Enzymaktivitäten durch die Bindung von kleinen Molekülen oder anderen Proteinen verändert werden. Ein ebenso wichtiger Mechanismus ist die posttranslationale Modifikation von Proteinen. Die bekanntesten sind die Adenylierung, Glycosylierung, Acetylierung, Methylierung und die Phosphorylierung von verschiedenen Aminosäureresten in Proteinen (Abu-Qarn *et al.*, 2008; Amaro and Jerez, 1984; Cozzone, 1998b; Merrick and Edwards, 1995). Bei der Phosphorylierung von Proteinen kann in drei Gruppen unterschieden werden.

2.2.1. Phosphorylierung von Proteinen an Serin, Threonin und Tyrosin Resten

Die reversible Phosphorylierung durch Kinasen und eine Dephosphorylierung durch Phosphatasen kann die Aktivität und die Funktion von Proteinen modulieren. Die Phosphorylierungsereignisse haben Auswirkungen auf die DNA-Bindeaffinitäten von Transkriptionsregulatoren, auf Enzymaktivitäten und auch auf Protein-Protein Interaktionen. Die Phosphorylierung von Serinen, Threoninen und Tyrosinen wurde zuerst in Eukaryonten entdeckt und es wurde lange Zeit angenommen, dass diese Mechanismen auf Eukaryonten beschränkt sind (Pereira *et al.*, 2011). Durch die Methode der Phospho-Proteomanalyse und durch Genomanalysen konnten in vielen Bakterien derartige Phosphorylierungen nachgewiesen und Kinasen identifiziert werden. Wichtige Beispiele wären die Serin-Phosphorylierung der Isozitat-

Dehydrogenase, einem Enzym des Zitratzyklus, durch eine bifunktionelle Kinase/Phosphatase. Die Phosphorylierung ist dabei entscheidend für eine Balance zwischen dem Zitratzyklus und dem Glyoxalatzyklus (Cozzone, 1998a; LaPorte and Chung, 1985). Ebenso die HPr Kinase/Phosphatase, welche die Proteine HPr und Crh an Serinen phosphoryliert. Die Serinphosphorylierung in HPr ist essentiell für die Kohlenstoff Kataboliten Repression in vielen Gram Positiven Bakterien (Görke and Stülke, 2008).

2.2.2. Signaltransduktion durch Zwei-Komponenten Systeme

Zwei-Komponenten Systeme (ZKS) sind die häufigsten Signalwahrnehmungs- und Signaltransduktionskaskaden in Bakterien (Heermann and Jung, 2010). Sie detektieren einen oft externen Stimulus, der über die Zytoplasmamembran transportiert und in ein spezifisches Signal umgewandelt wird. Dadurch wird die Genexpression oder das Verhalten der Zelle so geändert, dass der entstandene Stress kompensiert wird. Im Generellen bestehen sie aus zwei Proteinkomponenten. Einer membran-gebundenen Sensorkinase und einem dazugehörigen zytoplasmatischen Response Regulator. Dabei bilden die beiden Proteine einen Histidin-Aspartat Phosphorylay und interagieren über konservierte Interaktionsflächen miteinander (Hoch and Varughese, 2001).

In den meisten Fällen sind Sensorkinase und Response Regulator in einem Operon kodiert, dieses impliziert Koexpression und ein funktionelles Zusammenspiel. Des Weiteren sind diese Systeme oft autoreguliert, d.h. die Expression dieser Proteine ist direkt von ihrem spezifischen Stimulus abhängig (Yamamoto *et al.*, 2005). In *E. coli* sind etwa 30 ZKS bekannt und viele dieser Systeme schon gut erforscht. Sie sind für verschiedenste Signale und Stimuli wie z. B. Osmolarität, Motilität, Virulenz, genetische Kompetenz, Quorum sensing oder den Redoxstatus der Zelle spezifisch (Laub and Goulian, 2007). Meistens ist die N-terminale Domäne der Sensorkinase für die Wahrnehmung eines oder mehrerer Signale zuständig. Diese Bereiche der Proteine sind wenig konserviert, da sie durch die Signalspezifität zu verschiedenen Domänengruppen gehören. Oft sind diese N-terminalen Bereiche aber PAS-ähnlichen Domänen zugeordnet (PER, ARNT und SIM Domänen) (Taylor and Zhulin, 1999). Diese Domänen sind mit einem oder mehreren Segmenten in der Zytoplasmamembran verankert. In Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit des Signals, oder auch durch

die Signalmenge, wird die sensorische Domäne in ihrer Struktur verändert. In vielen Fällen ist dieser Stimulus ein kleines Molekül z. B. Azetoazetat, ein Ion wie Kupfer oder Kalium oder aber die Bindung eines anderen Proteins (Salis *et al.*, 2009). Die Transmission von der Sensordomäne zur Kinasedomäne wird häufig über konservierte HAMP Domänen erreicht. Durch die signalinduzierte Veränderung der Sensordomäne werden die helikalen Elemente der Transmembrandomäne wahrscheinlich in eine Drehbewegung versetzt. Dadurch wird die Konformation der vier Helices der HAMP Domäne, welche direkt auf der zytoplasmatischen Seite der Transmembrandomäne liegen, verändert (Parkinson, 2010). Diese Strukturänderung wird an die Output Domäne übertragen. Dieser C-terminale Teil der Sensorkinase besteht meistens aus einer Dimerisierungs Domäne, der Histidinkinase Domäne und der ATPase Domäne. Die Phosphorylierung des konservierten Histidinrestes in der Kinasedomäne wird durch die Hydrolyse von ATP unterstützt (Salis *et al.*, 2009). Des Weiteren ist die Kinase Domäne wichtig für die Interaktion mit dem Response Regulator. Dabei wird die Phosphatgruppe vom Histidinrest der Sensorkinase auf ein konserviertes Aspartat in der Receiver Domäne des Response Regulators übertragen. Einige Sensorkinasen wirken als bifunktionelle Enzyme und sind auch in der Lage den Response Regulator wieder zu dephosphorylieren. Diese Phosphataseaktivität entzieht der Receiver Domäne das Phosphat und es wird auf das Histidin der Sensorkinase rückübertragen (Salis *et al.*, 2009). Doch nicht nur die spezifischen Sensorkinasen sind von Wichtigkeit für die Phosphorylierung der Response Regulatoren, sondern auch die Kreuzphosphorylierungen zwischen verschiedenen Zwei-Komponenten Systemen konnten schon *in vivo* nachgewiesen werden (Laub and Goulian, 2007).

Für einige Systeme wurden auch spezifische Proteine gefunden welche die Dephosphorylierung des Response Regulators anstelle der Histidinkinase übernehmen können (Stock *et al.*, 2000). In immer mehr Fällen scheint es auch eine Autophosphorylierung und Autodephosphorylierung von Response Regulatoren zu geben. Hierzu sind vor Allem die Bindung von divalenten Kationen und niedermolekulare Phosphatdonoren nötig. Durch die Nutzung von Phosphoramidaten oder Acylphosphaten, wie Acetylphosphat und Carbamoylphosphat als Donoren, wären Receiver Domänen nicht nur Substrate für Phosphorylierung, sondern aktive Domänen in der Signaltransduktion (Bourret, 2010). Einige Response Regulatoren besitzen aber auch sogenannte atypische oder Pseudo-Receiver Domänen. Diese werden nicht

phosphoryliert, enthalten aber trotzdem manchmal den konservierten Aspartat Rest. Allerdings sind diese Sonderformen der Response Regulatoren nur wenig untersucht und man vermutet, dass ihre Aktivität über die Bindung anderer Liganden reguliert wird (Bourret, 2010). Die zweite, wichtige Domäne der Response Regulatoren ist die Output Domäne. Hier gibt es mehr als 60 verschiedene. Die Meisten sind für die Regulation der Transkription zuständig, indem der Response Regulator direkt an die Promotorregionen der zu regulierenden Gene bindet. Etwa 15% der bekannten Response Regulatoren besitzen keine Output Domäne und agieren über Protein-Protein Interaktionen (Jenal and Galperin, 2009). Die Phosphorylierung der Receiver Domäne kann die Dimerisierung oder Tetramerisierung des Proteins begünstigen und so die DNA Bindeaffinität erhöhen. Andere Voraussetzungen können ebenfalls den Einfluss der Response Regulatoren ändern. Dazu gehört die Konserviertheit der Bindesequenz genauso wie die Anzahl und die Position der Bindestellen (Diniz *et al.*, 2011). Entweder kommt es zur Konkurrenz des Response Regulators mit der RNA Polymerase um die Bindung an der DNA und die Expression wird verhindert, oder die Bindung des Response Regulators weiter vor dem Transkriptionsstartpunkt ermöglicht die Rekrutierung der RNA Polymerase durch Interaktion mit dem σ -Faktor oder der RNAP- α Untereinheit. Dies hat eine Stimulation der Genexpression zur Folge. Ebenso kann die Stärke der Interaktion mit der RNA Polymerase für die Transkriptionsregulation wichtig sein. Bei komplexeren Operatoren können auch mehrere Response Regulatoren oder andere Transkriptionsfaktoren binden, die entweder miteinander interagieren oder um Bindung konkurrieren. Dies ermöglicht die Antwort auf mehrere Stimuli gleichzeitig (Salis *et al.*, 2009).

2.2.2.1. Das KdpD/KdpE Zwei-Komponenten System

Kalium ist ein wichtiges monovalentes Kation in Zellen und übernimmt Funktionen als Regulator der Genexpression und von Proteinaktivitäten (Heermann and Jung, 2010; Lee *et al.*, 2007). Ebenso wird die negative Ladung von Makromolekülen durch Kalium ausgeglichen und so die Osmolarität der Zelle in Balance gehalten (Cayley *et al.*, 1991; McLaggan *et al.*, 1994). Bei Bedingungen eines osmotischen Schocks wirkt Kalium als Osmoprotektans und wird für die Aufrechterhaltung des zellulären pHs und des Turgors benötigt (Booth, 1985; Epstein, 2003). Kalium wird durch drei verschiedene

Transportsysteme in *E. coli* aufgenommen. Unter normalen Wachstumsbedingungen reicht die Aufnahme durch den Kup Transporter und den wenig affinen Trk Transporter aus. Bei Kaliummangel wird der 500-fach affinere Kaliumtransporter KdpFABC für das Wachstum benötigt (Altendorf, 2009).

Das KdpD/E Zwei-Komponenten System ist für die Induktion der Expression des *kdpFABC*-Operons, welches für den hochaffinen Kaliumtransporter KdpFABC kodiert, verantwortlich (Abbildung 2). Über den von der Sensor kinase KdpD wahrgenommenen Stimulus wird kontrovers diskutiert. Es reicht von der Detektion der Osmolarität, über die Wahrnehmung der inter- oder extrazellulären Kaliumkonzentration bis hin zur Veränderung der Ionen- oder Lipidzusammensetzung in der Zelle (Heermann and Jung, 2010). Das System wird durch einen noch unklaren Mechanismus durch einen Mangel an Kalium und durch Salzstress induziert. Da die Transkriptionsaktivierung des *kdpFABC*-Operons unter Kaliummangel etwa 100-fach höher ist als bei Induktion des Systems durch erhöhte Salzkonzentrationen, kann auch angenommen werden, dass KdpD entweder verschiedene Reize wahrnimmt oder einen Stimulus erhält, der sowohl unter K^+ -Limitation als auch bei hoher Osmolalität auftreten kann (Hamann *et al.*, 2008; Zimmann *et al.*, 2007).

Die Sensor kinase KdpD ist mit vier Transmembrandomänen in der Zytoplasmamembran verankert und besitzt zwei große zytoplasmatische Domänen am N- und am C-Terminus. Durch die Länge der N-terminalen Domäne mit 400 Aminosäuren unterscheidet sich KdpD stark von anderen Sensor kinasen. Diese Domäne umfasst ein Walker A und B Motiv, welche für die Stabilisierung des KdpD-KdpE-DNA-Komplexes wichtig sind (Heermann *et al.*, 2003; Jung and Altendorf, 1998a). Zusätzlich beinhaltet sie eine Usp Domäne (Universelles Stress Protein), die für die Interaktion mit UspC nötig ist. Eine KdpD-UspC Interaktion induziert wahrscheinlich die *kdp* Expression unter Salzstress über die Stabilisierung des Protein-DNA-Komplexes (Heermann *et al.*, 2009). Die N-terminale Domäne ist Interaktionsplattform für weitere assessorische Proteine in *M. tuberculosis* (Steyn *et al.*, 2003). Weiterhin gehört zu der sogenannten „Input Domäne“ von KdpD eine Arginin-reiche Region im C-Terminus, welche für die Wahrnehmung von Kalium wichtig sein könnte (Sugiura *et al.*, 1994; Zimmann *et al.*, 2007). Die C-terminale Transmitter Domäne ist über einen Linker mit der Input Domäne verbunden und beinhaltet, wie üblich bei Sensor kinasen, eine Histidinkinase Domäne mit der konservierten Phosphorylierungsstelle (His673),

eine Dimerisierungs Domäne (HisKA Domäne) und konservierte Motive, die für die Bindung und Hydrolyse von ATP benötigt werden (HATPase_c Domäne) (Parkinson and Kofoid, 1992). Diese Domänen sind für die Interaktion mit dem Response Regulator KdpE wichtig. Nach Aktivierung und Autophosphorylierung der Sensorkinase wird durch eine Kinasereaktion das konservierte Aspartat 52 in der Receiver Domäne in KdpE phosphoryliert. Durch die Dimerisierung des Response Regulators wird die Output Domäne aktiviert und KdpE bindet mit hoher Affinität an Sequenzen vor dem *kdp*-Promotor und führt zur Transkriptionsaktivierung (Puppe *et al.*, 1996; Toro-Roman *et al.*, 2005). Unter normalen Wachstumsbedingungen überwiegt die KdpE-spezifische Phosphataseaktivität von KdpD, sodass KdpE dephosphoryliert wird, von seiner DNA-Bindestelle dissoziiert und die Expression des *kdp*-Operons eingestellt wird (Brandon *et al.*, 2000).

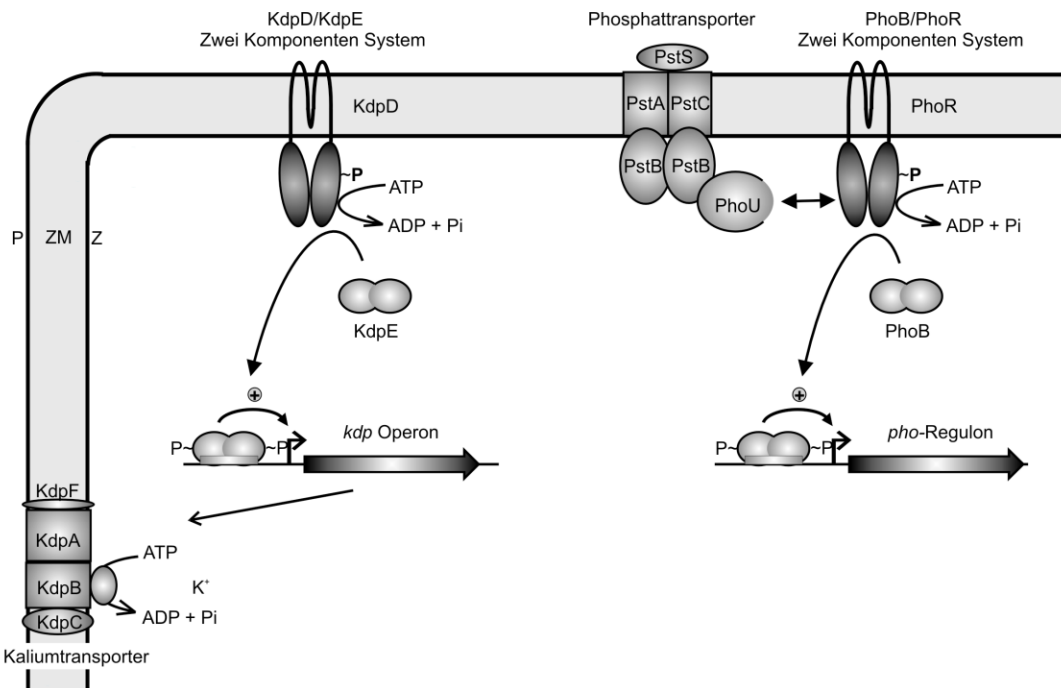


Abbildung 2: Modell für die Signaltransduktionskaskaden der KdpDE und PhoB/R Zwei-Komponenten Systeme. (links) Bei Kaliummangel oder unter Salzstressbedingungen wird die Autophosphorylierung der Sensorkinase KdpD und die Übertragung der Phosphatgruppe auf den Response Regulator KdpE induziert. KdpE bindet an die Region vor dem Promotor des *kdp*-Operons und induziert die Expression. Unter normalen Wachstumsbedingungen ist KdpD inaktiv, KdpE liegt unphosphoryliert vor und die Expression des *kdp*-Operons ist inhibiert. (rechts) Bei Sättigung des Pst Transporters interagiert der Pst Transporter wahrscheinlich über das Chaperon PhoU mit der Sensorkinase PhoR oder dem PhoR/PhoB-Komplex und führt zur Inaktivierung von PhoR, was in einer Inhibition von PhoB und/oder Dephosphorylierung von PhoB resultiert. Bei Phosphatmangel wird die Interaktion zwischen PhoR und PhoU wahrscheinlich aufgelöst. Dieses erlaubt die Autophosphorylierung von PhoR, den Phosphotransfer auf PhoB und die Transskriptionsregulation des *Pho*-Regulons. ZM,

Zytoplasmamembran; P Periplasma; Z, Zytoplasma nach (Heermann and Jung, 2010; Lamarche *et al.*, 2008).

2.2.2.2. Das PhoR/PhoB Zwei-Komponenten System

Die ausreichende Versorgung der Zellen mit Phosphatquellen ist wichtig für das Überleben von Zellen. Phosphat ist essentiell für viele zelluläre Prozesse und die Bildung aller Makromoleküle.

Die Aufnahme von anorganischem Phosphat wird durch zwei Transportsysteme (Pit und Pst) übernommen. Der wenig affine Pit Transporter wird konstitutiv exprimiert und sichert die Phosphatversorgung unter normalen Wachstumsbedingungen. Der 100-fach affinere Pst Transporter wird nur unter Mangelbedingungen exprimiert und versorgt die Zelle unter limitierenden Bedingungen mit anorganischem Phosphat. Die Expression der Gene des Pst Transporters und vieler weiterer Gene, die bei Phosphatmangel benötigt werden, stehen unter der Kontrolle des PhoR/PhoB Zwei-Komponenten Systems. Es sind um die 30 Gene bekannt, dessen Expression direkt vom Zwei-Komponenten System abhängt (Hsieh and Wanner, 2010). Proteomanalysen lassen allerdings vermuten, dass etwa 10% der Gene des *E. coli* Genoms durch Phosphatmangel induziert werden (Toro-Roman *et al.*, 2005; van Bogelen *et al.*, 1996; VanBogelen *et al.*, 1996). Dazu gehören Aufnahme- und Verwertungssysteme für Phosphonate, für Glycerin-3-Phosphat und andere organische Phosphatverbindungen.

Auch die Veränderung der Zellform oder Zelloberfläche in einigen Bakterien wird auf das Pho-Regulon zurückgeführt. Außerdem wird vermutet, dass das PhoB/R Zwei-Komponenten System sowohl direkt, als auch indirekt mit verschiedenen Stressantworten verbunden ist. Dazu kommt die Regulation der Virulenz und der Biofilmbildung in verschiedenen Bakterien (Buckles *et al.*, 2006; Lamarche *et al.*, 2008; Suziedeliene *et al.*, 1999). Diese regulatorischen Prozesse sind nur schlecht mit der Auswirkung von Phosphatmangel in der Zelle zu erklären und lassen eher die Vermutung zu, dass das PhoB/R Zwei-Komponenten System sowohl durch Kreuzreaktionen mit anderen Zwei-Komponenten Systemen oder durch die Wahrnehmung anderer Signale in die oben beschriebenen Regulationswege involviert ist (Lamarche *et al.*, 2008).

Das PhoB/R ZKS ist ein klassisches Zwei-Komponenten System bestehend aus einer membrangebundenen Sensor kinase und dem zytoplasmatischen Response Regulator.

Doch das System scheint weitaus komplexer zu sein. Die Sensorkinase PhoR besitzt nur eine sehr kleine extrazytoplasmatische Domäne am N-Terminus, die für die Wahrnehmung der extrazellulären Phosphatkonzentration wichtig wäre. Auch die Transmembrandomänen scheinen für die Signalwahrnehmung nicht entscheidend zu sein (Wanner, (Hsieh and Wanner, 2010)). Der C-Terminus ist klassisch aufgebaut und dient der Dimerisierung, der Bindung und Hydrolyse von ATP, der Autophosphorylierung und der Interaktion mit dem Response Regulator PhoB. Die Stimuluswahrnehmung erfolgt bei dem PhoB/R System über die Interaktion mit dem Pst Transporter und dem Protein PhoU. Es wird vermutet, dass die Phosphatsättigung des Pst Transporters sich direkt über eine PstSABC-PhoU-PhoBR-Interaktion auf die Aktivität von PhoR auswirkt (Wang *et al.*, 1994). Ist die Phosphatversorgung ausreichend, läuft der Transportprozess des Pst Transporters langsam ab und über die Interaktion der sieben Proteine wird die Phosphorylierung, also die Aktivierung des Response Regulators verhindert (Abbildung 2). Ist nach einem Mangel, die Phosphatmenge wieder ausreichend, unterstützt die Komplexbildung die Dephosphorylierung von PhoB. Bei Phosphatmangel wird PhoR in seine aktivierte Form versetzt und der PstSABC-PhoU-PhoBR-Komplex durch die Transportaktivität des Pst Transporters wahrscheinlich aufgehoben. Nach der Autophosphorylierung der Sensorkinase und Übertragung der energiereichen Phosphorylgruppe auf den Response Regulator erfolgt die Aktivierung der Gene des Pho-Regulons (Abbildung 2). Interaktionen zwischen einer Histidinkinase und mit einem Transporter wurde auch schon im Fall von DcuS/DcuR und dem Fumerat/Succinat Antiporter DcuB angenommen (Kleefeld *et al.*, 2009). Für den Regulator der Lysindecaboxylase CadC konnte die indirekte Wahrnehmung von Lysin durch Interaktion mit der Lysinpermease LysP schon gezeigt werden (Tetsch *et al.*, 2008).

2.2.2.3. Modulatoren von Zwei-Komponenten Systemen

Zwei-Komponenten Systeme sind keine autonomen Signaltransduktionskaskaden. Ihre Aktivitäten können in vielen Fällen moduliert werden. Dies geschieht zum Einen wie bereits unter 2.3.2. beschrieben durch Kreuzphosphorylierung mit anderen Zwei-Komponenten Systemen oder durch Phosphorylierungen mit niedermolekulare Phosphatdonoren. Ein anderer Mechanismus ist die Expression eines Proteins unter der

Kontrolle eines bestimmten Zwei-Komponenten Systems und Auswirkungen dieses Proteins auf die Aktivität anderer Zwei-Komponenten Systeme, sogenannte ZKS-Konnektoren. Des Weiteren gibt es ZKS-Modulatoren, welche die Aktivität der Zwei-Komponenten Systeme modulieren.

ZKS-Konnektoren verbinden verschiedene Zwei-Komponenten Systeme miteinander und führen so zur kooperativen Induktion von Zwei-Komponenten Systemen mit unterschiedlichen Stimuluswahrnehmungen.

Das CpxA/CpxR ZKS wird unter anderem bei Zellhüllstress aktiviert. Ein Gen, welches unter CpxA/CpxR-Kontrolle steht, ist *mzrA*. MzrA ist ein membrangebundenes Protein, dass über direkte Interaktion die Aktivität des Zwei-Komponenten Systems EnvZ/OmpR reguliert. Des weiteren gibt es einen negativen Feed-back loop, denn auch EnvZ und OmpR sind in die Expressionsregulation von *mzrA* involviert. Somit werden die zwei wichtigsten ZKS, die durch unterschiedliche Signale induziert werden aber beide die Komposition der äußeren Membran bestimmen, miteinander verbunden (Gerken *et al.*, 2009).

Die Expression des Proteins SafA steht unter Kontrolle von EvgS/EvgA und wird unter Säurestress induziert. Die Interaktion der Sensorkinase PhoQ mit SafA führt zu einer Induktion der PhoQ/PhoP abhängigen Gene. Des Weiteren wird durch PhoQ/PhoP die Expression von IraM reguliert. Dieses Protein kann über die Interaktion mit dem Response Regulator RssB die Proteolyse von σ^S regulieren (Bougdour *et al.*, 2008). Interessanterweise wird auch die Expression von *ssrA/ssrB* bzw. die Sensorkinaseaktivität von SsrA durch die Response Regulatoren PhoP und OmpR moduliert (Bijlsma and Groisman, 2005; Feng *et al.*, 2003).

Durch das Auffinden und die Erforschung solcher ZKS-Konnektoren können immer größere Netzwerke von Signaltransduktionswegen entdeckt werden. Das bedeutet, dass viele Signale in eine Antwort integriert werden können und/oder eine Vielzahl von Antworten auf ein spezifisches Signal erfolgen (Laub and Goulian, 2007). Erst diese Vernetzung von Signalwegen kann eine optimale Adaption an Stresssituationen, Umwelt- und Nährstoffbedingungen ermöglichen.

Die zweite große Gruppe von Proteinen reguliert in den meisten Fällen die Signalwahrnehmung und/oder die Aktivität von Sensorkinasen (ZKS-Modulatoren). Das KdpD/KdpE Zwei-Komponenten System wird durch das universale Stressprotein UspC unter Salzstress kontrolliert. So kann die Bindung von UspC an die Usp Domäne

im N-Terminus von KdpD den KdpD/KdpE/DNA Komplex stabilisieren und die inhibitorische Wirkung einer ausreichenden Kaliumversorgung der Zelle unterdrücken (Heermann *et al.*, 2009). In *Mycobacterium tuberculosis* konnte gezeigt werden, dass die zwei Lipoproteine LprJ und LprF über direkte Interaktion mit KdpD die Expression des *kdp*-Operons modulieren können. Dabei ist auch hier die große N-terminale, cytoplasmatische Domäne von KdpD, die Interaktionsfläche (Steyn *et al.*, 2003). Dies lässt die Vermutung zu, dass über die Interaktion der N-terminalen Domäne mit anderen Proteinen eine Signalintegration in das Phosphorylay System stattfindet. Es sind weitere Zwei-Komponenten Systeme beschrieben, bei denen Lipo- oder Membranproteine die Aktivitäten der Sensorinasen beeinflussen (Dartois *et al.*, 1997; Raivio and Silhavy, 1997).

FeuN ein Regulator des FeuQ/FeuP Zwei-Komponenten Systems in *Sinorhizobium meliloti* stimuliert den Shift der Sensorkinase hin zu ihrer FeuP-spezifischen Phosphatase Aktivität. Dies geschieht möglicherweise über eine direkte Interaktion des periplasmatischen FeuN mit der extrazytoplasmatischen Domäne von FeuQ. FeuN kann dabei die Signaltransduktion, aber nicht die Stimuluswahrnehmung des Zwei-Komponenten Systems beeinflussen (Carlyon *et al.*, 2010). Eine ähnliche Regulation ist für das CpxA/CpxR Zwei-Komponenten System in *E. coli* bekannt (Raivio *et al.*, 2000). Hier ist die Expression des negativen Regulators des Zwei-Komponenten Systems CpxP direkt von der Aktivität des ZKS abhängig. Das periplasmatische CpxP wird nicht nur für die Regulation der Aktivität von CpxA durch direkte Interaktion benötigt, sondern dient ebenfalls als Adapterprotein für periplasmatische Proteasen für den Abbau von falsch gefalteten Proteinen (Buelow and Raivio, 2009). Aber auch cytoplasmatische Proteine können Zwei-Komponenten Systeme regulieren (Kato and Groisman, 2004).

In *Mycobacterium tuberculosis* wird der Response Regulator DosR des DosS/DosR Zwei-Komponenten Systems neben der Phosphorylierung am Aspartat durch die Sensorkinase DosS auch an zwei Threoninen (Thr198 und Thr205) durch die Kinase PknH phosphoryliert. Die kooperativen Phosphorylierungen erhöhen dabei die DNA-Bindeaffinität von DosR (Chao *et al.*, 2010). Dies zeigt, dass viele verschiedene Proteingruppen als Modulatoren von Zwei-Komponenten Systemen agieren können. Für *B. subtilis* und *E. coli* ist sogar bekannt, dass eukaryontische Peptidoglykan-Bindeproteine über die Interaktion mit den Sensorkinase CsxS bzw. CpxA eine

übertriebene Stressantwort auslösen und so zum Zelltod beitragen (Chao *et al.*, 2010; Kashyap *et al.*, 2011).

2.2.3. Phosphotransferasesysteme

Phosphotransferasesysteme (PTS) sind in vielen Bakterien die wichtigsten Importsysteme für Kohlenstoffquellen. Sie können Kohlenhydrate, die als Energiequellen für das Wachstum sehr bedeutend sind, mit hoher Affinität und Effizienz aufnehmen. Dabei findet ausgehend von dem energiereichen Intermediat Phosphoenolpyruvat die Übertragung einer Phosphatgruppe auf die über die Membran hinweg transportierten Kohlenhydrate mittels einer Proteinphosphorylierungskaskade statt (Lengeler *et al.*, 1994; Postma *et al.*, 1993). Die Kaskade wird über die Phosphorylierung und die Übertragung der Phosphatgruppen auf die einzelnen Proteine in einer festen Reihenfolge gesteuert (Kundig *et al.*, 1964). Die energiereiche Phosphatgruppe wird zuerst durch Autophosphorylierung auf das Enzym I (EI) übertragen. Dieses Proteinkinase übergibt das Phosphat an das kleine, cytoplasmatische Protein HPr durch Phosphorylierung eines konservierten Histidinrestes. Anschließend erfolgt die Phosphorylierung eines großen membranassoziierten Proteinkomplexes, der im Generellen aus drei Untereinheiten besteht. Zuerst wird die A Untereinheit (Enzym IIA) an einem Histidinrest phosphoryliert. Nach Übertragung des Phosphats auf Histidin oder Cysteinrest in der B Domäne (Enzym IIB) werden die über die Enzym IIC Domäne importierten Kohlenhydrate phosphoryliert. Während das EI und HPr generelle Phosphorylgruppendonoren der PTS-Systeme sind und in nahezu allen Bakterien konserviert sind, können sich die Komponenten der membrangebundenen EII Komplexe in ihrer Anzahl und auch ihrer Substratspezifität in verschiedenen Organismen unterscheiden (Cases *et al.*, 2007; Warner and Lolkema, 2003). *Escherichia coli* besitzt 21 verschiedene EIIs (Tchieu 2001). Sie sind jeweils für die Aufnahme eines bestimmten Substrats zuständig und können als Polypeptidketten oder auch als einzelne Proteine vorkommen (Meadow *et al.*, 1990). Abbildung 3 gibt einen Überblick über einige PTS Proteine in *E. coli*.

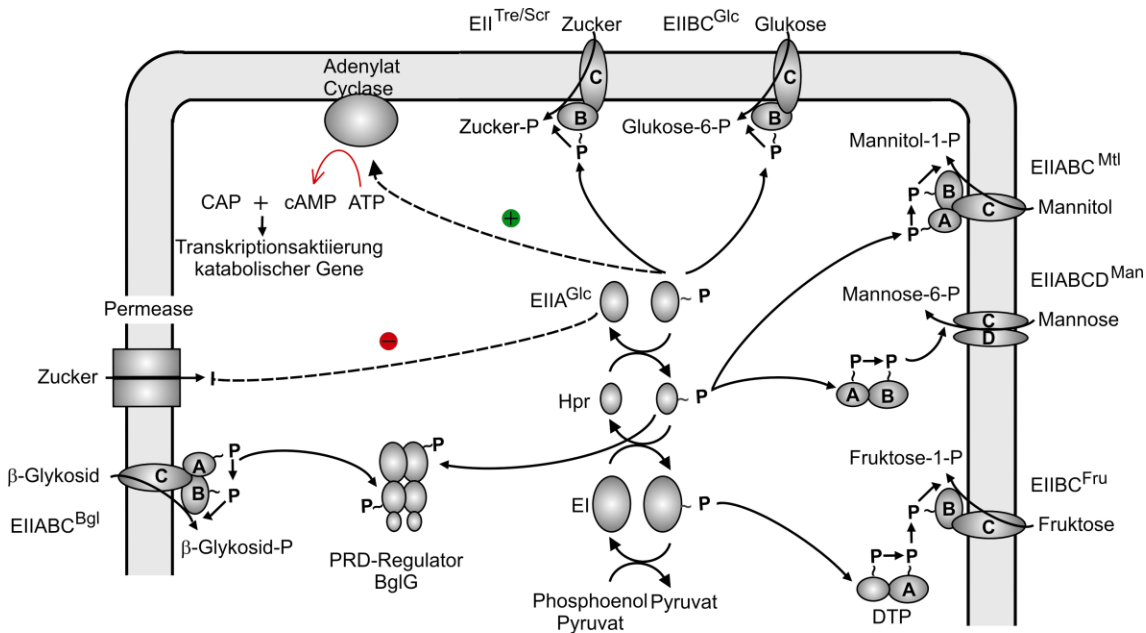


Abbildung 3: Überblick über das kanonische PTS. Das kanonische PTS ist für den Kohlenhydrattransport verantwortlich. EI liefert die Phosphorylgruppen für HPr und das DTP-Protein. HPr überträgt die Phosphatgruppen auf die zuckerspezifischen EII-Komplexe, sodass das Kohlenhydrat in die Zelle aufgenommen und phosphoryliert werden kann. Ebenso sind die wichtigsten Regulationsmechanismen des kanonischen PTS dargestellt. EIIA^{Glc}-P aktiviert die Adenylatcyclase, dies ermöglicht die Expression kataboler Gene. EIIA^{Glc} reprimiert Zuckerpermeasen durch Protein-Protein Interaktionen. Zuckerspezifische EIIs und HPr regulieren die Aktivität von PRD-Regulatoren.

Eine weitere wichtige Funktion des Phosphotransferase Systems ist die Regulation von vielen physiologischen Prozessen. Wie zum Beispiel die Regulation der Chemotaxis durch die Interaktion von EI mit der Histidinkinase CheA oder die Regulation der Glykogenphosphorylase GlgP durch HPr (Lux *et al.*, 1995; Seok *et al.*, 2001). Auch die Biofilmbildung und der Stickstoff-Metabolismus sind betroffen (Lengeler and Jahreis, 2009). Des Weiteren wird die Balance zwischen Fermentation und Respiration durch die Interaktion von EI mit dem metabolischen Switch-Protein FrsA reguliert (Koo *et al.*, 2004).

Von besonderer Wichtigkeit ist die Kohlenstoff-Katabolitenrepression (carbon catabolite repression (CCR)) (Deutscher, 2008; Görke and Stülke, 2008). Die Kohlenstoff-Katabolitenrepression ist bei dem Vorhandensein einer bevorzugten Kohlenstoffquelle, d. h. einem Nährstoff, der für das Bakterium leicht verstoffwechselt werden kann und ein schnelles Wachstum erlaubt, aktiv. Bei diesem Mechanismus wird die Expression von Genen, sowie die Aktivität von Transportern und Enzymen reprimiert, die für die Verwertung alternativer C-Quellen benötigt werden. Dadurch,

dass das PTS aus mehreren cytoplasmatischen und membrangebundenen Proteinen besteht und ihre Phosphorylierung in Antwort auf das extrazelluläre Nährstoffangebot und den metabolischen Status der Zelle variiert, können PTS-Proteine sowohl auf metabolischem als auch genetischem Level wirken (Deutscher *et al.*, 2006; Meadow *et al.*, 1990). In *E. coli* wird die CCR hauptsächlich durch EIIA^{Glc} reguliert. Ist EIIA^{Glc} in Folge einer effizienten Aufnahme eines PTS-Zuckers oder einem niedrigen PEP/Pyruvat Verhältnis unphosphoryliert, kommt es zur Interaktion mit verschiedenen Permaesen (z. B. für Laktose und Raffinose) und der Glyzerinkinase und gleichzeitiger Inhibition der Enzymfunktionen (Lengeler and Jahreis, 2009). Dies verhindert die Aufnahme und die Synthese der Induktoren der untergeordneten katabolischen Systeme, wenn deren Substrate verfügbar sind (Saier *et al.*, 1983; Smirnova *et al.*, 2007). Dieser Mechanismus wird als Induktorausschluss bezeichnet. Ist allerdings kein PTS-Substrat verfügbar, oder das PEP/Pyruvat-Verhältnis hoch, liegen die Proteine des Phosphotransferasesysteme aufgrund des fehlenden Phosphatazeptors hauptsächlich phosphoryliert vor (Bettenbrock *et al.*, 2007; Hogema *et al.*, 1998). In diesem Zustand interagiert das EIIA^{Glc} mit der Adenylat Cyclase und aktiviert diese (Park *et al.*, 2006; Roseman and Meadow, 1990). Der aus ATP entstehende second messenger cAMP dient als Ko-Aktivator des CAP (cAMP Bindeprotein). Die Bindung des CAP-cAMP Komplexes an die Bindestellen in der Nähe der Promotoren der Zielgene führt zur Transkriptionsaktivierung von Genen für den Metabolismus und Kohlenhydrattransport (Görke and Stülke, 2008). Eine andere Komponente des PTS, das EIIBC^{Glc} Protein kann in seinem unphosphorylierten Zustand über die Interaktion mit dem DNA-Bindeprotein Mlc die Expression seines eigenen Transkripts und Transkripte anderer Kohlenhydrat-Transporter und metabolischen Genen kontrollieren (Gabor *et al.*, 2011)

Die Regulationsmechanismen der CCR sind in Gram Positiven Bakterien anders organisiert. Über die Interaktion mit HPr kann der Transkriptionsfaktor CcpA (carbon catabolite protein A) die Expression von katabolen Genen reprimieren und die Expression von Genen des Überflussmetabolismus in Abhängigkeit von der Glukoseverfügbarkeit aktivieren (Fujita, 2009; Görke and Stülke, 2008). Als Ko-Faktor für die DNA-Bindung benötigt CcpA ein PTS-Protein (HPr oder auch das HPr Homolog Crh), welches an einem Serin phosphoryliert ist. HPr wird einmal durch das EI an einem Histidin phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ist wichtig für die Teilnahme am Transport von PTS-Substraten. Des Weiteren wird HPr bei PTS-

Substratverfügbarkeit durch eine regulatorische Phosphorylierung am Serin (HPr(Ser-P)) durch die HprKinase/Phosphatase phosphoryliert und kann somit mit CcpA interagieren (Boel *et al.*, 2003; Warner and Lolkema, 2003). Ebenfalls ist in Gram Positiven Bakterien das HPr entscheidend für den Induktorausschluss. Hier werden z. B. die Aufnahme von Ribose und Galaktose durch direkte Interaktion von HPr(Ser-P) mit den Transportproteinen oder die Glyzeringene durch Phosphorylierung von GlpK durch HPr(His-P) reguliert (Lengeler and Jahreis, 2009; Ye *et al.*, 1994).

Eine weitere wichtige Regulation durch PTS Proteine ist die Regulation der Aktivitäten von Antiterminationsproteinen, die sowohl in Gram Negativen als auch in Gram Positiven Bakterien vorkommen. Antiterminatorproteine besitzen eine N-terminale RNA-Bindedomäne über die sie an ihre spezifische Ziel-mRNA binden können und die Ausbildung eines transkriptionellen Terminators verhindern. Dies unterbindet die Synthese von spezifischen EIIs und anderen assoziierten Proteinen. Die Dimerisierung, also die Entstehung der aktiven Form der Antiterminationsproteine, ist hierbei von der Phosphorylierung des Regulatorproteins an konservierten Histidinresten in den 2 homologen PTS Regulationsdomänen (PRDs) abhängig. Die Phosphorylierung der PRD1 erfolgt im Generellen durch das spezifische EII (im Fall BglG in *E. coli* durch EII^{Bgl}; von LicT in *B. subtilis* durch EII^{Bgl}) (Görke, 2003; Schnetz *et al.*, 1996). Diese Phosphorylierungen wirken inaktivierend auf den Regulator und sind von der Verfügbarkeit des Substrats der entsprechenden EII-Komplexe abhängig (Stülke *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung der PRD2 wirkt antagonistisch und wird durch HPr vorgenommen. Ist der PRD-Regulator an der PRD2 phosphoryliert, dimerisiert er und aktiviert die Transkription der Zielgene (Lindner *et al.*, 2002).

2.2.3.1. Paraloge Phosphotransferasesysteme

Viele Bakterien besitzen neben dem typischen Kohlenhydrat PTS weitere paraloge Systeme. Im *B. subtilis* ist nur das Vorhandensein des HPr Homologs Crh bekannt, welches zu einem geringen Teil an der CCR beteiligt, aber hauptsächlich in die Regulation des Stoffwechsels involviert ist (Landmann *et al.*, 2011a; Pompeo *et al.*, 2007). Das *E. coli* Genom kodiert für eine Vielzahl PTS-ähnlicher Proteine, welche häufig Phosphorylierungsketten ähnlich zum kanonischen PTS formen. Der EII-Komplex des Fruktose Transporters wird z.B. durch DTP (Diphosphoryl-Transfer-

Protein), einem fusionierten HPr und EIIA-Protein, welches die Phosphatgruppe vom EI des kanonischen PTS erhält, phosphoryliert (Sutrina *et al.*, 2002). Das DhaM-Protein, genauso wie das FryA und FrwA bestehen aus fusionierten EI-, HPr- und EIIA-ähnlichen Untereinheiten. Während die Funktion von FryA und FrwA noch weitestgehend unbekannt ist, liefert das durch EI und HPr phosphorylierte DhaM die Phosphorylgruppen an die Dihydroxyacetonkinase zur Detoxifizierung von Dihydroxyaceton (Deutscher *et al.*, 2006; Gutknecht *et al.*, 2001). Ein in fast allen Gram Negativen (außer den ϵ -Proteobakterien) hoch konserviertes System ist das Stickstoff-PTS (PTS^{Ntr}). Diese weite Verbreitung lässt die Vermutung zu, dass das PTS^{Ntr} eine wichtige Rolle in der Regulation von zellulären Prozessen zukommt (Pflüger-Grau and Görke, 2010).

2.2.3.2. Das Stickstoff-PTS (PTS^{Ntr})

Durch die Untersuchung des PTS^{Ntr} konnte gezeigt werden, dass dieses Phosphorylay System (EI^{Ntr} → NPr → EIIA^{Ntr}) nicht an der Aufnahme von Kohlenhydraten beteiligt ist. Dem Enzym EIIA^{Ntr}, welches homolog zum EIIA^{Fru} ist, fehlt die Interaktionsfläche mit einem EIIB-Protein (Powell *et al.*, 1995). Des Weiteren konnte bisher kein finaler Akzeptor der übertragenen Phosphorylgruppe identifiziert werden. Seinen Namen verdankt das Stickstoff-PTS der häufigen Kolo-kalisation von NPr und EIIA^{Ntr} mit dem σ^{54} -Faktor (verantwortlich für die Expression von Genen des Stickstoff-Stoffwechsels) im *rpoN*-Operon (Ninfa, 2007; Powell *et al.*, 1995; Reizer and Reizer, 1996). EI^{Ntr} ist an anderen Orten im Genom kodiert, kann aber in einigen Bakterien ganz fehlen (Pflüger-Grau and Görke, 2010). Die kodierenden Gene für die drei Proteine des Stickstoff-PTS sind *ptsP* (kodiert für EI^{Ntr}), *ptsO* (kodiert für NPr) und *ptsN* (kodiert für EIIA^{Ntr}). Das PTS^{Ntr} ist kein autarkes System. Kreuzphosphorylierungen zwischen den Komponenten der verschiedenen PTS-Systeme konnten bereits gezeigt werden (Powell *et al.*, 1995; Rabus *et al.*, 1999; Zimmer *et al.*, 2008).

2.2.3.3. Regulation des Phosphorylierungsstatus der Proteinen des PTS^{Ntr}

Über die Steuerung der Phosphorylierung des PTS^{Ntr} ist recht wenig bekannt. Wie bereits oben erwähnt, kann die Kreuzphosphorylierung mit anderen PTS Komponenten

zu einer Änderung des Phosphorylierungsstatus führen. Dabei ist die Kohlenhydratversorgung, also der Phosphorylierungsstatus der PTS Proteine entscheidend (Pflüger and de Lorenzo, 2008; Powell *et al.*, 1995; Zimmer *et al.*, 2008). In *E. coli* liegt das EIIA^{Ntr} zu 70% in seiner phosphorylierten Form vor. In *P. putida* ist es in der exponentiellen Wachstumsphase auch unphosphoryliert, akkumuliert aber später in seiner phosphorylierten Form (Pflüger and de Lorenzo, 2007; Wang *et al.*, 2005). Eine weitere, wichtige Rolle für die Phosphorylierung der PTS^{Ntr} Proteine könnte die N-terminale GAF-Domäne des EI^{Ntr}s spielen. Diese ist allein in EI^{Ntr}, aber nicht im EI des kanonischen PTS vorhanden, kommt allerdings in Transkriptionsregulatoren der NifA Familie vor und ist hier für die Wahrnehmung der Stickstoff Versorgung zuständig (Little and Dixon, 2003; Reizer *et al.*, 1996). GAF Domänen sind in Proteinen von Prokaryonten und Eukaryonten weit verbreitet und sind eine der größten Gruppen der ligandenbindenden Proteine. Dabei wirken eine große Vielfalt an niedermolekularen Stoffen, wie z. B. Ionen, Stoffwechselintermediate, aromatische Verbindungen und zyklische Nukleotide als Kofaktoren dieser Signalwahrnehmungsdomänen (Cann, 2007). Die Bindung der spezifischen Liganden kann entweder die Aktivität der Proteine oder Protein-Protein Interaktionen beeinflussen (Martinez-Argudo *et al.*, 2005; Tucker *et al.*, 2006). In NifA reguliert die GAF Domäne die Hydrolyse von ATP und so die Aktivität der σ^{54} -RNAP-Bindedomäne (Aravind and Ponting, 1997). In vielen Fällen sind GAF Domänen an katalytische Signaldomänen in Proteinen gekoppelt und so fast ausschließlich für Signaltransduktion von Bedeutung (Anantharaman *et al.*, 2001). Sie könnte auch EI^{Ntr} und Sensor kinase, wie HisK und KdpD, sowie die Aktivität von CyaA in *Anabaena* kontrollieren (Aravind and Ponting, 1997).

2.2.3.4. Regulationsmechanismen des PTS^{Ntr}

Das PTS^{Ntr} ist auf vielfache Weise in die Regulation des Metabolismus in verschiedenen Bakterien involviert. Einige Beispiele werden im Folgenden vorgestellt.

Durch die Kolokalisation mit *rpoN* wurde dem PTS^{Ntr} eine Rolle in der Regulation des Stickstoffmetabolismus zugeschrieben (Powell *et al.*, 1995). Untersuchung in *Klebsiella pneumoniae* und *Azotobacter vinelandii* zeigten, dass durch das Stickstoff-PTS die Expression von Genen für die Stickstofffixierung und ihre Enzymaktivitäten reguliert werden (Begley and Jacobson, 1994; Merrick and Coppard, 1989; Segura and Espin,

1998). In *E. coli* wird die Synthese von Aminosäuren wie Leuzin, Isoleuzin und Valin durch die Inhibition der entsprechenden Synthase durch EIIA^{Ntr} inhibiert (Lee *et al.*, 2005). Dieser Effekt tritt allerdings als Konsequenz der Regulation des Kaliumtransportes auf (Lee *et al.*, 2007). Des Weiteren konnten Wachstumsdefekte von *ptsN* Mutanten in Medium mit verschiedenen Stickstoffquellen und TCS-Intermediaten als Kohlenstoffquellen beobachtet werden (Powell *et al.*, 1995). In *Pseudomonas aeruginosa* ist das PTS^{Ntr} wichtig für die Verwertung von organischen Stickstoffquellen. In *Bradyrhizobium japonicum* reguliert PTS^{Ntr} den Transport von Oligonukleotiden (Jin *et al.*, 1994; King and O'Brian, 2001). Dadurch scheint das Stickstoff-PTS zwar eine Rolle bei der Regulation des Stickstoffmetabolismus zu spielen, dass es allerdings als Verbindungsglied zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus wirkt, konnte durch neuere Untersuchungen widerlegt werden oder über polare Effekte von Aminosäurebiosyntheseegenen erklärt werden (Reaves and Rabinowitz, 2011). Neueste Studien haben gezeigt, dass in *E. coli* dieses Bindeglied nicht das PTS^{Ntr} ist, sondern das kanonische Phosphotransferase System selbst. Über die Menge an zellulärem α -Ketoglutarat, einem wichtigen Metabolit zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffkreislauf, wird die Aufnahme von PTS-Substraten reguliert. Dabei führt die Akkumulation von α -Ketoglutarat durch Stickstoffmangel zur Inhibition von EI und resultiert in einer verminderten Aufnahme von Kohlenstoffquellen (Doucette *et al.*, 2011). Des Weiteren wird die Expression der Glutamin Synthetase durch den CAP-cAMP reguliert. Auch hier spielt wahrscheinlich die Regulation der Adenylatzyklase durch das kanonische PTS eine wichtige Rolle (Tian *et al.*, 2001).

Dem PTS^{Ntr} kommt weiterhin eine Rolle bei dem Abbau von Aromaten und der Einlagerung von Speicherstoffen zu. In *Pseudomonas putida* und *Azotobacter vinelandii* konnte gezeigt werden, dass die Polyhydroxybuttersäurespeicherung durch das PTS^{Ntr} reguliert wird (Pflüger-Grau and Görke, 2010). Weiterhin reguliert NPr die Biosynthese von Lipid A, einem wichtigen Bestandteil der äußeren Membran durch direkte Interaktion mit LpxD in *E. coli* (Kim *et al.*, 2011).

Auch sind Auswirkungen des PTS^{Ntr} auf generelle Regulationsvorgänge bekannt. Eine Überexpression von *ptsN* kann durch einen noch unbekanntem Mechanismus die Lethalität einer Mutation des σ^E -Faktors RpoE supprimieren (Hayden and Ades, 2008). Des Weiteren wirkt sich das Stickstoff-PTS auch auf andere Sigma Faktoren aus. In Microarray Analysen wurde gezeigt, dass in $\Delta ptsN$ Mutanten viele σ^S -abhängige Gene

hoch- und σ^{70} -abhängige Gene runterreguliert sind. Dies liegt nicht etwa an der Kontrolle der Expression von *rpoS* und *rpoD* durch $EIIA^{Ntr}$ oder einer direkten Interaktion mit den Sigmafaktoren, sondern die Aktivität von σ^S wird reguliert. Dies geschieht über die intrazelluläre Kaliumkonzentration und die $EIIA^{Ntr}$ -vermittelte Regulation von TrkA (siehe unten). Wird die Kaliumkonzentration in der Zelle durch die Deletion von *ptsN* hoch, wird die Affinität zwischen σ^S und der RNA-Polymerase größer und die Bindung von σ^{70} verschlechtert sich. In Wildtypzellen ist grundsätzlich mehr von dem „housekeeping“ Sigma-Faktor vorhanden, als von σ^S . So wird scheinbar eine Regulation benötigt, bei der die Selektivität der Sigma-Faktoren die Anpassung an Stress unterstützt. (Lee *et al.*, 2010).

Das Stickstoff-PTS ist auch in andere Prozesse involviert, wie in die Regulation der Kaliumaufnahme und der Virulenz (Pflüger-Grau and Görke, 2010). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die unphosphorylierte Form des $EIIA^{Ntr}$ die Kaliumaufnahme durch den Kaliumtransporter Trk durch direkte Interaktion mit der TrkA Untereinheit reprimiert (Lee *et al.*, 2007). Des Weiteren wird die Expression eines zweiten Kaliumtransporters, dem hochaffinen KdpFABC, durch $EIIA^{Ntr}$ stimuliert (Lüttmann *et al.*, 2009). Über die Regulation der Kaliumhomöostase in der Zelle könnte das PTS^{Ntr} pleiotrophe Effekte in der Genregulation und bei Enzymaktivitäten hervorrufen (Pflüger-Grau and Görke, 2010).

2.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist Regulationsmechanismen und zelluläre Komponenten zu identifizieren, die den Phosphorylierungsstatus der Proteine des PTS^{Ntr} beeinflussen. Weiterhin sollte die regulatorische Funktion des PTS^{Ntr} in *E. coli* untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Bakterienmedien und Nähragarplatten

Die Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und 20 min im Autoklaven bei 121°C und 2 bar erhitzt. Thermolabile Substanzen wurden gelöst und sterilfiltriert.

Tabelle 3.1: Medien

LB-Medium (Standard-Vollmedium)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1l mit H ₂ O _{dest.}
LB-Platten	wie LB-Medium, aber Zugabe von 15 g Agar
K ⁺ -Medium (K ₁₁₅) (Epstein and Kim, 1971) (Minimalmedium)	46 mM K ₂ HPO ₄ [0.5 M] 23 mM KH ₂ PO ₄ [0.5 M] 8 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ [0.8 M] 0,4 mM MgSO ₄ [40 mM] 6 µM FeSO ₄ [0.6 mM] 1 mM Natriumcitrat [100 mM] 0,2% (w/v) Glukose [50% (w/v)]
Supplemente (je nach Stamm):	5 ml L-Prolin [4mg/ml] 1 mg/l Thiamin HCl [1 mg/ml] ad 1l mit H ₂ O _{dest.}
Um Kalium-Medium mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen (0,1; 1; 5; 10; 20; 40; 80; 115 mM K ⁺) herzustellen, wurden K ₁₁₅ -Medium und K ₀ -Medium gemischt. Zur Herstellung des K ₀ -Mediums wurden die kaliumhaltigen Lösungen (K ₂ HPO ₄ und KH ₂ PO ₄) durch die gleichen Mengen (Na ₂ HPO ₄ bzw. NaH ₂ PO ₄) ersetzt. Dabei wird zwar die Kaliumkonzentration des Mediums verändert, der pH-Wert und die Osmolarität bleiben konstant.	

	hinzufügen
<u>SOC-Medium</u>	SOB, nach dem Autoklavieren Zugabe von 19,8 ml 20 % Glukose
Low Phosphate Medium (LoPi-Medium) (Baek and Lee, 2006; Wanner and Chang, 1987) Supplemente (je nach Stamm):	100 ml 10x MOPS-Puffer 0,2% Glucose 50% 0,1 mM K ₂ HPO ₄ [0,5 M] ad 1l mit H ₂ O _{dest.} 1 mg/l Thiamin HCl [1 mg/ml] 5 ml L-Prolin [4mg/ml]
High Phosphate Medium (HiPi-Medium) (Baek and Lee, 2006; Wanner and Chang, 1987) Supplemente (je nach Stamm):	100 ml 10x MOPS-Puffer 0,2% Glucose 50% 2 mM K ₂ HPO ₄ [0,5 M] ad 1l mit H ₂ O _{dest.} 1 mg/l Thiamin HCl [1 mg/ml] 5 ml L-Prolin [4mg/ml]
10x MOPS-Puffer (Neidhardt <i>et al.</i> , 1974)	0,4 M MOPS (Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit KOH) [1 M] 40 mM Tricine (Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit KOH) [1 M] 1 mM FeSO ₄ [0,01 M] 95 mM NH ₄ Cl [1,9 M] 2,8 mM K ₂ SO ₄ [0,276 M] 5 µM CaCl ₂ [0,1 M] 5,3 mM MgCl ₂ [0,5 M] 0,5 M NaCl [5 M] 10ml Spurenelemente Lösung ad 1l mit H ₂ O _{dest.}
Spurenelemente Lösung	0,1 mM ZnSO ₄

(Neidhardt <i>et al.</i> , 1974)	0,03 mM (NH ₄) ₇ M ₆ O ₂₄ 0,3 mM CoCl ₂ 0,1 mM CuSO ₄ 0,8 mM MnCl ₂ 4 mM H ₃ BO ₃ ad 1l mit H ₂ O _{dest.}
NH ₄ -Medium (van Heeswijk <i>et al.</i> , 1996)	100 ml 10x MOPS-Puffer (mit oder ohne 14 mM NH ₄ Cl) 0,2 % Glucose 50% 2 mM K ₂ HPO ₄ [0,5 M] 14 mM L-Glutamin [125 mM] ad 1l mit H ₂ O _{dest.}
N-Medium (Kato and Groisman, 2004; Nelson and Kennedy, 1971)	5 mM KCl [3 M] 7,5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ [1 M] 0,5 mM K ₂ SO ₄ [0,3 M] 0,1 mM KH ₂ PO ₄ [0,5 M] 0,1 M Tris-HCl pH 7,7 [1 M] 0,2 % Glucose 50% ad 1l mit H ₂ O _{dest.} Um N-Medium mit limitierender Magnesiumkonzentration herzustellen, wurde MgCl ₂ [0,5 M] in einer Endkonzentration von 0,01 mM zugegeben. Für eine ausreichende Magnesiummenge im Medium wurde dieses in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben.

Die zur Selektion erforderlichen Antibiotika wurden aus sterilen Stammlösungen nach dem Autoklavieren und Abkühlung der Medien auf ca. 50°C zu folgenden Endkonzentrationen hinzugegeben:

Tabelle 3.2: Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	Stammlösung (Lagertemperatur)	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in 70% Ethanol (-20°C)	100 µg/ml
Chloramphenicol	15 mg/ml in 70% Ethanol (-20°C)	15 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml in H ₂ O (4°C)	30 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in H ₂ O (4°C)	50 µg/ml

3.2. Methoden

3.2.1. Anzucht von Escherichia coli-Kulturen

Kulturen der jeweiligen *E. coli* Stämme wurden, falls erforderlich unter selektiven Bedingungen (mittels Antibiotikazusätzen) zu einer $OD_{600} = 0,1$ von den Vorkulturen angeimpft. In den meisten Fällen wurden die Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase $OD_{600} = 0,5-0,8$ geerntet. Die Anzucht der Kulturen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben in einem Volumen von 10 ml in 100 ml Glaskolben.

3.2.2. Messung der optischen Dichte

Zur Überprüfung des Wachstums der *E. coli*-Kulturen erfolgten Messungen der optischen Dichte. Mit Hilfe eines Photometers wurde die optischen Dichte von geeigneten Verdünnungen der *E. coli*-Kulturen mit einer Leerkontrolle mit dem jeweils verwendeten Medium bestimmt. Die Messungen erfolgten in 1ml Plastikkuvetten (Schichtdicke 1 cm) bei einer Wellenlänge von 600 nm.

3.2.3. Konservierung von Stämmen

Zur Langzeitkonservierung wurden verwendete und neukonstruierte *E. coli* Stämme sowie Transformanten bei -70°C gelagert. Zum Schutz vor Frostschäden wurde 1 ml einer frischen Übernachtskultur mit 80 μL DMSO versetzt und in beschrifteten Schraubdeckelröhrchen eingefroren.

3.2.4. Arbeiten mit DNA

3.2.4.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Restriktionsverdauung von DNA erfolgten unter Reaktionsbedingungen, die vom Enzymhersteller angegeben wurden. Im Allgemeinen wurde bei Plasmidrestriktionsverdauen 2 u

Enzym pro μg DNA eingesetzt. Beim Verdau von PCR-Fragmenten wurde die Enzymmenge auf die Molarität der Restriktionsschnittstellen abgestimmt. Das Reaktionsvolumen für analytische Restriktionsverdau von Plasmiden betrug $10 \mu\text{l}$, bei präparativen Restriktionsverdauen $60 \mu\text{l}$.

3.2.4.2. Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Vektoren, welche für Klonierungen eingesetzt wurden, wurden nach dem Restriktionsverdau an den 5'-Enden dephosphoryliert. Dies verhindert bei einer Ligation eine Religation des Vektorrückgrates. Hierzu wurde $1,5 \mu\text{l}$ FastAP (Alkalische Phosphatase) direkt zum Vektorverdauansatz gegeben, nachdem dieser abgeschlossen war. Die Ansätze mit den gespaltenen Vektoren wurden nach Zugabe der alkalischen Phosphatase für 30 min bei 37°C inkubiert.

3.2.4.3. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese erfolgte in Flachbett-Elektrophorese-Apparaturen. Je nach den Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden verschiedene Agarosekonzentrationen (1,0 % bis 2%) verwendet. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Zur Detektion der DNA nach dem Lauf, wurde den Gelen Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von $0,5 \mu\text{g/ml}$ hinzugefügt. Zur Bestimmung der Größen der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden DNA-Größenstandards in jedem Gel aufgetrennt. Nach dem Beladen der Gele erfolgte die Auftrennung der DNA gewöhnlich nach 5-minütigem Einlaufen bei 50 V, bei 130 V. Analytische Gele wurden nach dem Lauf im UV-Licht bei 254 nm fotografiert. Aus präparativen Gelen wurden zunächst die Banden, die den erwarteten DNA-Fragmenten entsprachen, bei UV-Licht von 366 nm ausgeschnitten und das Gel anschließend im UV-Licht bei 254 nm fotografiert.

Puffer und Marker für die DNA-Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (Laufpuffer):	40 mM	Tris-Acetat pH 7,8
	2 mM	EDTA
DNA-Proben-Puffer (10x):	10 mM	Tris-HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA pH 8,0
	30% (w/v)	Glyzerin
	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
DNA-Größenstandards:	verschiedene DNA-Marker der Firma Fermentas	

3.2.4.4. Isolation von DNA aus Agarosegelen und Reinigung aus Lösungen

Um DNA-Fragmente nach einem Verdau oder einer PCR aufzureinigen, wurde entweder der Reaktionsansatz direkt mit dem „QIAquick PCR purification kit“ der Firma QIAGEN, Hilden aufgereinigt, oder die Fragmente wurden zunächst in einem präparativen Gel aufgetrennt, die gewünschte Bande ausgeschnitten und anschließend mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN, Hilden nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die zweite Möglichkeit wurde immer dann gewählt, wenn im Ansatz neben dem gewünschten DNA-Fragment noch ein weiteres DNA-Fragment vorhanden war, welches groß genug gewesen wäre an die Aufreinigungssäulen zu binden. Das Prinzip der Kits beruht auf einer Affinitätschromatographie von DNA an Silica-Membranen.

3.2.4.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationsansätze wurden circa 100 ng des Vektorrückgrats und die doppelte molare Menge an zu ligierender DNA eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Ligationsansätze betrug meistens 20 µl. Für die Ligation wurden folglich 2 µl 10x Ligase-Puffer eingesetzt. Es wurde 1,5 u der T4-DNA-Ligase verwendet und die Ligationsansätze wurden für 2 h bei 22°C, oder für 12 h bei 16°C inkubiert.

3.2.4.6. Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Dur Erzeugung von kurzen, synthetischen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten können zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide hybridisiert werden. Diese Fragmente eignen sich dann zur rekombinanten Klonierung in einen Vektor. Die Oligonukleotide sollten für diese Anwendung an den 5'-Enden phosphoryliert vorliegen. Zur Hybridisierung wurden je 20 pMol der Oligonukleotide in 1 M NaCl und 10 mM Tris/HCl pH 7,5 (Endvolumen: 150 µl) aufgenommen und die Lösung auf dem Heizblock auf 99°C erhitzt. Nach langsamen Abkühlen der Lösung auf dem ausgeschalteten Heizblock wurde die DNA durch Zugabe von 300 µl Ethanol (100 %) gefällt, anschließend mit Ethanol (80 %) gewaschen und in H₂O_{dest.} aufgenommen.

3.2.4.7. Polymerase Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki et al., 1989)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur Amplifikation von DNA. Das Prinzip der PCR beruht auf der Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes mit Hilfe von Oligonukleotid-Primern.

Die PCR ist in der Regel aus folgenden Teilen aufgebaut: einem Denaturierungsschritt, hier werden die DNA-Stränge getrennt; einem Annealingschritt, bei dem sich die Oligonukleotid-Primer an die DNA-Stränge anlagern können und einem Elongationsschritt, bei dem eine hitzestabile Polymerase die Primer an den DNA-Strängen verlängert. Diese Schritte werden 20- bis 30-mal wiederholt.

Zur Berechnung der Annealingtemperatur (AT) der verwendeten Oligonukleotid-Primer wurde eine Faustregel angewandt:

$AT = [(Zahl\ der\ A/T\text{-Nukleotide} \times 2^{\circ}C) + (Zahl\ der\ G/C\text{-Nukleotide} \times 4^{\circ}C)] - 5^{\circ}C$. Bei der Berechnung wurden nur die, zur Matrizen-DNA komplementären Nukleotide berücksichtigt.

Kolonie-PCR mit der *Taq*-Polymerase

Die *Taq*-PCR wurde eingesetzt um Deletionen oder Insertionen im *E. coli* Genom, sowie Plasmidkonstruktionen zu überprüfen. Hierzu konnte direkt von Kolonien oder *E. coli* Flüssigkulturen eine PCR angesetzt werden. Die *Taq*-PCR wurde des Weiteren für die Amplifikation von Deletions-PCR-Fragmenten verwendet.

Reaktionsansatz für die *Taq*-Polymerase (50 µl):

5 µl	10x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (MBI-Fermentas)
5 µl	10x dNTP Lösung
4 µl	Primer 1 (Stammlösung: 5 pmol/µl)
4 µl	Primer 2 (Stammlösung: 5 pmol/µl)
1 µl	Matrizen-DNA/ <i>E. coli</i> Kultur
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (~5 u)
30 µl	H ₂ O _{dest.}

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler (Tpersonal / Biometra) mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Anfangsdenaturierung	95°C	2 min	} x 30
2. Denaturierung	94°C	30 sec	
3. Annealing	AT	40 sec	
4. Extension	72°C	1 min/kb	
5. Abschlussynthese	72°C	5 min	
6. Pause	15°C		

Da die *Taq*-Polymerase eine relativ hohe Fehlerrate hat, wurde für Klonierungen die *Pfu*- und *Phusion*-Polymerase laut Protokoll des Herstellers eingesetzt.

Overlap-Extension PCR

Für die Konstruktion von Hybriden des *kdpD*s aus *E. coli* und des *kdpD2*s aus *R. eutropha* wurde die Overlap-Extension PCR angewendet. Diese Methode dient der Herstellung linearer DNA-Fragmente zur Konstruktion von Hybridgenen. Die Abbildung 3.1 zeigt schematische die Herstellung eines solchen PCR-Produkts. Für die Konstruktion der Fusionsgene wurden zunächst die einzelnen Bereiche der Gene aus den beiden Organismen amplifiziert. Das erste Fragment enthielt am 3'-Bereich eine zum zweiten PCR-Produkt komplementäre Sequenz, während das zweite Produkt eine zum zweiten Fragment komplementäre Sequenz am 5'-Ende enthielt (siehe Abbildung 3.1).

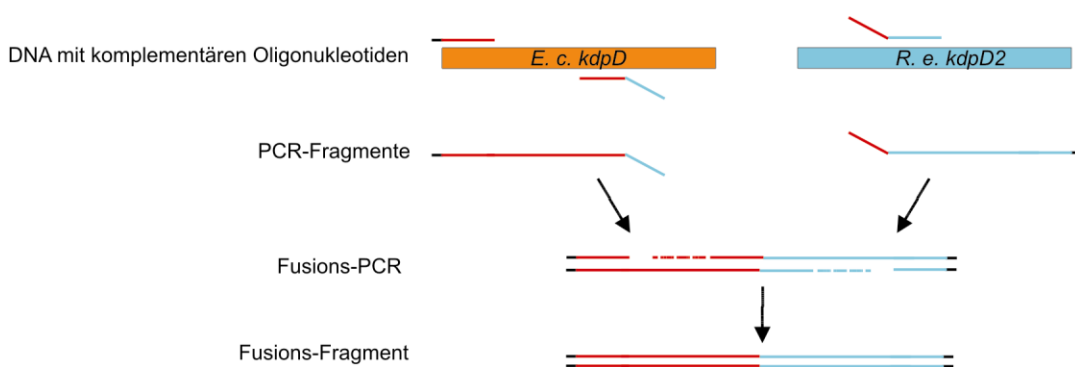


Abbildung 3.1: Overlap-Extension PCR. Mit einer normalen Phusion PCR wurden die benötigten Fragmente aus den *kdpD* Genen aus *E. coli* und *kdpD2* aus *R. eutropha* amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente mit überlappenden Enden wurden für eine zweite PCR eingesetzt. Hierbei lagerten sich die komplementären Bereiche zusammen und mit den vorher verwendeten Außenprimern konnten Fusionsgene amplifiziert werden.

Für die Fusions-PCR wurden 100 ng des einen Fragments und die einfach äquimolare Menge des zweiten Fragments eingesetzt, für die PCR wurde die *Accuzym* DNA Polymerase (Bioline, Witten) benutzt. Zuerst wurde ein Amplifikationsschritt durchgeführt, bei dem die PCR-Fragmente annealen konnten. Im zweiten Schritt der PCR wurden umfassende Primer hinzugefügt um das Fusionsgen zu amplifizieren.

Reaktionsansatz für die Accuzym-Polymerase (50 µl):

- 5 µl 10x Accu-Polymerase-Puffer (MBI-Fermentas)
 - 5 µl 10x dNTP Lösung
 - 4 µl Primer 1 (Stammlösung: 5 pmol/µl)
 - 4 µl Primer 2 (Stammlösung: 5 pmol/µl)
 - x µl Matrizen-DNA (Fragmente der 1. und 2. P
 - 2 µl Accuzym-Polymerase (~5 u)
 - ad 50 µl H₂O_{dest.}
- } Zugabe erst nach Schritt 5 der PCR

Die Reaktion wurde nach dem Mischen des Ansatz mit folgendem Programm durchgeführt:

- | | | | |
|-------------------------|------|---------------------|--------|
| 1. Anfangsdenaturierung | 98°C | 2 min | |
| 2. Denaturierung | 98°C | 30 sec | } x 10 |
| 3. Annealing | AT | 30 sec | |
| 4. Extension | 68°C | 1 min/kb | |
| 5. Abschlussynthese | 68°C | 5 min | |
| 6. Pause | 15°C | → Zugabe der Primer | |
| 7. Anfangsdenaturierung | 98°C | 2 min | |
| 8. Denaturierung | 98°C | 30 sec | } x 21 |
| 9. Annealing | AT | 30 sec | |
| 10. Extension | 68°C | 1 min/kb | |
| 11. Abschlussynthese | 68°C | 5 min | |
| 6. Pause | 15°C | | |

3.2.4.8. PCR-vermittelte ortsspezifische Mutagenese (CCR) und Multiple Mutation Reaktion (Bi and Stambrook, 1998; Hames *et al.*, 2005)

Die CCR ist eine Methode um spezifische Punktmutationen in eine beliebige DNA-Sequenz mittels einer PCR-Reaktion einzuführen. Zusätzlich zu den Außenprimern wird ein am 5'-Ende phosphorylierter Mutageneseprimer zum PCR-Ansatz hinzugefügt (siehe Abbildung 3.2).

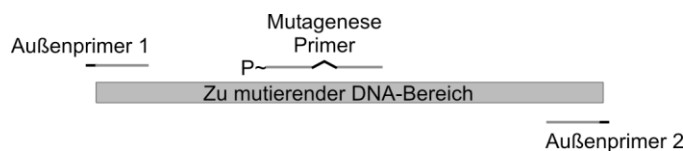



Abbildung 3.2: Schema der CCR zur ortsspezifischen Mutagenese einer beliebigen DNA-Sequenz. Der phosphorylierte Mutageneseprimer trägt in der Mitte einen nicht zur Matrize komplementären Bereich.

Durch die Zugabe der thermostabilen Ampligae zum PCR-Ansatz, kann der Mutageneseprimer mit seiner 5'-Phosphorylierung in das amplifizierte PCR-Fragment eingefügt. Die Schmelztemperatur des Mutageneseprimers sollte leicht über der, der Außenprimer liegen und der Elongationsschritt erfolgt bei dieser PCR bei 65°C statt bei 72°C.

Reaktionsansatz für eine CCR (50 µl)

1 µL	Matrizen-DNA (circa 100 ng)
5 µL	10x CCR-Puffer
5 µL	dNTP-Lösung (Stammlösung: je 2 mM)
2 µL	Primer 1 (Stammlösung: 5 pmol/µl)
2 µL	Primer 2 (Stammlösung: 5 pmol/µl)
8 µL	jedem phosphorylierten Mutageneseprimer (Stammlösung: 5 pmol/µl)
2 µL	<i>Pfu</i> -Polymerase (= 5 u)
3 µL	Ampligase (= 15 u)
22 µL	H ₂ O _{dest.}

Die Reaktion wurde nach dem Mischen des Ansatzes im Thermocycler (Tpersonal/ Biometra) mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Anfangsdenaturierung	95°C	5 min	 x 29
2. Denaturierung	95°C	30 sec	
3. Annealing	AT	30 sec	
4. Extension	65°C	2 min/kb	
5. Abschlussynthese	65°C	5 min	
6. Pause	4°C		

Zur Kontrolle erfolgte jeweils eine PCR-Reaktion ohne Mutagenese-Primer und Ampligase aber mit den verwendeten Außenprimern, Außerdem wurde das Amplifikat mittels Gelextraktion aufgereinigt, als Vergleichsansatz diente hierbei die Kontrolle ohne Mutagenese-Primer und Ampligase.

10x CCR-Puffer:	200 mM	Tris/HCl (pH 8,5)
	30 mM	MgCl ₂
	500 mM	KCl
	5 mM	NAD ⁺

3.2.4.9. Plasmidisolierung

Plasmidpräparationen im analytischen Maßstab, also für die Restriktionsanalyse und für die DNA-Sequenzierung, erfolgten mit dem „Nucleospin® Plasmid DNA Purification Kit“ der Firma Macherey-Nagel, Düren nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Das Kit beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und anschließender Affinitätschromatographie der DNA an Silica-Membranen. Die isolierten Plasmide wurden in 50 µl H₂O, pH 8,0 eluiert.

3.2.4.10. DNA-Sequenzanalyse

Sequenzanalysen wurden vom G2L (= Göttingen Genomics Laboratory) durchgeführt. Es wurden jeweils 4 µl des zu sequenzierenden Plasmids oder PCR-Fragments (ca. 100 ng/µl) in H₂O_{dest} pH 8,0 mit 1 µl Sequenzierungsprimer (Stammlösung: 5 pmol/µl) abgegeben.

3.2.4.11. Transformation von *E. coli* Zellen (Lederberg and Cohen, 1974)

Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

Von einer über Nacht-Vorkultur des zu transformierenden Stammes wurde eine 25 ml Hauptkultur in LB-Medium 1:100 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 erreicht hatte. Die Hauptkultur wurde in ein vorgekühltes 50 ml Falconröhrchen überführt und die Suspension bei 4°C und 4000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 10 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann für 20 min auf Eis inkubiert und die Zellen erneut, wie oben, abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Die Zellen waren nun kompetent und wurden auf Eis aufbewahrt.

Transformation der kompetenten *E. coli*-Zellen

Die zu transformierende Plasmid-DNA wurde in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen vorgelegt und auf Eis vorgekühlt. Zur gekühlten DNA-Lösung wurden dann 50 µl der kompetenten Zellen

hinzugefügt, es wurde vorsichtig gemischt und die Mischung zur Anlagerung der DNA an die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der DNA in die Zellen, wurden die Zellen einem 150-sekündigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und wiederum für 10 min auf Eis inkubiert. Um die Expression der aufgenommenen Antibiotikaresistenzgene zu ermöglichen, wurde zum Transformationsansatz 500 µl LB-Medium gegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Dann wurden jeweils 100 µl des Ansatzes und der nach Abzentrifugieren im Rücklauf resuspendierte Rest auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.4.12. Stammkonstruktion

In dieser Arbeit wurden *E.coli*-Stämme mit veränderten genetischen Eigenschaften konstruiert, indem chromosomale Marker in andere Stämme transduziert und DNA-Fragmente, die Resistenzkassetten enthielten in Stämme eingebracht wurden. Dabei wurde der Mechanismus der homologen Rekombination und der Einbau von DNA in die λ Attachment Seite ausgenutzt.

3.2.4.12.1. Generelle Transduktion mit dem Phagen T4-GT7

Bestimmte Phagen sind in der Lage chromosomale genetische Marker des Wirtes, die aus allen Bereichen des Genoms stammen können, durch zufälligen Einbau und Verpackung in Phagenpartikel auf andere Bakterien zu übertragen. Dieser Vorgang heißt generelle Transduktion. Der lytische *E. coli*-Phage *T4* ist zur Transduktion ungeeignet, da er die Wirts-DNA abbaut. Die multiple Mutante *T4-GT7* kann allerdings chromosomale Marker mit einer Häufigkeit von bis zu einer Transduktande pro 10^4 Einzelinfektionen übertragen.

Herstellung des Phagenlysats zur Transduktion

Von einer Übernachtskultur des in LB-Medium angezogenen Donorstammes wurden jeweils 100 µl mit verschiedenen Phagenlysatsverdünnungen (10^{-2} bis 10^{-6}) gemischt und zur Adsorption der Phagen für 20 min bei Raumtemperatur in Glasröhrchen inkubiert. Dann wurden zu jeder Verdünnungsstufe zunächst 300 µl LB-Medium und danach 3 ml T4-Topagar (44°C) hinzugefügt, vorsichtig gemischt und die Flüssigkeit auf LB-Platten verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte, bei der sich gerade konfluente Lyse zeigte, ausgewählt. Mit Hilfe eines sterilen Drygalskispatels wurde der Topagar nach Zugabe von 3 ml LB-Medium abgekratzt und in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt. In das Falconröhrchen wurde dann 1 ml Chloroform gegeben und die Mischung mit Hilfe eines

sterilen Glaskugelstabes homogenisiert. Die entstandene Suspension wurde für 10 min bei 4500 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zusammen mit 1 ml Chloroform bei 4°C in einem 15 ml Falconröhrchen gelagert.

Transduktion mit T4-GT7

Je 500 µl einer Übernachtskultur des Rezipientenstammes wurden mit 0,01 µl, 0,1 µl, 1 µl und 10 µl des transduzierenden Phagenlysats infiziert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Von jedem der Ansätze wurden jeweils 100 µl und 300 µl auf für den Marker selektivem Medium ausplattiert. Entstandene Kolonien trugen den transduzierten Marker des Donorstammes und wurden durch wiederholtes Vereinzeln auf LB-Selektionsplatten mit einer Platinnadel von Phagen befreit. Der Phänotyp der erhaltenen Kolonien wurde überprüft. Genotypisch wurden die Stämme durch eine PCR überprüft.

3.2.4.12.2. Integration von DNA in die λ -*attB*-Stelle des *E. coli*-Chromosoms (Diederich *et al.*, 1992)

Der temperente Phage λ kann sein Wirtsbakterium infizieren ohne sofort in den lytischen Zyklus überzugehen und sich zu vermehren, hierbei wird über die ortsspezifische Rekombination die DNA des Phagen in die *attB*-Stelle von *E. coli* integriert. Für diese Reaktion ist die phagenkodierte λ -Integrase nötig, dieser Prozess ist in Abwesenheit der phagenkodierten Excisionase irreversibel. Diese Eigenschaft der phagenvermittelten DNA-Integration wird für den Einbau von spezifischen DANN-Sequenzen in das *E. coli* Chromosom genutzt. Im ersten Schritt wird das zu integrierende DNA-Fragment in einen Klonierungsvektor eingebracht. Der Vektor enthält das *aadA*-Gen (Spectinomycinresistenz) und die *attP*-Stelle, über welche die Rekombination mit der *attB*-Stelle im *E. coli* Chromosom erfolgt. Dieser Bereich des Vektors ist von zwei *Bam*HI-Schnittstellen umrahmt. Die zweite Komponente des Systems ist ein Helferplasmid mit Temperatur-sensitivem Replikationsursprung. Es trägt das für die λ -Integrase kodierende *λint*-Gen (pLDR8). Die Expression des *λint*-Gens steht unter Kontrolle des λP_R -Promotors, der wiederum durch den λcI_{857} -Repressor, dessen Gen sich ebenfalls auf diesem Plasmid befindet, reprimiert wird. Der λcI_{857} -Repressor ist eine Mutation des λcI -Gens, welches für einen veränderten Temperatur-sensitiven Repressor kodiert. Die DNA-Integrations-Kassette wird über *Bam*HI-Verdau aus dem Vektor isoliert. Zur Transformation in *E. coli* werden mittels Religation des entstandenen *Bam*HI-Fragments zirkuläre DNA-Moleküle erzeugt, welche nicht replikationsfähig sind. Der Rezipientenstamm, welcher das *λint* tragende Helferplasmid besitzt, wird mit den zirkulären DNA-Fragmenten transformiert und bei der nicht-permissiven

Temperatur von 42°C inkubiert. Hierdurch kommt es zum Einen zur Induktion der Expression des Integrase-Gens außerdem verliert das Helferplasmid seine Replikationsfähigkeit. Durch die Selektion auf Agarplatten, die Spectinomycin enthalten, können nur solche Rekombinanten wachsen, die die Integrationskassette stabil in das Genom eingebaut haben.

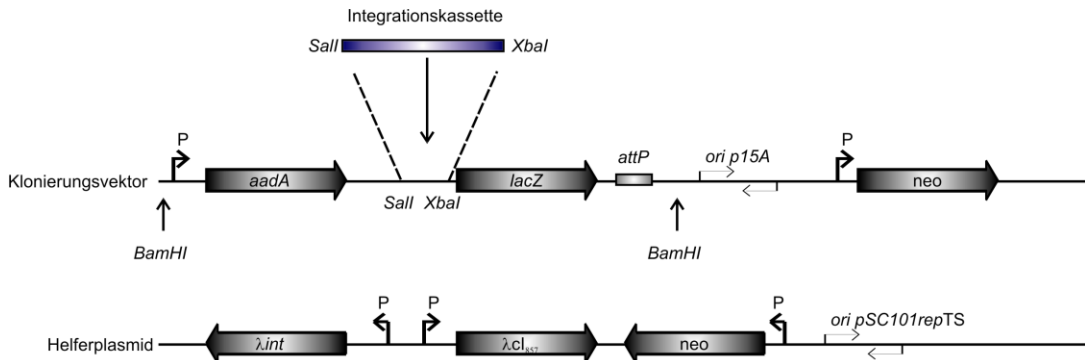


Abbildung 3.3: Plasmide des attB-Integrationsystems (nach (Diederich *et al.*, 1992)). Es ist der Aufbau des Klonierungsvektors und des Integrase-kodierenden Helferplasms dargestellt. Das gewünschte DNA-Fragment wird zunächst in den Klonierungsvektor inseriert (z.B. über die *Sall* und *XbaI* Schnittstellen). Im 3'-Bereich dahinter liegt die *attP*-Stelle für die Rekombination und im 5'-flankierenden Bereich das zur Selektion DNA-Integrations-Kassette benutzte *aadA*-Gen. Das Gen *lacZ* kodiert für die β -Galaktosidase. Das Helferplasmid kodiert für die λ -Integrase und den λ cl₈₅₇-Repressor und besitzt einen Temperatur-sensitiven Replikationsursprung.

Die gewünschten DNA-Abschnitte wurden in die in den Vektor kloniert. Über einen *BamHI*-Verdau wurden die zu integrierenden Fragmente isoliert und mit T4-DNA-Ligase zirkularisiert (um dabei die Multimerisierung zu vermeiden, wurde die DNA-Fragment-Konzentration $\leq 0,1$ nM eingestellt). Der Rezipienten-Stamm wurde mit dem Helfer-Plasmid transformiert und die Transformanten bei 28°C selektiert. Übernachtskulturen der Transformanten wurden 1:50 in LB-Medium verdünnt und für 90 min bei 37°C, 200 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden kompetent gemacht und mit den zirkularisierten *BamHI*-Fragmenten transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf vorgewärmten (42°C) M9-Platten mit Spectinomycin ausplattiert und bei 42°C inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden auf M9-Spec-Platten vereinzelt, und auf M9-Kan-Platten ausgestrichen. Durch die Selektion auf Kanamycin konnte sowohl das Vorhandensein des Vektors als auch des Helferplasms ausgeschlossen werden. Spectinomycin-resistente und Kanamycin-sensitive Klone wurden anschließend mittels Kolonie-PCR auf die Integration der Kassette in das Genom überprüft. Weiterhin konnte so die Integration von Multimeren der Kassette ausgeschlossen werden. Dazu wurden folgende Primerpaare verwendet: mit S93/S164 wurde die *attB/P'*-Stelle überprüft (Produktgröße:

563 bp), das Paar S95/S96 diente zur Kontrolle der *attP/B'*-Stelle (Produktgröße: 427 bp) und mit Hilfe von S95/S164 wurde die Integration von Dimeren ausgeschlossen (Produktgröße im Fall von Dimeren: 581 bp). Es wurden auch Vektoren benutzt, mit denen es möglich war Gene von Interesse mit Sequenzen, die für Affinitätstags kodieren, zu fusionieren. Diese Kassetten aus diesen Plasmiden wurden mit der gleichen Methode in die Chromosomen der Zielstämme integriert. Stämme mit dem gewünschten Genotyp wurden konserviert und für weitere Analysen eingesetzt.

3.2.4.12.3. Deletion chromosomaler Gene über homologe Rekombination (Datsenko and Wanner, 2000)

Diese Methode wurde verwendet um markerlose Deletionen von ganzen, oder Teilen von Genen in die Chromosomen der Zielstämme einzuführen. Dabei wurden DNA-Sequenzen, die flankierend zu den zu deletierenden Gene waren, an die unten gezeigten Sequenzen angefügt. Mit den konstruierten Oligonukleotiden konnte nun eine Zielsequenz, bestehend aus Resistenzkassette und FRT sites, von geeigneten Plasmiden amplifiziert werden. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in die Zielstämme transformiert. Die DNA-Fragmente ersetzen dann das zu deletierende Gen. Die umgebenen Bereiche des zu deletierenden Gens wurden dabei nicht verändert. Über die, in den DNA-Fragmenten enthaltenen FRT sites konnte die Resistenzkassette wieder aus dem Genom entfernt werden. Das Gen, welches im Chromosomen hinter dem deletierten Gen kodiert ist, konnte durch das Vorhandensein einer ribosomalen Bindestelle und eines Startkodons in dem verwendeten Oligonukleotid trotz der Deletion des vorderen Gens, exprimiert werden.

I. Herstellung der Primer

Es wurden umfassende Primer verwendet, die 40-45 Basen lange homologe Bereiche zu den zu deletierenden Genen aufweisen. An das 3'-Ende des Forward-Primers wurde folgende, zur Resistenzkassette komplementäre Sequenz angehängt:

GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

Ebenso wurde an das 3'-Ende des Reverse-Primers eine entsprechende zur Resistenzkassette komplementäre Sequenz angehängt:

CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTC

II. Amplifikation der Resistenzkassette mit flankierenden, zur Zielsequenz homologen Bereichen

Mittels der unter I. entworfenen Primer wurde die Chloramphenicol-Resistenzkassette von dem Plasmid pKD3 oder die Kanamycin-Resistenzkassette von dem Plasmid pKD4 amplifiziert. Hierzu wurde *Taq*-Polymerase verwendet.

Reaktionsansatz für eine PCR (50 μ l)

- 5 μ l 10x Taq-Puffer
- 5 μ l dNTPs (2mM each)
- 28 μ l H₂O_{dest.}
- 4 μ l Fwd-Primer (5 pmol/ μ l)
- 4 μ l Rev-Primer (5 pmol/ μ l)
- 2 μ l Template Plasmid pKD3 (~ 2 ng/ μ l)
- 2 μ l Taq-Polymerase

Cycler-Programm:

94° C	2 min	} 29x
94° C	0:45 min	
54° C	0:45 min	
72° C	2:00 min	
72° C	10:00 min	

Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, die DNA ausgeschnitten und aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit). Die Konzentration sollte idealerweise ≥ 100 ng/ μ l betragen.

III. Vorbereitung der Zielstämme

Die Zielstämme wurden mit dem Helferplasmid pKD46 transformiert. Dieses Plasmid ist temperatursensitiv und Stämme, die es tragen, sollten nur bei 30° C inkubiert werden. Auf dem Plasmid pKD46 sind die Rekombinationsgene des Phagen λ RED kodiert. Diese werden bei einer Temperaturerhöhung auf 42°C exprimiert und katalysieren die Rekombination mit der DNA.

IV. Elektroporation

Für die Elektroporation wurden elektrokompente Zellen benötigt. Hierzu wurde eine Vorkultur des Zielstammes mit dem Plasmid pKD46 in 5 ml SOB-Medium mit Amp₁₀₀ und 20 mM L-Arabinose inokuliert und über Nacht bei 30° C unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur in 25 ml SOB-Medium mit Amp₁₀₀ und 20 mM L-Arabinose mit der Vorkultur auf OD₆₀₀ = 0,1 inokuliert und unter Schütteln bei 30° C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 inkubiert.

Die Kultur wurde dann in ein vorgekühltes 50 ml Falconröhrchen überführt und 1h auf Eis inkubiert.

Es folgten eine Reihe von Wasch- und Zentrifugationsschritten:

- Zentrifugation 15 min, 3.000 rpm, 4°C
- Überstand verworfen, Pellet in 50 ml eiskaltem , sterilem Wasser aufnehmen
- Zentrifugation 15 min, 3.000 rpm, 4°C
- Überstand verworfen, Pellet in 25 ml eiskaltem , sterilem Wasser aufnehmen
- Zentrifugation 15 min, 3.000 rpm, 4°C
- Überstand verworfen, Pellet in 2 ml eiskaltem Glycerin 10% aufnehmen
- Zentrifugation 15 min, 3.000 rpm, 4°C
- Überstand verworfen, Pellet in 200 µl eiskaltem Glycerin 10% aufnehmen

Für die Elektroporation wurden Elektroküvetten und 1,5 ml Röhrchen auf Eis vorgekühlt. Dann wurde ~100 ng PCR-Produkt in einem Röhrchen vorgelegt und 40 µl elektrokompente Zellen hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert , dann in Elektroküvetten (0,1 cm Gene Pulser Küvetten, Bio-Rad) transferiert. Die Elektroporation erfolgte für 3 sec bei 1,8 kV, 200 Ohm und 25 F. Nach der Elektroporation wurde sofort 1 ml SOC-Medium zu den Zellen pipettiert, der Ansatz in kurze Glasröhrchen transferiert und unter Schütteln für 1 h bei 37°C inkubiert.

500 µl des Ansatzes wurden auf LB mit Cm₁₅ (bzw. Kan₃₀) –Platten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die restlichen 500 µl wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am folgenden Tag ausplattiert.

V. Überprüfung der Deletion

Einige der erhaltenen Kolonien wurden vereinzelt und in LB mit Cm₁₅ (bzw. Kan₃₀) –Medium angezogen. Die Deletion wurde mittels PCR verifiziert hierzu wurden umfassende und Resistenzkassetten-spezifischen Primer verwendet.

VI. Entfernen der Resistenzkassette

Stämme mit Austausch der Zielregion gegen die Resistenzkassette wurden zunächst parallel auf LB und LB mit Amp₁₀₀ plattiert und bei 37° C inkubiert, um den Verlust des temperatursensitiven Helferplasmid pKD46 zu überprüfen. Stämme, welche die Amp-Resistenz verloren hatten, wurden mit dem Helferplasmid pCP20 transformiert. Auch dieses Plasmid ist temperatursensitiv und Stämme, die es tragen, dürfen ebenfalls nur bei 30° C inkubiert werden. Die erhaltenen Transformanten wurden in 2 ml LB-Medium mit 20 mM L-Arabinose resuspendiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Von dieser Kultur wurden 10 µl auf LB-Agarplatten ausgestrichen und in einem Brutschrank bei 42°C inkubiert. Entstandene Kolonien wurden auf frischen LB-Agarplatten weitervereinzelt. Diese Agarplatten wurden ebenfalls bei 42°C inkubiert. Von diesen Kolonien wurden 2 ml Flüssigkulturen hergestellt, von denen je 10 µl auf LB-, LB mit Cm₁₅ (bzw. Kan₃₀) und LB mit Amp₁₀₀ ausplattiert wurde, um den Verlust des Plasmids pCP20, aber auch um den Verlust der Resistenzkassette aus dem Chromosom zu überprüfen. Stämme, die beide Resistenzen verloren hatten, wurden mit Hilfe einer erneuten Kolonie-PCR auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

3.2.4.12.4. Epitop tagging chromosomaler Gene über homologe Rekombination (Uzzau *et al.*, 2001)

Diese Methode wurde verwendet um Gene in ihrem authentischen, chromosomen Locus mit einer Sequenz zu fusionieren, die für einen FLAG-Tag kodiert. Dabei wurden DNA-Sequenzen, die jeweils stromaufwärts und stromabwärts des Stopkodons des zu verändernden Gens an die unten gezeigten Sequenzen angefügt. Mit den konstruierten Oligonukleotiden konnte nun eine Zielsequenz, bestehend aus der FLAG-Tag Sequenz, einer Resistenzkassette und FRT sites, von einem geeigneten Plasmid amplifiziert werden. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in die Zielstämme transformiert. Das DNA-Fragment wurde im Leserahmen an das Gen fusioniert, so dass das entsprechende Zielgen mit der FLAG-Tag Sequenz fusioniert wurde. Die umgebenen Bereiche im Chromosom wurden dabei nicht verändert. Über die, in den DNA-Fragmenten enthaltenen FRT sites konnte die Resistenzkassette wieder aus dem Genom entfernt werden (s.

Cycler-Programm:

94° C	2 min	
94° C	0:45 min	} 29x
54° C	0:45 min	
72° C	2:00 min	
72° C	10:00 min	

Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelution aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit). Die Konzentration sollte ideal ≥ 100 ng/ μ l betragen.

Die Vorbereitung der Zielstämme und die Elektroporation erfolgten wie bei der Deletion chromosomaler Gene über homologe Rekombination (Material und Methoden 3.2.4.12.3.).

III. Überprüfung der Insertion

Resistente Kolonien wurden vereinzelt, in LB mit Kan₃₀ angezogen und die Insertion mittels PCR verifiziert (mit umfassenden Primern/Resistenzkassetten-spezifischen Primern).

Die Entfernung der Resistenzkassette erfolgte wie bei der Deletion chromosomaler Gene über homologe Rekombination (Material und Methoden 3.2.4.12.3.).

3.2.5. Arbeiten mit RNA

Durch den Abbau von RNA durch RNasen müssen beim Arbeiten mit RNA besondere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden. Da RNasen weit verbreitet und durch einfaches Autoklavieren nicht zu zerstören sind, wurden zum Schutz der RNA sämtliche Puffer und Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem oder RNase-freiem Wasser (Fa. Qiagen, Hilden) angesetzt. Es wurden Handschuhe getragen und alle Arbeitsgeräte und der Arbeitsplatz vor RNA-Arbeiten mit 70% -igem (v/v) Ethanol gereinigt. Weiterhin wurden nur zweifach autoklavierte Verbrauchsmaterialien (Spitzen, Reaktionsgefäße) eingesetzt.

3.2.5.1. RNA-Isolierung aus *E. coli*

Von einer Übernachtskultur wurde eine 10 ml Hauptkultur zu einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je 2 ml der Kultur durch

5-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C pelletiert und das Pellet sofort in flüssigem N₂ schockgefroren. Die RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden) den Herstellerangaben folgend isoliert.

3.2.5.2. Agarosegelelektrophorese von RNA

Zur Gelelektrophorese von RNA wurden einerseits denaturierende Agarosegele (1,5%) mit einer Seitenlänge von 9 x 11 cm und einer Schichtdicke von circa 0,5 cm und andererseits Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Gelgießform und die Gelkammer wurden vor Gebrauch gründlich mit 70%-igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend erfolgte das Gießen der Gele. Hierzu wurde die erforderliche Menge Agarose vorgelegt und in 72 ml DEPC-Wasser durch Erhitzen im Mikrowellengerät gelöst. Die Agarose wurde dann mit 18 ml Formaldehyd und 10 ml 10x MOPS versetzt. Das Gel wurde nach dem Mischen sofort gegossen und konnte bei Raumtemperatur polymerisieren.

Nach Überschichten der Gele mit dem Laufpuffer (1x MOPS) wurden die Gele über Nacht bei 4°C gekühlt. Am folgenden Tag wurden die Kämmen entfernt und ein 10-minütiger Vorlauf bei 100 V durchgeführt. Die RNA-Proben enthielten 5 µg RNA und wurden in Eppendorfgefäßen mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl Probenvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden 5 µl Ethidiumbromid-haltiger RNA-Auftragspuffer (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) zugegeben. Vor dem Auftragen auf das denaturierende Formaldehyd-Gel wurden die Proben für 15 min bei 65°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis schockgekühlt. Nach dem Beladen wurden die RNA-Proben bei 100 V aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Bande das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend unter der Gel-Dokumentationsanlage Bio-Rad, München fotografiert.

3.2.5.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von RNA

Zur Auftrennung kleinerer RNA-Moleküle, im Bereich von 100-400 Nukleotiden, wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Diese erfolgte kontinuierlich in einem 8%-igen Polyacrylamid-Gel, dem Harnstoff in einer Endkonzentration von 7 M zugegeben wurde. Beim Gießen des Gels musste dieser zunächst vollständig in einem Gemisch aus Acrylamid, 1xTBE und Wasser gelöst, bevor die erforderlichen Mengen APS und TEMED zugegeben werden konnten. Die RNA-Proben vorbereitet. Die Taschen des Gels wurde durch gründliches Spülen mit Laufpuffer von überschüssigem Harnstoff befreit und die Proben zügig geladen. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE-Puffer. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 100V bis die

Bromphenolblau-Bande des Auftragspuffers (2x RNA-Ladepuffer ohne EtBr) das Ende des Gels erreichte

.

8%-ige Polyacrylamid Gele mit TBE-Puffer (15 ml)

6.3 g	Harnstoff 7 M
3 ml	AA/Bis 29:1 (40 %)
1.5 ml	10x TBE
5.25 ml	H ₂ O
<hr/>	
150 µl	10% APS
3 µl	TEMED

3.2.5.4. Northern-Blot von Agarosegelen (modifiziert nach (Engler-Blum *et al.*, 1993))

Der Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde mit Hilfe einer Vakuum-Blot-Anlage (GE Medical Systems, Solingen) durchgeführt. Die positiv geladene Nylonmembran zunächst mit sterilem deionisiertem Wasser benetzt und danach für 10 min in 20 x SSC inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf eine mit deionisiertem Wasser befeuchtete poröse Trägerplatte aufgelegt. Mit einer Maske aus Folie wurde der Blot abgedichtet und das Agarosegel auf die Membran und die Folienmaske aufgelegt. Ein Vakuum von circa 60 mm Hg wurde an die Vakuum-Kammer angelegt und das Gel nacheinander mit den folgenden Lösungen überschichtet:

1. 5 min Denaturierungslösung
2. 5 min Neutralisierungslösung
3. 4 - 5 h 20 x SSC

Beim Wechsel der Lösungen wurden Reste der vorherigen Lösung durch Abkippen entfernt. Nach Beendigung des Transfers wurde die RNA mittels UV-Licht (254 nm) für ungefähr 3 min an der Membran fixiert.

3.2.5.5. Northern Blot von Polyacrylamidgelen

Nach dem Gellauf erfolgte der Transfer der RNA auf die positiv-geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) mittels Semi-dry Elektroblothing. Dazu wurden Graphitplatten-Geräte (Eigenbau, Universität Göttingen) verwendet. Der Aufbau der Apparatur für den *Blot*

wurde wie in Abbildung 3.5 dargestellt aufgebaut. Das Prinzip beruht auf der Übertragung der negativ geladenen RNA-Moleküle auf die positiv-geladene Nylon-Membran durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Die Übertragung erfolgte für eine Stunde bei 15V, als Transferpuffer wurde 0,5x TBE verwendet.

3.2.5.6. Hybridisierung membrangebundener RNA mit DIG-markierten RNA Sonden

Die Hybridisierung von RNA-Molekülen mit spezifischen markierten Sonden, sowie deren Nachweis erfolgte für Northern Blots mit Polyacrylamid-Gelen und Agarose-Gelen.

Die Nylonmembran mit der UV-fixierten RNA wurde für 2 h mit 10 ml vorgewärmter Prähybridisierungslösung in Hybridisierungsröhrchen im Hybridisierungsöfen bei 68°C inkubiert. Zur Hybridisierung wurde 1 µl der gewünschten Sondenstammllösung zunächst in 1 ml vorgewärmtem Prähybridisierungspuffer verdünnt. Die Mischung wurde zum Prähybridisierungsansatz gegeben und die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal für 5 min bei Raumtemperatur in 5 ml Waschlösung I, sowie zweimal für 15 min bei 68°C in 5 ml vorgewärmter Waschlösung II inkubiert, um unspezifisch gebundene RNA-Sonde zu entfernen. Anschließend wurden die auf der Membran DIG-markierten RNA-RNA Hybride detektiert.

3.2.5.7. Detektion von RNA-RNA-Hybriden

Zunächst wurde die Membran für 5 min in 1x Puffer I und danach für 30 min bei Raumtemperatur in Puffer II inkubiert. Zur Detektion der hybridisierten Sonden mittels Anti-DIG-Antikörper gekoppelt mit alkalischer Phosphatase wurde der entsprechende Antikörper (Anti-DIG Fab, Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) im Verhältnis 1:10000 in Puffer II verdünnt und die Membran 30 min damit inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min in Puffer I gewaschen und für 5 min in Puffer III äquilibriert. Im letzten Schritt wurde die Membran zwischen eine Klarsichtfolie gelegt und mit 250 µl Puffer III, der 5 µl des Substrats der alkalischen Phosphatase, CDP*, enthielt, für 5 min inkubiert. Abschließend erfolgte die Auswertung des Blots im Lumi-Imager (Firma PeqLab, Erlangen), hierbei wurde die Chemilumineszenz detektiert, die bei der enzymatischen Spaltung von CDP* durch die Alkalische Phosphatase entsteht.

Puffer und Lösungen für RNA-Isolation und Northern Blot

Blocking-Lösung	10 % (w/v)	Blockingreagenz in Puffer I autoklaviert
Denaturierungslösung	50 mM 10 mM	NaOH NaCl autoklaviert
Lysozymlösung	25 mg	Lysozym/ml in H ₂ O _{dest.}
10x MOPS-Puffer	200 mM 50 mM 10 mM	MOPS Na-Acetat EDTA pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt und die Lösung wurde punktautoklaviert
Neutralisierungslösung	100 mM	Tris/HCl, pH 7,4 autoklaviert
10% N-Lauroylsarcosin	10% N-Lauroylsarcosin (w/v)	autoklaviert
Prähybridisierungs-Lösung (200 ml)	100 ml 50 ml 40 ml 2 ml 0,2 ml	100% Formamid 20 x SSC 10% Blocking-Lösung 10% N-Lauroylsarcosin 20% SDS
5xPuffer I	0,5 M 0,75 M	Maleinsäure NaCl pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt und autoklaviert
Puffer II	1% Blockingreagenz in 1x Puffer I	
Puffer III	0,1M 0,1M	Tris-HCl NaCl pH-Wert mit HCl auf 9,5 eingestellt und autoklaviert

20x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat
	pH-Wert mit HCl auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert	
10x TBE- Puffer	890 mM	Tris
	890 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA
	pH-Wert mit HCl auf pH 8,0 eingestellt und autoklaviert	
Waschlösung I	2x	SSC
	0,1%	SDS
Waschlösung II	0,1x	SSC
	1%	SDS

3.2.6. Arbeiten mit Proteinen

3.2.6.1. Proteinaufreinigung

3.2.6.1.1. Überproduktion von Proteinen

Zur Überexpression von Proteinen wurde 1l LB-Medium unter Zugabe der notwendigen Antibiotika mit einer Übernachtskultur der entsprechenden Transformante, die das Überexpressionsplasmid trug, auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft.

Die Kulturen wurden bei 37°C auf dem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,8 wurde die Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden für weitere 60 min inkubiert.

Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 8000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde in 10 ml ZAP-Puffer resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt.

3.2.6.1.2. Quervernetzung von Proteinen: SPINE

Um Interaktionspartner von Proteinen aufzureinigen wurde neben der normalen Überexpression von Proteinen die SPINE Methode durchgeführt (verändert nach (Herzberg *et al.*, 2007) . Hierbei wurden die Transformanten, wie unter 3.2.6.1.1. angezogen. Nach der einstündigen Induktionsphase zur Expression des Strep-Fusionsproteins wurde die wachsende Kultur mit einer Formaldehydlösung zu einer Endkonzentration von 0,4 % Formaldehyd [4% gelöst in PBS] versetzt. Die Kultur wurde unter langsamen Schwenken (90 rpm) für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Hiermit wurde die Quervernetzung der Zellbausteine erreicht. Die Zellen wurden wie oben , durch Zentrifugation geerntet.

3.2.6.1.3. Zellaufschluss

Anschließend wurde das Pellet in 10 ml ZAP-Puffer resuspendiert und mit der French Press bzw. mit dem One Shot Model aufgeschlossen.

Der Aufschluss erfolgte in der Digi-F-Press bei einem Zellinnendruck von 18000 psi. Beim One Shot Model wurden die Zellen bei einem Innendruck von 2500 psi zweimal aufgeschlossen.

Zur Entfernung von Zelltrümmern erfolgte eine erste Zentrifugation für 10 min bei 4°C und bei 8.000 rpm. Der gewonnene Überstand wurde in einem zweiten Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge für 1 h bei 4°C und 35.000 rpm weiter von Zelltrümmern befreit.

3.2.6.1.4. Aufreinigung von Proteinen über Ni²⁺-NTA Säulen

Zur Aufreinigung der Proteine mit fusionierter Decahistidin-Sequenz (am N- oder C-Terminus des Proteins) wurden Poly-Prep-Chromatographie-Säulchen der Firma Bio-Rad verwendet. Die Säule wurde zunächst mit 4 ml Ni-NTA Superflow der Firma QIAGEN, Hilden beladen und dann mit 10 ml ZAP-Puffer äquilibriert.

Der gewonnen Proteinrohextrakt wurde über die Säulematrix gegeben. Zuerst wurde zweimal mit 10 ml ZAP und gegebenenfalls mit 10 ml ZAP mit 0,5% TritonX gewaschen. Mit steigenden Imidazolkonzentrationen im ZAP-Puffer wurden zunächst unspezifisch bindende Proteine abgewaschen und danach das His-Tag-tragende Protein eluiert. Zum Waschen wurden je 6 ml 10 mM, 25 mM, 50 mM und 75 mM Imidazolösung auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgte bei Imidazol-Konzentrationen von 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM und 500 mM, wobei jeweils 4 ml der Lösungen auf die Säule aufgetragen wurden.

3.2.6.1.5. Aufreinigung von Proteinen über Streptaktin Säulen

Zur Aufreinigung der Proteine mit Strep-Tag wurden Poly-Prep-Chromatographie-Säulchen der Firma Bio-Rad verwendet. Die Säule wurde zunächst mit Streptaktin Sepharose (1 ml pro 1l Kultur) der Firma IBA beladen und dann mit 10 ml ZAP-Puffer äquilibriert.

Der gewonnene Proteinrohextrakt wurde über die Säulematrix gegeben. Durch das viermalige Waschen mit 10 ml Puffer W wurden zunächst unspezifisch bindende Proteine abgewaschen. Die Elution der Strep-Tag-tragenden Proteine erfolgte mit 3x 1ml Puffer E.

3.2.6.1.6. Aufreinigung von Proteinen im BATCH Verfahren

Dieses Aufreinigungsverfahren wurde angewendet, wenn die aufgereinigten Proteine und die möglicherweise koaufgereinigten niedermolekularen Stoffe massenspektrometrisch untersucht werden sollten. Hierzu wurden die Zellen wie gewohnt aufgeschlossen. Die Zellysate wurden in gekühlten 50 ml Glasröhrchen mit 1 ml Streptaktin Sepharose gemischt. Die Suspension wurde für 2 h bei 4°C unter schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose durch eine Zentrifugation (5000 rpm, 4°C, 15 min) pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und die Sepharose 15 min mit 10 ml Puffer W unter schwenken inkubiert. Nach dem Pelletieren der Sepharose wurde dieser Schritt dreimal wiederholt. Nach dem vierten Waschschritt wurde der Überstand abgenommen und die an die Sepharose gebundenen Proteine zur massenspektrometrischen Analyse gegeben.

3.2.6.1.7. Dialyse

Nach Überprüfung der erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.6.4.) wurde die gewünschte Fraktion dialysiert. Zur Lagerung werden aufgereinigte Proteine gegen 25% Glycerin-Puffer dialysiert (Yamamoto *et al.*, 2005). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Zunächst wurde ein Dialyseschlauch entsprechender Größe in 500 ml H₂O unter Zugabe von 1 mM EDTA aufgeköcht. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. In den vorgekühlten Dialyseschlauch wurden anschließend die Fraktion mit dem aufgereinigten Protein eingefüllt und der Schlauch fest verschlossen.

Die Dialyse fand im 1000fachen Probenvolumen statt, das heißt es wurden bei 4 ml Probe 4 l Puffer verwendet.

Der Schlauch mit der Proteinprobe wurde in vorgekühlten Puffer gegeben und bei 4°C unter leichtem Rühren über Nacht dialysiert.

3.2.6.2. Proteinnengenbestimmung (Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford. In einer Halbmikroküvette wurden 800 µl H₂O und 200 µl Roti[®]-Nanoquant Reagenz, der Firma ROTH vorgelegt und dann verschiedene Volumina des Proteins hinzugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD₅₉₅ bestimmt.

Mit Hilfe einer BSA-Stammlösung wurde zuvor eine Eichkurve für das Roti[®]- Nanoquant Reagenz erstellt, so konnte ein Umrechnungsfaktor von OD₅₉₅ 0,0514 = 1 µg/µl Protein bestimmt werden. Die Proteinkonzentration anhand der Extinktion (E₅₉₅) der Probe berechnet sich wie folgt:

Gleichung 1: Berechnung der Proteinkonzentration nach Bradford

$$\text{Konzentration} = \frac{E_{595}}{0,0514[1/\mu\text{g}] \cdot V[\mu\text{L}]} = [\mu\text{g} / \mu\text{L}]$$

Dabei wird das eingesetzte Volumen der Proteinlösung (V) ebenfalls einbezogen.

3.2.6.3. Gelelektrophoretische Untersuchungen

3.2.6.3.1. Herstellung von *E. coli*-Gesamtzellextrakten für die gelelektrophoretischen Untersuchungen

Von 5 ml Übernachtskulturen der zu untersuchenden Stämme/Transformanten in gewünschtem Medium wurden 10 ml-Hauptkulturen im selben Medium in 100 ml Kölbchen zu einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Das Medium wurde mit den erforderlichen Antibiotika versehen. Falls erforderlich, wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG (Stammlösung: 0.1 M) bzw. 0,2 % Arabinose (Stammlösung: 20 %) induziert. Die Kulturen wurden, wenn nicht anders angegeben bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0.5-0.8 wachsen gelassen. Anschließend wurde von jeder Kultur die Menge entsprechend 1 OD₆₀₀ in ein vorgekühltes 2 ml Eppendorf-Röhrchen auf Eis transferiert und abzentrifugiert (10 min, 4°C und 13000 rpm). Die Überstände wurden dekantiert und die Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Die Probenvorbereitung für die SDS-PAGE:

Die Pellets wurden in 200 µl 1× Laemmli-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 60°C erhitzt (Kochen ist unnötig und führt zur Zerstörung sensitiver Proteine!). Von den obigen Zellextrakten wurden 13 µl ($\equiv 0.065 \text{ OD}_{600}$; $\equiv 3.25 \text{ µg Protein}$) pro Spur aufgetragen.

Die Probenvorbereitung für native Gelelektrophorese:

Die Pellets wurden in 200 µl 1× nativem Auftragspuffer resuspendiert. Von den obigen Zellextrakten wurden 13 µl ($\equiv 0.065 \text{ OD}_{600}$; $\equiv 3.25 \text{ µg Protein}$) pro Spur aufgetragen.

3.2.6.3.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese Methode wird verwendet um ein Gemisch aus Proteinen (z. B. Zellextrakten) nach ihrer Größe aufzutrennen. Durch die Zugabe von SDS wird erreicht, dass die Faltung, aber auch die Ladung der Proteine aufgehoben wird und somit keinen Einfluss auf die Auftrennung haben. Nach der elektrophoretischen Auftrennung können Proteine entweder durch unspezifische Methoden, wie der Coomassie oder Silberfärbung aller Proteine detektiert werden. Oder aber man wendet die spezifische Immunodetektion mit mono- oder polyklonalen Antikörpern an. Das Auftrennen von Proteinen erfolgte durch SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration der Trenngele (Acrylamid:Bisacrylamid 29:1, 375 mM Tris/HCl pH 8.7, 0.1 % (w/v) SDS) wurde entsprechend dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine gewählt. Die Konzentration der Sammelgele war 5 % (5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 120 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.1 % (w/v) SDS). Die Polymerisation des Gels wurde durch Zugabe von 1 µl TEMED und 10 µl APS (10 % (w/v)) pro 1 ml Gellösung gestartet.

Beispiel: Es wurde ein 12.5 % Gel für die Hoefer SE-400-Apparatur gegossen. Die Länge des Trenngels betrug hierbei 11.5 cm, die des Sammelgels 2 cm von der Trenngelkante bis zur Unterkante der Geltaschen (Auf Glasplatten vor dem Gießen markiert).

Für 25 ml Trenngel:

6.25 ml	1.5 M Tris/HCl pH 8.7
7.81 ml	AA/Bis 29:1 (40%)
250 µl	10 % SDS
<u>10.69 ml</u>	<u>H₂O_{dest.}</u>
25 µl	TEMED
250 µl	APS (10 %)

Die Lösung wurde mit einer 25 ml Glaspipette in den Gießstand gefüllt. Danach wurde die Lösung mit Butanol zur Erzeugung einer glatten Gelkante überschichtet.

Für 15 ml Sammelgel:

1.8 ml	1 M Tris/HCl pH6.8
1.875 ml	AA/Bis 29:1 (40 %)
150 µl	10 % SDS
<u>11.18 ml</u>	<u>H₂O_{dest.}</u>
15 µl	TEMED
150 µl	APS (10 %)

Der Lauf der Gele erfolgte in SDS-Laufpuffer bei einer Feldstärke von 5 V/cm, solange sich die Proben im Sammelgel befanden und 13 V/cm, als der Blaumarker das Trenngel erreicht hatte. Für Hoefer SE400: Einlauf bei 90V; Hauptlauf bei 180 V oder über Nacht bei 40 V. Die Elektrophorese wurde beendet, als das Bromphenolblau den unteren Gelrand erreicht hatte. Bei Biorad Mini Protean Gelen erfolgte der Einlauf bei 50 V und der Hauptlauf bei 100 V.

3.2.6.3.3. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Diese Methode wird verwendet um ein Gemisch aus Proteinen (z.B. Zellextrakten) nach ihrer Größe aufzutrennen. Bei der nativen Gelelektrophorese wird kein SDS zu den Proben gegeben, sodass die Faltung der Proteine erhalten bleibt. Auch die Ladung der Proteine wird nicht aufgehoben, somit werden die Proteine entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung können Proteine entweder durch unspezifische Methoden, wie der Coomassie oder Silberfärbung aller Proteine detektiert werden. Oder aber man wendet die spezifische Immunodetektion mit mono- oder polyklonalen Antikörpern an.

Das Auftrennen von Proteinen erfolgte durch native PAGE nach dem Protokoll der Firma Lonza und der Methode von Pflüger (Pflüger *et al.*, 2007). Die Acrylamidkonzentration des Gel (ProSieve® 50 Gel Solution, 375 mM Tris/HCl pH 8.7) wurde entsprechend dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine gewählt. Die Polymerisation des Gels wurde durch Zugabe von 0,4 µl TEMED und 10 µl APS (10 % (w/v)) pro 1 ml Gellösung gestartet.

Beispiel: Es wurde ein 12 % Gel für die Bio-Rad Mini-PROTEAN II gegossen.

Für 10 ml Gellösung:

2,4 ml	ProSieve® 50 Gel Solution
2,5 ml	1.5 M Tris/HCl pH 8.7
<u>4,9 ml</u>	<u>H₂O_{dest.}</u>
4 µl	TEMED
100 µl	APS (10 %)

Der Laufpuffer und die Gelektrophoresekammer wurden auf Eiswasser vorgekühlt. Der Lauf der Gele erfolgte in nativem Laufpuffer bei einer Feldstärke von 13 V/cm auf Eiswasser. Die Elektrophorese wurde beendet, 1 h nachdem das Bromphenolblau den unteren Gelrand erreicht hatte.

3.2.6.3.4. Anfärben der Gele mit Coomassie R

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel direkt in Coomassie-Lösung überführt und für mindestens 30 min geschwenkt. Das Gel wurde für 1 min in H₂O gespült und anschließend für 5 min in Fixierlösung I inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift für 1 min in H₂O. Das Gel wurde für 2 × 30 min in Fixierlösung II geschwenkt, bis der Hintergrund klar und die Proteinbanden gut sichtbar waren. Das Gel wurde erneut mit H₂O gespült, anschließend eingescannt und zur Konservierung auf Whatman 3MM-Papier gelegt (doppellagig), mit Cellophan-Folie abgedeckt und für mindestens 2 h auf dem Geltrockner getrocknet.

3.2.6.3.5. Anfärben der Gele mit Silbernitrat

Bei der Silberfärbung handelt es sich um eine der sensitivsten Färbemethoden für Polyacrylamid-Gele, die sich besonders dann eignet, wenn die Reinheit eines Proteins überprüft oder Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden sollen. Ihr Vorteil liegt in der hohen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze: ca. 5 ng Protein pro Bande). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel direkt in Fixierlösung überführt und über

Nacht geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die Fixierlösung entfernt und das Gel für dreimal 30 min in einer 50%igen Ethanollösung unter Schwenken, inkubiert. Das Gel wurde 1 mi in Thiosulfatlösung inkubiert und dreimal kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen. Dann erfolgte eine Inkubation in Imprägnierlösung für 25 min, nach drei kurzen Waschschrinen mit Wasser wurde das Gel mit Entwickler gefärbt. Nach ausreichender Färbung wurde die Reaktion mit Stopplösung abgestoppt. Das Gel wurde in Wasser gelagert und später getrocknet.

Lösungen, Puffer und Marker für die Arbeiten mit Proteinen:

SDS-Laufpuffer:	25 mM	Tris
	184 mM	Glycin
	0.1 % (w/v)	SDS
1 × Laemmli-Puffer:	62.5 mM	Tris/HCl pH 6.8
	5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	2 % (w/v)	SDS
	10 % (v/v)	Glycerin
	0.05 % (w/v)	Bromphenolblau
Nativer Laufpuffer pH 8,7:	50 mM	Tris
	192 mM	Glycin
Nativer Auftragspuffer:	10 % (v/v)	Glyzerin
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
Coomassie-Lösung:	40 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0.4 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
Fixierlösung I:	40 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
Fixierlösung II:	20 % (v/v)	Ethanol
	5 % (v/v)	Essigsäure

Fixierer (100 ml)	50 ml	Methanol (100 %)
für Silberfärbung	12 ml	Essigsäure (100 %)
	100 µl	Formaldehyd (37 %)
	ad. 100 ml	deion. Wasser
Thiosulfatlösung (100 ml)	20 mg	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O
für Silberfärbung	ad. 100 ml	deion. Wasser
Imprägnierer (100 ml)	0,2 g	AgNO ₃
für Silberfärbung	37 µl	Formaldehyd (37 %)
	ad. 100 ml	deion. Wasser
Entwickler (100 ml)	6 g	Na ₂ CO ₃
für Silberfärbung	2 ml	Thiosulfatlösung
	50 µl	Formaldehyd (37 %)
	ad. 100 ml	deion. Wasser
Stopplösung (100 ml)	1,86 g	EDTA
für Silberfärbung	ad. 100 ml	deion. Wasser
ZAP-Puffer:	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	100 mM	NaCl
Dialyse-Puffer:	50 mM	Tris-HCl pH 7,6
	200 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	Dithiothreitol
	25 % (v/v)	Glyzerin
Puffer W:	100 mM	Tris-HCl pH 8.0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA

Puffer E:	100 mM	Tris-HCL pH 8.0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2.5 mM	D-Desthiobiotin
PBS:	140 mM	NaCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM	NaH ₂ PO ₄
	2.7 mM	KCl

3.2.6.4. Das Bakterielle Two-Hybrid System (Karimova *et al.*, 1998)

Das Two-Hybrid-System kann zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* eingesetzt werden. Das System basiert auf der Aktivität der bakteriellen Adenylate-Zyklase aus *Bordetella pertussis* und auf ihrer Rekonstruktion in einem *E. coli* *cyaA* Mutationsstamm. Die katalytische Domäne der Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis* besteht aus zwei Untereinheiten, T25 und T18 (siehe Abbildung 3.4).

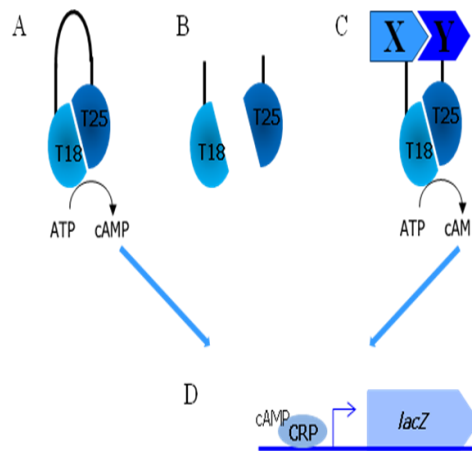


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des bakteriellen Two-Hybrid-Systems BACTH.

(A) Die katalytischen Domänen der Adenylatzyklase synthetisieren cAMP. (B) Die Domänen sind im getrennten Zustand inaktiv. (C) Sind die Domänen mit zwei interagierenden Proteinen (X und Y) fusioniert, ist die Aktivität wiederhergestellt. (D) Durch die Bildung von cAMP wird *lacZ* transkribiert.

Sind die beiden Domänen getrennt, so ist die Adenylat Zyklase inaktiv. Sind die beiden Fragmente mit zwei interagierenden Proteinen, X und Y, fusioniert, können auch die beiden Untereinheiten der Adenylat Zyklase interagieren. Das Protein ist aktiv und zyklischen cAMP wird synthetisiert. Das cAMP bindet als Koaktivator an das CAP Protein, so dass ein

Reportergen wie *lacZ* transkribiert werden. Die Induktion dieser Expression dient zum Nachweis der Interaktionen zwischen den untersuchten Proteinen. Für die Untersuchungen der Proteininteraktionen *in vivo*, können die zu untersuchenden Proteine sowohl N- als auch C-terminal mit den Fragmenten der Adenylat Zykase fusioniert werden. Für die Klonierungen der Plasmide werden unterschiedliche Vektoren verwendet, einmal für die Expression von T18-Fusionsproteinen (pUT18 und pUT18C) und für die Expression der T25-Fusionsproteine (pKT25 und p25-N). Für die Klonierungen wurde der Stamm XL1-Blue verwendet, *lacI* wird in diesem Stamm stark exprimiert und verhindert die Expression der Fusionsproteine. So können auch Gene kloniert werden, deren Produkte für die Zelle letal sind oder einen Wachstumsdefekt verursachen. Für die Interaktionsanalyse wird ein *E. coli*-Stamm mit einer mutierten Adenylat Zykase (BTH101) verwendet. Als Positivkontrolle nutzt man die beiden Plasmide pKT25-*zip* und pUT18C-*zip*, als Negativkontrolle die Leervektoren. Durch die Dimerisierung der Proteine des Leucin-Zippers kommt es bei der Positivkontrolle zu einer hohen cAMP Synthese und die Transformanten zeigen hohe β -Galaktosidase Aktivitäten. Die Transformanten der Negativkontrolle zeigen nur geringe β -Galaktosidase Aktivitäten. Die Interaktionen können mit phänotypischem und quantitativem β -Galaktosidase Test analysiert werden.

3.2.6.5. Messungen der Alkalischen Phosphatase Aktivität

Die Bestimmung von Alkalischer Phosphatase-Enzymaktivität erfolgt nach der, von (Brickman and Beckwith, 1975) beschriebenen Methode mit leichten Modifikationen. Die Alkalische Phosphatase (AP) spaltet das künstliche Substrat PNP in Orthophosphat und o-Nitrophenol, dessen Absorption bei 420 nm quantitativ bestimmt werden kann. Die Menge an pro Zeiteinheit freigesetztem o-Nitrophenol ist bei Substratsättigung ein direktes Maß für die vorhandene AP-Aktivität.

Durchführung

Von 5 ml der Vorkulturen wurden 15 ml Hauptkulturen zu einer OD_{600} von 0,1 angeimpft. Wenn nicht anders angegeben wurden die Hauptkulturen bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} zwischen 0,5 und 0,8 (exponentielle Phase) inkubiert und dann durch sofortiges Kühlen auf Eis abgestoppt. 1 ml jeder Kultur wurde abzentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 5 min), bei -20°C eingefroren oder sofort für Aktivitätstests eingesetzt Für die Messung wurden die Zellpellets in 1 ml Tris-Puffer resuspendiert. Von jeder Kultur wurden drei verschiedene geeignete Verdünnungen mit Tris-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 1 ml in 2 ml-Eppendorfgefäßen

angelegt. Als Referenz wurde 1 ml Tris-Puffer eingesetzt. Um die Zellen durchlässig zu machen, wurde jede Verdünnung mit 50 µl Chloroform und 25 µl 0,1%-iger SDS-Lösung versetzt. Durch 15-sekündiges Vortexen wurde die Zellmembran durchlässig gemacht. Die Ansätze wurden zunächst für 5 min bei 37°C vorinkubiert und dann durch Zugabe von 200 µl PNP-Lösung die Reaktion gestartet. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl 1 M K₂HPO₄ gestoppt. Der Grad der Gelbfärbung wurde bei 420 nm (A₄₂₀) im Photometer gegen den mitgeführten Referenzwert gemessen. Die Alkalische Phosphatase-Aktivität einer Probe wurde nach Gleichung 2 berechnet. Hierzu wurde die Verdünnung der Probe bei der A₄₂₀ berücksichtigt. Außerdem muss die OD bei 550 nm gemessen werden.

Eine Einheit (u) AP, die von einer OD₆₀₀ Zellen pro Minute freigesetzt wird, berechnet sich durch:

Gleichung 2: Berechnung der AP-Aktivität in Units. t: Inkubationszeit der Reaktion bei 37°C, V: Verdünnungsfaktor

$$1 \text{ unit} = 1000 \times \frac{OD_{420} - 1,75 \times OD_{550}}{t \times OD_{600}} \times V$$

Puffer und Lösungen für den AP-Test

PNPG-Lösung: 0.5% (w/v) p-Nitrophenyl-Phosphate (0.5% PNP) in Tris Puffer

Tris Puffer: 1 M Tris/HCl pH 8,0
1 mM MgCl₂

1 M K₂HPO₄

0,1% SDS

Chloroform

3.2.6.6. Enzymaktivitätsbestimmungen: β-Galaktosidase-Aktivitätstests

Die von *lacZ* kodierte β-Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse von Laktose zu D-Galaktose und D-Glukose. Das Enzym ist allerdings nur für den Galaktoseteil des Substrats spezifisch, so dass es ein breites Spektrum an Substraten spalten kann. Aus diesem Grund kann das Enzym als Reporter für die Untersuchung der Expression verschiedener Gene genutzt werden. Hierzu

können zu untersuchende Gene oder entsprechende Zielgene der zu untersuchenden Gene an *lacZ* fusioniert werden und dann die Expression von *lacZ* phänotypisch oder quantitativ untersucht werden.

3.2.6.6.1. Phänotypischer β -Galaktosidase-Aktivitätstest

Um *E. coli* Zellen phänotypisch auf die Expression der β -Galaktosidase hin zu überprüfen wurde auf zwei Weisen vorgegangen. Zum Einen wurden die Bakterien auf Nähragarplatten ausgestrichen, die mit X-Gal Lösung supplementiert wurden. Die β -Galaktosidase kann X-Gal als Substrat nutzen. Bei dessen Spaltung wird ein blauer Farbstoff freigesetzt. Wenn die Zellen die β -Galaktosidase exprimieren, resultiert dies in einer Blaufärbung der entstandenen Kolonien. Zum Anderen wurden MacConkey-Agarplatten eingesetzt, die den Zucker Laktose enthielten. *E. coli*-Zellen, welche die β -Galaktosidase exprimieren, spalten die Laktose und verwerten sie als Substrat. Dabei produziert *E. coli* Säuren, die zur Rotfärbung eines in den Platten enthaltenen Indikators führt. Da MacConkey-Medium auch Wachstum erlaubt, wenn die Laktose nicht verwertet wird, kann man zwischen roten, β -Galaktosidase exprimierenden Kolonien, und farblosen Kolonien, die das Enzym nicht exprimieren, unterscheiden.

3.2.6.6.2. Quantitativer β -Galaktosidase-Aktivitätstest nach (Miller, 1972), leicht modifiziert)

Um die β -Galaktosidase-Aktivität in einer Kultur quantitativ zu bestimmen, wurde das künstliche Substrat ONPG eingesetzt, welches in Galaktose und o-Nitrophenol gespalten wird. O-Nitrophenol ist ein gelber Farbstoff und kann photometrisch bei 420 nm quantifiziert werden.

Durchführung

Von 5 ml der Vorkulturen wurden 15 ml Hauptkulturen zu einer OD_{600} von 0,1 angeimpft. Wenn nicht anders angegeben wurden die Hauptkulturen bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} zwischen 0,5 und 0,8 (exponentielle Phase) inkubiert und dann durch sofortiges Kühlen auf Eis abgestoppt. 1 ml jeder Kultur wurde abzentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 5 min), die Pellets bei -20°C eingefroren oder sofort für Aktivitätstests eingesetzt. Hierfür wurden sie in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. Von jeder Kultur wurden drei verschiedene geeignete Verdünnungen mit Z-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 1 ml in 2 ml-Eppendorfgefäßen angelegt. Als Referenz wurde 1 ml Z-Puffer eingesetzt. Um die Zellen durchlässig zu machen, wurde jede Verdünnung mit 50 μ l Chloroform und 25 μ l 0,1%-iger SDS-Lösung versetzt. Durch 15-sekündiges

Vortexen wurde die Zellmembran durchlässig gemacht. Die Ansätze wurden zunächst für 5 min bei 28°C vorinkubiert und dann durch Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung die Reaktion gestartet. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Der Grad der Gelbfärbung wurde bei 420 nm (A₄₂₀) im Photometer gegen den mitgeführten Referenzwert gemessen. Die β-Galaktosidase-Aktivität einer Probe wurde nach Gleichung 3 berechnet. Hierzu wurde die Verdünnung der Probe bei der A₄₂₀ berücksichtigt.

Gleichung 3: Berechnung der LacZ-Aktivität in Miller Units. t: Inkubationszeit der Reaktion bei 28°C, V:Verdünnungsfaktor

$$\text{Miller Units} = \frac{\text{OD}_{420} \times 1000}{t \times \text{OD}_{600}} \times V$$

Puffer und Lösungen für β-Galaktosidase-Aktivitätstests:

ONPG-Lösung:	60 mM	Na ₂ HPO ₄
	40 mM	NaH ₂ PO ₄
	4 mg/ml	ONPG
Z-Puffer:	60 mM	Na ₂ HPO ₄
	40 mM	NaH ₂ PO ₄
	10 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄
	100 µg/ml	Chloramphenicol
	20 mM	β-Mercaptoethanol

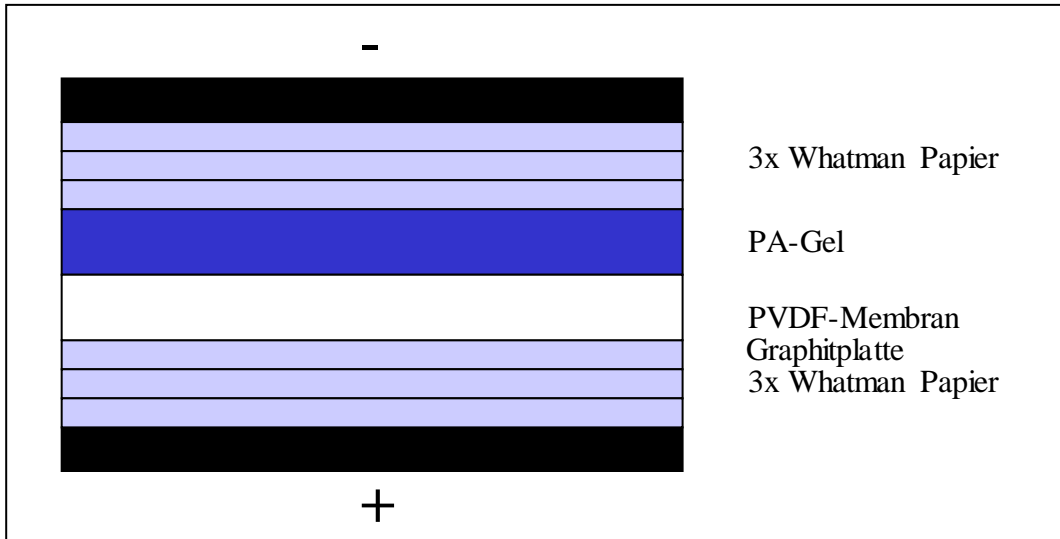
Chloramphenicol und β-Mercaptoethanol wurden am Tag des Gebrauchs jeweils frisch zum benötigten Puffervolumen zugegeben.

3.2.6.7. Immunodetektion von Proteinen: Western Blot

Die Proteine wurden zunächst durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) oder native Gelelektrophorese aufgetrennt (Material und Methoden 3.2.6.3.2. und 3.2.6.3.3.). Anschließend erfolgt die Übertragung der Proteine mittels einer Semi Dry Blotting Apparatur auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Dabei wurden die durch das SDS negativ geladenen Proteine durch das Anlegen eines elektrischen

Feldes und ihre Bewegung zum positiven Pol auf die PVDF-Membran übertragen (60 mA für h). Der Aufbau des Blots ist in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt

Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau einer Semidry Western Blot Apparatur: Beim Semidry Blot werden das Polyacrylamidgel und die PVDF-Membran zwischen je drei zuvor in



Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere gelegt. Das angelegte elektrische Feld wird durch die sich oben und unten befindlichen Graphitplatten geleitet. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern nun in Richtung der Anode und können so auf die durch Methanol aktivierte PVDF-Membran übertragen werden.

Anschließend konnten Proteine durch spezifische Antikörper detektiert werden. Zunächst erfolgte die Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Membran, indem die Membran unter Schütteln für mindestens 3 Stunden in Blotto inkubiert wurde. Dies ist nötig, da die verwendeten Antikörper sonst auch diese Bindungsstellen besetzen und eine spezifische Detektion von Proteinen unmöglich machen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper für 3 Stunden. Dieser Antikörper ist spezifisch gegen ein zelluläres Protein von *E. coli* oder einen bestimmten Affinitätstag gerichtet und erlaubt somit die Detektion eines spezifischen Proteins aus einem aufgetrennten Zellextrakt. Danach wurde die Membran dreimal für 30 min mit Blotto gewaschen und anschließend für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen Antikörper) behandelt. Dieser zweite Antikörper bindet spezifisch an andere Antikörper und dient somit der Detektion des ersten Antikörpers. Die weitere Besonderheit liegt darin, dass dieser Antikörper mit einem Enzym konjugiert ist, der alkalischen Phosphatase. Nach drei weiteren Waschschritten in Blotto für jeweils 20 min, wurde die Membran für 5 min in Puffer III inkubiert um den pH-Wert anzuheben und die Voraussetzung für die Aktivität der alkalischen Phosphatase zu schaffen. Anschließend wurde die Membran zwischen Klarsichtfolien gelegt und das Substrat (CDP-Star) des Enzyms in einer 1:100 Verdünnung in Puffer III zugeben. Durch die Spaltung des Substrats konnte das spezifische Protein durch die

Entwicklung im „Lumi Imager“ (Chemilumineszenz-System ChemiSmart von Peqlab) nachgewiesen werden.

3.2.6.8. Far Western

Um die Interaktion von Proteinen miteinander oder von Proteinen mit anderen Substanzen (z.B. zelluläre Metabolite oder Membranbestandteile) *in vitro* zu untersuchen, kann die Far Western Technik angewendet werden.

3.2.6.8.1. Protein-Protein Interaktionen

Hierbei wurden 5; 1; 0,5; 0,25 und 0,1 μg der aufgereinigten Proteine (möglicher Interaktionspartner, ein Kontrollprotein und BSA) in einem Endvolumen von 10 μl mit Dialysepuffer verdünnt. Anschließend wurden die Proteinlösungen auf eine Nylonmembran getropft. Als Kontrollen dienten hierbei 10 μl Dialysepuffer und 0,2 μg des Testproteins (siehe Abbildung 3.6).

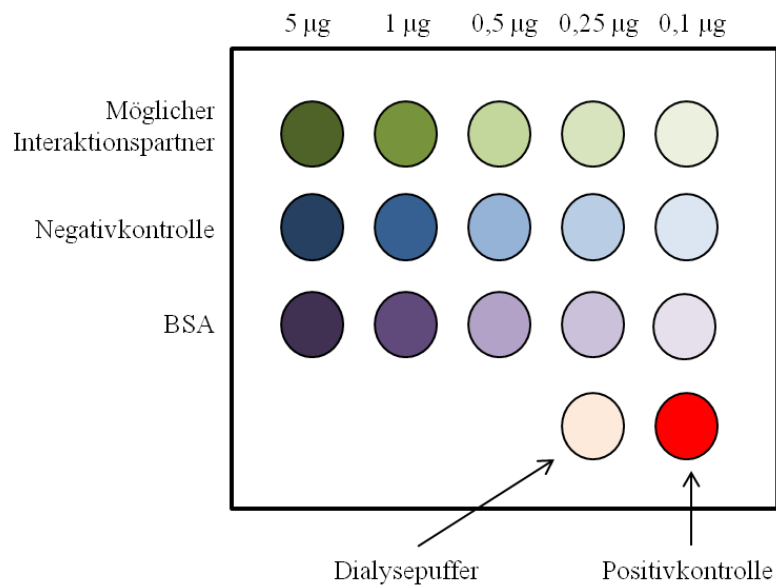


Abbildung 3.6: Schema eines Far Western Blots. Mögliche Interaktionspartner und Kontrollen wurden auf eine Nylonmembran getropft

Nachdem die Membran bei Raumtemperatur 10 min getrocknet wurde, erfolgte zunächst die Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Membran, durch das Schütteln der Membran für 2 Stunden in Blotto. Dies ist nötig, da das Testprotein sonst auch unspezifisch an die Kontrollproteine oder die Membran binden könnte. Anschließend wurde die Membran zweimal

Transferpuffer:	15,1 g Tris 72,1 g Glycin 750 ml Methanol 100% ad 5l mit H ₂ O _{dest}
Blotto:	100 ml 10x TBS 25 g Magermilchpulver 1 ml Tween 20 ad 1l mit H ₂ O _{dest}
Puffer III:	12,1 g Tris-HCl pH 9,5 5,8 g NaCl ad 1l mit H ₂ O _{dest}

3.2.6.9. *In vitro* Phosphorylierung von Proteinen mit [³²P]-ATP

Die Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie wie unter 2.2.6.1. beschrieben aufgereinigt und dann dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford Assay (2.2.6.2.) bestimmt. Für die Autophosphorylierungsassays von PhoR wurde das Protein zu einer Endkonzentration von 1 µM in Reaktionspuffer 5 min bei 25°C vorinkubiert. Zum Zeitpunkt t₀ wurde nicht radioaktiv markiertes 2µl ATP [1 µM] und 1 µl [γ-³²P] ATP (10µCi/µl) [2 µM] hinzugegeben um die Autophosphorylierung von PhoR zu starten. Um den Einfluss von EIIA^{Ntr} auf die Autophosphorylierung zu untersuchen wurde entweder Dialysepuffer oder 5,3 µM EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}(H73A) zum Zeitpunkt t₀ hinzugegeben. Jeweils nach 2, 4 und 10 min wurde ein Drittel des Reaktionsansatzes entnommen und mit 2x Laemmli gemischt und bis zur Auftragung auf ein SDS-Gel auf Eis inkubiert.

Ebenfalls wurde der Phosphoryltransfer von PhoR auf PhoB analysiert. Hierzu wurde wie oben beschrieben, PhoR für 10 min vorphosphoryliert. Nach dieser Inkubationszeit wurde 5,3 µM aufgereinigtes PhoB hinzugegeben. Zeitgleich wurde für die Untersuchung des Einflusses von EIIA^{Ntr} auf den Phosphoryltransfer oben beschriebene Mengen an Dialysepuffer, EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}(H73A) hinzugegeben. Ebenfalls nach 2, 4 und 10 min wurde ein Drittel des Reaktionsansatzes entnommen und mit 2x Laemmli gemischt und bis zur Auftragung auf ein SDS-Gel auf Eis inkubiert.

Danach wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.2.6.9.1. Auswertung radioaktiver Gele mit dem Bio Imaging Analyzer

Radioaktive Gele wurden durch Autoradiographie und mit einem Bio Imaging Analyzer ausgewertet. Die Gele wurden auf einer lichtempfindlichen Imaging plate exponiert. Mit einem Bildplatten-Scanner und unter Verwendung des Software-Programms Storm 860 (GE Healthcare Life Sciences, München) wurden die auf der Imaging plate gespeicherten Informationen in Bitmap-Bilddaten (Graustufen) umgesetzt. Mit dem Software-Programm ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences, München) wurden die Bilddaten quantitativ ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Regulation des Kaliumtransportsystems KdpFABC durch das PTS^{Ntr}

Vorangegangene Phosphoproteomanalysen zeigten, dass die Überproduktion von EIIA^{Ntr} zu der Akkumulation der phosphorylierten Form von KdpB führt. Das KdpB Protein ist eine Untereinheit des Kaliumtransporters KdpFABC. Western Blot Analysen zeigten, dass die Menge an KdpB, aber nicht dessen Phosphorylierung durch die Anwesenheit von EIIA^{Ntr} stimuliert wurde (Lüttmann *et al.*, 2009). Ausgehend von diesen initialen Beobachtungen sollten nun untersucht werden wie sich die unterschiedlichen Komponenten des PTS^{Ntr} auf den Kaliumtransporter KdpFABC auswirken.

4.1.1. Das PTS^{Ntr} moduliert die Mengen der Proteine KdpB und KdpC, Untereinheiten des Kaliumtransporters KdpFABC

EI^{Ntr} und NPr sind für die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} zuständig. Im Wildtyp liegt EIIA^{Ntr} hauptsächlich in der phosphorylierten Form vor (s. Abb. 4.1.10). Durch die Deletion von *ptsP* (kodiert für EI^{Ntr}) und *ptsO* (kodiert für NPr) liegt mehr EIIA^{Ntr} in der unphosphorylierten Form vor als im Wildtyp (Zimmer *et al.*, 2008). Nun sollte untersucht werden, ob sich der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} auf die Mengen an KdpB und KdpC in den Zellen auswirkt. Hierzu wurden Zellen des Wildtyps, der $\Delta ptsN$ Mutante und die $\Delta ptsP$ Deletionsmutante in Medium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen angezogen. Die Gesamtzellextrakte wurden durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde KdpB durch einen Western Blot detektiert (Abbildung 4.1.1).

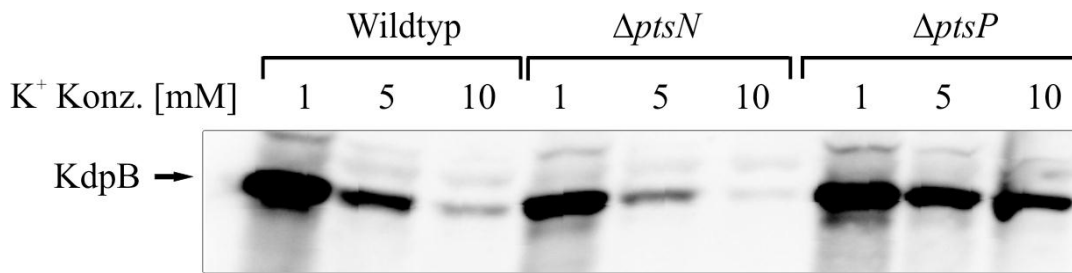


Abbildung 4.1.1: Mutationen im PTS^{Ntr} wirken sich auf die Mengen an KdpB aus. Der Wildtyp (R1279), eine $\Delta ptsN$ Mutante (Z79) und die $\Delta ptsP$ Mutante (R2404) wurden in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen angezogen. Die Gesamtzellextrakte der Stämme wurden durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und KdpB und KdpC durch einen Western Blot mit KdpB/KdpC Antiserum sichtbar gemacht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Menge an KdpB durch die verwendete Kaliumkonzentration im Medium und durch den Stammhintergrund bestimmt wird. Während bei einer geringen Kaliumkonzentration große Mengen von KdpB vorliegen, nimmt seine Menge mit steigender Kaliumkonzentration ab (vgl. jeweils Spuren 1-3 jedes Stammes miteinander). Die Deletion von $\Delta ptsN$ führt zu einer Verminderung der Menge an KdpB im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Spur 1 mit 4, 2 mit 5 und 3 mit 6 in Abbildung 4.1.1). Die Deletion von $ptsP$ bewirkt das Gegenteil, hier ist bei allen untersuchten Kaliumkonzentrationen mehr KdpB vorhanden als im Wildtyp unter gleichen Anzuchtbedingungen (vgl. Spur 4 mit 7, 5 mit 8 und 6 mit 9 in Abbildung 4.1.1). Abschließend kann davon ausgegangen werden, dass EIIA^{Ntr} positiv auf die Menge an KdpB in der Zelle auswirkt. Die Deletion von $ptsP$ und die daraus resultierenden Veränderung der Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} beeinflusst die zellulären Mengen an KdpB auch. Liegt mehr unphosphoryliertes EIIA^{Ntr}, so sind die detektierten Mengen an KdpB und KdpC vergleichsweise höher.

4.1.2. Die Transkription des *kdpFABC*-Operons wird durch das PTS^{Ntr} reguliert

Um zu untersuchen durch welchen Mechanismus die zelluläre Menge an KdpB durch das PTS^{Ntr} reguliert wird, wurde die Transkription des *kdp*-Operons analysiert. Hierfür wurde eine *kdpFA'-lacZ*-Fusion verwendet. Es wurde bereits früher gezeigt, dass die Expression dieser *lacZ*-Fusion von der Kaliumkonzentration des Mediums abhängt

(Lüttmann *et al.*, 2009). Die Erhöhung der Kaliumkonzentration reprimiert die Expression des *kdp*-Operons (Walderhaug *et al.*, 1992). In der $\Delta ptsN$ Mutante ist die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen stets geringer als im Wildtyp. Diese Regulation erfolgt unabhängig von der $EIIA^{Ntr}$ -vermittelten Inaktivierung des Kaliumtransporters Trk, da sie auch in einer $\Delta trkA$ Mutante noch zu beobachten ist (Lüttmann *et al.*, 2009).

Im Folgenden wurde nun die Expression der transkriptionellen *kdpFA'-lacZ*-Fusion in Stämmen analysiert in denen einzelne oder zwei Gene des PTS^{Ntr} Systems gleichzeitig deletiert wurden. Nachdem gezeigt wurde, dass das PTS^{Ntr} die Mengen an KdpB in der Zelle verändert, sollte nun analysiert werden, ob die Transkription des *kdp*-Operons durch die Komponenten des PTS^{Ntr} reguliert wird. Durch die Untersuchungen sollte auch geklärt werden, ob EI^{Ntr} und NPr über die Modulation von $EIIA^{Ntr}$ auf die Expression des *kdp*-Operons wirken (Abbildung 4.1.2 und 4.1.3).

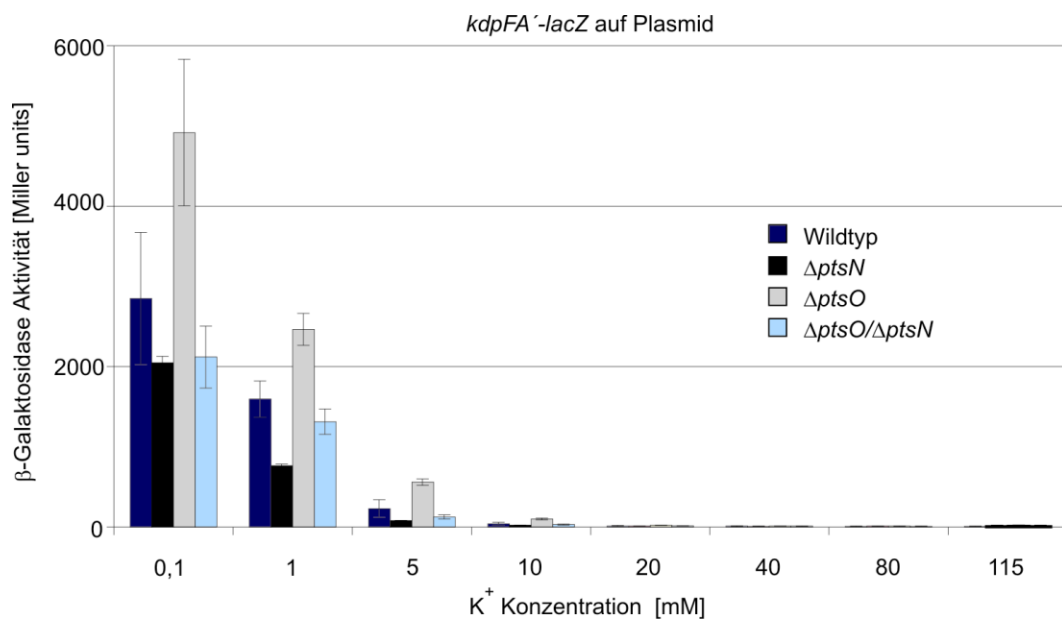


Abbildung 4.1.2: Einfluss von NPr auf die Transkription der *kdpFA'-lacZ*-Fusion.

Der Wildtyp (R1279), die isogene $\Delta ptsN$ Mutante, sowie die $\Delta ptsO$ Mutante (Z80) und die $\Delta ptsN-O$ Mutante (R1213) wurden mit einem Plasmid, welches eine *kdpFA'-lacZ*-Fusion trug (pBGG158), transformiert. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen angezogen. Die Zellen wurden geerntet und es wurden β -Galaktosidase Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

In allen untersuchten Stämmen nahm die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion mit steigender Kaliumkonzentration ab (Abbildung 4.1.2 und 4.1.3). Bei gleicher

Kaliumkonzentration wurde in der $\Delta ptsN$ Mutante stets eine geringere β -Galaktosidase-Aktivität gemessen als für den Wildtyp (vgl. schwarze mit dunkelblauen Säulen in Abbildung 4.1.2). In den $\Delta ptsO$ und $\Delta ptsP$ Mutanten war die β -Galaktosidase-Aktivität immer höher als im Wildtyp (vgl. jeweils graue mit dunkelblauen Säulen in Abbildung 4.1.2 und 4.1.3). In einer $\Delta ptsO$ Mutante waren die Werte nur leicht höher als im Wildtyp. In der $\Delta ptsP$ Mutante war ein deutlicherer Anstieg der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp und auch zur $\Delta ptsO$ Mutante zu beobachten. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Reporterfusion korrelieren somit mit den Ergebnissen des Western Blots. Die erhöhte Menge an KdpB in der $\Delta ptsP$ Mutante, die in den Western Blot Analysen detektiert worden war (s. Abb 4.1.1), kann also auf eine verstärkte Transkription des *kdp*-Operons zurückgeführt werden. Durch die Untersuchungen von $\Delta ptsP/\Delta ptsN$ und $\Delta ptsO/\Delta ptsN$ Doppelmutanten sollte auch geklärt werden, ob EI^{Ntr} und NPr indirekt durch die Änderung des Phosphorylierungszustandes von $EIIA^{Ntr}$ auf die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion wirken.

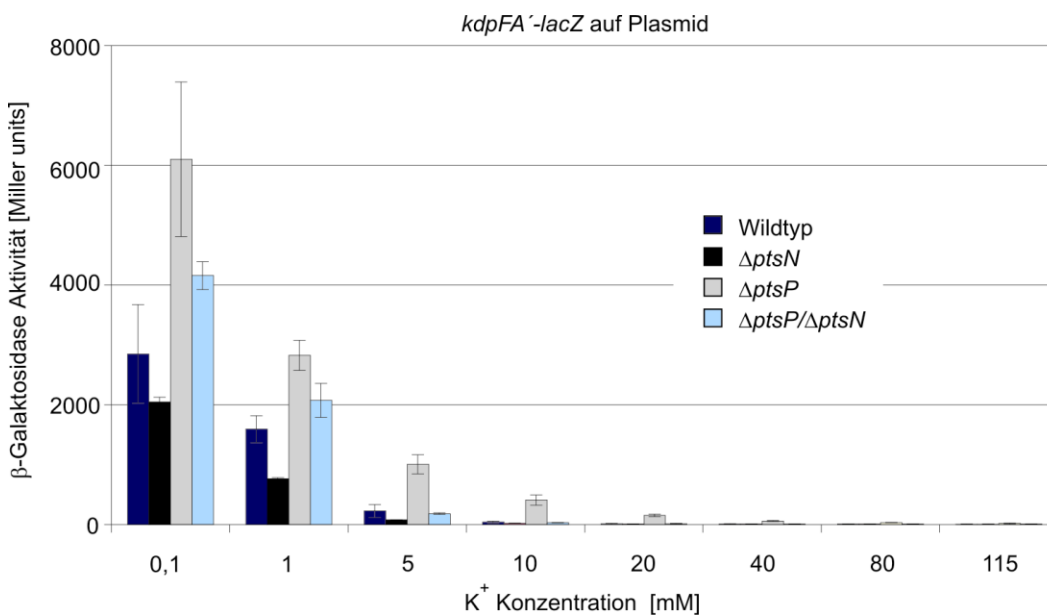


Abbildung 4.1.3: Einfluss von EI^{Ntr} auf die Transkription der *kdpFA'-lacZ*-Fusion.

Der Wildtyp (R1279), die isogene $\Delta ptsN$ Mutante, sowie die $\Delta ptsP$ Mutante (R2404) und die $\Delta ptsP \Delta ptsN::cat$ Mutante (Z288) wurden mit einem Plasmid, welches eine *kdpFA'-lacZ*-Fusion trug (pBGG158), transformiert. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen angezogen. Die Zellen wurden geerntet und es wurden β -Galaktosidase Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Für beide Doppelmutanten fiel auf, dass die gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten weit unter denen der jeweiligen $\Delta ptsO$ und $\Delta ptsP$ Einzelmutanten lagen. Dies war bei allen untersuchten Kaliumkonzentrationen der Fall (vgl. jeweils hellblaue mit grauen Säulen in Abbildung 4.1.2 und 4.1.3). Die zusätzliche Deletion von $ptsN$ in den $\Delta ptsO$ und $\Delta ptsP$ Mutanten führte also zu einer Erniedrigung der kdp -Expression. In Abwesenheit von EI^{Ntr} und NPr zeigte sich eine Verstärkung der kdp -Expression im Vergleich zum Wildtyp. Diese konnte durch die Deletion von $\Delta ptsN$ und $\Delta ptsO$ bzw. $\Delta ptsN$ und $\Delta ptsP$ wieder erniedrigt werden. Dies bedeutet, dass die Deletion von $\Delta ptsO$ keinen Effekt mehr auf die Expression der $kdpFA'$ - $lacZ$ -Fusion zeigen, wenn kein $EIIA^{Ntr}$ vorhanden ist (vgl. hellblaue mit schwarzen Säulen in Abbildung 4.1.2). In der $\Delta ptsP/\Delta ptsN$ Mutante verhielt sich dies etwas anders, hier ging die Aktivität nur auf die des Wildtyps, aber nicht auf die der $\Delta ptsN$ Mutante zurück (vgl. hellblaue mit dunkelblauen und schwarzen Säulen in Abbildung 4.1.3). Dieser Effekt müsste noch erforscht werden. Allerdings kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass EI^{Ntr} und NPr über die Modulation des Phosphorylierungszustandes auf die Expression des kdp -Operon wirken. $EIIA^{Ntr}$ stimuliert dabei die Expression des kdp -Operons unabhängig von der Kaliumkonzentration. EI^{Ntr} und NPr verändern den Phosphorylierungszustand von $EIIA^{Ntr}$, dies bewirkt wiederum eine Veränderung der Expression des kdp -Operons. Dies lässt vermuten, dass der Phosphorylierungszustand von $EIIA^{Ntr}$ entscheidend für die Regulation ist. Aus diesem Grund wurde analysiert welche Wirkung $EIIA^{Ntr}$ -Varianten, deren Phosphorylierungsstelle mutiert ist, auf die Expression der $kdpFA'$ - $lacZ$ -Fusion haben.

4.1.3. Der Phosphorylierungszustand von $EIIA^{Ntr}$ ist entscheidend für die Regulation der Expression des kdp -Operons

Im Folgenden wurde die Auswirkung der Überproduktion von $EIIA^{Ntr}$ auf die Mengen an $KdpB$ und $KdpC$ untersucht. Es wurden sowohl das Wildtyp $EIIA^{Ntr}$, als auch mutante $EIIA^{Ntr}$ -Varianten überproduziert. In diesen mutante Varianten wurde die Phosphorylierungsstelle Histidin73 gegen andere Aminosäuren ausgetauscht um die phosphorylierte und unphosphorylierte Form des Proteins zu simulieren. Für die Untersuchungen wurden Plasmide, die verschiedene Allele von $ptsN$ (kodiert für

EIIA^{Ntr}) unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors trugen, in die $\Delta ptsN$ Mutante eingebracht. Dabei handelte es sich einmal um das Wildtyp *ptsN*-Gen, sowie um mutante Allel in denen das Kodon für Histidin 73 gegen Kodons für Alanin bzw. Aspartat ausgetauscht waren. Die EIIA^{Ntr} Proteine mit diesen Aminosäureaustauschen können nicht mehr phosphoryliert werden (Zimmer *et al.*, 2008).

Die Transformanten wurden in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen angezogen und anschließend geerntet. Die Proteine der gewonnenen Zellextrakte wurden durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte ein Western Blot um die zellulären Mengen von KdpB und KdpC zu detektieren (Abbildung 4.1.4).

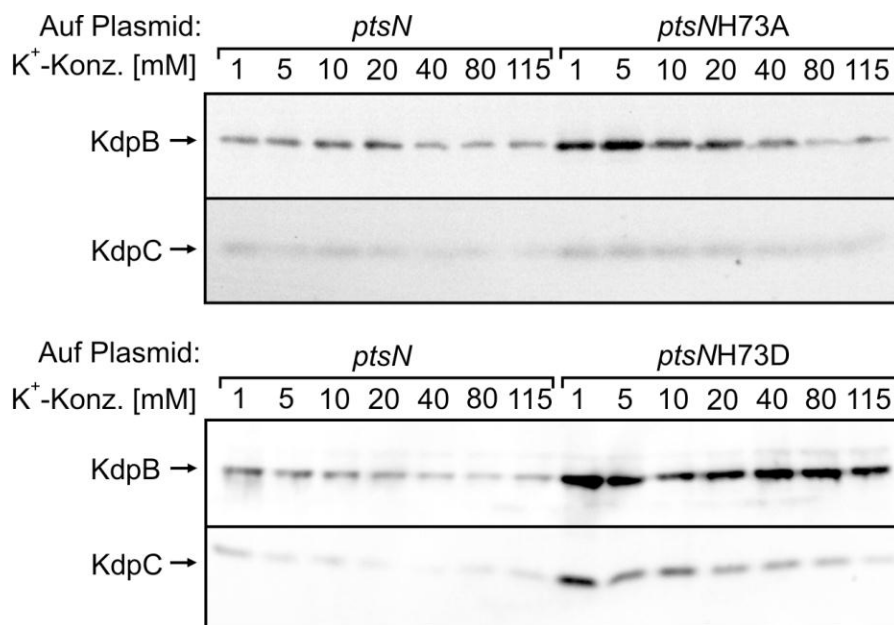


Abbildung 4.1.4: Die Untereinheiten KdpB und KdpC des Kaliumtransporters KdpFABC akkumulieren bei Überproduktion von EIIA^{Ntr}. Die $\Delta ptsN$ Mutante (Z79) mit Arabinose-induzierbarem *ptsN*-, *ptsN*-H73A und *ptsN*-H73D-Überexpressionsplasmiden (pBGG86; pBGG93 und pBGG92) wurde unter Zugabe von Arabinose in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen angezogen. Die Gesamtzellextrakte wurden durch eine denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und KdpB und KdpC durch einen Western Blot mit KdpB/C Antiserum sichtbar gemacht

In den Western Blot Analysen konnten nur die KdpB und KdpC Untereinheiten des Kaliumtransporters KdpFABC detektiert werden. KdpA und KdpF sind hydrophobe Proteine und sind durch das verwendete KdpFABC Antiserum nicht zu detektieren. In Folge der Überexpression von *ptsN* wurden bei allen untersuchten

Kaliumkonzentrationen Signale für KdpB und KdpC detektiert (s. Abbildung 4.1.4). Die Überexpression der beiden mutierten Allele von *ptsN* (*ptsNH73A* und *ptsNH73D*) führte zu einer stärkeren Akkumulation von KdpB und KdpC als bei der Überexpression des Wildtyp Gens zu beobachten war. Dieses Resultat traf für alle verwendeten Kaliumkonzentration zu. Das zeigt, dass die Phosphorylierungsstelle Histidin73 für die regulatorische Funktion von EIIA^{Ntr} wichtig ist. EIIA^{Ntr}-Varianten, die nicht mehr phosphoryliert werden können (EIIA^{Ntr}H73A und EIIA^{Ntr}H73D), bewirken eine stärkere Akkumulation von KdpB und KdpC in der Zelle, als das Wildtyp Protein. Nun wurde untersucht, welchen Einfluss eine Überexpression verschiedener *ptsN* Allele auf die Expression von *kdpFA'-lacZ* zeigt. Hierzu wurde die $\Delta ptsN$ Mutante mit Plasmiden, die entweder das Wildtyp *ptsN*-Gen oder die mutanten Allele *ptsN*-H73A, *ptsN*-H73D und *ptsN*-H73E unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors trugen, und dem Plasmid mit der transkriptionellen *kdpFA'-lacZ*-Fusion kotransformiert. Die Transformanten wurden in Minimalmedium mit Glukose und einer Kaliumkonzentrationen von 0.1 bis 115 mM angezogen. Anschließend wurde die β -Galaktosidase-Aktivität dieser Zellen bestimmt (Abbildung 4.1.5).

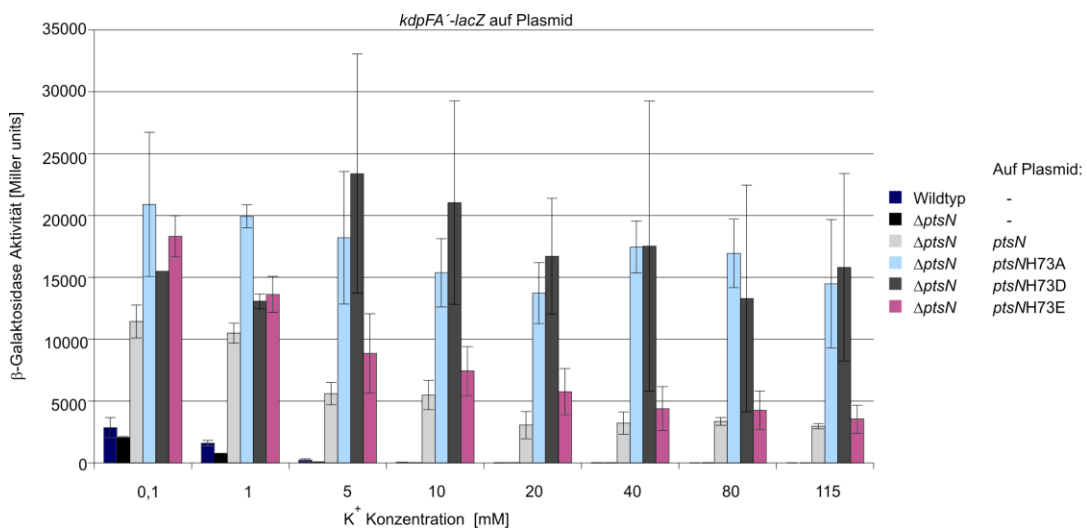


Abbildung 4.1.5: Die Überproduktion von EIIA^{Ntr} stimuliert die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion. Ein *ptsN* Deletionsstamm wurde mit einem Plasmid, welches eine *kdpFA'-lacZ*-Fusion (pBGG158) trug und mit Arabinose-induzierbaren *ptsN*-, *ptsN*-H73A, *ptsN*-H73D- und *ptsN*-H73E-Überexpressionsplasmiden (pBGG86; pBGG93, pBGG92 und pBGG334) transformiert. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen unter Zugabe von 0,2%

Arabinose angezogen. Die Zellen wurden geerntet und es wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und Messungen.

In der Abbildung 4.1.5 sind sehr unterschiedliche Expressionsmuster zu erkennen. Durch die Überexpression der verschiedenen *ptsN*-Allele wurde Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion im Vergleich zum Wildtyp und der Δ *ptsN* Mutante um ein Vielfaches induziert (vgl. dunkelblaue und schwarze Säulen mit anderen Säulen in Abbildung 4.1.5). Die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion bei Überexpression von Wildtyp *ptsN* war bei niedrigen Kaliumkonzentrationen ~ 10 -fach höher und bei hohen Kaliumkonzentration sogar 200- bis 400-fach höher als im Wildtyp. Dies bedeutet, dass durch die Überexpression von *ptsN* die Gene für den Kaliumtransporter KdpFABC sehr viel stärker exprimiert werden. Die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion nimmt bei steigenden Kaliumkonzentrationen des Mediums ab (hellgraue Säulen in Abbildung 4.1.5). Die Überproduktion der mutanten *ptsN*-Allele wirkte sich unterschiedlich auf die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion aus. Durch den Austausch der Phosphorylierungsstelle in einem PTS-Protein kann oft seine phosphorylierte oder unphosphorylierte Form vorgetäuscht werden (Deutscher *et al.*, 1984). Der Austausch von Histidin zu Alanin täuscht die unphosphorylierte Form vor. Der Austausch zu Aspartat bzw. Glutamat simuliert häufig die phosphorylierte Form des Proteins. Die Überexpression eines mutanten Allels (*ptsN* H73E), welches vermutlich die phosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} simuliert, führte zu ähnlichen Werten wie die Überproduktion des Wildtypproteins (vgl. lila mit hellgrauen Säulen in Abbildung 4.1.5). Auch hier war die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion von der Kaliumkonzentration abhängig. Wurden hingegen die mutanten Allele von *ptsN* überexprimiert, bei denen die Phosphorylierung des Proteins durch die H73A und H73D Mutationen unterbunden ist, so wurde die *kdpFA'-lacZ*-Fusion unabhängig von der Kaliumkonzentration ständig stark exprimiert (vgl. hellblaue und dunkelgraue Säulen in Abb. 4.1.5). Wie schon bekannt, liegt EIIA^{Ntr} im Wildtyp hauptsächlich phosphoryliert vor. Die EIIA^{Ntr}H73E-Variante scheint tatsächlich die phosphorylierte Form des Proteins zu simulieren, da hier ein fast identischer Einfluss auf die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion festgestellt werden konnte, wie für das Wildtyp EIIA^{Ntr}. Die

EIIA^{Ntr}H73A und EIIA^{Ntr}H73D-Varianten zeigen ein sehr ähnliches Verhalten, dass allerdings von dem des Wildtyp Proteins abweicht. Hier kann vermutet werden, dass beide Varianten des Proteins die unphosphorylierte Form des Proteins simulieren. Dies war für die EIIA^{Ntr}H73D-Variante sehr ungewöhnlich. In vielen Fällen, wie z. B. in HPr von *Bacillus subtilis* simuliert der Histidin → Aspartat Austausch die phosphorylierte Form von HPr (Deutscher *et al.*, 1984). Dies scheint hier nicht der Fall zu sein. Dies könnte durch strukturelle Unterschiede in den aktiven Zentren der Proteine begründet sein (van Montfort and Dijkstra, 1998). Zusammenfassend bewirkt also der Verlust der Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} und gleichzeitige Überproduktion, dass der Kaliumtransporter KdpFABC auch in hohen Mengen in der Zelle vorhanden ist, wenn kein Kaliumimport durch dieses System nötig ist (Kaliumkonzentration > 20 mM). Die Ergebnisse der β -Galaktosidase-Messungen bestätigen, die Akkumulation der zellulären Mengen an KdpB und KdpC aus dem vorangegangenen Experiment (Abbildung 4.1.4). Folglich kommt die Zunahme der Proteinmengen von KdpB und KdpC durch die Stimulation der *kdp*-Expression zustande.

4.1.3. Das kanonische PTS hat keinen Einfluss auf die Expression des *kdp*-Operons

Wichtig war nun auch zu klären, ob auch das kanonische PTS einen Einfluss auf den Kaliumtransporter KdpFABC hat. Da die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion stimuliert, sollte nun untersucht werden, ob diese Funktion möglicherweise auch von dem EIIA^{Glc} ausgeführt werden kann. Da es sich um ähnliche Proteine handelt, wäre dies denkbar. Hierzu wurde eine Mutante verwendet, in denen die Gene, die für die Proteine des kanonischen PTS kodieren, deletiert (*ptsHlcr*: EI, HPr und EIIA^{Glc}). Neben dem Wildtyp-Stamm, der Δ *ptsO* und Δ *ptsP* Mutante wurden zusätzlich die Δ *ptsHlcr*::*kan* Mutante, die Δ *ptsO* Δ *ptsHlcr*::*kan* Doppelmutante und Δ *ptsP* Δ *ptsHlcr*::*kan* Doppelmutante verwendet. Die Stämme wurden mit Plasmid pBGG158 transformiert, welches die *kdpFA'-lacZ*-Fusion trug. Die Transformanten wurden in Minimalmedium mit Glukose und Kaliumkonzentrationen von 0,1 bis 115 mM angezogen. In diesem Medium sollten die Proteine des kanonischen PTS hauptsächlich unphosphoryliert vorliegen. Die Kulturen wurden

geerntet und anschließend wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.1.6).

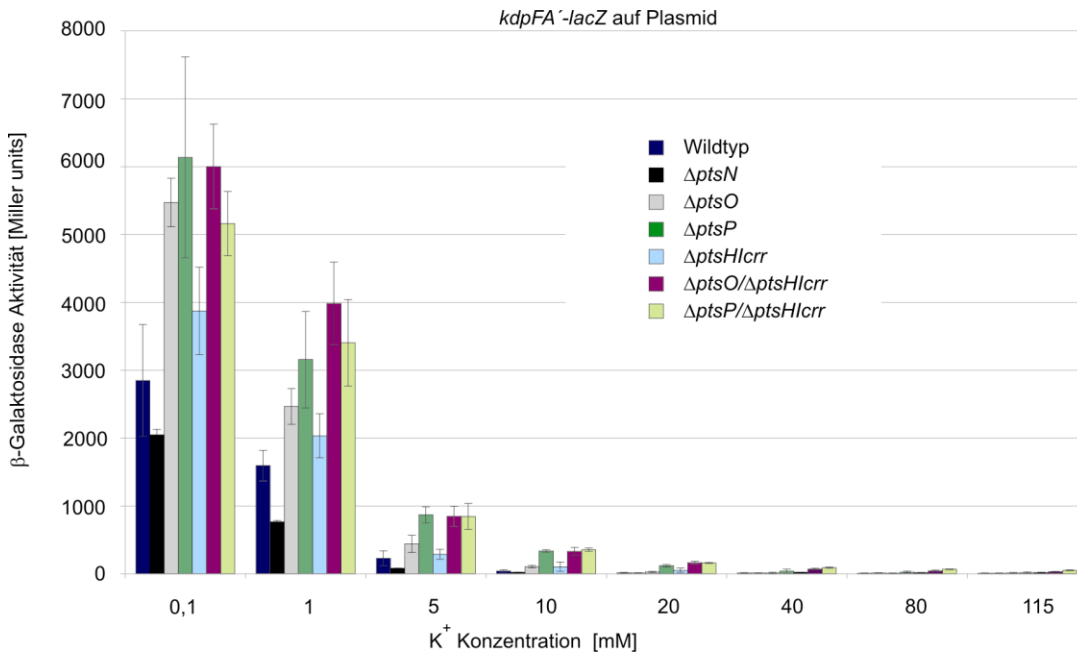


Abbildung 4.1.6: Das kanonische PTS nur einen geringen Einfluss auf die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion. Der Wildtyp (R1279), die isogene $\Delta ptsN$ Mutante (Z79), sowie die $\Delta ptsP$ Mutante (R2404), die $\Delta ptsO$ Mutante (Z80), die $\Delta ptsHlcr::kan$ Mutante (R1653) und die $\Delta ptsO \Delta ptsHlcr::kan$ (Z101) und $\Delta ptsP \Delta ptsHlcr::kan$ (R2409) Doppelmutanten wurden mit einem Plasmid, welches eine *kdpFA'-lacZ*-Fusion trägt (pBGG158), transformiert. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen angezogen, geerntet und es wurden β -Galaktosidase Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten der in dem Diagramm dargestellten plasmidischen *lacZ*-Fusion sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Deletion der Gene für EI, HPr und EIIA^{Glc} nur einen geringen Einfluss auf die Expression des *kdp*-Operons hatten. Die Werte lagen in allen Fällen nur leicht über denen des Wildtyps (vgl. hellblaue mit dunkelblauen Säulen in Abbildung 4.1.6). Die zusätzliche Deletion von *ptsHlcr* in den $\Delta ptsO$ und $\Delta ptsP$ Mutanten zeigten ebenfalls kaum Auswirkungen (vgl. lila mit grauen und hellgrüne mit dunkelgrünen Säulen in Abbildung 4.1.6). Hier waren die erhaltenen Werte im Vergleich zu den $\Delta ptsO$ und $\Delta ptsP$ Einzelmutanten für alle Kaliumkonzentrationen ähnlich oder nur etwas erhöht. Mit diesen Messungen konnte ausgeschlossen werden, dass das EIIA^{Glc} des kanonische PTS ähnliche Regulationen auf die Expression der Kaliumtransportproteine ausführt wie das EIIA^{Ntr} des PTS^{Ntr}. Es kann davon

ausgegangen werden, dass die Stimulation der *kdpFABC*-Expression eine PTS^{Ntr}-spezifische Funktion ist und das EIIA^{Glc} nicht die Funktion von EIIA^{Ntr} übernehmen kann.

4.1.4. EIIA^{Ntr} interagiert mit der Sensorkinase KdpD des KdpD/KdpE Zwei-Komponenten Systems

Die Expression des *kdp*-Operons ist direkt von der Aktivität des KdpD/KdpE Zwei-Komponenten Systems abhängig. Bei Kaliumlimitation und unter Salzstress kommt es zur Autophosphorylierung der Sensorkinase KdpD und Übertragung der Phosphatgruppe auf den Response Regulator KdpE. Phosphoryliertes KdpE kann an Regionen vor dem *kdpFABC* Promotor binden und so die Transkription initiieren (siehe Einleitung 2.3.2.1). EIIA^{Ntr} stimuliert die Transkription des Operons. Es wäre möglich, dass EIIA^{Ntr} auf die Aktivität des Zwei-Komponenten Systems wirkt. Ein vorstellbarer Mechanismus wäre eine direkte Interaktion von EIIA^{Ntr} mit KdpD oder KdpE. Um dies zu untersuchen, wurde ein bakterielles Two-Hybrid System benutzt (Material und Methoden 3.2.6.4.). Das System beruht auf der Wiederherstellung der Aktivität der Adenylatzyklase. An die Proteine von Interesse werden jeweils die T18 oder T25 Untereinheit der Adenylatzyklase fusioniert. Interagieren die Proteine miteinander, so kommen die Untereinheiten der Adenylatzyklase in räumliche Nähe. Es wird cAMP gebildet. Dieses aktiviert zusammen mit dem CAP (cAMP Akzeptorprotein) die Expression des Reportergens *lacZ*. In einem quantitativen Test kann nun zwischen Interaktion (starke *lacZ*-Expression) und keiner Interaktion (geringe *lacZ*-Expression) unterschieden werden. Die Gene *ptsN*, *ptsN(H73A)*, *kdpD* und *kdpE* wurden in die Vektoren für das BACTH kloniert. Als Negativkontrolle wurde die Sensorkinase AtoS verwendet. Es wurden Plasmide erhalten, in denen die jeweiligen Gene entweder mit der T25- oder der T18-Untereinheit der Adenylatzyklase fusioniert waren. Um Interaktionen zwischen den Fusionsproteinen zu untersuchen, wurde der BACTH-Analysestamm *E. coli* BTH101 mit jeweils zwei der Plasmide kotransformiert. Danach wurde die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen (Abbildung 4.1.7).

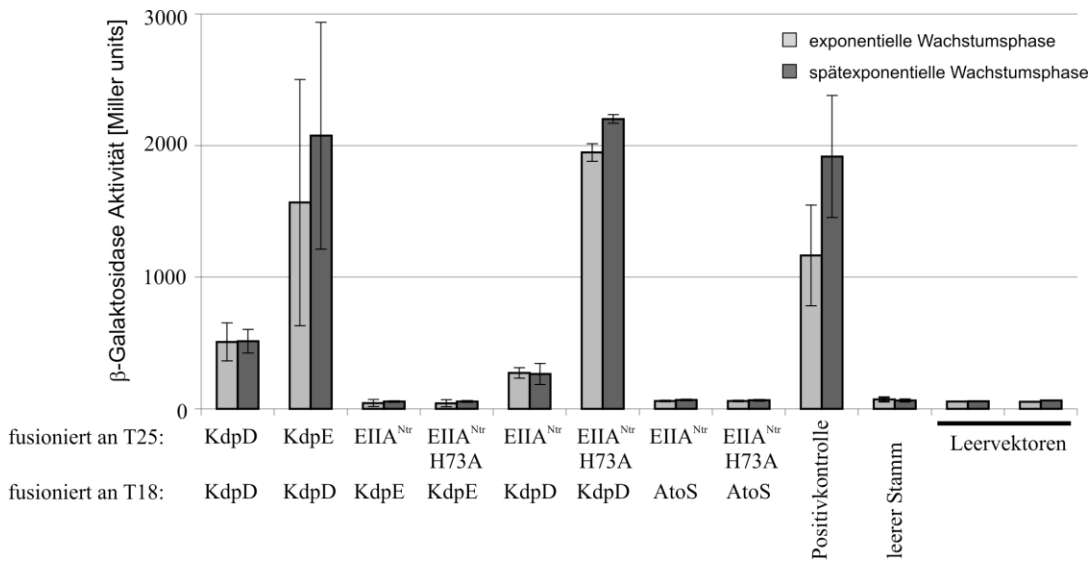


Abbildung 4.1.7: KdpD interagiert mit EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr} H73A. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (T25-*ptsN*: pBGG261; T25-*ptsNH73A*: pBGG262; T25-*kdpD*: pBGG267 und T18-*kdpD*: pBGG264; T18-*kdpE* pBGG260 und T25-*kdpE*: pBGG263 und T18-*atoS* pBGG333) sowie die Leerplasmide (pKT25, p25-N, pUT18 und pUT18C) und die Plasmide der Positivkontrolle (pUT18C-*zip* und pKT25-*zip*) wurden in den Stamm BTH101 eingebracht. Die Transformanten wurden in LB-Medium angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600}=0,5$) und nach längerem Wachstum ($OD_{600}=1,3$) geerntet. Anschließend wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die in dem Diagramm dargestellten β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Wie im Diagramm zu erkennen, zeigten die Negativkontrollen, der leere Stamm und die Leervektoren nur geringe β -Galaktosidase-Aktivitäten und somit keine Interaktion. Die Positivkontrolle des Two Hybrid Systems, welche die Interaktion des Gcn4 Leucin Zippers detektiert, zeigte wie erwartet hohe β -Galaktosidase-Aktivitäten und somit eine starke Interaktion. Erhöhte β -Galaktosidase-Aktivitäten konnten auch gemessen werden, wenn eine Interaktion von KdpD mit sich selbst oder mit KdpE getestet wurde. Dies war wichtig um sicher zu stellen, dass die Fusionsproteine Interaktionen eingehen können. Die Überprüfung dieser Interaktionen diente als Positivkontrolle. Als nächstes wurde eine mögliche Interaktion zwischen EIIA^{Ntr} und KdpD oder KdpE untersucht. Hier wurde beobachtet, dass EIIA^{Ntr} mit der Sensorkinase interagiert. Der gemessene LacZ-Wert lag bei 273 Miller units. Die Interaktion ist damit fast so stark wie die Interaktion von KdpD mit sich selbst. Eine Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr}H73A wurde ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass diese Interaktion viel stärker

war als die Interaktion von KdpD mit dem EIIA^{Ntr} Wildtypprotein. Sie war in etwa so stark, wie die Interaktion zwischen KdpD und KdpE (1500 und 1900 Miller units). Eine Interaktion zwischen dem Response Regulator und EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A konnte demgegenüber nicht detektiert werden. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten lagen im Bereich der Negativkontrollen. Eine Interaktion zwischen der Sensor kinase AtoS und EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Die Resultate zeigen, dass EIIA^{Ntr} spezifisch mit der Sensor kinase KdpD, aber nicht mit dem Response Regulator KdpE oder einer anderen Sensor kinase (AtoS) interagiert. Weiterhin interagiert die unphosphorylierbare EIIA^{Ntr}-Variante stärker mit KdpD als das Wildtypprotein. Dies korreliert mit den Beobachtungen, dass EIIA^{Ntr}H73A die Expression des *kdp*-Operons stärker induziert als Wildtyp EIIA^{Ntr} (s. Abb. 4.1.5).

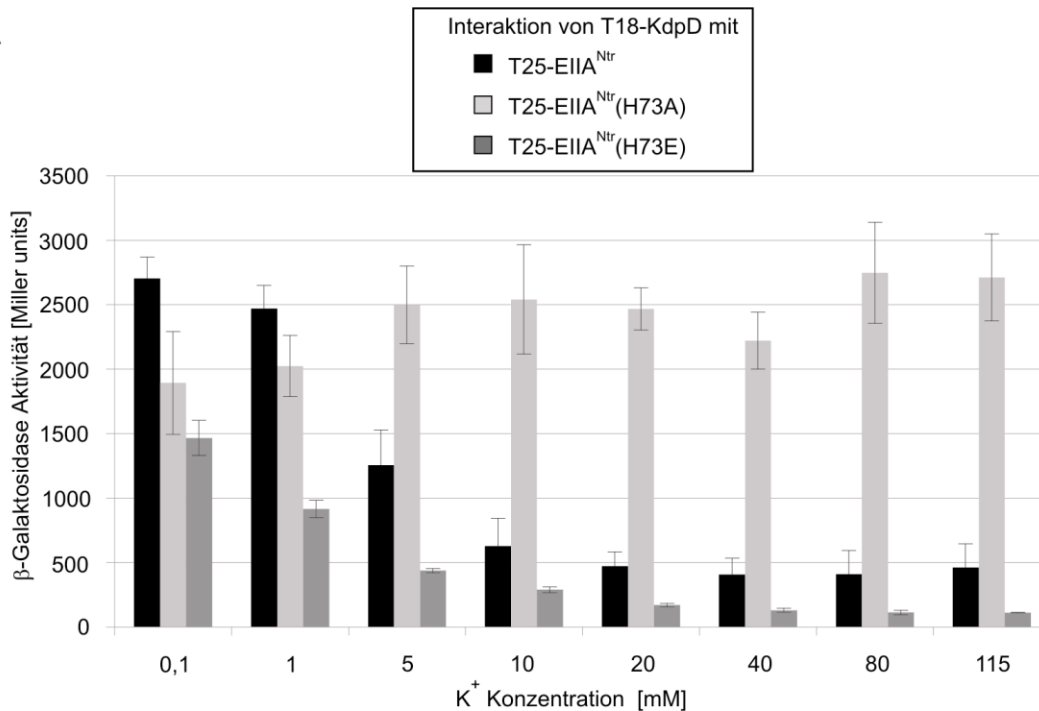
4.1.5. Die Bedeutung der Phosphorylierungsstelle Histidin73 in EIIA^{Ntr} für die Interaktion mit KdpD

4.1.5.1. Die Interaktion von EIIA^{Ntr} und KdpD wird durch die Kaliumkonzentration beeinflusst

Der Einfluss der Überexpression von verschiedenen *ptsN*-Allelen auf die Expression des *kdpFABC*-Operons wurde bereits untersucht. Die Analysen ergaben, dass bei Überproduktion der EIIA^{Ntr}H73A-Variante die Expression unabhängig von der Kaliumkonzentration erfolgte und bei allen untersuchten Kaliumkonzentrationen sehr hoch war. Die Überproduktion von EIIA^{Ntr}, welches wahrscheinlich die phosphorylierte Form des Proteins vortäuscht (EIIA^{Ntr}H73E) und des Wildtypproteins, ergab eine starke Expression der Gene des Kaliumtransporters bei geringen und eine zunehmend schwächere Expression bei steigenden Kaliumkonzentrationen (Abbildung 4.1.5). Es war nun wichtig herauszufinden, ob diesen verschiedenen Expressionsmustern ein jeweils unterschiedliches Interaktionsverhalten der verschiedenen EIIA^{Ntr}-Varianten mit KdpD zu Grunde liegt. Hierzu wurde die Interaktion zwischen KdpD und den verschiedenen EIIA^{Ntr}-Varianten bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen untersucht. Die Transformanten des Stammes BTH101 wurden in Minimalmedium mit Glukose und einer Kaliumkonzentrationen von 0,1 bis 115 mM angezogen. Die Zellen wurden geerntet und es wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Zur

Kontrolle wurde auch eine mögliche Kaliumabhängigkeit der Aktivitäten der Negativkontrolle (Leervektoren) und der Positivkontrolle (Zip-Vektoren) überprüft. Die Resultate sind in Abbildung 4.1.8 graphisch dargestellt.

A



B

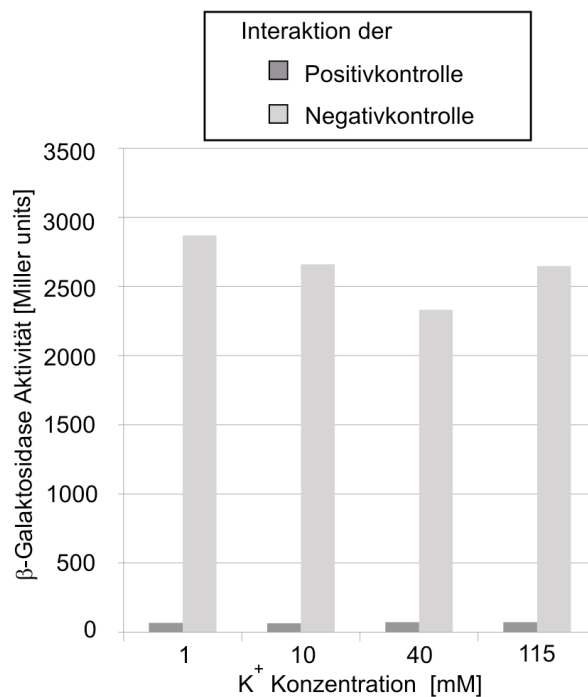


Abbildung 4.1.8: Einfluss der Kaliumkonzentration auf die Interaktion von KdpD mit den verschiedenen EIIA^{Ntr}-Varianten. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (*kdpD*: pBGG267; *ptsN*: pBGG261; *ptsNH73A*: pBGG262; *ptsNH73E*: pBGG336), wurden in den Stamm BTH101

kotransformiert und von den erhaltenen Kolonien wurden Kulturen angezogen und LacZ-Messungen durchgeführt. (A) β -Galaktosidase-Messungen der KdpD Interaktion mit EIIA^{Ntr}-Varianten. Die in dem Diagramm dargestellten β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen. (B) β -Galaktosidase-Messungen der Leervektoren und Zip-Kontrollen in Medium mit 1; 10; 40 und 115 mM Kalium

Für die Negativkontrolle konnte bei keiner Kaliumkonzentration eine Interaktion festgestellt werden. Die Stärke der Interaktion der Positivkontrolle wurde von der Kaliumkonzentration ebenfalls nicht beeinflusst (s. Abbildung 4.1.8 B). Das bakterielle Two-Hybrid System eignet sich somit für Analysen der Interaktion von EIIA^{Ntr} mit KdpD, die bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen des Mediums durchgeführt werden. Bei einer sehr geringen Kaliumkonzentrationen von 0,1 mM war eine sehr starke Interaktion zwischen den EIIA^{Ntr}-Varianten und KdpD zu beobachten (s. Abbildung 4.1.8 A). Bei höheren Kaliumkonzentrationen unterschied sich das Interaktionsverhalten der verschiedenen EIIA^{Ntr}-Varianten voneinander. Die Stärke der Interaktion von KdpD mit dem EIIA^{Ntr} Wildtypprotein nahm mit steigenden Kaliumkonzentrationen ab. Das EIIA^{Ntr}H73E Protein zeigte ein ähnliches Verhalten (schwarze und dunkelgraue Säulen in Abbildung 4.1.8 A). Auch hier nahm die β -Galaktosidase-Aktivität mit steigenden Kaliumkonzentrationen ab. Dabei war zu beobachten, dass die Interaktion von EIIA^{Ntr}H73E mit KdpD bei allen untersuchten Kaliumkonzentrationen schwächer war, als die Interaktion zwischen KdpD und dem EIIA^{Ntr} Wildtypprotein. Die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr}H73A zeigte keine Beeinflussung durch Kalium (hellgraue Säulen in Abbildung 4.1.8 A). Die β -Galaktosidase-Aktivität war bei allen Kaliumkonzentrationen in etwa gleich hoch und entsprach in etwa der Aktivität, die für die Interaktion des Wildtyp EIIA^{Ntr} mit KdpD bei einer Kaliumkonzentration von 0,1 mM zu beobachten war. Die Daten zeigten, dass die Interaktion des Wildtypproteins mit KdpD durch hohe Kaliumkonzentrationen inhibierbar ist. Dies traf jedoch nicht auf die Interaktion der nicht-phosphorylierbaren EIIA^{Ntr}H73A-Variante mit KdpD zu. Demgegenüber verhielt sich die EIIA^{Ntr}H73E-Variante wie das Wildtyp EIIA^{Ntr}. Häufig ist der Austausch von Histidin zu Glutamat in der Lage eine Phosphorylierung an dieser Stelle im Protein vorzutauschen. Wäre dies auch für das EIIA^{Ntr} der Fall, müsste man schlussfolgern, dass die Interaktion von KdpD mit phosphoryliertem EIIA^{Ntr} durch Kalium gehemmt wird. Dies trifft hingegen nicht

für das unphosphorylierte Protein zu. Weiterhin müsste man folgern, dass das Wildtyp EIIA^{Ntr} in der Zelle überwiegend phosphoryliert vorliegt, da dessen Interaktion mit KdpD ebenfalls durch Kalium gehemmt werden kann.

Um dies weiter zu untersuchen, wurde in den Analysestamm des Two Hybrid Systems eine Deletion von *ptsP* eingeführt. In diesem Stamm liegt EIIA^{Ntr} in seiner unphosphorylierten Form vor (s. Abb. 4.1.10). Die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} bzw. EIIA^{Ntr}H73A und EIIA^{Ntr}H73E wurde in diesem Stammhintergrund ermittelt. Hierfür wurde das Plasmid, welches eine T18-*kdpD*-Fusion trägt mit Plasmiden, die entweder für T25-*ptsN*, T25-*ptsNH73A* oder für T25-*ptsNH73E* kodierten, in den konstruierten Stamm eingebracht. Die Transformanten wurden in Minimalmedium mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen angezogen, geerntet und β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.1.9).

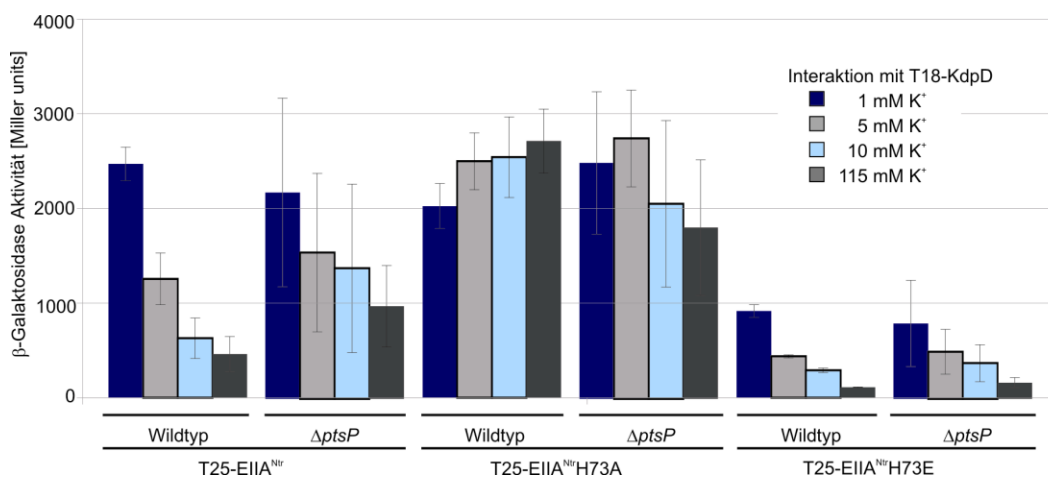


Abbildung 4.1.9: Die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} steuert die Interaktion mit KdpD. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (T18-*kdpD*: pBGG264; T25-*ptsN*: pBGG261; T25-*ptsNH73A*: pBGG262; T25-*ptsNH73E*: pBGG336), wurden in den Stamm BTH101 (Wildtyp) und BTH101 $\Delta ptsP$ (Z337) kotransformiert. Von den erhaltenen Kolonien wurden Kulturen in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen angezogen und LacZ-Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

In den Untersuchungen zeigte sich, dass die Interaktion zwischen KdpD und der EIIA^{Ntr}H73A-Variante nicht von der Kaliumkonzentration beeinflusst ist. Dies war für den Wildtyp und für die $\Delta ptsP$ Mutante zu beobachten. (mittlere Säulen in Abbildung 4.1.9.) In den beiden Stämmen kam es zu einer starken Interaktion zwischen KdpD und

der EIIA^{Ntr}H73A-Variante. Die Deletion von *ptsP* hatte durch die Mutation der Phosphorylierungsstelle in EIIA^{Ntr} keinen starken Einfluss auf die Interaktion. Dies war auch für die EIIA^{Ntr}H73E-KdpD Interaktion zu beobachten. Sie veränderte sich durch die Deletion von *ptsP* kaum (rechte Säulen in Abbildung 4.1.9). Genau wie im Wildtyp war hier eine starke Abhängigkeit der Interaktion von der Kaliumkonzentration zu erkennen. Die Interaktion von Wildtyp EIIA^{Ntr} mit KdpD war in der $\Delta ptsP$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp verändert (linke Säulen in Abbildung 4.1.9). In der $\Delta ptsP$ Mutante war der inhibitorische Einfluss von Kalium auf die Interaktion von KdpD und EIIA^{Ntr} geringer als im Wildtypstamm. Während im Wildtyp die Interaktion drastisch mit höheren Kaliumkonzentrationen abfiel, war dieser Effekt in der Deletionsmutante reduziert. Die gemessene Aktivität für die Interaktion betrug im Wildtyp bei Kaliumkonzentrationen von 1, 5, 10 und 115 mM 2470, 1257, 629 und 461 Miller units. In der $\Delta ptsP$ Mutante waren allerdings 2181, 1547, 1380 und 980 Miller units gemessen worden. Diese Messungen zeigen, dass die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} bei der Interaktion mit KdpD eine Rolle spielt. In einer $\Delta ptsP$ Mutante sollte EIIA^{Ntr} hauptsächlich unphosphoryliert vorliegen, in diesem Fall sollte die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit KdpD weniger stark von der Kaliumkonzentration abhängen. In der $\Delta ptsP$ Mutante ähnelt die Interaktion von Wildtyp EIIA^{Ntr} mit KdpD eher derjenigen einer EIIA^{Ntr}H73A-Variante. Da sich das Interaktionsverhalten von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A mit KdpD so stark unterscheidet, sollte nun die Ursache dafür untersucht werden. Hierfür kamen zwei Möglichkeiten in Betracht. Zum Einen könnte sich die Proteinmenge oder der Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} durch unterschiedliche Kaliumkonzentrationen verändern (Abschnitt 4.1.5.2). Zum Anderen könnte die Interaktion von EIIA^{Ntr} und KdpD direkt von der Kaliumkonzentration beeinflusst sein (Abschnitt 4.1.5.3).

4.1.5.2. Kalium hat keinen Einfluss auf die zelluläre Menge und den Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr}

Die Hemmung der Interaktion von EIIA^{Ntr} mit KdpD durch hohe Kaliumkonzentrationen könnte dadurch verursacht sein, dass Kalium EIIA^{Ntr} direkt beeinflusst. Es wäre möglich, dass die zelluläre Menge an EIIA^{Ntr} oder der Phosphorylierungszustand des Proteins durch Kalium moduliert wird. Um dies zu

untersuchen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hierzu wurde das authentische *ptsN*-Gen an seinem 3'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, die für das 3xFLAG Epitop kodiert. Der C-terminale 3xFLAG-Tag beeinträchtigte die Funktionalität von $EIIA^{Ntr}$ nicht (s. Abb. 4.4.1).

Das *ptsN*-3xFLAG-Allel wurde in den Wildtypstamm und die $\Delta ptsP$ Mutante eingebracht. Die Stämme wurden in Minimalmedium mit Glukose und 0,1, 10 und 115 mM Kalium angezogen. Die Gesamtzellextrakte wurden durch native als auch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde $EIIA^{Ntr}$ -3xFLAG mit einem FLAG Antiserum im Western Blot detektiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 4.1.10 gezeigt.

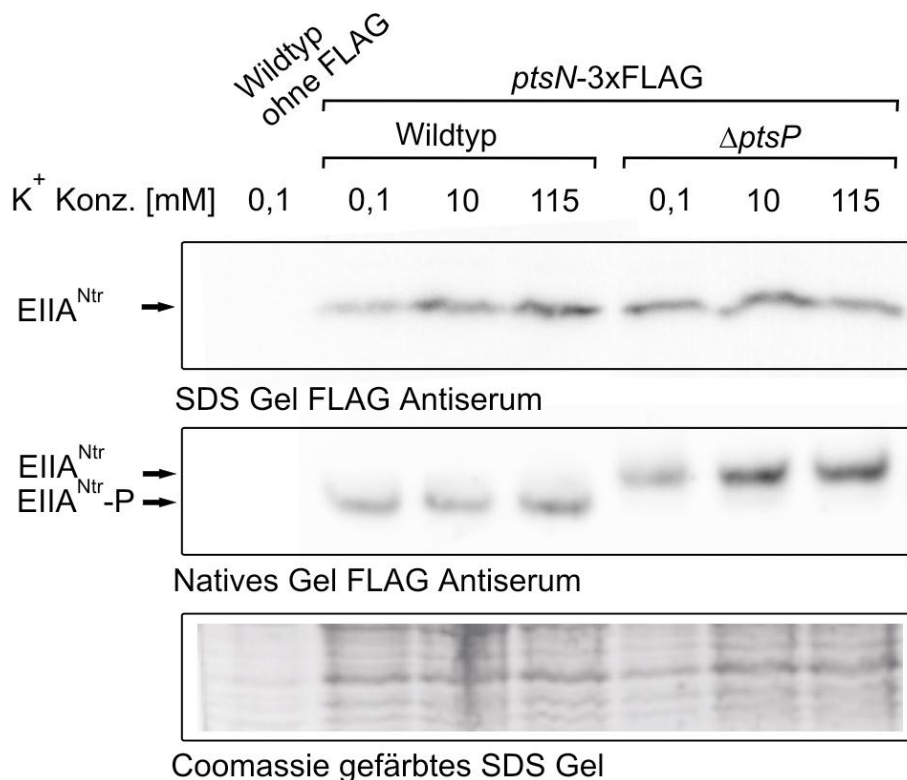


Abbildung 4.1.10: Die Kaliumkonzentration hat keinen Einfluss auf die zelluläre Menge und den Phosphorylierungsstatus von $EIIA^{Ntr}$. Die Stämme mit der chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Fusionen Wildtyp (Z424) und die $\Delta ptsP$ Mutante mit *ptsN*-3xFLAG-Fusion (Z436) wurden in Minimalmedium mit 0,1; 10 und 115 mM Kalium angezogen, Zellextrakte auf einer 12,5% SDS-PAGE und einem 12,5%igem Proseive Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurde der Wildtypstamm ohne *ptsN*-3xFLAG-Fusion (S4197) verwendet. $EIIA^{Ntr}$ -3xFLAG wurde mit einem FLAG Antiserum detektiert. Als Ladekontrolle ist das mit Coomassie angefärbte SDS-Gel gezeigt. Es ist ein repräsentatives Beispiel von unabhängigen Western Blots dargestellt.

Im Western Blot des denaturierenden SDS-Gels ist zu erkennen, dass die Mengen von EIIA^{Ntr} im Wildtyp und der $\Delta ptsP$ Mutante gleich waren (Abbildung 4.1.10 oben). Die Abwesenheit von EI^{Ntr} hatte keinen Einfluss auf die Expression oder Stabilität von EIIA^{Ntr}. Weiterhin ist erkennbar, dass die Menge an EIIA^{Ntr} von der Kaliumkonzentration des Anzuchtmediums nicht beeinflusst wurde. Bei jeder untersuchten Kaliumkonzentration waren die Mengen von EIIA^{Ntr} im Wildtyp und der $\Delta ptsP$ Mutante identisch. Eine native Gelelektrophorese wurde durchgeführt um die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} zu untersuchen. Diese Gele enthalten kein SDS und die Proteine werden sowohl nach ihrer Ladung als auch der Größe aufgetrennt. So ist es möglich unphosphoryliertes von phosphoryliertem EIIA^{Ntr} zu trennen. Aufgrund seiner Ladung bewegt sich die phosphorylierte Form des Protein schneller durch das Gel als die unphosphorylierte Form. Im resultierenden Western Blot (Abbildung 4.1.10 Mitte) ist zu erkennen, dass EIIA^{Ntr} im Wildtypstamm überwiegend in seiner phosphorylierten Form detektiert werden konnte. In der $\Delta ptsP$ Mutante lag es vollständig unphosphoryliert vor. Weiterhin hatte die Kaliumkonzentration keinen Einfluss auf den Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} in den beiden Stämmen. Im Wildtyp ist EIIA^{Ntr} bei allen untersuchten Kaliumkonzentrationen überwiegend phosphoryliert, in der $\Delta ptsP$ Mutante unphosphoryliert. Mit diesen Untersuchungen konnte also ausgeschlossen werden, dass EIIA^{Ntr} durch die Kaliumkonzentration moduliert wird.

4.1.5.3. Beeinflussung der Interaktion zwischen EIIA^{Ntr} und KdpD durch Kalium *in vitro*

Die Interaktion zwischen KdpD und EIIA^{Ntr} wurde auch *in vitro* analysiert. Hierzu wurden aufgereinigte Proteine verwendet. Das His-EIIA^{Ntr}-Fusionsprotein wurde über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt (s. Abb. 6.23 A). KdpD-Strep Protein wurde in Proteoliposomen rekonstituiert und mittels eines Strep-Antikörpers auf einem Sensorchip in einer Miniaturflusszelle immobilisiert. Als Kontrollen dienten das in Proteoliposomen rekonstituiertes CadC und Leerkontrollen mit Puffer. EIIA^{Ntr} wurde über die Oberfläche des Sensorchips gespült. Die Wechselwirkungen von EIIA^{Ntr} mit dem immobilisierten KdpD wurde zeitabhängig gemessen. Die Stärke der Interaktion konnte in Resonanz units gemessen werden. Die Messungen und Auswertungen wurden

von Günther Gabriel (Ludwig-Maximilians Universität München) durchgeführt (Abbildung 4.1.11).

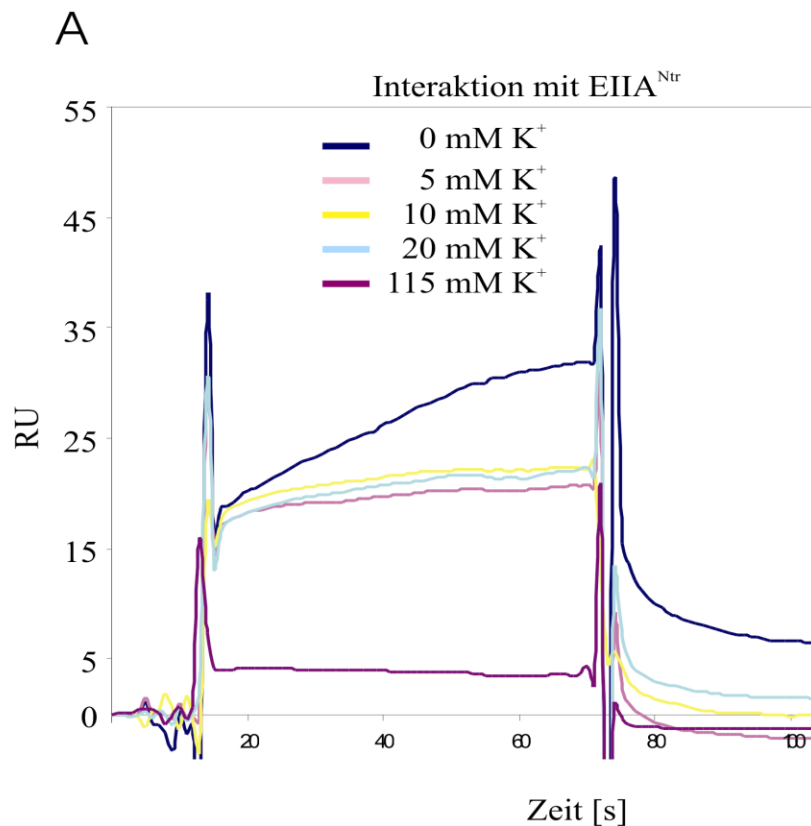


Abbildung 4.1.11: Die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} wird auch *in vitro* durch hohe Kaliumkonzentrationen gehemmt. KdpD wurde in Proteoliposomen durch einen Strep-Antikörper an einen Sensorchip gebunden. Das Protein wurde bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen in einer Miniaturflusszelle inkubiert und die Interaktion mit EIIA^{Ntr} durch Surface Plasmon Resonanz gemessen. Die Interaktionsstärke ist in Resonanz units (RU) angegeben. Für die Interaktionsanalysen wurden 0,15 mg/ml EIIA^{Ntr} verwendet.

Es war zu beobachten, dass EIIA^{Ntr} bei niedrigen Kaliumkonzentrationen mit KdpD interagiert. Die Interaktion wurde mit steigenden Kaliumkonzentrationen schwächer. Die Interaktion ging schließlich vollständig verloren, wenn eine Kaliumkonzentration von 115 mM eingesetzt wurde. Diese *in vitro* Analysen zeigen, dass die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit KdpD direkt durch die umgebene Kaliumkonzentration gehemmt wird.

4.1.6. Interaktion von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A mit mutanten KdpD Proteinen und Auswirkungen auf die Expression des *kdp*-Operons

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, wird bei Überexpression der EIIA^{Ntr}H73A-Variante das *kdp*-Operon ständig, auch bei hohen Kaliummengen, exprimiert (s. Abb. 4.1.5). Ebenfalls wurde beobachtet, dass die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr}H73A nicht durch Kalium hemmbar war. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass das EIIA^{Ntr} mit Kaliumionen oder einem anderen Signal, welches von KdpD wahrgenommen wird, um die Bindestelle konkurriert. Die sehr starke Bindung von EIIA^{Ntr}H73A an die Sensorkinase könnte somit die Wahrnehmung des Signals für die Sensorkinase unmöglich machen. Es wurde beschrieben, dass ein kurzer Bereich im vorderen Bereich der C-terminalen Domäne von KdpD, das Arginin-Cluster, für die Wahrnehmung des Stimulus der Sensorkinase wichtig sein könnte. Dieser Bereich grenzt direkt an die Transmembrandomäne und es wird vermutet, dass die Anhäufung von Argininen in dieser Region für die Signalwahrnehmung zuständig ist. Es wären z. B. elektrostatische Interaktionen mit den sauren Kopfgruppen von Phospholipiden möglich. Diese Protein-Membran Interaktion könnte zur Aktivierung von KdpD unter Stressbedingungen beitragen (Jung and Altendorf, 1998b). Aminosäureaustausche im Arginin-Cluster führen zu veränderten Kinase und Phosphatase Aktivitäten von KdpD. Mutante Proteine mit Austausch dieser Arginine sind prinzipiell fähig KdpE zu phosphorylieren und sind somit enzymatisch aktiv. Allerdings zeigen die mutanten Proteine KdpD-R503Q und KdpD-R506Q eine vermehrte Phosphatase Aktivität und reduzierte Kinase Aktivität. Die Mutation von Arginin 511 zu Glutamin führt zum Verlust der Phosphatase Aktivität des Proteins. Allerdings ist auch die Kinase Aktivität dieses mutanten Proteins verstärkt. KdpD R511Q induziert die *kdp*-Expression auch bei hohen Kaliumkonzentrationen, zeigt also eine reduzierte Sensitivität gegenüber Kalium (Jung and Altendorf, 1998b).

Um die Funktion des Arginin-Clusters bei der EIIA^{Ntr}/KdpD Interaktion zu untersuchen, wurde ein Stamm benutzt, der kein funktionelles KdpD besitzt und eine *kdp-lacZ*-Fusion im authentischen Locus im Chromosom trägt. Dieser Stamm ist also geeignet um verschiedenste KdpD-Varianten zu untersuchen. Von diesem Stamm wurde eine isogene *ptsN* Deletionsmutante konstruiert. Die Stämme wurden mit Plasmiden komplementiert, die das Wildtyp *kdpD*-Gen oder dessen Allele mit Aminosäureaustauschen im Arginin-

Cluster exprimierten (P_{Ara} -*kdpDR503Q*; P_{Ara} -*kdpDR506Q*; P_{Ara} -*kdpDR511Q*), komplementiert.

Anschließend wurde die β -Galaktosidase-Aktivität dieser Transformanten nach Anzucht in Medium mit 0,1 und 1 mM Kalium gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1.12A dargestellt. Zunächst war zu beobachten, dass in dem Stamm, der das Wildtyp *kdpD* exprimiert, die *kdp*-Transkription stärker von $EIIA^{Ntr}$ abhing als in dem Stammsystem R1279 und Derivate, welches für die vorherigen Untersuchungen benutzt wurde. Eine Deletion von *ptsN* führte zu einer 10- bis 20-fachen Erniedrigung der *kdp*-Expression. In R1279 war je nach verwendeter Kaliumkonzentration lediglich eine 1,4- bis 2,1-fache Reduktion zu erkennen (siehe Abbildung 4.1.2).

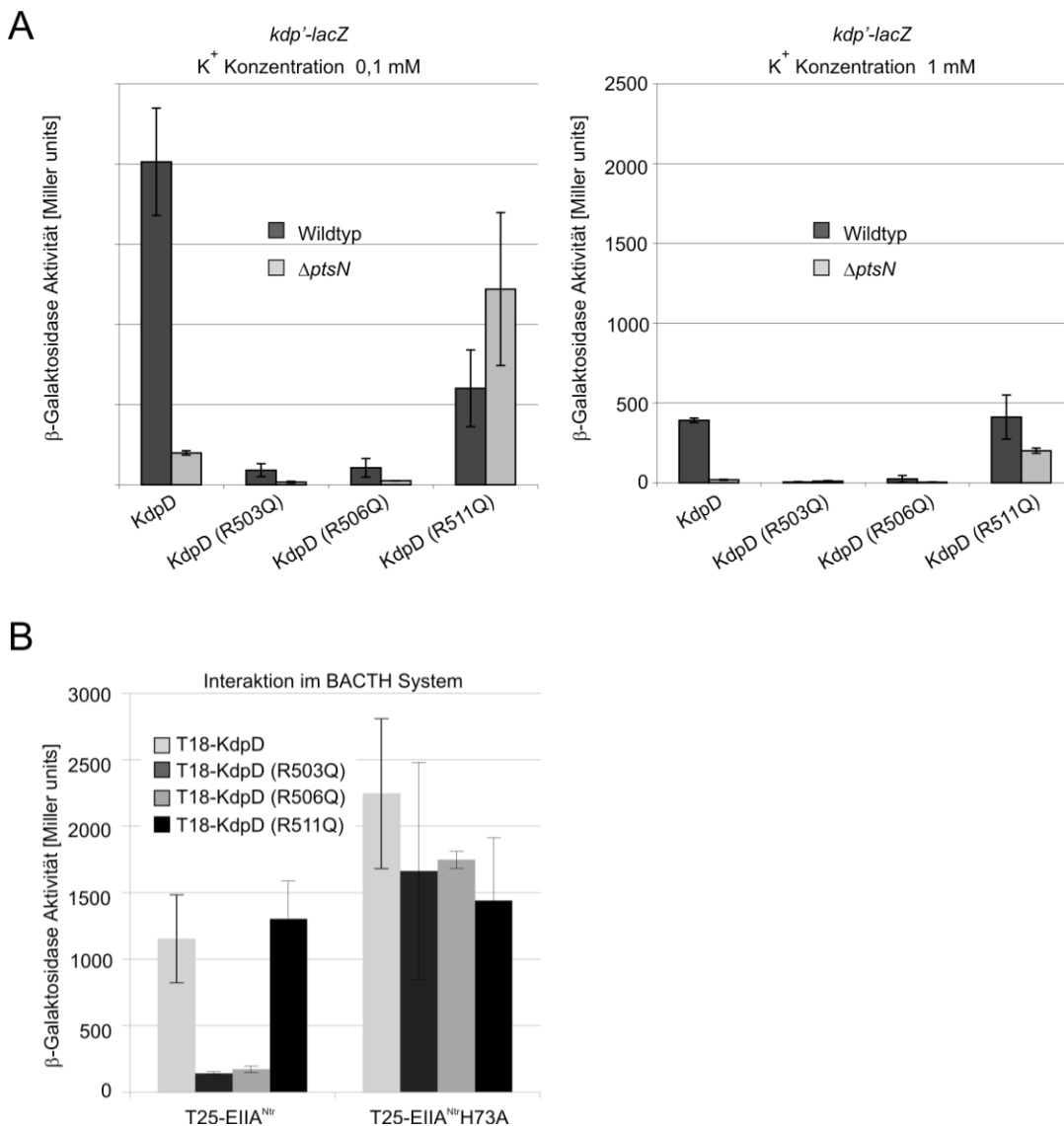


Abbildung 4.1.12: Rolle des Arginin-Clusters in KdpD für die Interaktion mit EIIA^{Ntr}. (A) Expressionsverhalten der chromosomalen *kdp-lacZ*-Fusion bei Überexpression mutanter *kdpD* Allele: *kdpD* und die mutanten Allele, *kdpDR503Q*; R506Q und R511Q) (pBD; pPV5-3R503Q; pPV5-3R506Q und pPV5-3R511Q) wurden in den Wildtypstamm mit *kdpD* Deletion (HAK006) und in den isogenen $\Delta ptsN$ Stamm (Z186) transformiert. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit Glukose und Arabinose (Induktion der *kdpD* Expression) mit 0.1 und 1 mM Kalium angezogen, geerntet und β -Galaktosidase-Messungen der chromosomalen *kdp-lacZ*-Fusion durchgeführt. (B) Die Plasmide mit T18-*kdpD* und die mutanten Allele, *kdpDR503Q*; R506Q und R511Q (pBGG267; pDL4; pDL5; pDL6) wurden mit T25-*ptsN* und T25-*ptsNH73A* (pBGG261; pBGG262) in BTH101 eingebracht. Die Transformanten wurden in K⁺-Medium mit 5 mM Kalium angezogen und die β -Galaktosidase-Aktivitäten bestimmt. Die in dem Diagramm dargestellten β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die beiden mutanten Proteine KdpD-R503Q und KdpD-R506Q waren kaum noch in der Lage die Expression der *kdp-lacZ*-Fusion zu aktivieren (WT-KdpD: 2014, KdpD-R503Q 91 und KdpD-R506Q 106 Miller units). Die LacZ-Werte verringern sich durch eine höhere Kaliumkonzentration auf 392, 5 und 25 Miller units. Für das Wildtyp KdpD und diese beiden mutanten KdpD Proteine war eine Repression der *kdp-lacZ*-Expression durch Kalium zu beobachten. Dies galt allerdings nicht für die KdpD-R511Q Mutante. Hier war keine Repression durch Kalium mehr zu beobachten (vgl. dunkle Säulen in Abbildung 4.1.12 A links und rechts). Bei Deletion von *ptsN* kam es auch in Gegenwart der mutanten Proteine KdpD-R503Q und KdpD-R506Q zu einer noch weitergehenden Reduktion der ohnehin schon niedrigen *kdp-lacZ*-Expression. Dies galt jedoch nicht für die KdpD-R511Q Mutante. Hier hatte die Deletion von *ptsN* keinen signifikanten Effekt auf die Expression der *kdp-lacZ*-Fusion (vgl. helle mit dunklen Säulen in Abbildung 4.1.12 A links). Demnach führt eine Mutation von Arginin511 in KdpD zu einem Verlust der Regulation durch EIIA^{Ntr}. Um zu untersuchen, ob hier die veränderte Interaktion von der KdpD-Varianten mit EIIA^{Ntr} verantwortlich ist, wurden die mutanten KdpD-Varianten im Bakteriellen Two-Hybrid System getestet (Abbildung 4.1.12 B). Es wurde die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr} H73A untersucht. Hierzu wurden die Transformanten des Stammes BTH101 in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM angezogen, geerntet und β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.1.12 B). Die Interaktionsanalysen zeigten, dass die mutante EIIA^{Ntr}H73A-Variante in der Lage war mit allen getesteten KdpD Proteinen zu interagieren. Die Mutationen in KdpD hatten

dabei keine Auswirkung auf die Stärke der Interaktion. Ein anderes Bild ergab sich für die Interaktion des EIIA^{Ntr} Wildtypproteins mit den verschiedenen KdpD Proteinen. Während EIIA^{Ntr} stark mit dem Wildtyp KdpD interagiert, waren die Interaktionen mit KdpD-R503Q und KdpD-R506Q nur sehr schwach (1153 versus 142 und 172 Miller units). Demnach könnte eine abgeschwächte Interaktion mit EIIA^{Ntr} ursächlich für die geringere Aktivität dieser KdpD-Varianten bei der Stimulation der *kdp-lacZ*-Expression sein. Demgegenüber war die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit KdpD-R511Q durch die Mutation nicht beeinträchtigt und ähnlich wie beim Wildtyp. Obwohl also KdpD-R511Q das EIIA^{Ntr} nicht für die Aktivierung der *kdp-lacZ*-Expression benötigt, ist es immer noch in der Lage mit EIIA^{Ntr} zu interagieren. Zusammengefasst scheinen zumindest zwei der Reste im Arginin-Cluster für die Interaktion mit EIIA^{Ntr} wichtig zu sein. Es ist also möglich, dass EIIA^{Ntr} mit dieser Region in KdpD interagiert.

4.1.7. EIIA^{Ntr} interagiert mit der C-terminalen Domäne von KdpD

Die Analysen mit den im Arginin-Cluster mutierten KdpD-Proteinen lieferte erste Hinweise, dass die C-terminale Domäne von KdpD für die Interaktion mit EIIA^{Ntr} wichtig ist. Dies sollte durch eine Deletionsanalyse näher untersucht werden. Daher wurde im Folgenden untersucht, wie sich Verkürzungen des Proteins KdpD auf die Interaktion mit EIIA^{Ntr} auswirken. Die verschiedenen Bereiche von *kdpD* wurden amplifiziert und in einen Two-Hybrid Vektor kloniert. So entstanden diverse Plasmide, in denen die verschiedenen Bereiche von *kdpD* mit dem T18-Fragment von *cyaA* fusioniert waren. Der Stamm BTH101 wurde mit den neukonstruierten Plasmiden und Plasmiden, die entweder *ptsN* oder *ptsNH73A* enthielten, kotransformiert. Die Kulturen wurden in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 1 mM angezogen und es wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1.13 dargestellt. Die Verkürzungen KdpD 1-395, KdpD 1-448 sowie KdpD 1-526 und KdpD 1-666 zeigten keine Interaktion mit EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A. Demnach scheint der C-Terminus für die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} essentiell zu sein. Es wurden auch N-terminale Verkürzungen von KdpD getestet. Hier war zu beobachten, dass das Entfernen der N-terminalen Domäne von Aminosäure 1 bis 252 keinen Einfluss auf die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A hatte. Dieses verkürzte Protein zeigte ähnliche Werte für die Interaktionen mit EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A wie das

Wildtyp KdpD. Wenn allerdings zusätzlich der C-Terminus nur leicht verkürzt und die HATPase Domäne von KdpD entfernt wurde (KdpD 1-766), verschlechterte sich die Interaktion sowohl zwischen KdpD und EIIA^{Ntr} als auch zwischen KdpD und EIIA^{Ntr} H73A.

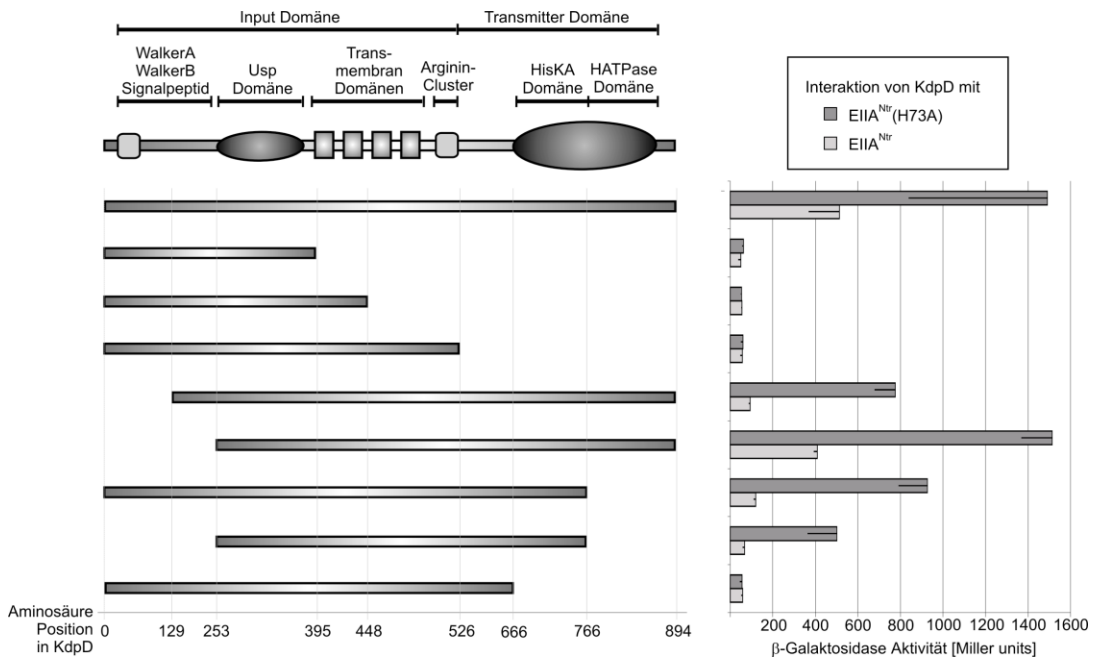


Abbildung 4.1.13: Interaktion von KdpD Verkürzungen mit EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (*kdpD* an T18 fusioniert: von oben nach unten: *kdpD*: pBGG267; *kdpD* 1-395: pBGG265; *kdpD* 1-448: pBGG297; *kdpD* 1-526 pBGG371; *kdpD* 129-894: pBGG359; *kdpD* 253-894: pBGG369; *kdpD* 1-766 pBGG360; *kdpD* 253-766: pBGG386 und *kdpD* 1-666: pBGG370) wurden jeweils zusammen mit den Plasmiden T25-*ptsN*: pBGG261 oder T25-*ptsNH73A*: pBGG262 in den Stamm BTH101 eingebracht. Von den erhaltenen Kolonien wurden Kulturen angezogen (Kaliummedium 1mM) und β-Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β-Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Wurde die Output Domäne von KdpD fast komplett entfernt (KdpD 1-666), so ging die Interaktion zwischen KdpD und den EIIA^{Ntr} vollkommen verloren. Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass der Bereich von Aminosäure 526 bis 766 essentiell für eine Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} ist. Die Region 767-894 scheint die Interaktion der beiden Proteine zu unterstützen. Beim Vorhandensein dieses Bereichs ist die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} stärker.

Nun musste sichergestellt werden, dass die verkürzten KdpD Proteine, welche im BACTH keine Interaktion mit EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A zeigten, trotzdem in der Zelle

produziert werden und funktional sind. Hierzu wurden die Kotransformanten der verschiedenen *kdpD* Allele und *ptsN* angezogen, die gewonnenen Zellextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Vorhandensein der Proteine per Western Blot überprüft. Hier konnten nur sehr wenige der KdpD Verkürzungen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde bereits beobachtet, dass T18- und T25-Fusionsproteine die in BACTH keine Interaktion zeigen in der Zelle nicht stabil sind. Durch diese Tatsache, kann nicht zwischen fehlender Interaktion und generelle Instabilität eines Fusionsproteins unterschieden werden (Workentine *et al.*, 2009). In einem neuen experimentellen Ansatz wurden die KdpD Verkürzungen auf ihre Dimerisierung mit dem KdpD Wildtypprotein und Interaktion mit dem Response Regulator KdpE getestet (Abbildung 4.1.14).

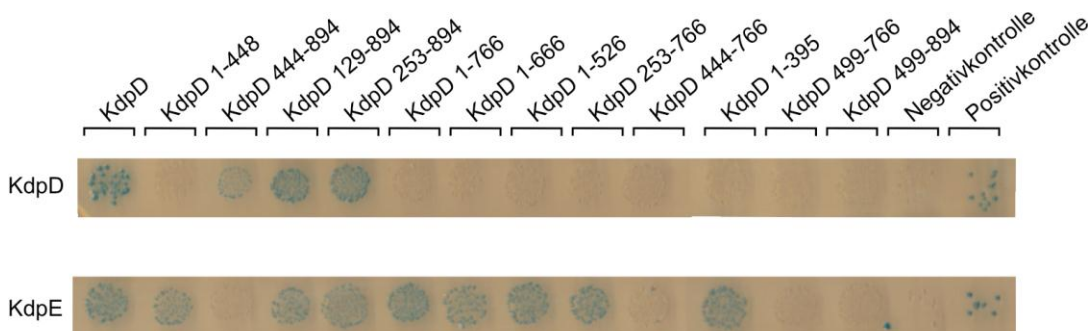


Abbildung 4.1.14: Interaktionsanalyse von KdpD Verkürzungen mit KdpD und KdpE. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (*kdpD* an T18 fusioniert: von links nach rechts: *kdpD*: pBGG267; *kdpD* 1-448: pBGG297; *kdpD* 444-894: pBGG298; *kdpD* 129-894: pBGG359; *kdpD* 253-894: pBGG369; *kdpD* 1-766 pBGG360; *kdpD* 1-666: pBGG370; *kdpD* 1-526 pBGG371; *kdpD* 253-766: pBGG386; *kdpD* 444-766: pBGG387; *kdpD* 1-395: pBGG265; *kdpD* 499-766: pBGG388 und *kdpD* 499-894: pBGG266 wurden mit den Plasmiden T25-*kdpD*: pBGG267 und T25-*kdpE*: pBGG263 in den Stamm BTH101 kotransformiert. Die Kolonien wurden auf LB-Agar mit X-Gal und IPTG phänotypisch analysiert

Diejenigen KdpD Proteine, die keine Interaktion mit KdpD oder KdpE zeigten, waren in den obigen Experimenten (s. Abb. 4.1.13) nicht weiter untersucht worden. Hier war zu vermuten, dass die Proteine nicht funktional oder stabil sind. Für alle weiteren Konstrukte wurden LacZ-Messungen zur Quantifizierung der Interaktionen durchgeführt (Abb. 4.1.15). Nur für diese weiterverwendeten Konstrukte wurde die Interaktion mit EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A untersucht (siehe Abb. 4.1.13). Die quantitative Bestimmung der Interaktionen zeigt, dass nur das KdpD Wildtypprotein, sowie KdpD 129-894 und KdpD 253-894 mit KdpD interagieren können. Alle der in

Abbildung 3.1.15 getesteten KdpD Konstrukte zeigen Interaktion mit KdpE. Die Stabilität der Proteine konnte also dadurch nachgewiesen werden, dass die verschiedenen KdpD Proteine Interaktion mit KdpE zeigten.

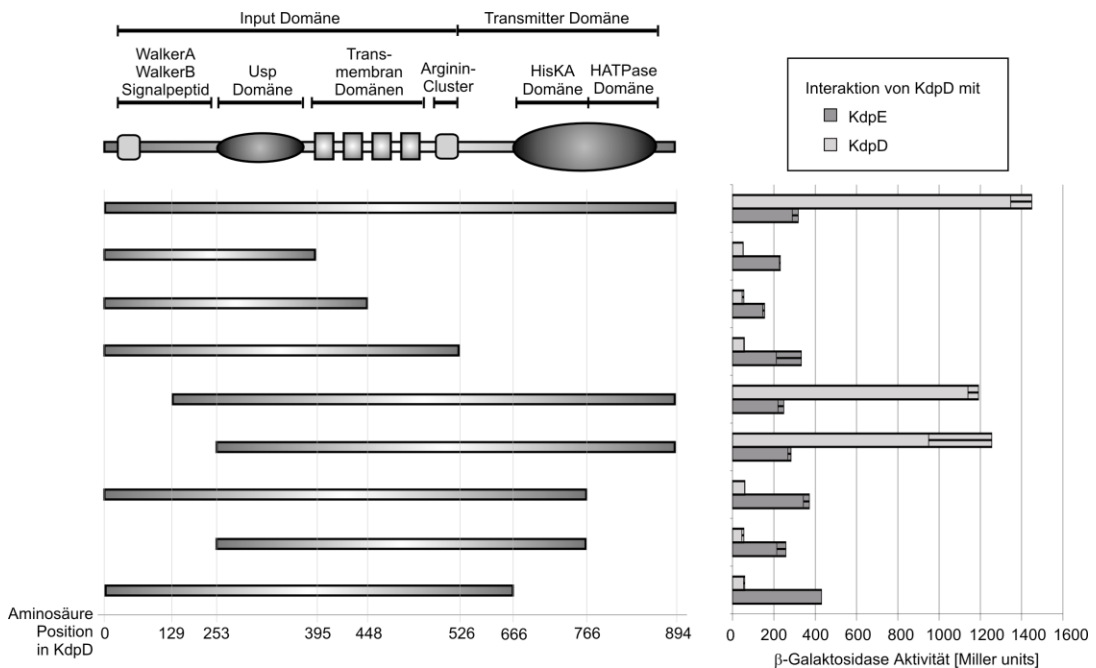


Abbildung 4.1.15: Interaktion verkürzter KdpD-Proteine mit Vollängen KdpD und KdpE. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (*kdpD* an T18 fusioniert: von oben nach unten: *kdpD*: pBGG267; *kdpD* 1-395: pBGG265; *kdpD* 1-448: pBGG297; *kdpD* 1-526 pBGG371; *kdpD* 129-894: pBGG359; *kdpD* 253-894: pBGG369; *kdpD* 1-766 pBGG360; *kdpD* 253-766: pBGG386 und *kdpD* 1-666: pBGG370) wurden mit den Plasmiden T25-*kdpD*: pBGG267 und T25-*kdpE*: pBGG263 in den Stamm BTH101 kotransformiert. Von den erhaltenen Kolonien wurden Kulturen in LB-Medium angezogen und β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

4.1.8. Untersuchung der Interaktion von EIIA^{Ntr} mit chimären KdpD Proteinen zur Eingrenzung der Interaktionsfläche

Wie viele andere Bakterien auch, besitzt auch *Ralstonia eutropha* weitere Homologe der PTS Proteine. Unter anderem wurde ein EIIA^{Ntr} (*ptsN*) Homolog identifiziert. Außerdem besitzt *R. eutropha* auf seinen zwei Chromosomen zwei Kopien von KdpD Homologen. Das Gen für KdpD1 kolokalisiert mit *kdpE*. Das Gen *kdpD2* lokalisiert in einem Gencluster mit *kdpE/A/B/C* vor (Pohlmann *et al.*, 2006). Es war nun interessant zu überprüfen, ob die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit KdpD auch in *R. eutropha* konserviert

ist. Um dies zu überprüfen wurden neben den Plasmiden, welche die Gene aus *E. coli* enthielten auch Plasmide verwendet, die *ptsN*-, *ptsNH67A*-, sowie *kdpD2*-Fusionen mit den Untereinheiten der Adenylatzyklase enthielten. Die Interaktionen der unterschiedlichen Proteine sollten so organismenübergreifend analysiert werden. Die Transformanten des BTH101 Stammes wurden phänotypisch auf LB-Agarplatten analysiert (Abbildung 4.1.16).

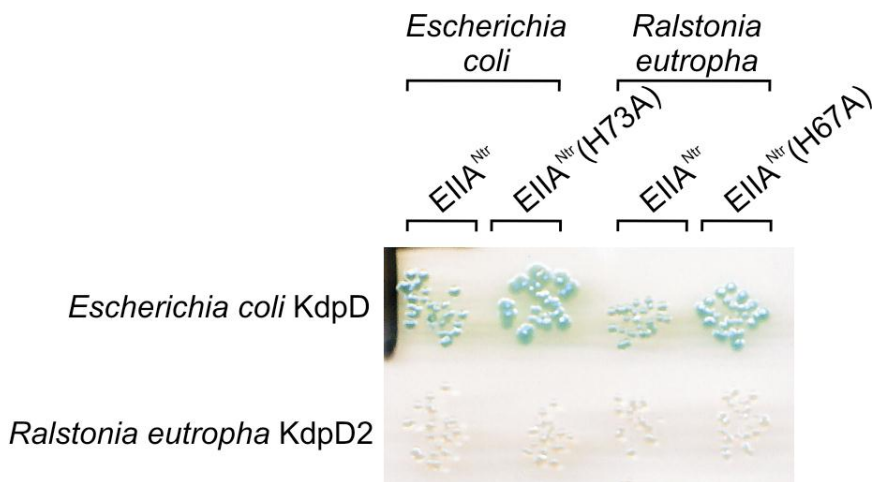


Abbildung 4.1.16: Interaktionsanalyse von KdpD, EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A aus *E. coli* und *R. eutropha*. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (*E.c. kdpD*: pBGG264; *R.e. kdpD*: pGP1675; *E.c. ptsN*: pBGG261; *E.c. ptsNH73A*: pBGG262; *R.e. ptsN*: pGP1660 und *R.e. ptsNH67A*: pGP1682) wurden in verschiedenen Kombinationen in den Stamm BTH101 kotransformiert. Die Kolonien wurden auf LB-Agarplatten mit X-Gal und IPTG dargestellt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von unabhängigen Experimenten.

Die phänotypische Analyse bestätigt die bereits beobachtete Interaktion von *E. coli* KdpD mit EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A aus *E. coli*. Des Weiteren konnte eine Interaktion zwischen *E. coli* KdpD und EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H67A aus *R. eutropha* nachgewiesen werden. Die EIIA^{Ntr} Proteine aus *E. coli* und *R. eutropha* haben eine Homologie von 29% (siehe Abbildung 4.1.-18). Zwischen den *R. eutropha* Proteinen konnte keine Interaktion festgestellt werden. Auch EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A aus *E. coli* konnten nicht mit KdpD2 aus *R. eutropha* interagieren. Dies zeigt, dass die Interaktion zwischen KdpD und EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A, die in *E. coli* gezeigt wurde, in *R. eutropha* nicht vorhanden ist (Karstens, 2009) und Abbildung 4.1.16). Allerdings konnte diese fehlende Interaktion der Proteine für die Untersuchung der Interaktion der *E. coli* Proteine verwendet werden. KdpD aus *E. coli* und KdpD2 aus *R. eutropha* sind sehr ähnlich (45%) (siehe Abbildung 4.1.17). Die Untersuchung von chimären *E. coli*/*R. eutropha*

KdpD Proteinen könnte so nützlich sein um die Regionen, welche für die KdpD-EIIA^{Ntr} Interaktion wichtig sind, weiter einzugrenzen. Dadurch, dass keine Verkürzungen vorgenommen werden, sondern Vollängen Proteine für die Interaktionsanalysen genutzt werden, sollte das Problem der Instabilität umgangen werden. Des Weiteren wird durch die Nutzung von Vollängenproteinen erreicht, dass alle Domänen vorhanden sind und nicht etwa wichtig strukturelle Bereiche fehlen, die die Interaktion beeinträchtigen könnten.

A

E. coli KdpD MNNEPL-----RPDPDRLLEQT---- AAPHRGKLVFFGACAGVGKTWAML-AEQRLRAQ--GLDI
R. eutropha KdpD2 MPDAELREAGSRPDPDALL-QMVQEEGARASRGKLRVYFGASAGVGKTFAMLTA-A-RT-ASARGTDA

VVGVVETHGRKD TAAMLEGLAVLPLKQRQAYRGRHISEFDLDAALARRPALILMDELAHSNAPGSRHPK
 VIGIVETHGRAETEALIAGIERLPMKDVYRERVLQEFDLDAALVRRPALVLVDELAHSNAPGSRHPK

RWQDIEELLEAGIDVFTTVNVQHLESLNDVVSQVGTGIQVRETVPDPFFDAADDVVLVDLPPDDLRLRQL
 RWQDIQELQAAGIDVWTTVNVQHLDLSLNEAVGGITGIRVWETVPDVFVDSAEVVLVDLPADELRLRL

KEGKVYIAGQAERAIEHFFRKGNLIALRELALRRTADRVEEQMRARWGHPPGEEKVWHTRDAILLCIGH
 KEGKVYIPEQARHAARNFFRKGNLIALRELALRRTADRVDSDVRAWRQSEAVQGVWRTRAEVLACIGS

NTGSEKLVRAARLASRLGSHAVYVETPALHRLPEKKRAILSALRLAQELGAETATLSDPAEEKKA
 GDDAEQVVRSAARLAGQLDCDWHVVTIATPRLAPPSDFAKTRIQTAMRLAEELGARTEFLAGNDMVQA

VVRYAREHNLGKIILGR-PAS-RR-----WWR-RE-----T-----FADRLARIAPDL
 IVGYVRRHNLTKVVGIRAPADWRRGGASVAERARSLLGLALTPFVNAPAWLFGRRSFADALALGCFEI

DQVLVALDEPPARTINNAPDNRSEFKDKWRVQIQGCVV-----AAALCAVITLIAMQWLMAFDAANLV
 DIIRVAAD-TTRV--DLRP-RHGTEAPDAPAPGDGATRKDYLWAAAWCAGATALSALAFPWFDDVNNIA

MLYLLGVVVVALFYGRWPSVVAIVINVSFDLFFIAPRGT LAVSDVQYLLTFVAVMLTVGLVIGNLTAG
 MLFLAAVVGVALRHGRGPAALASVLAVAAFDFFVPPRLSFAVSDVQYLLTFLVLLSVGLVIGQLTAG

VRYQARVARYREQTRHLYEMSKALAVGRSPQDIAAT-SEQFTASTFHARSQVLLPDDNGKQLPLTHP
 LREQAQVAVQRENDARTLYELARELSAALVNPQIVSISR-FLRAAFDANSAFFLVSAGRLLPVSQD

QGMTPAIAQW-S-----FDKGLPAGAGTDTLPGVPIQLPLKSGEKTYG-LVVVEPGLNRQLM
 VEQHDGTARTSIDRVL-AEWFVDHQPAGTGHTLPGSTVLYLPLKAPMQTRGVLA-VEPAVSRFAFA

IPEQQRLLLETFTLLVANALERLTLTASEEQARMASEREQIRNALLAALSHDLRTPPLTVLFGQAEIITL
 QPALRRQVDVFTLIAIAIERLHYVEVAQLALLSMESERLRSLLAAVSHDLRTPPLTSLIGMAETMQR

DLASEGSPHARQASEIRQHVLNTRLVNLLDMARIQSGGFNLKKEWLTLEEVVGSALQMLEPGLSSP
 SDPGLAPSLAETVAAMLEQARRMRTMVNLLDMAKLQGREVRMSKEWQSVVEELV GASLAAMREALEHH

INLSLP-EPLTLIHVDGFLFERVLINLENNAVYAGAQAIEGIDAHVEGENLQDVLVDNGPGLPPGQE
 RVVVVDLSRVPLVECDVLIERVLNLENAAKYTPAGTEIRLSAAPVDEIRIAVEDDGGVPGKKE

QTIFDKFARGNKESAVPGVGLGLAICRAIVDVHGGTITAFN--RPE--GG-AC--FRVTLPPQQTAPEL
 RQIFEKFTRGERESATAGVGLGLAVCEAIVQAHHGRIWVEPAQRDRPGGQAGARFLVALPRGNPPAV

EEFHEDM

EPEQTDA

- Signalpeptid
- Usp Domäne
- Transmembrandomänen
- Arginin-Cluster
- HisKA Domäne
- HATPase Domäne

B

```

E. coli EIIANtr MTNNDTTLQLSSV---LNRECTRSRVHCQSKKRALEIISELAAKQLSLPPQVVFEAILT
R. eutropha EIIANtr M-NRLAKL-LPPGNITLDVSVT-----SKKRVFEEQAGLLFENNHGVARAIVTDNLFA

REKMGSTGIGNGIAIPHGKLEEDTLRA-VGVFVQLETPIAFDAIDNQVVDLL-FALLVP
RESLGSTGLGAGVAIPHGRIGK--LKQPLAAFMLAEPIPFESPDGKPVSLLIIF-LLVP

ADQ-TKTHLHTLSLVAKRLADKTCRR-LRAAQ-SDEE-LYQI-ITDTEGTPDEA
E-QATQQHLEILSEIAQLLSDRDM-REGL-ATLPTP-DAVHQLLIAWHP

```

Abbildung 4.1.17: Alignment von (A) KdpD und (B) EIIA^{Ntr} aus *E. coli* und *R. eutropha*. Die Proteinsequenzen von KdpD und EIIA^{Ntr} wurden mit Vector NTI auf Übereinstimmung und Ähnlichkeit der Proteine überprüft. Aminosäuren, die nicht übereinstimmen sind schwarz markiert, gleiche Aminosäuren sind rot und ähnliche Aminosäuren in grün markiert. (A) Alignment von KdpD aus *E. coli* und KdpD2 aus *R. eutropha*. Wichtige Domänen des Proteins sind farblich gekennzeichnet. Die Proteine besitzen eine Übereinstimmung von 45% und eine Ähnlichkeit von 58%. (B) Alignment von EIIA^{Ntr} aus *E. coli* und *R. eutropha*. Die Proteine besitzen eine Übereinstimmung von 29% und eine Ähnlichkeit von 46%.

kdpD aus *E. coli* und *kdpD2* aus *R. eutropha* wurden in Vektoren des Two Hybrid Systems eingebracht. Außerdem wurden verschiedene Chimären konstruiert. Diverse Fusionsgene wurden hierfür durch die Kombination der verschiedenen Gensequenzen in den Two-Hybrid Vektor eingebracht, so dass isogene Konstrukte entstanden (siehe Abbildung 4.1.18). Die Plasmide, die entweder *kdpD* aus *E. coli*, *kdpD2* aus *R. eutropha* oder die chimären *kdpD*-Gene enthielten, wurden zusammen mit Plasmiden, die entweder T25-*ptsN*- oder T25-*ptsNH73A*-Fusionen enthielten, in den Stamm BTH101 eingebracht. Die Transformanten wurden in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 1 mM angezogen. Anschließend wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1.18 dargestellt.

Für die Chimäre *R. e. KdpD2* (1-712)/*E. c. KdpD* (667-894) (Chimäre A) konnte keine Interaktion mit EIIA^{Ntr} beobachtet werden. Allerdings zeigt das Protein eine schwache Interaktion mit EIIA^{Ntr}H73A. Wurde die komplette C-terminale Region von *E. coli* KdpD an die vordere Region von *R. eutropha* KdpD2 (*R. e. kdpD2* (1-537)/*E. c. kdpD* (499-894) (Chimäre B) fusioniert, so war diese Chimäre in der Lage mit EIIA^{Ntr} zu interagieren. Die Interaktion mit EIIA^{Ntr}H73A war sehr viel stärker als die der ersten Chimäre. Demgegenüber zeigten die Chimären, in denen nur Teile der N-terminalen Domäne aus *E. coli* stammten (Abbildung 4.1.18 Chimären C und F) keine Interaktion mit EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A. Betrachtet man diese fehlende Interaktion allein, scheint der N-Terminus nicht wichtig für die Interaktion der Proteine miteinander. Werden

diese vorderen Bereiche aber mit den C-terminalen Regionen von *E.coli* KdpD kombiniert (vgl. Chimäre B mit E und G) so führte dies immer zu einer weiteren Verstärkung der Interaktion mit EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A. Durch die Untersuchung der Chimäre H konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Bereich des Arginin-Clusters und der dahinter folgenden Linkerregion des *E. coli* KdpD für eine Interaktion mit EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A nicht ausreichend war. Zwei weitere Konstrukte, in denen nur das KdpD Arginin-Cluster bzw. das Arginin-Cluster sowie die Transmitter Domäne aus *E. coli* KdpD stammten, wurden nicht exprimiert oder waren in der Zelle instabil (Daten nicht gezeigt). Deshalb konnten sie nicht weiter untersucht werden.

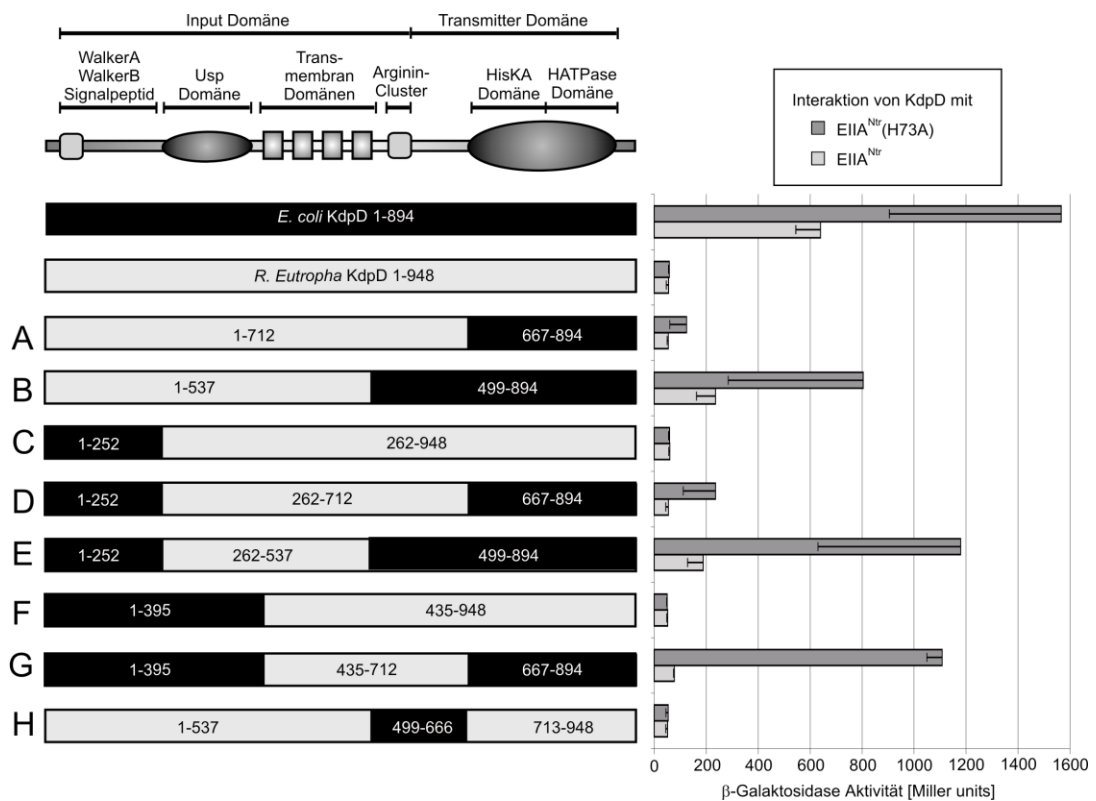


Abbildung 4.1.18: Interaktion von KdpD aus *E. coli*, KdpD2 aus *R. eutropha* und diversen KdpD-Chimären mit EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr} H73A. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (von oben nach unten: *E.c. kdpD*: pDL1; *R.e. kdpD2*: pDL2; *R.e. kdpD2*(1-712)/*E.c. kdpD*(667-894): pDL3; *R.e. kdpD2*(1-537)/*E.c. kdpD*(499-894): pDL9; *E.c. kdpD*(1-252)/*R.e. kdpD2*(262-948): pDL8; *E.c. kdpD*(1-252)/*R.e. kdpD2*(262-712)/*E.c. kdpD*(667-894): pDL10; *E.c. kdpD*(1-252)/*R.e. kdpD2*(262-537)/*E.c. kdpD*(499-894): pDL12; *E.c. kdpD*(1-395)/*R.e. kdpD2*(435-948): pDL25; *E.c. kdpD*(1-395)/*R.e. kdpD2*(435-712)/*E.c. kdpD*(667-894): pDL23; *R.e. kdpD2*(1-537)/*E.c. kdpD*(499-666)/*R.e. kdpD2*(713-948): pDL13; *R.e. kdpD2*(1-537)/*E.c. kdpD*(499-526)/*R.e. kdpD2*(566-948): pDL14 und *R.e. kdpD2*(1-537)/*E.c. kdpD*(499-526)/*R.e. kdpD2*(566-712)/*E.c. kdpD*(667-894): pDL24) wurden mit den Plasmiden T25-*ptsN*: pBGG261 und T25-*ptsNH73A*: pBGG262 in den Stamm BTH101 eingebracht. Von den erhaltenen Kolonien wurden Kulturen angezogen (Kaliummedium

1mM) und β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die Funktionsfähigkeit und Stabilität der chimären Proteine wurde durch die Interaktion mit den KdpD Wildtypproteinen aus *E. coli* und *R. eutropha* überprüft. Hierzu wurden die Plasmide, welche für die chimären Proteine kodieren und die Plasmide für die jeweiligen Wildtypproteine mit Two Hybrid Plasmiden kotransformiert, die entweder *kdpD* aus *E. coli* oder *kdpD2* aus *R. eutropha* enthielten. Die Dimerisierung wurde quantitativ durch β -Galaktosidase-Messungen untersucht (Abbildung 4.1.19). Die meisten der chimären Proteine zeigten Interaktionen sowohl mit *E. coli* KdpD als auch mit *R. eutropha* KdpD2. Die Stärke der Interaktionen war dabei sehr unterschiedlich. Dies lag wahrscheinlich an den unterschiedlichen Kombinationen der Bereiche aus den beiden Proteinen. Für zwei chimäre Proteine konnte keine Interaktion mit den Wildtypproteinen festgestellt werden (Chimären I und J). Für diese Proteine konnte auch keine Interaktion mit EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

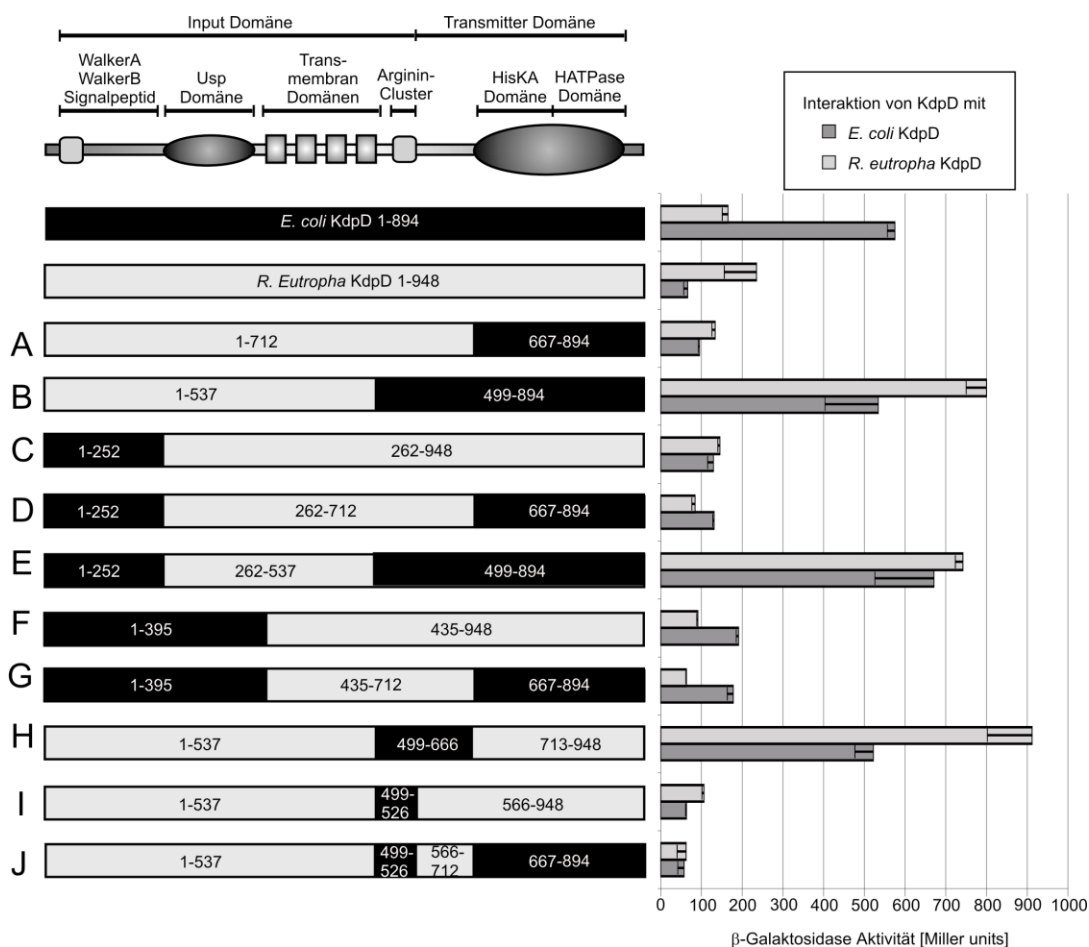


Abbildung 4.1.19: Interaktion von KdpD aus *E. coli*, KdpD2 aus *R. eutropha* mit diversen KdpD-Chimären. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (wie in Abb. 4.1.18) wurden mit den Plasmiden *E.c. kdpD*: pBGG267 und *R.e. kdpD2*: pGP1674 in den Stamm BTH101 eingebracht. Von den erhaltenen Kolonien wurden Kulturen in LB-Medium angezogen und β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Zusammenfassend ergibt sich dass der C-Terminus von *E. coli* KdpD für die Interaktion mit EIIA^{Ntr} essentiell ist. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der Untersuchung der verkürzten KdpD Proteine (Abschnitt 4.1.7.). Auch dort wurde herausgefunden, dass der C-Terminus von KdpD für die Interaktion essentiell ist. Die HisKA Domäne scheint von besonderer Wichtigkeit. Der vordere Bereich der C-terminalen Domäne und der Bereich der HATPase Domäne unterstützen die Interaktion. EIIA^{Ntr} wirkt durch die Interaktion mit der C-terminalen Domäne von KdpD auf die Expression des *kdp*-Operons aus. Es kann vermutet werden, dass die Interaktion von EIIA^{Ntr} und KdpD eine Veränderung der KdpD Aktivität zur Folge hat, damit sich die Interaktion auf die Regulation der *kdp*-Expression auswirken kann. Hier bestanden verschiedene Möglichkeiten: (1) EIIA^{Ntr} stimuliert die Kinase Aktivität von KdpD. (2) EIIA^{Ntr} hemmt die Phosphatase Aktivität von KdpD. (3). Diese beiden Möglichkeiten wurden im Folgenden analysiert.

4.1.9. Auswirkungen der Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A auf die Aktivität der Sensorkinase

4.1.9.1. Rekonstitution der KdpD/KdpE Phosphorylierungskaskade *in vitro*

Um den Einfluss von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A auf die Autophosphorylierung und die Kinase Aktivität von KdpD *in vitro* zu untersuchen, wurden die aufgereinigten Proteine His-EIIA^{Ntr}, His-EIIA^{Ntr}H73A, KdpD-His und His-KdpE benötigt. KdpD wurde in Proteoliposomen rekonstituiert und mit KdpE und DNA-Fragmenten, die KdpE Bindestellen enthielten in Puffer mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen gemischt (Heermann *et al.*, 2009; Lüttmann *et al.*, 2009). Diese Ansätze wurden mit und ohne Zugabe von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A inkubiert und die Phosphorylierungsreaktion

durch Zugabe von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und ADP [8:1] gestartet. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Proteine nach ihrer Größe in einem denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die phosphorylierten Proteine konnten mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden (Lüttmann *et al.*, 2009). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1.20 gezeigt. Die Untersuchung des Einflusses von EIIA^{Ntr} und $\text{EIIA}^{\text{Ntr}}\text{H73A}$ auf die Phosphorylierungskaskade von KdpD und KdpE wurde von Ralf Heermann (Ludwig-Maximilians Universität München) durchgeführt.

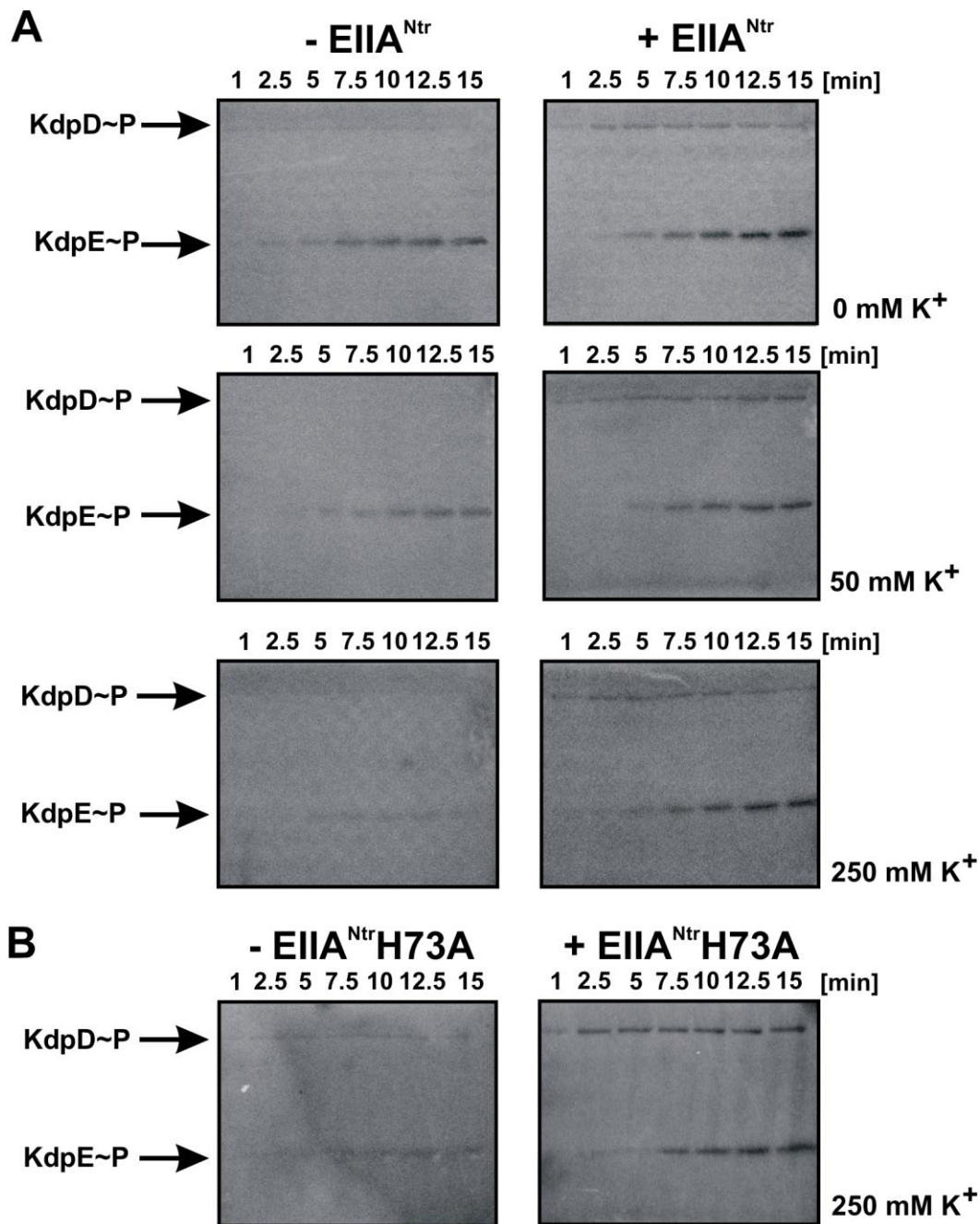


Abbildung 4.1.20: EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A stimulieren die KdpD/KdpE Phosphorylierungskaskade *in vitro*. KdpD-haltige Proteoliposomen wurden mit KdpE und DNA gemischt (A) Die Phosphorylierung von KdpD und KdpE wurde in An- und Abwesenheit von EIIA^{Ntr} analysiert. Die Reaktionen wurden bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen (0; 50 und 250 mM) durchgeführt. (B) Die Phosphorylierung von KdpD und KdpE wurde in An- und Abwesenheit von EIIA^{Ntr}H73A analysiert. Die Reaktion wurde bei einer Kaliumkonzentration von 250 mM durchgeführt. Die gezeigten Autoradiographien sind repräsentative Beispiele von unabhängigen Experimenten. Durchführung der Experimente: Ralf Heermann (Ludwig-Maximilians Universität München).

In den Ansätzen ohne EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A war bei Kaliumkonzentrationen von 0 und 50 mM eine Phosphorylierung des Response Regulators KdpE zu erkennen. Bei 250 mM konnte die Sensor kinase nicht, aber der Response Regulator in geringen Mengen in der phosphorylierten Form detektiert werden (Abbildung 4.1.20 A links). Durch Zugabe von EIIA^{Ntr} verstärkte sich das Signal für KdpE bei niedrigen Kaliumkonzentrationen. Auch bei der Phosphorylierungsreaktion bei 250 mM Kalium konnte nun mehr KdpE-P detektiert werden (Abbildung 4.1.20 A rechts). Die Zugabe von EIIA^{Ntr} bewirkte weiterhin die Akkumulation der phosphorylierten Form von KdpD bei allen getesteten Kaliumkonzentrationen. Die Anwesenheit von EIIA^{Ntr}H73A verstärkte die Phosphorylierung der beiden Proteine des Zwei-Komponenten Systems weiter (Abbildung 4.1.20 B). Die Signale waren viel stärker im Vergleich zum Ansatz mit und ohne das EIIA^{Ntr} Wildtypprotein. Die Anwesenheit von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A stimuliert somit die Phosphorylierungskaskade von KdpD und KdpE. Dies könnte durch eine EIIA^{Ntr}-abhängige Stimulierung der Kinase Aktivität der Sensor kinase KdpD oder aber durch die Inhibition der Phosphatase Aktivität von KdpD geschehen.

4.1.9.2. EIIA^{Ntr} stimuliert die Kinase Aktivität von KdpD

In weiteren Analysen wurde nun die Kinase Aktivität von KdpD untersucht. Hierfür wurde KdpD in Proteoliposomen phosphoryliert und nach dieser Vorinkubation KdpE hinzugegeben. Die Verteilung der Phosphorylierung der Proteine KdpD und KdpE wurde anschließend per Autoradiographie analysiert (Abbildung 4.1.21). Die Untersuchung des Einflusses von EIIA^{Ntr} auf die Kinase Aktivität von KdpD wurde von Ralf Heermann (Ludwig-Maximilians Universität München) durchgeführt.

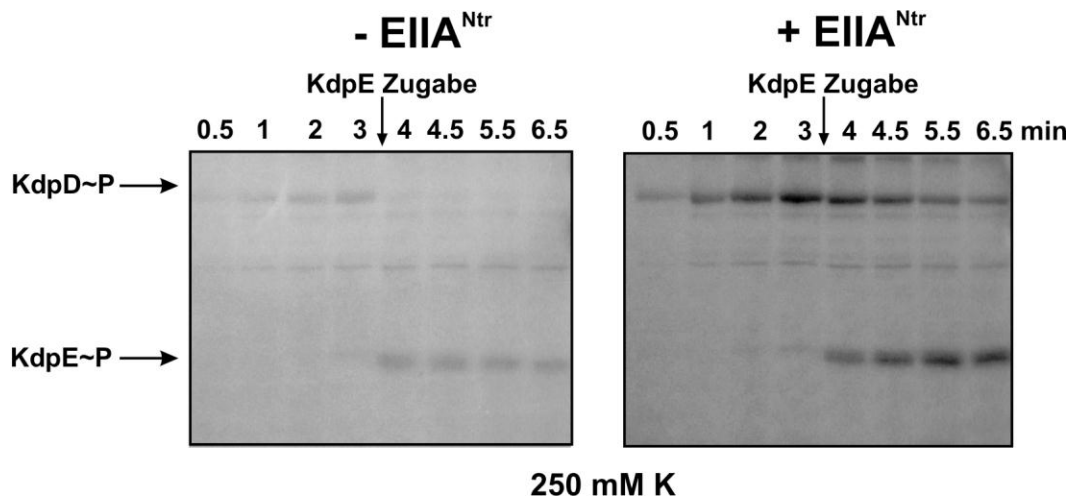


Abbildung 4.1.21: EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A stimulieren die Kinase Aktivität von KdpD *in vitro*. KdpD-haltige Proteoliposomen wurden in Puffer mit 250 mM Kalium inkubiert und KdpD wurde mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP phosphoryliert. Nach 3,5 min wurde KdpE hinzugegeben und nach unterschiedlichen Zeiten Proben der Reaktion entnommen, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. (A) Die Phosphorylierung von KdpD und KdpE wurde in Abwesenheit von EIIA^{Ntr} analysiert. (B) Die Phosphorylierung von KdpD und KdpE wurde in Anwesenheit von EIIA^{Ntr} analysiert. Die gezeigten Autoradiographien sind repräsentativ für unabhängig durchgeführte Experimente. Durchführung der Experimente: Ralf Heermann (Ludwig-Maximilians Universität München).

In den Autoradiographie ist zu erkennen, dass die Phosphorylierung von KdpD zeitabhängig zunimmt. Dabei schien die Phosphorylierung des Proteins bei allen Zeitpunkten durch Zugabe von EIIA^{Ntr} stärker zu sein. EIIA^{Ntr} stimuliert also die Autophosphorylierung der Sensor kinase. Nach 3,5 min wurde unphosphoryliertes KdpE hinzugegeben und somit die Kinase Aktivität durch Übertragung des Phosphats auf KdpE analysiert. Hier zeigte sich, dass die Phosphorylierung von KdpD durch Zugabe von KdpE sofort verloren ging. Gleichzeitig konnte KdpE in der phosphorylierten Form detektiert werden. In dem Ansatz mit EIIA^{Ntr} nahm die Phosphorylierung von KdpD zeitabhängig ab und die Phosphorylierung von KdpE nimmt gleichzeitig zu. Insgesamt war die Phosphorylierung beider Proteine bei Anwesenheit von EIIA^{Ntr} stärker. EIIA^{Ntr} stimuliert also die Kinase Aktivität von KdpD.

4.1.9.3. EIIA^{Ntr} hat keinen Einfluss auf die Phosphatase Aktivität von KdpD

In dem vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass sich EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A auf die Kinase Aktivität von KdpD auswirken. Nun war es interessant herauszufinden, ob auch die Phosphatase Aktivität des Proteins durch EIIA^{Ntr}

beeinflusst wird. Hierzu wurden wieder aufgereinigte Proteine verwendet. KdpE wurde mit phosphorylierter Sensorkinase KdpD vorphosphoryliert. Anschließend wurde KdpE in seiner phosphorylierten Form aufgereinigt und mit in Proteoliposomen rekonstituierter Sensorkinase in An- und Abwesenheit von $EIIA^{Ntr}$ inkubiert. Durch die KdpE-spezifische Phosphatase Aktivität sollte KdpE dephosphoryliert werden. Es wurde untersucht, ob $EIIA^{Ntr}$ auf diese Reaktion einen Einfluss hat. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 4.1.22 gezeigt. Die Untersuchung des Einflusses von $EIIA^{Ntr}$ auf die Phosphatase Aktivität von KdpD wurde von Ralf Heermann (Ludwig-Maximilians Universität München) durchgeführt.

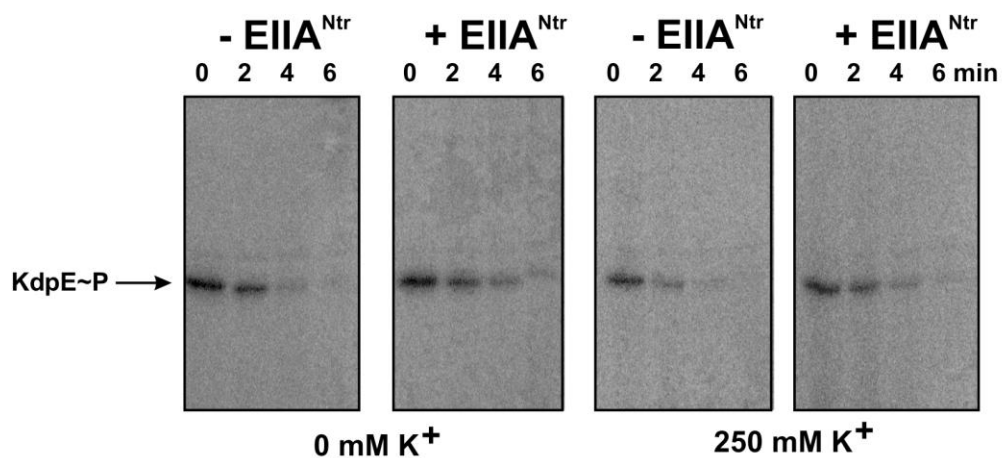


Abbildung 4.1.22: $EIIA^{Ntr}$ hat keinen Einfluss auf die Phosphatase Aktivität von KdpD *in vitro*. KdpD-haltige Proteoliposomen wurden in Puffer mit 250 mM Kalium inkubiert und KdpD mit $[\gamma^{32}P]$ -ATP phosphoryliert. Nach 3,5 min wurde KdpE hinzugegeben und nach unterschiedlichen Zeiten Proben der Reaktion entnommen, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. (A) Die Phosphorylierung von KdpD und KdpE wurde in Abwesenheit von $EIIA^{Ntr}$ analysiert. (B) Die Phosphorylierung von KdpD und KdpE wurde in Anwesenheit von $EIIA^{Ntr}$ analysiert. Die gezeigten Autoradiographien sind repräsentative Beispiele von unabhängigen Experimenten. Durchführung der Experimente: Ralf Heermann (Ludwig-Maximilians Universität München).

In den Autoradiographien ist zu erkennen, dass die Phosphorylierung von KdpE schnell nach der Zugabe von KdpD abnimmt. Dabei verschwindet die Phosphorylierung bei einer Kaliumkonzentration von 250 mM im Reaktionspuffer schneller als bei der Abwesenheit von Kalium. Bei einer Kaliumkonzentration von 250 mM scheint $EIIA^{Ntr}$ keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Phosphatase Reaktion zu haben. Ebenfalls ist zu erkennen, dass durch die Zugabe von $EIIA^{Ntr}$ in dem Ansatz ohne Kalium die Phosphatase Reaktion etwas langsamer abläuft als bei Abwesenheit von $EIIA^{Ntr}$.

4.1.10. Untersuchung zur Physiologischen Bedeutung der Steuerung der Aktivität der Sensorkinase KdpD durch EIIA^{Ntr}

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass EIIA^{Ntr} die Kinase Aktivität der Sensorkinase KdpD stimuliert. Dies führt zu einer verstärkten Phosphorylierung des Response Regulators KdpE und einer vermehrten Expression des *kdp*-Operons. Allerdings ist die physiologische Bedeutung dieser Regulation noch unklar. Es wäre vorstellbar, dass EIIA^{Ntr} für die schnelle und effiziente Expression des *kdp*-Operons bei Kaliummangel verantwortlich ist. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass die $\Delta ptsN$ Mutante keinen Wachstumsdefekt gegenüber dem Wildtyp bei Anzucht in verschiedenen Kaliumkonzentrationen hatte (Daten nicht gezeigt).

4.1.10.1. Einfluss einer $\Delta ptsN$ Mutation auf die Expression des *kdp*-Operons bei einem Kalium-Downshift

Es wurde untersucht, ob die Interaktion zwischen KdpD und EIIA^{Ntr} und die daraus resultierende Stimulation der *kdp*-Expression den *E. coli* Zellen einen Vorteil verschafft, wenn sie plötzlichem Kaliummangel ausgesetzt werden. Hierzu wurde das Wachstum und die Anpassung an Kaliummangel durch die Analyse der Expression des *kdp*-Operons analysiert. Der Wildtyp und die isogene $\Delta ptsN$ Mutante mit chromosomalen *kdpFA*'-lacZ-Fusionen wurden in Minimalmedium mit Glukose und einer Kaliumkonzentration von 5 mM angezogen. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, gewaschen und in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 0,1 mM überimpft. Die optische Dichte wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt und es wurden Proben für einen β -Galaktosidase-Aktivitätstest entnommen. Die Resultate für die Wachstumsexperimente und die β -Galaktosidase-Messungen sind in Abbildung 4.1.23 gezeigt.

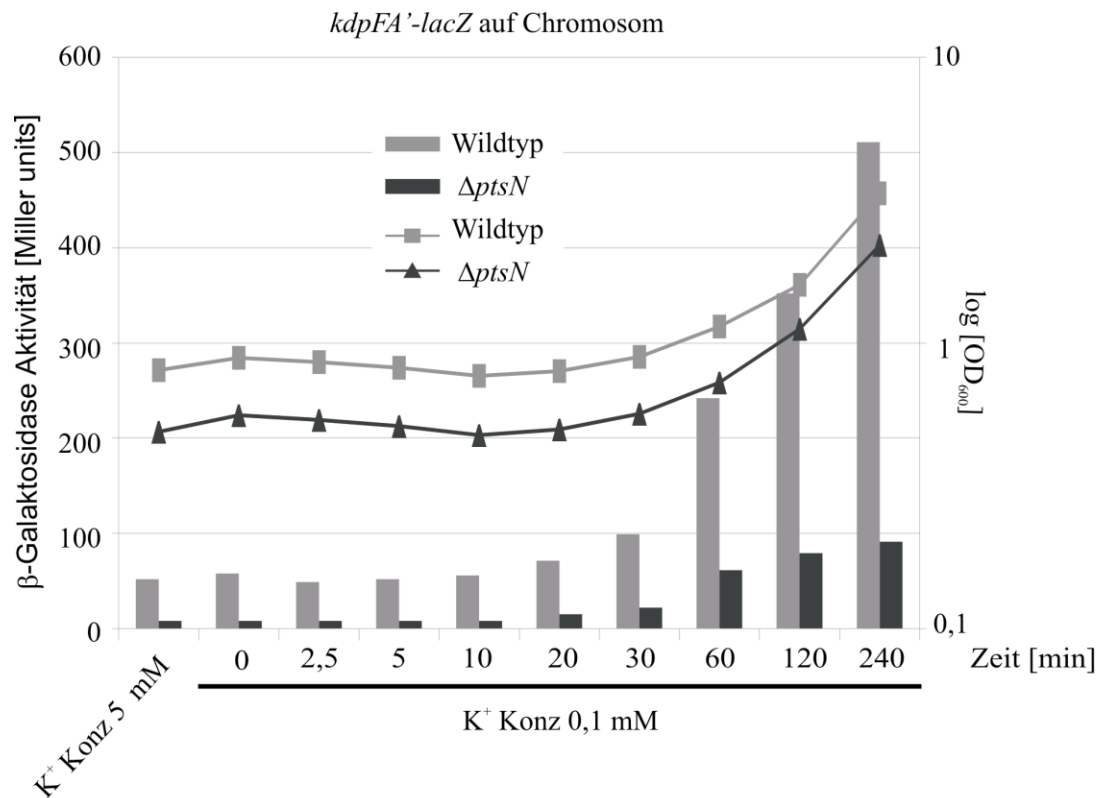


Abbildung 4.1.23: Durch die Deletion von *ptsN* wird die Induktion der Expression der *kdpFA`-lacZ*-Fusion bei Kaliummangel verzögert. Die Stämme wurden in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM angezogen. In der exponentiellen Phase wurden die Zellen geerntet und in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 0,1 mM überimpft. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der OD_{600} und für die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität entnommen. Das Wachstum des Wildtyps (Z367) und der $\Delta ptsN$ Mutante (Z406) und sowie die LacZ-Aktivitäten der chromosomalen *kdpFA`-lacZ*-Fusion beider Stämme ist dargestellt.

Die Absenkung der Kaliumkonzentration im Medium bewirkte bei beiden Stämmen ein verlangsamtes Wachstum (hell- und dunkelgraue Linien in Abbildung 4.1.23). Erst nach etwa 30 min in dem neuen Medium mit einer geringeren Kaliumkonzentration fingen beide Stämme an, sich auf die neue Situation einzustellen. Zu diesem Zeitpunkt begann das Wachstum wieder und die Expression des *kdp*-Operons wurde induziert. Es fällt auf, dass beide Stämme etwa gleichzeitig mit dem Wachstum begannen und, dass die Zunahme der optischen Dichte bis 2 Stunden nach dem Umimpfen in beiden Stämmen ähnlich war. Bei der Expression des *kdp*-Operons unterschieden sich beide Stämme. Es ist zu beobachten, dass im Wildtyp und in der $\Delta ptsN$ Mutante die Expression induziert wurde. Dabei war die Induktion der Expression der *kdpFA`-lacZ*-Fusion im Wildtyp um das ca. 4- bis 4,5-fache höher als in einer $\Delta ptsN$ Mutante (vgl. hellgraue- mit

dunkelgrauen Säulen zu Zeitpunkten 0 bis 120 min in Abbildung 4.1.23). Nach 2 Stunden war bei der $\Delta ptsN$ Mutante nur noch eine kleine Steigerung der Expression erkennbar, im Wildtyp stieg die *kdp*-Expression weiter an. Zu diesem Zeitpunkt erhöhte sich der Expressionsunterschied beider Stämme auf das 5,6-fache (vgl. hellgraue- mit dunkelgrauer Säule zum Zeitpunkt 240 min in Abbildung 4.1.23). Dies zeigt, dass die $\Delta ptsN$ Mutante keinen Wachstumsdefekt bei einem abrupten Kaliummangel im Vergleich zum Wildtyp hat. Allerdings kann die $\Delta ptsN$ Mutante die Expression der *kdpFA`-lacZ*-Fusion vergleichsweise weniger stark und nur verlangsamt induzieren.

4.1.10.2. Einfluss einer $\Delta ptsN$ Mutation auf die Expression des *kdp*-Operons bei einer Veränderung der Osmolarität

Das KdpD/E Zwei-Komponenten System ist nicht nur durch die Veränderung der Kaliumkonzentration induzierbar, sondern auch durch osmotischen Stress. Osmotischer Stress kann durch die Zugabe von NaCl zum Anzuchtmedium erreicht werden (Hamann *et al.*, 2008; Zimmann *et al.*, 2007). Also sollte untersucht werden, ob EIIA^{Ntr} auch auf die Induktion des Kdp-Systems durch osmotischen Stress einen Einfluss hat. Hierzu wurden Vorkulturen des Wildtypstammes und der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante mit chromosomalen *kdpFA`-lacZ*-Fusionen in Minimalmedium mit Glukose und einer Kaliumkonzentration von 5 mM angezogen. Beide Stämme wurden zu einer OD₆₀₀ von 0,1 in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM in An- und Abwesenheit von 0,4 M NaCl angezogen. Die optische Dichte wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt und es wurden Proben für einen β -Galaktosidase-Aktivitätstest entnommen. Die Resultate der Wachstumsexperimente und der β -Galaktosidase-Messungen sind in Abbildung 4.1.24 gezeigt.

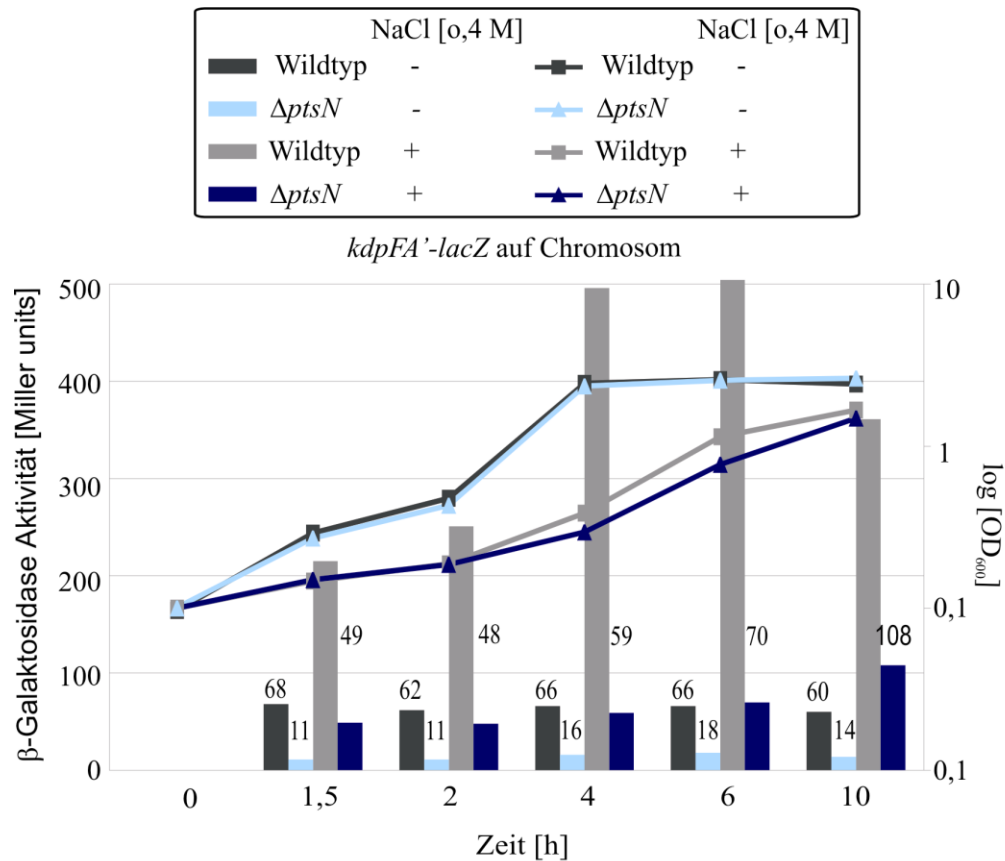


Abbildung 4.1.24: Die $\Delta ptsN$ Mutante zeigt eine verzögerte Anpassung an veränderte osmotische Bedingungen. Die Stämme wurden in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM +/- 0,4 M NaCl angezogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der OD_{600} und für die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität entnommen. Das Wachstum des Wildtyps (Z367) und der $\Delta ptsN$ Mutante (Z406) und sowie die LacZ-Aktivitäten der chromosomalen $kdpFA$ - $lacZ$ -Fusion beider Stämme ist dargestellt.

Die Wachstumsraten des Wildtyps und der $\Delta ptsN$ Mutante in Kaliummedium mit 5 mM Kalium war sehr ähnlich (vgl. hellblaue und schwarze Linien in Abbildung 4.1.24). Wie zu erwarten, veränderte sich die Expression der $kdpFA$ - $lacZ$ -Fusion nicht. Für den Wildtyp konnte zu allen Zeitpunkten eine β -Galaktosidase-Aktivität zwischen 60 und 70 Miller units gemessen werden. Die Werte für die $\Delta ptsN$ Mutante waren geringer und lagen zwischen 11 und 18 Miller units (schwarze und hellblaue Säulen in Abbildung 4.1.23). Sie waren bei allen Messzeitpunkten ähnlich hoch. Wurde dem Medium NaCl hinzugefügt, so verschlechterte sich das Wachstum beider Stämme (vgl. graue und dunkelblaue mit schwarzen und hellblauen Linien). Die $\Delta ptsN$ Mutante wuchs unter osmotischem Stress etwas schlechter als der Wildtyp (vgl. dunkelblaue mit grauer Linie in Abbildung 4.1.23). Für die Expression der kdp - $lacZ$ -Fusion konnte beobachtet

werden, dass die Aktivität in Wildtyp stark anstieg (graue Säulen: Anstieg von 68 auf 251 bis sogar 504 Miller units). Dies zeigt, dass das Kdp-System durch eine veränderte Osmolarität im Wildtyp stark induziert wurde. Nach sechs Stunden wurde die stärkste Induktion erreicht und die gemessene β -Galaktosidase-Aktivität verzehnfachte sich fast im Vergleich zur Kontrollanzucht ohne NaCl (vgl. hellgraue mit schwarzer Säule zum Zeitpunkt 6 h). Auch für die $\Delta ptsN$ Mutante stiegen die Werte an, aber nur leicht. Hier war die Expression zu Beginn des Experiments etwa 4-fach höher als in der Kontrollanzucht ohne NaCl (dunkelblaue mit hellblauen Säulen in Abbildung 4.1.23). Zehn Stunden nachdem der osmotische Stress ausgelöst worden war, stieg der Unterschied beider Kulturen (+/- NaCl) auf das zehnfache an (11 versus 108 Miller units, vgl. hellblaue mit dunkelblauer Säule zum Zeitpunkt 10 h). Die Ergebnisse zeigen, dass sich EIIA^{Ntr} auch auf die Wahrnehmung von osmotischen Stress durch das KdpD/KdpE Zwei-Komponenten System auswirkt. Eine Deletion von *ptsN* führt zu einer verminderten Expression des *kdp*-Operons bei osmotischem Stress. Damit einhergehend war ein schlechteres Wachstum der $\Delta ptsN$ Mutante beobachtbar. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Stimulation der KdpD Aktivität durch EIIA^{Ntr} für die rasche Anpassung der Zellen an veränderte osmotische Bedingungen benötigt wird.

4.2. Regulation des Pho-Regulons durch das PTSNtr

4.2.1. Die zellulären Mengen von Proteinen des Pho-Regulons werden von EIIANtr moduliert

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass EIIA^{Ntr} die Expression des *kdp*-Operons reguliert. Diese Regulation verändert auch die Mengen der Proteine des Kaliumtransporters KdpFABC. Nun wurde untersucht, ob durch die Deletion von *ptsN* die Veränderung der Mengen weiterer Proteine im Proteom beobachtet werden kann. Dieses Experiment wurde in einem $\Delta trkA::cat$ Stamm durchgeführt. Durch die Deletion von *trkA* (kodiert die TrkA Untereinheit des Kaliumtransporters Trk) sollte sichergestellt werden, dass die Veränderungen der Proteine im Proteom nicht indirekt durch die Steuerung der Aktivität von TrkA durch EIIA^{Ntr} hervorgerufen werden. Es

wurde also das Proteom der *ΔtrkA::cat* Mutante mit dem Proteom der *ΔptsN ΔtrkA::cat* Doppelmutante verglichen. Hierzu wurden die Zellextrakte auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine mit Coomassie blue angefärbt und die angefärbten Proteine beider Stämme miteinander verglichen. Es wurden zwei Proteinbanden beobachtet, die in der *ΔtrkA::cat* Mutante in großen Mengen vorkamen, in der *ΔptsN ΔtrkA::cat* Doppelmutante allerdings nicht zu detektieren waren. Die beiden Proteine wurden in massenspektrometrischen Untersuchungen als PhoA und PhnD identifiziert (Lüttmann, 2008). PhnD ist die periplasmatische Untereinheit des PhnCDE Transporters. Dieser kann Phosphonate, Phosphite, Phosphate und Phosphatester in die Zelle transportieren (Wanner, 1992). PhoA ist die alkalische Phosphatase. Möglicherweise werden PhoA und PhnD durch EIIA^{Ntr} reguliert. Sie tauchen nur im SDS-Gel auf, wenn *ptsN* exprimiert wird. Beide analysierten Proteine werden normalerweise nur unter Bedingungen der Phosphatlimitation synthetisiert und sind Bestandteil des Pho-Regulons (Wanner). Die Expression von *phnD* und *phoA* ist direkt durch das PhoR/PhoB Zwei-Komponenten System kontrolliert (Tommasen and Lugtenberg, 1982; Torriani, 1990).

4.2.2. EIIANtr reguliert die Expression von Genen des Pho-Regulons

Da die Proteomanalysen zeigten, dass die Mengen von zwei Proteinen des Pho-Regulons durch die An- und Abwesenheit von EIIA^{Ntr} moduliert werden, sollte nun der zu Grunde liegende Mechanismus aufgeklärt werden. Wie in der Einleitung beschrieben (Abschnitt 2.3.2.2.) wird die Expression der Gene des Pho-Regulons durch das PhoR/PhoB Zwei-Komponenten System reguliert. Die Aktivität des ZKS ist von dem Protein PhoU abhängig. In *phoU* Deletionsstämmen werden die Gene des Pho-Regulons konstitutiv exprimiert (Lamarche *et al.*, 2008). PhoU inhibiert, wahrscheinlich durch direkte Interaktion, mit der Sensorkinase PhoR den Phosphoryltransfer auf den Response Regulator PhoB (siehe Einleitung 2.3.2.2.). In vielen *E. coli* Stämmen, die in der Arbeitsgruppe verwendet werden, ist das *bglGFBHIK*-Operon und das angrenzende Gen *phoU* deletiert. Dies lässt vermuten, dass die PhoR/PhoB Regulationskaskade in diesen Stämmen ständig aktiv ist und die Gene des Pho-Regulons ständig exprimiert werden. Um dies zu überprüfen, wurde für die folgenden

Analysen einerseits die $\Delta phoU$ Mutante verwendet ist. Andererseits wurde ein Stamm benutzt, in dem das *phoU* Gen wieder eingebracht wurde. Beide Stämme waren ansonsten isogen. In beiden Stämmen wurde daraufhin auch das *ptsN* Gen deletiert. Um nun den Einfluss von PhoU und EIIA^{Ntr} des PTS^{Ntr} auf das Pho-Regulon zu untersuchen, wurden Reporterfusionen konstruiert. Hierfür wurden die Promotorregionen des *ugpBAECQ*- und des *phnC-P*-Operons verwendet. Die Expression beider Operons wird durch das PhoR/PhoB ZKS reguliert. Die Plasmide mit den *phnC*- und *ugpB*-Reporterfusionen wurden in die *phoU* und *phoU*⁺ Stämme und deren $\Delta ptsN$ -Derivate eingebracht. Zusätzlich wurde die Expression dieser *lacZ*-Fusionen bei Überproduktion von EIIA^{Ntr} untersucht. Hierzu erfolgte die Transformation der $\Delta ptsN$ Mutanten mit einem kompatiblen Plasmid, welches *ptsN* unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors trug. Die Transformanten wurden in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika und im Falle der *ptsN* Überexpression mit 0,2% Arabinose zur Induktion des Ara-Promotors angezogen. Anschließend wurden die β -Galaktosidase-Aktivitäten gemessen (Abbildung 4.2.1).

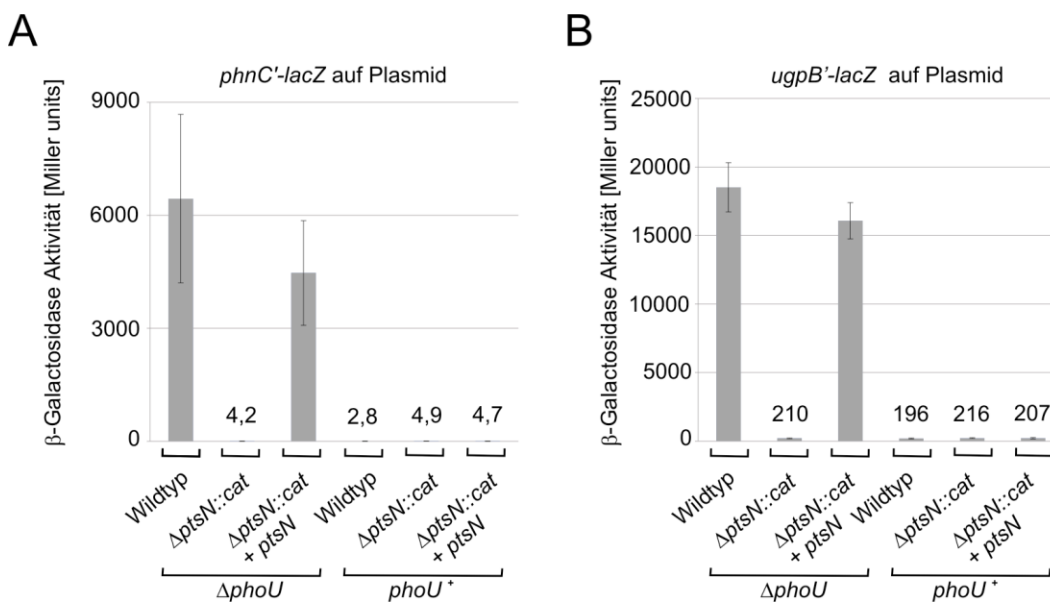


Abbildung 4.2.1: In einer $\Delta phoU$ Mutante ist die Expression der *phnC'-lacZ*- und *ugxB'-lacZ*-Fusionen vollständig von EIIA^{Ntr} abhängig. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten mit den plasmidisch lokalisierten *phnC'-lacZ*- und *ugxB'-lacZ*-Reporterfusionen im *phoU* und *phoU*⁺ Stammhintergrund, den entsprechenden $\Delta ptsN::cat$ Mutanten und den mit *P_{Ara}-ptsN* komplementierten Stämmen sind dargestellt. $\Delta phoU$ (R1279 (Wildtyp); Z77 ($\Delta ptsN::cat$)) und Z77 mit pBGG86) und *phoU*⁺ (S162 (Wildtyp); Z230 ($\Delta ptsN::cat$)) und Z230 mit pBGG86) wurden mit pBGG290 (*phnC*-5'-*lacZ*) und pBGG292 (*ugxB*-5'-*lacZ*) transformiert und in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden geerntet und es wurden LacZ-

Aktivitätsmessungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen für *phnC'-lacZ* sind unter A, die für *ugpB'-lacZ* durchgeführten Messungen sind unter B dargestellt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die Messungen zeigen, dass die Reporterfusionen in der $\Delta phoU$ Mutante stark exprimiert wurden (6440 bzw. 18512 Miller units). Im $phoU^+$ -Wildtypstamm wurden sehr niedrige Werte erhalten (4,2 bzw. 196 Miller units). Frühere Beobachtungen zeigten, dass die Gene des Pho-Regulons in einer $\Delta phoU$ Mutante konstitutiv exprimiert werden, auch wenn eine hohe Phosphatkonzentration vorliegt (Lamarche *et al.*, 2008). Da die Zellen in LB-Medium, einem Medium mit hohem Phosphatgehalt angezogen wurden, war die Expression beider Reporterfusionen in dem $phoU^+$ -Wildtypstamm vollständig reprimiert. Aufgrund der fehlenden Inhibition der Sensorkinase PhoR wurden in dem $\Delta phoU$ -Stamm die Gene des Pho-Regulons ständig exprimiert. Die Deletion von *ptsN* hatte in der $\Delta phoU$ Mutante den fast vollständigen Verlust der Expression der Reporterfusionen zur Folge. Im Falle von *phnC'-lacZ* war eine Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität von 6440 Miller units in der $\Delta phoU$ Mutante auf 4,2 Miller units in der $\Delta ptsN/\Delta phoU$ Doppelmutante zu erkennen. Im Falle von *ugpB'-lacZ* ergab sich eine fast 90-fache Reduktion auf 210 Miller units im Vergleich zur $\Delta phoU$ Mutante. Die Komplementation der $\Delta ptsN/\Delta phoU$ Doppelmutante mit plasmidständigem *ptsN* zeigte für beide *lacZ*-Fusionen Werte, die denen der $\Delta phoU$ Einfachmutante in etwa entsprachen (4468 gegenüber 6440 Miller units und 16075 versus 18512 Miller units). Im $phoU^+$ -Wildtypstamm waren nur geringe β -Galaktosidase-Aktivitäten messbar (~5 Miller units für die *phnC'-lacZ*-Fusion bzw. ~200 Miller units für die *ugpB'-lacZ*-Fusion) (siehe Abbildung 4.2.1). In den $phoU^+$ -Stämmen wird die Expression der Gene des Pho-Regulons durch Phosphat im Medium reprimiert. In dem $phoU^+$ -Stamm hatte weder die Deletion, noch die Überexpression von *ptsN* einen Einfluss auf die sehr niedrigen LacZ-Aktivitäten. EIIA^{Ntr} reguliert die Expression der Gene des Pho-Regulons nur in dem $\Delta phoU$ Stamm wenn ausreichend Phosphat im Medium verfügbar ist. In dem $phoU^+$ -Stamm werden die Gene des Pho-Regulons unter diesen nicht exprimiert.

Als Nächstes war es wichtig zu klären, ob EIIA^{Ntr} auch in einem $phoU^+$ -Stamm einen Einfluss auf die Expression der Gene des Pho-Regulons (stellvertretend

Reportergenfusionen von *phnC* und *ugpB*) hat, wenn Phosphatmangelbedingungen herrschen. Um Phosphatmangel auszulösen wurde LoPi-Medium (0,1 mM K_2HPO_4) verwendet. Um die Zellen bei ausreichender Phosphatkonzentration anzuziehen wurde HiPi-Medium (2 mM K_2HPO_4) benutzt. In beiden Fällen handelt es sich um Minimalmedium. Als Kohlenstoffquelle wurde Glukose verwendet. Für die Experimente wurde der Wildtyp, die $\Delta ptsN::cat$ Mutante und die mit $P_{Ara-ptsN}$ komplementierte $\Delta ptsN::cat$ Mutante verwendet. Diese Stämme trugen zusätzlich die transkriptionellen *phnC*'-lacZ- und *ugpB*'-lacZ-Reportergenfusionen auf kompatiblen Plasmiden. Die in HiPi-Medium gewachsenen Kulturen wurden bei einer optischen Dichte von 0,5-0,8 geerntet. Die LoPi-Kulturen wurden nach etwa 4 Stunden Wachstum bei durchschnittlichen OD_{600} von 0,3-0,4 geerntet, da die Zellen bei Phosphatmangel einen Wachstumsdefekt aufwiesen. Das Ernten der Kulturen erfolgte in diesem und in allen folgenden Experimenten für alle in HiPi- und LoPi-Medium gezogenen Kulturen gleich. Nach dem Ernten der Zellen wurde die Aktivität der β -Galaktosidase gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 4.2.2 dargestellt.

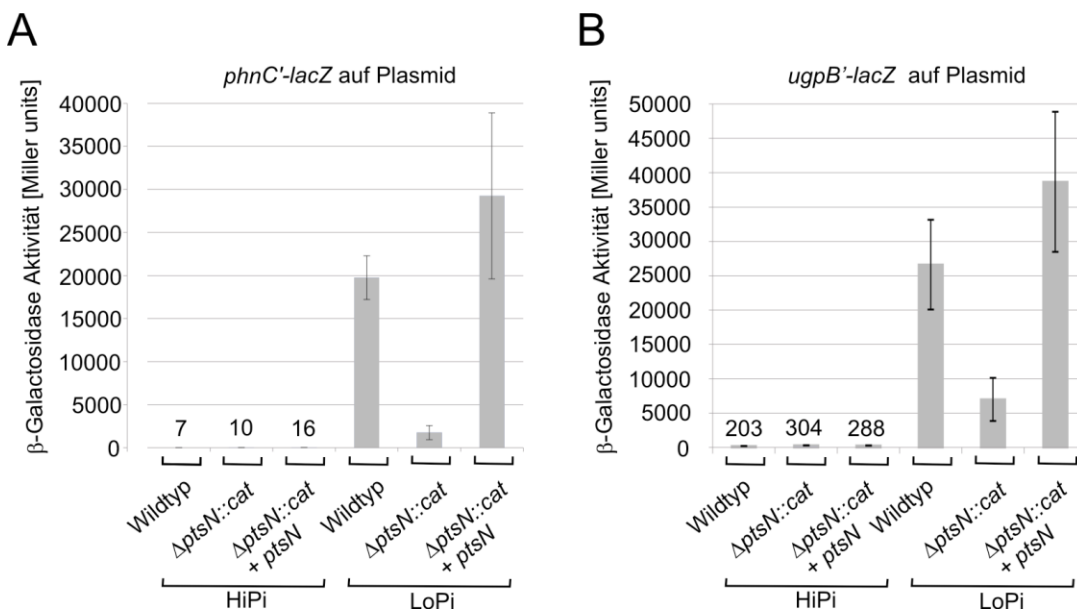


Abbildung 4.2.2: Die Phosphatmenge im Medium bestimmt die Expression der lacZ-Fusionen. Die Transformanten mit den plasmidisch lokalisierten *phnC*'-lacZ- und *ugpB*'-lacZ-Reportergenfusionen im *phoU*⁺-Stammhintergrund, der entsprechenden $\Delta ptsN::cat$ Mutante und dem mit $P_{Ara-ptsN}$ komplementierten Stamm. In S162 (Wildtyp); Z230 ($\Delta ptsN::cat$) und Z230 mit pBGG86 wurden Plasmide eingebracht, die für *phnC*'-lacZ (pBGG290) oder *ugpB*'-lacZ (pBGG292) kodieren. Die Transformanten wurden in HiPi- und LoPi-Medium angezogen. Die Zellen wurden geerntet und LacZ-

Aktivitätsmessungen unterzogen. Die Ergebnisse der Messungen für *phnC[?]-lacZ* sind unter A, die Messungen für *ugpB[?]-lacZ* sind unter B dargestellt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die Expression der beiden *lacZ*-Fusionen war in den in HiPi-Medium angezogenen Zellen sehr niedrig. Die Werte waren mit denen der in LB gezogenen Kulturen (Abbildung 4.2.1) vergleichbar. Es war kein Unterschied zwischen Wildtyp, der Δ *ptsN::cat* Mutante und der komplementierten Mutante zu erkennen. Durch eine ausreichende Phosphatversorgung ist das Pho-Regulon, genau wie in LB-Medium reprimiert. In LoPi-Medium sollte Phosphatlimitation herrschen und das Pho-Regulon sollte stark exprimiert werden. Tatsächlich stiegen im Wildtyp die LacZ-Aktivitäten bei Phosphatmangel im Falle der *phnC[?]-lacZ*-Fusion auf 19755 Miller units und im Falle von *ugpB[?]-lacZ*-Fusion auf 26613 Miller units an. Dies bestätigt, dass die Expression der *lacZ*-Fusionen von der Phosphatkonzentration im Medium abhängt. Die Deletion von *ptsN* hatte einen drastischen Einfluss auf die Expression der *lacZ*-Fusionen bei Phosphatmangel (siehe Abbildung 4.2.2). Bei den in LoPi-Medium gezogenen Kulturen kam es durch die *ptsN* Deletion zu einer 11- bzw. 5-fachen Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die Komplementation der Δ *ptsN::cat* Mutante mit plasmidständigem *ptsN* führte zur Wiederherstellung der hohen LacZ-Aktivitäten. Diese waren etwas höher als die gemessenen Aktivitäten in den Wildtypstämmen. Die Gene des Pho-Regulons werden in dem *phoU⁺*-Stamm nur bei Phosphatmangel exprimiert. Diese Daten zeigten, dass im gewählten Stammsystem das Gen *ptsN* für die volle Expression des *ugp*- und des *phn*-Operons benötigt wird.

Die Expression der Gene des PhoR/PhoB Zwei-Komponenten Systems ist autoreguliert. Das heißt die Expression von *phoR* und *phoB* hängt von der Aktivität seiner Genprodukte ab. Es ist vorstellbar, dass EIIA^{Ntr} direkt die Expression der Gene, die für Proteine des Zwei-Komponenten System kodieren, reguliert. So könnte sich EIIA^{Ntr} auf das gesamte Pho-Regulon auswirken. Für die Untersuchungen wurde also das Gen der Sensorkinase PhoR im authentischen, chromosomalen Locus mit einer Sequenz fusioniert, welche für das 3xFLAG-Epitop kodiert. Die Menge an vorhandenem PhoR-3xFLAG konnte so mittels Western Blot mit einem FLAG Antiserum in den verschiedenen Stämmen analysiert werden. Die jeweiligen Stämme *phoU⁺*, Δ *phoU*, und ihre Δ *ptsN::cat* Derivate, sowie die mit plasmidständigem *ptsN* komplementierten

Mutanten wurden in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 0,8 angezogen. Die Zellysate wurden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. PhoR-3xFLAG wurde im anschließenden Western Blot mit FLAG Antiserum detektiert (Abbildung 4.2.3).

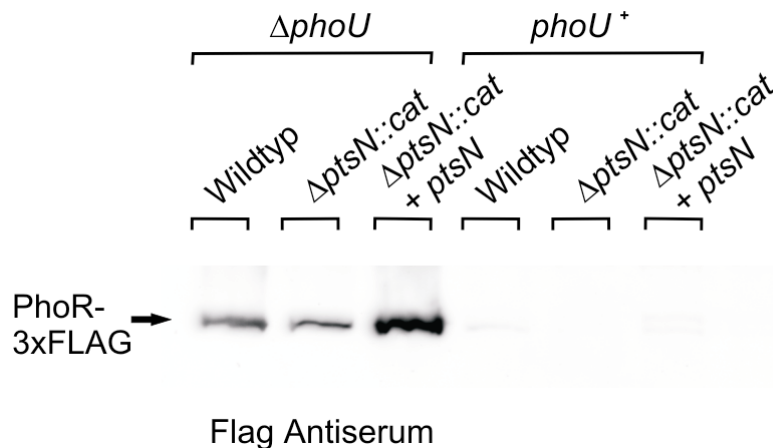


Abbildung 4.2.3: PhoR-3xFLAG kann nur im $\Delta phoU$ -Stamm detektiert werden. Die Stämme und Transformanten mit den chromosomalen *phoR*-3xFLAG Fusionen wurden in LB-Medium angezogen. Die Zellextrakte wurden auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. In Spuren 1-3 befinden sich $\Delta phoU$ -Derivate des Stammes R1279 (Spur 1: Z582; Spur2: Z584 und Spur 3: Z584 mit pBGG86); in Spuren 4-6 $phoU^+$ -Derivate des Stammes S162 (Spur 4: Z583; Spur5: Z585 und Spur 6: Z585 mit pBGG86). PhoR-3xFLAG wurde mit FLAG Antiserum detektiert.

In den $phoU^+$ -Stämmen konnte PhoR-3xFLAG nicht detektiert werden (Spuren 4 bis 6 in Abbildung 4.2.3). In den $\Delta phoU$ -Stämmen konnte PhoR-3xFLAG detektiert werden (Spuren 1 bis 3 in Abbildung 4.2.3). In der $\Delta phoU$ Mutante lag dabei mehr PhoR-3xFLAG als in der $\Delta phoU/\Delta ptsN::cat$ Doppelmutante, aber weniger als in der komplementierten Doppelmutante vor (vgl. Spuren 1-3 untereinander in Abbildung 4.2.3). Diese Verteilung stimmte mit den Erwartungen überein. PhoR wird in den $phoU^+$ -Stämmen nicht exprimiert, war also aufgrund der ausreichenden Phosphatversorgung der Zellen nicht detektierbar. In den $\Delta phoU$ -Stämmen war eine große Menge an PhoR zu detektieren. Hieraus ist zu schließen, dass in den $\Delta phoU$ -Stämmen die Gene des Pho-Regulons, also auch *phoR* selbst, konstitutiv exprimiert werden. Wie bereits vorher für die Reportergenkonstrukte von *phnC* und *ugpB* gezeigt, ist auch die Menge an PhoR-3xFLAG von $EIIA^{Ntr}$ abhängig.

4.2.3. Untersuchung des Einflusses des PTS^{Ntr} auf das Pho-Regulon in einem geeignetem Stammhintergrund

Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, dass das Pho-Regulon im gewählten Stammsystem R1279 ($\Delta phoU$) und S162 ($phoU^+$) durch die Regulatoren des Pho-Regulons (das PhoR/PhoB Zwei-Komponenten System und den PstSABC-PhoU-Komplex) gesteuert wird. Dies war erwartet worden und bestätigt die Daten in der Literatur. Allerdings ist S162 ein Abkömmling von R1279, in welchem das Gen *phoU* nachträglich wieder „kuriert“ wurde. Laut Literatur erwerben $\Delta phoU$ Mutanten rasch Sekundärmutationen in anderen Genen. Solche Sekundärmutationen könnten auch im hier verwendeten $phoU^+$ -Stamm vorliegen und somit die Ergebnisse verfälschen. Weitere Untersuchungen sollten also in Stämmen vorgenommen werden, in denen alle wichtigen Komponenten der Phosphatregulation vorhanden sind. Ein mögliches Stammsystem ist S4197, ein Derivat des Stammes MG1655. Der Stamm MG1655 gilt als Referenzstamm für *Escherichia coli* K12. Des Weiteren sind für diesen Stamm verschiedenste Derivate in Mutantenbanken erhältlich und er wird weltweit als Modellstamm verwendet. In S4197 sind alle Regulatorgene des Pho-Regulons vorhanden. Er besitzt eine Deletion von *lacZ*, damit er für β -Galaktosidase-Messungen genutzt werden kann. Außerdem ist auch das *ilvG*-Gen in diesem Derivat von MG1655 nachträglich „kuriert“ worden. Dies ist wichtig, da die Deletion von *ptsN* in *ilvG*-Stämmen zu artifiziellen Wachstumsdefekten führt (Reaves and Rabinowitz, 2011).

4.2.3.1. EIIA^{Ntr} moduliert die Mengen der Proteine PhoB und PhoR

Es wurde daher untersucht, welchen Einfluss EIIA^{Ntr} im Stammsystem MG 1655 auf die Expression der Genen des Pho-Regulons hat. Auch in diesem Stammsystem sollte das Pho-Regulon nur bei Phosphatmangel induziert sein. Für die Untersuchungen wurde neben PhoR-3xFLAG auch die Proteinmenge von PhoB-3xFLAG analysiert. Beide entsprechende Gene wurden in den jeweiligen authentischen, chromosomalen Loci mit einer Sequenz fusioniert, welche für das 3xFLAG-Epitop kodiert. So konnten die Mengen an vorhandenem PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG mittels Western Blot mit einem FLAG Antiserum in den verschiedenen Stämmen und Transformanten analysiert werden. Für den Versuch sollten die Proteinmengen im Wildtyp, der $\Delta ptsN$ Mutante

und der komplementierten Mutante untersucht werden. Die Komplementation erfolgte mit dem plasmidisch lokalisiertem Wildtyp *ptsN*-Gen und den mutanten *ptsN*(H73A)- und *ptsN*(H73E)-Allelen, deren Expression durch Arabinose induzierbar war. Die Kulturen wurden in HiPi- und LoPi-Medium angezogen und geerntet. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese. Es wurde ein Western Blot durchgeführt um die jeweiligen Mengen an PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG zu detektieren. Die Ergebnisse der Western Blots sind in Abbildung 4.2.4 dargestellt. Als jeweilige Ladekontrollen sind die mit Coomassie blue angefärbten SDS-Gele gezeigt.

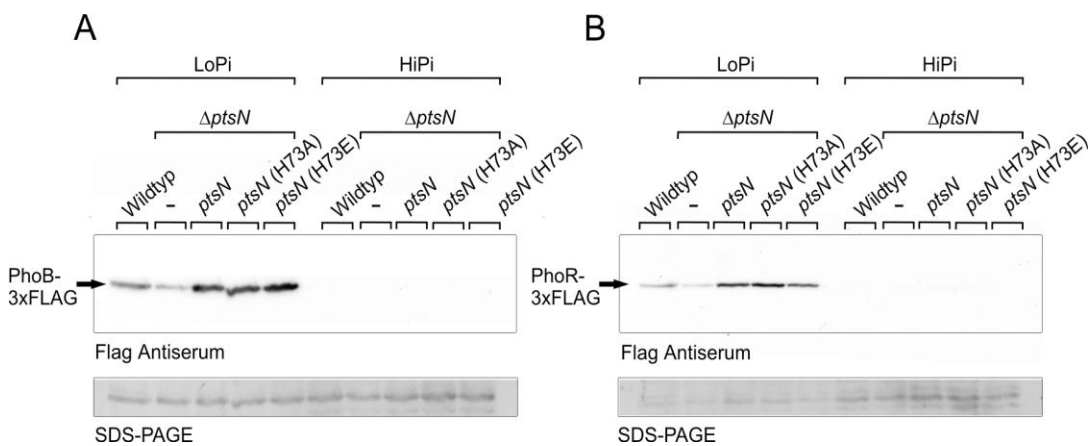


Abbildung 4.2.4: Die zellulären Mengen der Proteine PhoB-3xFLAG und PhoR-3xFLAG werden durch EIIA^{Ntr} beeinflusst. Die Stämme mit den chromosomalen *phoB*-3xFLAG und *phoR*-3xFLAG Fusionen wurden in HiPi- und LoPi-Medium angezogen. Zur Induktion der Expression der *ptsN*-Allele wurde Arabinose zugefügt. Die Zellextrakte wurden auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. (A) Der Wildtyp (Z594), sowie die isogene $\Delta ptsN$ Mutante (Z574) und die mit *ptsN* (pBGG86), *ptsN*(H73A) (pBGG93) oder *ptsN*(H73E) (pBGG334) komplementierte $\Delta ptsN$ Mutante wurden analysiert. PhoB-3xFLAG wurde mit einem FLAG Antiserum detektiert. (B) Der Wildtyp (Z595), sowie die isogene $\Delta ptsN$ Mutante (Z575) und die mit *ptsN* (pBGG86), *ptsN*(H73A) (pBGG93) oder *ptsN*(H73E) (pBGG334) komplementierte $\Delta ptsN$ Mutante wurden analysiert. PhoR-3xFLAG wurde mit einem FLAG Antiserum detektiert. Die Blots sind repräsentative Beispiele von mehreren unabhängigen Experimenten.

Für beide Proteine war zu erkennen, dass bei der Anzucht der Kulturen in Medium mit hohem Phosphatgehalt (HiPi-Medium) keine Signale detektiert werden konnten (jeweils Spuren 6-10 in Abbildung 4.2.-4 A und B). Dies zeigte, dass weder die Sensor kinase PhoR noch der Response Regulator PhoB bei ausreichender Phosphatmenge im Medium synthetisiert wurden. Wurden die Zellen allerdings Phosphatmangel (LoPi-

Medium) ausgesetzt, sollte das Pho-Regulon aktiviert sein und auch *phoR* und *phoB* exprimiert werden. Tatsächlich konnten Signale für beide Proteine detektiert werden. Die Deletion von *ptsN* und die Überexpression der verschiedenen *ptsN*-Allele zeigten einen Einfluss auf die Proteinmengen von PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG. Im Vergleich zum Wildtyp war sowohl die Menge an PhoB-3xFLAG als auch an PhoR-3xFLAG in der $\Delta ptsN$ Mutante reduziert (vgl. jeweils Spur 1 mit Spur 2 in Abbildung 4.2.-4 A und B). Wurde die $\Delta ptsN$ Mutante mit dem Wildtyp *ptsN*-Gen komplementiert, konnte wieder mehr PhoB-3xFLAG und PhoR-3xFLAG detektiert werden als in der $\Delta ptsN$ Mutante und auch im Wildtyp. Durch die Komplementation der $\Delta ptsN$ Mutante mit den *ptsN*(H73A) und *ptsN*(H73E) Allelen, welche für mutante EIIA^{Ntr} Proteine kodieren, erhielt man größere Mengen PhoB-3xFLAG und PhoR-3xFLAG als in der Deletionsmutante. Durch EIIA^{Ntr}H73A wird vermutlich die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} vorgetäuscht. Das Protein mit der H73E Mutation simuliert vermutlich die phosphorylierte Form von EIIA^{Ntr}. Dies bedeutet, dass alle drei *ptsN* Allele die Deletion von *ptsN* komplementieren können. Die Experimente zeigen, dass sich die Anwesenheit von EIIA^{Ntr} positiv auf die Stabilität und/oder Synthese von PhoB und PhoR auswirkt.

4.2.3.2. EIIA^{Ntr} wirkt sich auf weitere Komponenten des Pho-Regulons aus

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass EIIA^{Ntr} die Transkription der *phnC-lacZ*-Fusion und *ugpB-lacZ*-Fusion in *phoU*⁺-Stämmen bei Phosphatmangel reguliert. Da die Mengen an PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG durch EIIA^{Ntr} moduliert werden, sollte EIIA^{Ntr} einen Einfluss auf das gesamte Pho-Regulon haben. Dies sollte nun für das neue Stammsystem (S4197-Derivate) untersucht werden. Die *phnC'-lacZ*- und *ugpB'-lacZ*-Fusionen wurden über die *attB*-Stelle in das Chromosom des Wildtyps und der $\Delta ptsN$ Mutante integriert. Die $\Delta ptsN$ Mutante wurde zusätzlich mit Plasmiden transformiert, welche für das Wildtyp *ptsN*-Gen oder die mutanten *ptsN* Allele unter *P*_{Ara}-Kontrolle kodierten. Die Stämme und Transformanten wurden in LoPi-Medium (Phosphatmangel) angezogen. Anschließend wurden β -Galaktosidase Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Diagrammen in Abbildung 4.2.5 dargestellt.

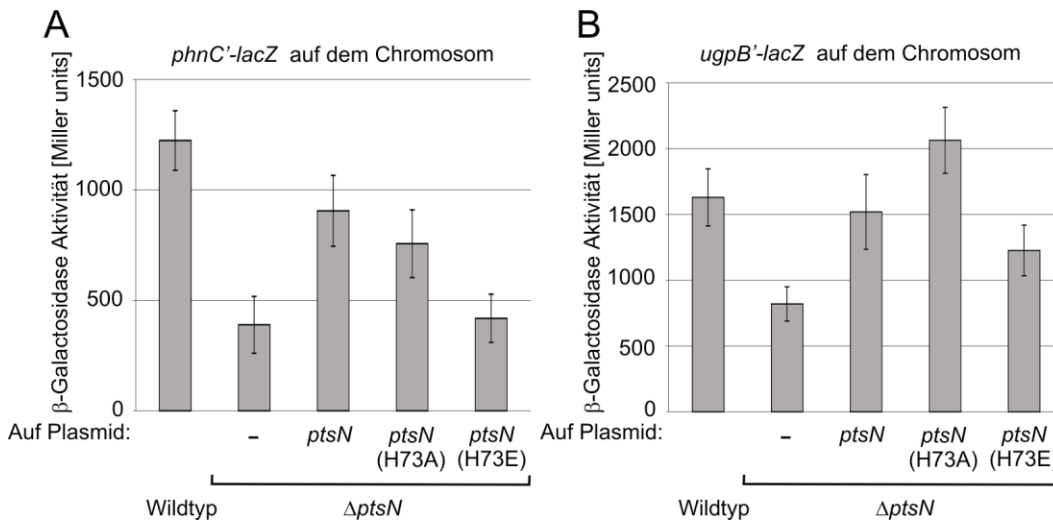


Abbildung 4.2.5: EIIA^{Ntr} reguliert die Expression von Genen des Pho-Regulons bei Phosphatmangel. Die Stämme und Transformanten mit den chromosomal lokalisierten *phnC'-lacZ*- und *ugpB'-lacZ*-Reporterfusionen wurden in LoPi-Medium und im Falle der Transformanten mit Arabinose angezogen. Die Zellen wurden geerntet und eine LacZ-Aktivitätsmessung durchgeführt. (A) Die Aktivität der chromosomalen *phnC'-lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z344); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z413), sowie der mit *ptsN* (pBGG86); *ptsN*(H73A) (pBGG93) oder *ptsN*(H73E) (pBGG334) komplementierten $\Delta ptsN$ Mutante wurde analysiert. (B) Die Aktivität der chromosomalen *ugpB'-lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z440); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z437), sowie der mit *ptsN* (pBGG86); *ptsN*(H73A) (pBGG93) oder *ptsN*(H73E) (pBGG334) komplementierten $\Delta ptsN$ Mutante wurde analysiert. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Für beide *lacZ*-Fusionen (*phnC* und *ugpB*) war zu erkennen, dass sie bei Phosphatlimitation im Wildtyp exprimiert wurden (1224 Miller units bzw. 1629 Miller units). Bei beiden *lacZ*-Fusionen führte die Deletion von *ptsN* zu einer 2- bzw. 3-fachen Reduktion der LacZ-Aktivität (vgl. Säule 2 mit 1 in Abbildung 4.2.5 A und B). Wurde das Wildtyp *ptsN*-Gen in der $\Delta ptsN$ Mutante überexprimiert, erhielt man für beide *lacZ*-Fusionen eine Steigerung der β -Galaktosidase Aktivität auf das Niveau der Wildtypen (vgl. Säule 3 mit 1 und 2 in Abbildung 4.2.5 A und B). Auch die Überexpression des *ptsN*(H73A)-Allels führte zu einer Komplementation der Mutante. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten waren höher als für die $\Delta ptsN$ Mutante. Die Überexpression von *ptsN*(H73E) zeigte kaum eine Auswirkung auf die LacZ-Aktivitäten (vgl. Säule 5 mit 1 und 2 in Abbildung 4.2.5 A und B). Dies bedeutet, dass eine Deletion von *ptsN* nicht durch dieses *ptsN*-Allel komplementiert werden konnte. Die Phosphorylierungsstelle von EIIA^{Ntr} scheint demnach für die Regulation der Expression der Gene des Pho-Regulons wichtig zu sein. Um den Einfluss von EIIA^{Ntr} auf ein weiteres Gen des Pho-

Regulons mit einer weiteren Methode zu untersuchen, wurden PhoA-Aktivitätstests durchgeführt (Material und Methoden 3.2.6.5.). PhoA ist die alkalische Phosphatase und die Expression von *phoA* wird direkt vom PhoR/PhoB Zwei-Komponenten System reguliert (Tommassen and Lugtenberg, 1982). Der Wildtyp, die $\Delta ptsN$ Mutante und die mit den verschiedenen *ptsN*-Allelen komplementierte $\Delta ptsN$ Mutante wurden in HiPi- und LoPi-Medium angezogen. Anschließend wurde die PhoA-Aktivität bestimmt (Abbildung 4.2.6).

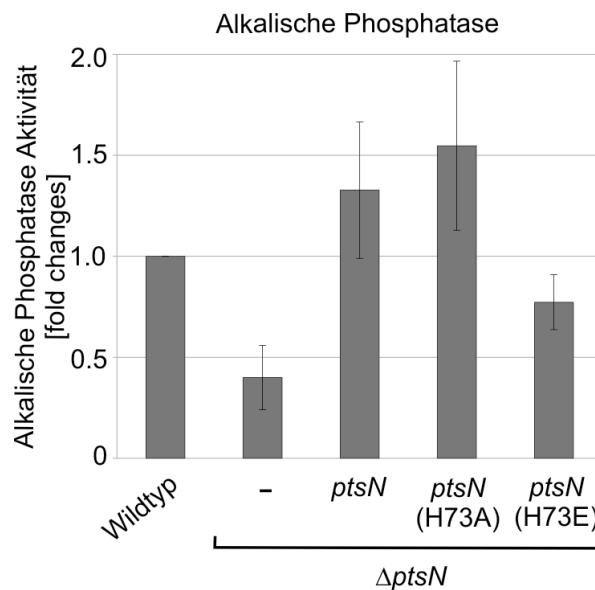


Abbildung 4.2.6: Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wird durch $EIIA^{Ntr}$ beeinflusst. Die Stämme und Transformanten wurden in HiPi und LoPi-Medium, im Fall der Überexpressionen mit Arabinose angezogen, die Zellen geerntet und eine PhoA-Aktivitätsmessung durchgeführt. Dargestellt sind die Aktivitäten des Wildtyps (S4197); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z405), sowie der mit *ptsN* (pBGG86); *ptsN*(H73A) (pBGG93) und *ptsN*(H73E) (pBGG334) komplementierten $\Delta ptsN$ Mutante. Die PhoA-Aktivitäten sind in fold changes angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die Messungen der Aktivität der alkalischen Phosphatase korrelierten mit den Ergebnissen der β -Galaktosidase Messungen (Abbildung 4.2.5). Wurden die Kulturen in HiPi-Medium angezogen, waren die gemessenen PhoA-Aktivitäten sehr gering (ca. 600-fach niedriger als im Wildtypstamm durch Phosphatmangel induziert). Hier konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp, *ptsN* Deletion und *ptsN* Überexpression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Wurden die Zellen in LoPi-Medium angezogen konnte PhoA-Aktivität gemessen werden (Abbildung 4.2.6). Die Deletion von *ptsN* führte zu einer etwa zweifachen Erniedrigung der PhoA-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die

Komplementation der $\Delta ptsN$ Mutante mit den *ptsN*- und *ptsN*(H73A)-Allelen zeigte Aktivitäten die ein wenig höher lagen als beim Wildtyp (1,3- und 1,6-fach). Die Überexpression von des *ptsN*(H73E)-Allels führte nicht zur vollständigen Komplementation der *ptsN* Deletion. Die PhoA-Aktivität lag, wie auch schon für die β -Galaktosidase Messungen von *phnC-lacZ* und *ugpB-lacZ* beobachtet, zwischen den Werten des Wildtyps und der Deletionsmutante. Die Ergebnisse dieses und der vorangegangenen Messungen zeigen, dass in allen Fällen die Deletion von *ptsN* zu einer Reduktion der Mengen der Proteine des Pho-Regulons durch verminderte Expression der Gene führt. Des Weiteren lässt sich durch die Experimente mit den verschiedenen *ptsN*-Allelen schließen, dass die Phosphorylierungsstelle von EIIA^{Ntr} für die Regulation des Pho-Regulons entscheidend ist. Nur das Wildtypprotein und das EIIA^{Ntr}H73A, welches dessen unphosphorylierte Form vortäuscht, sind dazu in der Lage sich positiv auf das Pho-Regulon auszuwirken. Die Anwesenheit der vorgetäuschten phosphorylierten Form von EIIA^{Ntr} kann die Synthese der Proteine des Pho-Regulons nicht vollständig stimulieren. Dies könnte bedeuten, dass auch die Funktionalität der Phosphorylierungskaskade (EI^{Ntr} \rightarrow NPr \rightarrow EIIA^{Ntr}) für den Regulationsmechanismus wichtig ist. Der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} scheint also wichtig für die Regulation zu sein. Es wurde deshalb im Folgenden getestet, wie sich eine Deletion von *ptsP* (kodiert EI^{Ntr}) und die Deletion von *ptsO* (kodiert NPr) auf das Pho-Regulon auswirkt.

4.2.3.3. EI^{Ntr} und NPr reprimieren die Expression der Gene des Pho-Regulons

Für die anschließenden Experimente wurden die vorher verwendeten *phnC'-lacZ*- und *ugpB'-lacZ*-Fusionen ektopisch in die Chromosomen der $\Delta ptsP$ und $\Delta ptsO$ Deletionsstämme integriert. Da das PTS^{Ntr} die Expressionen von zwei Operons des Pho-Regulons moduliert sollte der Einfluss auf weitere Gene des Pho-Regulons, vor allem auf die Expression der Gene des Zwei-Komponenten Systems (*phoBR*-Operon) untersucht werden. Es wurden also zwei weitere *lacZ*-Fusionen konstruiert (*pstS'-lacZ*- und *phoB'-lacZ*-Fusionen) und in die Chromosomen des Wildtyps und der Deletionsstämme von *ptsN*, *ptsP* und *ptsO* eingebracht. Die beiden Operone *pstSABC-phoU* und *phoBR* stehen ebenfalls unter Kontrolle des PhoB/PhoR Zwei-Komponenten

Systems und ihre Expression ist daher ebenfalls durch Phosphatmangel induzierbar. Die Kulturen wurden in HiPi- und LoPi-Medium angezogen und anschließend wurden β -Galaktosidase Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen für alle vier verwendeten *lacZ*-Fusionen sind in Abbildung 4.2.7 in Diagrammen dargestellt.

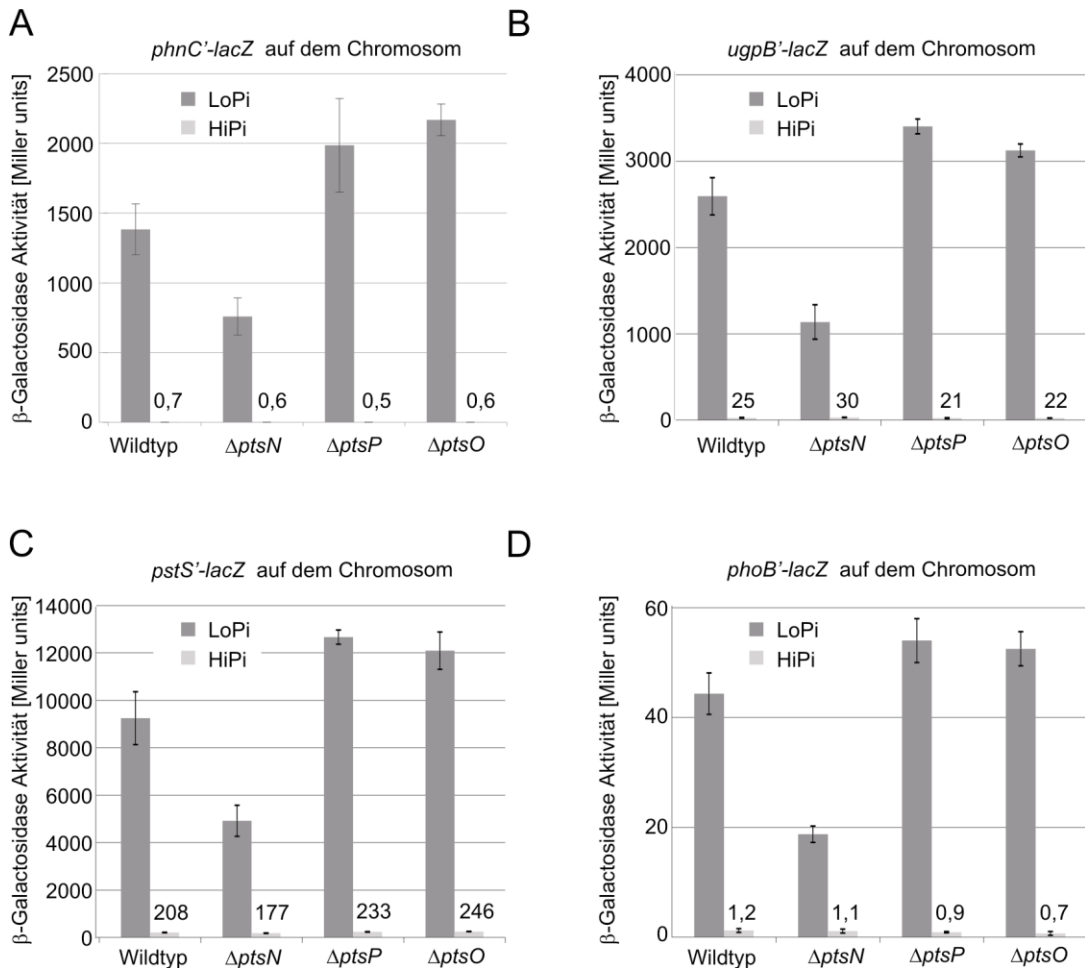


Abbildung 4.2.7: Alle drei Komponenten des PTS^{Ntr} regulieren die Expression von Genen des Pho-Regulons bei Phosphatmangel. Die Stämme mit den chromosomal lokalisierten *phnC'-lacZ*-, *ugpB'-lacZ*-, *pstS'-lacZ*- und *phoB'-lacZ*-Reporterfusionen wurden in HiPi- und LoPi-Medium angezogen, die Zellen geerntet und eine LacZ-Aktivitätsmessung durchgeführt. (A) Aktivität der chromosomalen *phnC'-lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z344); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z413), sowie den $\Delta ptsP$ (Z475) und $\Delta ptsO::cat$ (Z476) Mutanten. (B) Aktivität der chromosomalen *ugpB'-lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z440); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z437), sowie den $\Delta ptsP$ (Z466) und $\Delta ptsO::cat$ (Z467) Mutanten. (C) Aktivität der chromosomalen *pstS'-lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z442); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z439), sowie den $\Delta ptsP$ (Z472) und $\Delta ptsO::cat$ (Z473) Mutanten. (D) Aktivität der chromosomalen *phoB'-lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z441); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z438), sowie den $\Delta ptsP$ (Z469) und $\Delta ptsO::cat$ (Z470) Mutanten. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die Ergebnisse zeigten, dass für alle *lacZ*-Fusionen die β -Galaktosidase-Aktivitäten durch die Deletion von *ptsN* im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 1,9 bis 2,5 abnahmen. Dies bedeutet, dass die Anwesenheit von EIIA^{Ntr} auf die Expression aller *lacZ*-Fusionen einen positiven Effekt hat. Die Deletion von *ptsP* bzw. *ptsO* wirkten sich sehr ähnlich auf alle *lacZ*-Fusionen aus. Hier war zu beobachten, dass die β -Galaktosidase-Aktivitäten aller *lacZ*-Fusionen im Vergleich zum Wildtyp anstiegen. Dieser Anstieg betrug bei allen verwendeten *lacZ*-Fusionen etwa 30%. Diese signifikant stärkere LacZ-Aktivität in den *ptsP* Deletionsstämmen, lässt sich damit erklären, dass das EIIA^{Ntr} in diesen Stämmen nicht mehr durch EI^{Ntr} phosphoryliert werden kann (s. Abb. 4.2.8). Für die Δ *ptsO* Mutante wäre ähnliches denkbar. EIIA^{Ntr} sollte also vollständig oder zu einem großen Teil unphosphoryliert vorliegen. Die Auswirkungen von EI^{Ntr} und NPr auf die Expression der Gene des Pho-Regulons beruhen also wahrscheinlich auf der Modulation des Phosphorylierungszustandes von EIIA^{Ntr}. Aus den vorangegangenen Experimenten konnte man bereits schließen, dass die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} einen stimulatorischen Effekt auf die Expression der Gene des Pho-Regulons hat. Die Expressionsanalysen der Δ *ptsP* und Δ *ptsO* Mutanten unterstützen diese Vermutung. Nur das unphosphorylierte EIIA^{Ntr} scheint in der Lage zu sein die Expression der Gene des Pho-Regulons zu stimulieren.

4.2.3.4. Die Phosphatversorgung der Zelle hat keine Auswirkung auf die Stabilität oder Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}

Der genaue Mechanismus der Regulation des Pho-Regulons durch EIIA^{Ntr} ist noch zu untersuchen. Es wäre möglich, dass sich die Phosphatmenge in den Zellen auf die Phosphorylierung des PTS^{Ntr} oder auf die Stabilität von EIIA^{Ntr} auswirkt. EIIA^{Ntr} könnte z. B. auf Phosphatmangel reagieren und die Expression der Gene des Pho-Regulons induzieren. Daher wurde der Phosphorylierungsstatus und die quantitative Menge an EIIA^{Ntr} bei Phosphatmangel und Phosphatüberschuss untersucht. Hierzu wurde der Wildtypstamm und ein Stamm, der das *ptsN*-3xFLAG-Tag-Allel im Chromosom trug, sowie die isogene Δ *ptsP* Mutante verwendet. Die in LoPi- und HiPi-Medium gezogenen Kulturen wurden geerntet. Die Proteinextrakte wurden sowohl in einem nativen als auch in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und Western Blots durchgeführt.

Als Kontrolle für eine gleichmäßige Auftragung der Proteinextrakte wurde das SDS-Gel mit Coomassie blue angefärbt (Abbildung 4.2.8).

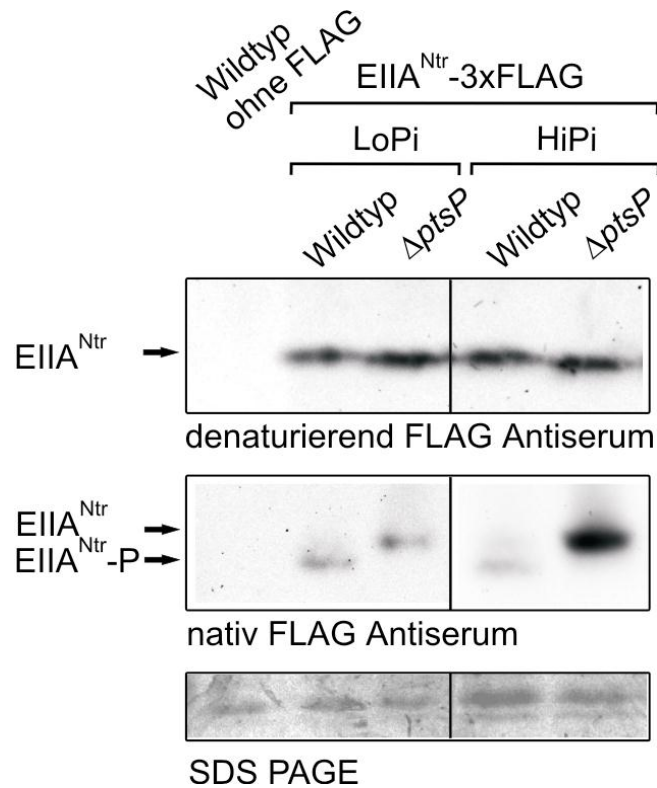


Abbildung 4.2.8: Die Phosphatversorgung der Zelle hat keinen Einfluss auf die Menge oder Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}. Die Stämme mit den chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allelen wurden in HiPi- und LoPi-Medium angezogen. Die Zellextrakte wurden auf einer 12,5% SDS-PAGE und einem 12,5%igem Prosieve Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. Der Wildtyp (S4197) sowie der isogene Stamm mit *ptsN*-3xFLAG-Allel (Z424) und die $\Delta ptsP$ Mutante mit *ptsN*-3xFLAG-Allel (Z436) wurden analysiert. EIIA^{Ntr}-3xFLAG wurde mit einem FLAG Antiserum detektiert. Als Ladekontrolle ist das mit Coomassie blue angefärbte SDS-Gel dargestellt.

Der Wildtyp ohne 3xFLAG-Allel zeigte wie erwartet keine Signale im Western Blot. Für die Stämme mit der chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allel konnten in allen Fällen Signale detektiert werden (vgl. Spuren 2-5 mit 1 in Abbildung 4.2.8). Für den Blot des SDS-Gels zeigte sich, dass die Menge an EIIA^{Ntr} im Wildtyp und der $\Delta ptsP$ Mutante nicht verändert ist. Die Proteinmenge hing auch nicht von der Phosphatversorgung der Zellen ab. Die Ergebnisse des Blots der nativen Gelelektrophorese zeigten, dass EIIA^{Ntr} im Wildtyp wie erwartet überwiegend phosphoryliert vorlag. In der $\Delta ptsP$ Mutante konnte nur die weniger schnell laufende Form von EIIA^{Ntr} detektiert werden. Hier lag

das Protein also unphosphoryliert vor. Des Weiteren fiel auf, dass die Phosphorylierung von $EIIA^{Ntr}$ nicht durch das gewählte Medium beeinflusst wurde. Damit kann ausgeschlossen werden, dass $EIIA^{Ntr}$ selbst durch die Phosphatversorgung der Zellen reguliert wird und dass eine solche Regulation sich auf das Pho-Regulon auswirkt.

Wird das Pho-Regulon indirekt durch die PTS^{Ntr} -vermittelte Kaliumregulation beeinflusst?

Die initialen Analysen der Gesamtzellextrakte der $\Delta trkA$ Mutante und der $\Delta ptsN/\Delta trkA::cat$ Doppelmutante ließ vermuten, dass die Regulation des Pho-Regulons durch $EIIA^{Ntr}$ unabhängig von der Regulation des Kaliumtransporters TrkA durch das Stickstoff-PTS ist (siehe Abschnitt 4.2.1.). Dies sollte nun durch Expressionsanalysen der $phnC'$ - $lacZ$ - und $ugpB'$ - $lacZ$ -Fusionen bestätigt werden. Hierzu wurden $\Delta trkA::cat$ Mutanten und $\Delta ptsN/\Delta trkA::cat$ Doppelmutanten konstruiert, die in der $attB$ -Stelle im Chromosom die verschiedenen $lacZ$ -Fusionen enthielten. Die Stämme wurden in LoPi-Medium angezogen. Im Anschluss wurden LacZ-Aktivitätsmessungen durchgeführt (Abbildung 4.2.9).

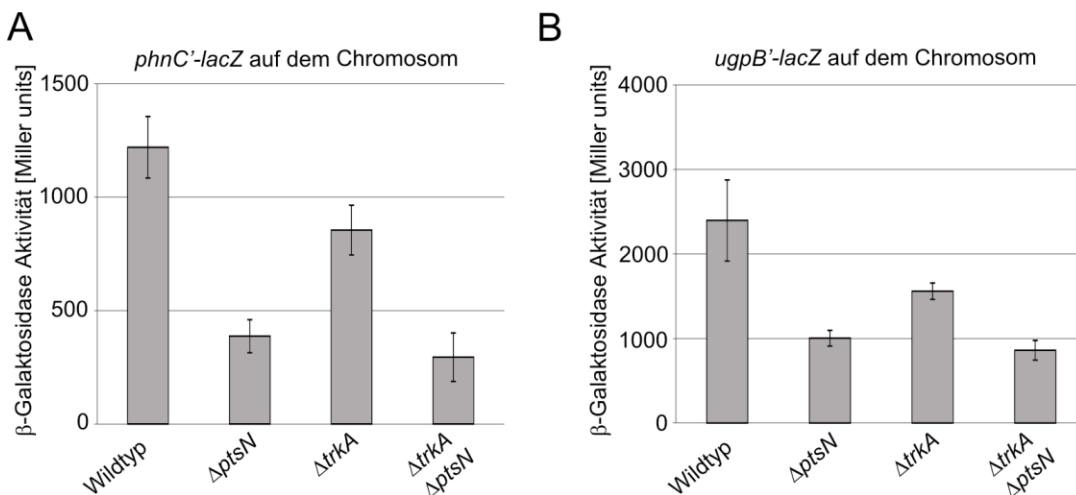


Abbildung 4.2.9: Die Regulation der $phnC'$ - $lacZ$ - und $ugpB'$ - $lacZ$ -Fusionen durch $EIIA^{Ntr}$ ist unabhängig von TrkA. Die Stämme mit den chromosomal lokalisierten $phnC'$ - $lacZ$ - und $ugpB'$ - $lacZ$ -Reporterfusionen wurden in LoPi-Medium angezogen, die Zellen geerntet und eine LacZ-Aktivitätsmessung durchgeführt. (A) Die Aktivität der chromosomalen $phnC$ -5'- $lacZ$ -Fusion im Wildtyp (Z344); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z413), sowie der $\Delta trkA::cat$ Mutante (Z338) und $\Delta ptsN/\Delta trkA::cat$ Doppelmutante (Z431) wurde untersucht. (B) Die Aktivität der chromosomalen $ugpB$ -5'- $lacZ$ -Fusion im Wildtyp (Z440); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z437), sowie der $\Delta trkA::cat$ Mutante (Z500) und $\Delta ptsN/\Delta trkA::cat$ Doppelmutante (Z499) wurde analysiert. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte

sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die Resultate zeigten, dass die β -Galaktosidase-Aktivitäten beider *lacZ*-Fusionen in der $\Delta trkA::cat$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp absanken (vgl. Säule 3 mit 1 in Abbildung 4.2.9 A und B). Eine zusätzliche Deletion von *ptsN* in der $\Delta trkA::cat$ Mutante hatte aber immer noch einen inhibitorischen Einfluss auf die Expression des *phn*- und *ugp*-Operons (vgl. Säule 4 mit 3 in Abbildung 4.2.9 A und B). In der Doppelmutante waren die LacZ-Aktivitäten auf 295 Miller units und 855 Miller units reduziert, während sie in der $\Delta trkA::cat$ Einfachmutante bei 855 Miller units und 1559 Miller units lagen. Durch die Deletion von *ptsN* kam es also immer noch zu einer signifikanten Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität beider *lacZ*-Fusionen. Dies bedeutet zusammenfassend, dass die Deletion von *trkA*, welches für ein Protein des Kaliumtransporters Trk kodiert, einen Einfluss auf das Pho-Regulon hat. Dieser Einfluss könnte durch eine veränderte Kaliumkonzentration in der Zelle begründet sein. Es lässt sich dadurch erklären, dass Störungen im Kaliumhaushalt der Zelle viele pleiotrophe Effekte hervorrufen. Hierzu gehören die Regulation von Genexpression, Proteinaktivitäten, aber auch die Sigma Faktor Selektivität (siehe Einleitung 2.3.3.4.). Der regulatorische Einfluss des Stickstoff-PTS auf das Pho-Regulon ist aber unabhängig von TrkA. Die Deletion von *ptsN* reduzierte die LacZ-Aktivität der untersuchten *lacZ*-Fusionen auch noch in einer $\Delta trkA::cat$ Mutante (siehe Abbildung 4.2.9). Dies zeigt, dass die EIIA^{Ntr}-vermittelte Stimulation der Expression der Gene des Pho-Regulons unabhängig von der EIIA^{Ntr}-vermittelten Regulation der Kaliumhomöostase ist. So kann also vermutet werden, dass es sich um einen direkten Regulationsmechanismus handelt. Diese Vermutung wird in den folgenden Kapiteln untersucht.

4.2.3.5. EIIA^{Ntr}-vermittelte Regulation des PhoR/PhoB Zwei-Komponenten Systems

Da alle der untersuchten Vertreter des Pho-Regulons einer PTS^{Ntr}-vermittelten Regulation unterliegen, ist anzunehmen, dass das Stickstoff-PTS auf einen der zentralen Regulatoren dieses Systems wirkt. Dies könnte z. B. das Zwei-Komponenten System direkt betreffen. Ebenfalls möglich wäre, dass eine Komponente des PstSABC-PhoU-

Komplexes, der an der Regulation des Pho-Regulons beteiligt ist, oder aber ein noch unbekannter Regulator des Pho-Systems durch das PTS^{Ntr} reguliert wird. Um zu untersuchen, ob die Sensorkinase oder ein stromaufwärts von der Sensorkinase agierender Faktor für die EIIA^{Ntr} -vermittelte Regulation essentiell ist, wurde zunächst das Gen der Sensorkinase deletiert und die Expression der chromosomalen $\text{phnC}'\text{-lacZ}$ - und $\text{ugpB}'\text{-lacZ}$ -Fusionen analysiert. Dazu wurden die Zellen zur Induktion von Phosphatmangel in LoPi-Medium angezogen und die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt (Abbildung 4.2.10).

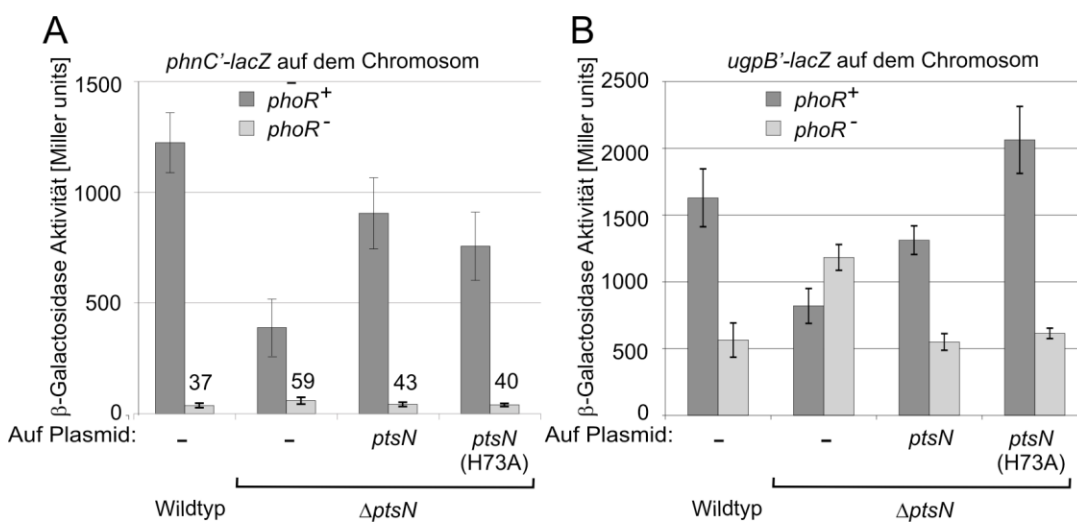


Abbildung 4.2.10: In einer ΔphoR Mutante hat EIIA^{Ntr} keinen Einfluss auf die Expression der $\text{phnC}'\text{-lacZ}$ - und $\text{ugpB}'\text{-lacZ}$ -Fusionen. Die Stämme und Transformanten mit den chromosomal lokalisierten $\text{phnC}'\text{-lacZ}$ - und $\text{ugpB}'\text{-lacZ}$ -Reporterfusionen wurden in LoPi-Medium angezogen. Die Zellen wurden geerntet und eine LacZ-Aktivitätsmessung durchgeführt. (A) Die Aktivität der chromosomalen $\text{phnC}'\text{-lacZ}$ -Fusion im Wildtyp (Z344); der isogenen ΔptsN Mutante (Z413), die mit ptsN (pBGG86) und ptsN(H73A) (pBGG93) komplementierte ΔptsN Mutante, sowie die entsprechenden ΔphoR Mutanten (Wildtyp (Z538) und die isogene ΔptsN Mutante (Z536)) wurde untersucht. (B) Die Aktivität der chromosomalen $\text{ugpB}'\text{-lacZ}$ -Fusion im Wildtyp (Z440); der isogenen ΔptsN Mutante (Z437), die mit ptsN (pBGG86) und ptsN(H73A) (pBGG93) komplementierte ΔptsN Mutante, sowie die entsprechenden ΔphoR Mutanten (Wildtyp (Z539) und die isogene ΔptsN Mutante (Z537)) wurde analysiert. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Für beide lacZ -Fusionen war zu erkennen, dass die β -Galaktosidase-Aktivität durch die phoR Deletion erheblich reduziert ist. Allerdings war der Faktor der Reduktion für beide lacZ -Fusionen unterschiedlich. Dies ergibt sich wahrscheinlich durch eine

unterschiedliche Abhängigkeit der Expression vom PhoR/PhoB Zwei-Komponenten System. Die Expression kann durch eine unterschiedliche Anzahl und Konserviertheit der PhoB-Bindestellen in den Promotorbereichen variiert werden (Diniz *et al.*, 2011). Die Überexpression von *ptsN* in den $\Delta ptsN/\Delta phoR$ Stämmen zeigte keinen Einfluss auf die Expression der *lacZ*-Fusionen im Vergleich zum $\Delta phoR$ Stamm (43 und 40 gegenüber 37 Miller units für *phnC'-lacZ* und 549 und 614 versus 563 Miller units für *ugpB'-lacZ*). Allerdings war zu beobachten, dass die Aktivität für beide *lacZ*-Fusionen durch die Deletion von *ptsN* in den $\Delta phoR$ Stämmen anstieg (59 versus 37 Miller units und 1182 versus 563 Miller units). Der negative Effekt einer *ptsN* Deletion auf die Expression der *lacZ*-Fusionen war hier nicht mehr zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass sich EIIA^{Ntr} auf die Aktivität der Sensor kinase auswirken könnte. In allen vorhergegangenen Experimenten hatte eine *ptsN* Deletion einen inhibitorischen Effekt auf die Expression der *lacZ*-Fusionen. In diesem experimentellen Ansatz war das Gegenteil der Fall (siehe Abbildung 4.2.10). Die Abwesenheit von EIIA^{Ntr} wirkte stimulierend. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass es noch einen weiteren Mechanismus gibt, über den EIIA^{Ntr} auf das Pho-Regulon in dieser Mutante wirkt. Hier könnte es sich z. B. über eine indirekte Regulation über die Kreuzphosphorylierung durch andere Zwei-Komponenten Systeme handeln. Dies kommt vor allem *in vivo* vor, wenn die eigentliche Sensor kinase deletiert ist (Amemura *et al.*, 1990; Laub and Goulian, 2007).

4.2.3.5.1. Der Einfluss des PTS^{Ntr} auf das Pho-Regulon ist unabhängig vom PhoQ/PhoP Zwei-Komponenten System und teilweise abhängig von RpoS

Es konnte gezeigt werden, dass das Protein YneM ein Konnektor zwischen dem Zwei-Komponenten System PhoQ/PhoP und dem PhoR/PhoB Zwei-Komponenten System ist (G. Storz persönliche Mitteilung). Das Gen für YneM ist in Enterobakterien zusammen mit der sRNA MgrR konserviert und die Expression beider Gene ist von dem PhoQ/PhoP Zwei-Komponenten System abhängig (Moon and Gottesman, 2009). Bislang kann nicht ausgeschlossen werden, dass die EIIA^{Ntr}-vermittelte Regulation des Pho-Regulons indirekt ist und über weitere Faktoren läuft. So könnte das EIIA^{Ntr} auch auf das von PhoQ/PhoP regulierte *yneM* wirken und so das Pho-Regulon beeinflussen.

Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, wurden *phoQ* und *phoP* Deletionsstämme mit chromosomalen *phnC'*-*lacZ*- und *ugpB'*-*lacZ*-Fusionen hergestellt. Die Deletionen wurden jeweils in den Wildtyp und die isogene Δ *ptsN* Mutante eingebracht. Die Stämme wurden zur Analyse der β -Galaktosidase Aktivitäten der *lacZ*-Fusionen in LoPi-Medium angezogen (Abbildung 4.2.11).

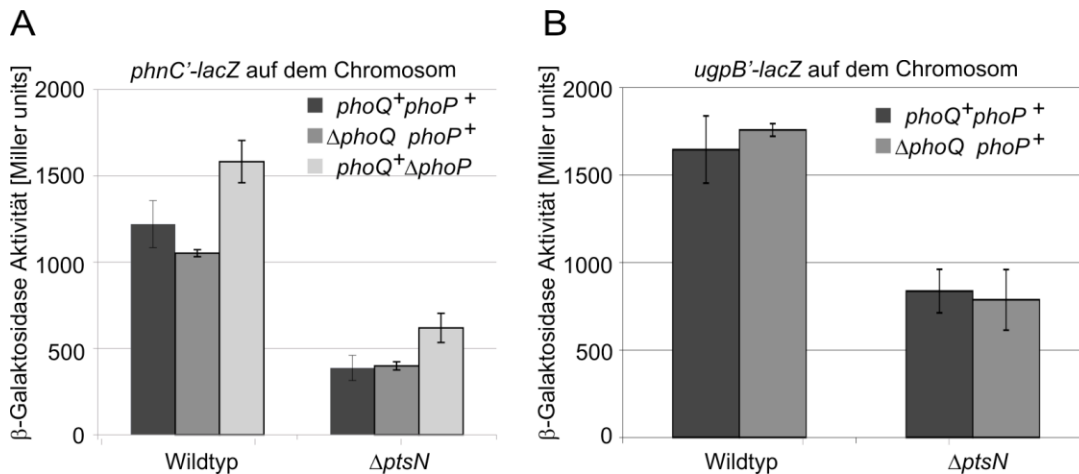


Abbildung 4.2.11: Das PhoQ/PhoP Zwei-Komponenten System hat keinen Einfluss auf das Pho-Regulon. Die Stämme mit den chromosomal lokalisierten *phnC'*-*lacZ*- und *ugpB'*-*lacZ*-Reporterfusionen wurden in LoPi-Medium angezogen. Die Zellen wurden geerntet und eine LacZ-Aktivitätsmessung durchgeführt. (A) Die Aktivität der chromosomalen *phnC'*-*lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z344); der isogenen Δ *ptsN* Mutante (Z413), der Δ *phoQ*::*kan* Mutante (Z542); der Δ *phoP*::*kan* Mutante (Z546) sowie der Δ *ptsN*/ Δ *phoQ*::*kan* Doppelmutante (Z543) und der Δ *ptsN*/ Δ *phoP*::*kan* Doppelmutante (Z547) wurde untersucht. (B) Die Aktivität der chromosomalen *ugpB'*-*lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z440); der isogenen Δ *ptsN* Mutante (Z437), der Δ *phoQ*::*kan* Mutante (Z545) sowie der Δ *ptsN*/ Δ *phoQ*::*kan* Doppelmutante (Z544) wurde analysiert. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression der *phnC'*-*lacZ*-Fusion weder im Wildtyp noch in der Δ *ptsN* Mutante von der An- oder Abwesenheit von PhoQ oder PhoP abhängen. Für den Wildtyp konnte eine Aktivität von 1220 Miller units gemessen werden. Die Werte der *phoQ* Mutante und der *phoP* Mutante mit 1052 und 1582 Miller units unterschieden sich nicht stark von denen des Wildtyps (Abbildung 4.2.11 A). Dies verhielt sich genauso für die Deletionen im Δ *ptsN* Stammhintergrund (387 versus 399 und 620 Miller units). Für die *ugpB'*-*lacZ*-Fusion wurde eine *phoQ* Deletionsmutante, aber keine *phoP* Mutante untersucht (Abbildung 4.2.11 B). Auch hier unterschied sich

die LacZ-Aktivität zwischen Wildtyp und *phoR* Deletionsmutante nicht (1646 gegenüber 1758 Miller units). Auch die $\Delta ptsN$ Mutante und die $\Delta ptsN/\Delta phoQ$ Doppelmutante zeigten ähnliche β -Galaktosidase-Aktivitäten (837 versus 787 Miller units). Das bedeutet, dass das PhoQ/PhoP Zwei-Komponenten System die Expression des Pho-Regulons *in vivo* nicht reguliert. Weiterhin scheint EIIA^{Ntr} nicht über dieses ZKS auf das Pho-Regulon zu wirken.

Im Folgenden wäre zu klären, ob EIIA^{Ntr} durch sekundäre Effekte, wie z. B. die Beeinflussung der Sigma Faktor Selektivität auf das Pho-Regulon wirkt. Es wurde gezeigt, dass durch die Abwesenheit von EIIA^{Ntr} viele σ^S -abhängige Gene stärker exprimiert werden und σ^{70} -abhängige Gene reprimiert werden (Lee *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurden Stämme mit chromosomalen *phnC'-lacZ*-Fusionen konstruiert, in denen *rpoS*, das Gen, welches für σ^S kodiert, deletiert ist. Zur Untersuchung der *phnC'-lacZ* Expression wurden die Stämme in LoPi-Medium angezogen. Die Zellen wurden geerntet und β -Galaktosidase-Messungen unterzogen (Abbildung 4.2.12).

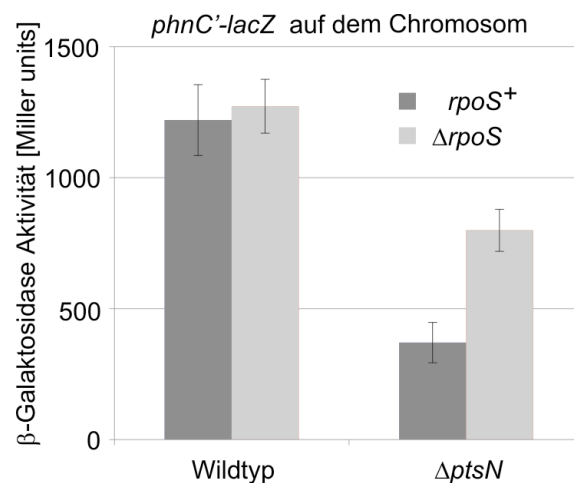


Abbildung 4.2.12: Die *phnC'-lacZ*-Fusion wird in einer $\Delta ptsN$ Mutante durch RpoS reguliert. Die Stämme wurden in LoPi-Medium angezogen. Die Zellen wurden geerntet und eine LacZ-Aktivitätsmessung durchgeführt. Dargestellt ist die Aktivität der chromosomalen *phnC'-lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z344); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z413), der $\Delta rpoS::kan$ Mutante (Z566); und der $\Delta ptsN/\Delta rpoS::kan$ Doppelmutante (Z567). Die β -Galaktosidase-Aktivitäten der in den Diagrammen dargestellten *lacZ*-Fusionen sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die Deletion von *rpoS* zeigte in dem Wildtypstamm keinen Einfluss auf die Expression der *phnC'-lacZ*-Fusion (1220 versus 1273 Miller units). Allerdings führte die zusätzliche Deletion von *rpoS* in einer $\Delta ptsN$ Mutante zu einer Steigerung der LacZ-

Aktivität (370 versus 799 Miller units). Damit lag die β -Galaktosidase-Aktivität der Doppelmutante zwischen den Werten der $\Delta ptsN$ Mutante und des Wildtyps (799 gegenüber 370 und 1220 Miller units). Dies bedeutet, dass sich scheinbar sekundäre Effekte, die durch eine Deletion von *ptsN* entstehen, auf das Pho-Regulon auswirken. Eine Möglichkeit wäre, dass hier die von EIIA^{Ntr} regulierte Sigma-Faktor Selektivität eine Rolle spielt.

4.2.4. Interaktionsanalysen von EIIA^{Ntr} mit Regulatoren des Pho-Regulons

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass EIIA^{Ntr} die Expression der Gene des Pho-Regulons moduliert. Diese Regulation ist von der Anwesenheit der Sensor kinase PhoR abhängig. Mit den Untersuchungen konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass EIIA^{Ntr} auf andere Regulatoren des Pho-Regulons wirkt. Die Regulation des Pho-Systems ist sehr komplex. Die Proteine des Phosphattransporters (PstSABC) bilden wahrscheinlich mit PhoU sowie mit PhoR und PhoB ein Sieben Komponenten System (Hsieh and Wanner, 2010). EIIA^{Ntr} könnte mit einem dieser Proteine interagieren und hierdurch die Aktivität oder Stabilität des Komplexes modifizieren und so letztendlich auf die Expression der Gene des Pho-Regulons wirken. Interaktionsanalysen mit dem BACTH System waren nicht erfolgreich. Es konnte weder eine Interaktion von EIIA^{Ntr} mit der Sensor kinase PhoR, noch mit dem Response Regulator PhoB nachgewiesen werden. In den Analysen zeigte sich im phänotypischen Test, das auch keine Interaktion der Sensor kinase PhoR mit dem Response Regulator PhoB, bzw. die Dimerisierung beider Proteine beobachtet werden konnte. EIIA^{Ntr} interagiert auch nicht mit einer der Komponenten des Phosphattransporters Pst (PstB) (Daten nicht gezeigt).

4.2.4.1. Analyse der Interaktion von EIIA^{Ntr} mit Regulatoren des Pho-Regulons durch Koaufräunigungen

Da die Interaktionsanalysen mit dem BACTH System keine Interaktionen von EIIA^{Ntr} mit den verschiedenen Proteinen zeigte, wurde ein anderer experimenteller Ansatz gewählt. Es sollten *in vivo* Interaktionsstudien durch Koaufräunigungen (Ligand-fishing) durchgeführt werden. Hierzu wurde ein Protein von Interesse mittels eines

Affinitätstags aufgereinigt. Mögliche Interaktionspartner sollten durch Western Blot mit spezifischen Antikörpern in den Eluaten der Aufreinigungen nachgewiesen werden können.

4.2.4.2.1. Funktionsüberprüfung von Strep-Fusionsproteinen

Für die Ligand-fishing Experimente wurden Plasmide konstruiert, die Fusionen eines Strep-Tags mit den Genen für EIIA^{Glc} (*crr*), EIIA^{Ntr} (*ptsN*) und EIIA^{Ntr}H73A (*ptsN* H73A) unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors enthielten. Ebenfalls wurde ein isogener Leervektor konstruiert, welcher nur den Strep-Tag unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors trug. Der Strep-Tag allein und EIIA^{Glc} wurden als Kontrollproteine verwendet, um die Spezifität der Interaktion von EIIA^{Ntr} mit anderen Proteinen zu zeigen. EIIA^{Glc} wurde auch schon für andere Interaktionen von EIIA^{Ntr} als Kontrollprotein verwendet (Choi *et al.*, 2010). Nach der Konstruktion und Sequenzierung der Plasmide musste die Expression der Fusionsproteine und die Funktionalität der Proteine überprüft werden.

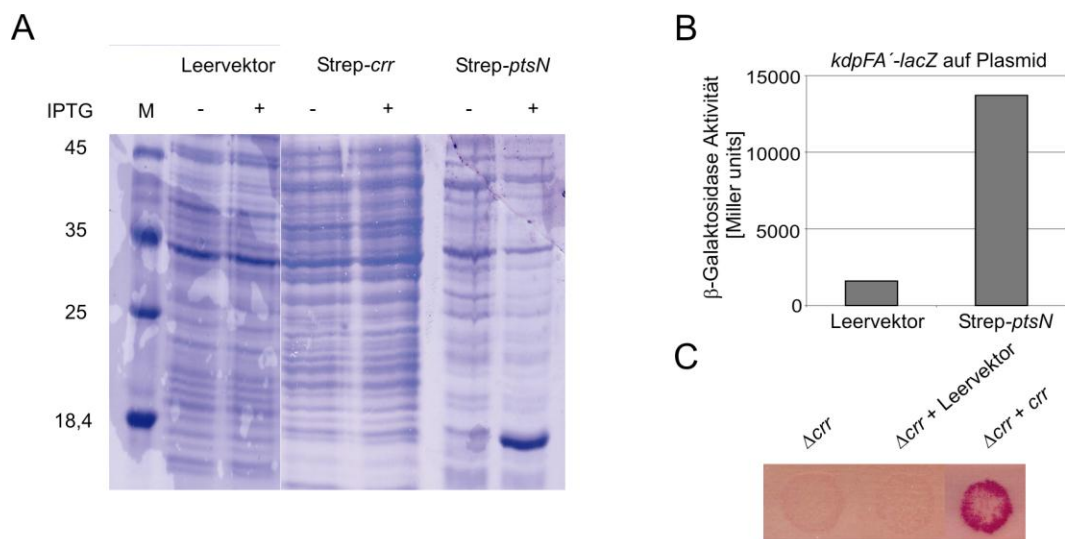


Abbildung 4.2.13: Expressions- und Funktionalitätsüberprüfung der Strep-Fusionsproteine. (A) Die Transformanten DH5 α mit dem Leervektor (pBGG237), Strep-EIIA^{Glc} (*strep-crr*; pBGG230), Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217) wurden in LB mit und ohne IPTG angezogen, geerntet und die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie blue angefärbt. (B) Der Wildtypstamm (R1279) wurde mit dem Plasmid pBGG158 (*kdpFA'-lacZ*-Fusion) und entweder mit dem Leervektor (pBGG237) oder *strep-ptsN* (pBGG217) transformiert. Die Kulturen wurden in K⁺-Medium mit einer Kaliumkonzentration von 1 mM angezogen, geerntet und ein LacZ-Aktivitätstest durchgeführt. (C) Der Stamm $\Delta crr::neo$ Mutante (TP2862) sowie die mit dem Leervektor (pBGG237) oder *strep-crr* (pBGG230) komplementierte

Mutante wurden in LB mit IPTG zur Induktion der Synthese der Strep-Proteine angezogen und eine geeignete Verdünnung auf McConkey-Agarplatten mit Trehalose getropft. Eine Verwertung von Trehalose zeigt rote Kolonien, kann Trehalose nicht aufgenommen und verwertet werden, sind die Kolonien weiß.

Zur Überprüfung der Expression der Fusionsproteine wurden die Plasmide in DH5 α transformiert und die Transformanten anschließend in LB-Medium angezogen. Die Zellextrakte wurden auf einem 12,5%igem SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie blue gefärbt um die Proteine sichtbar zu machen (Abbildung 4.2.13 A). Für das Strep-EIIA^{Glc} konnte keine Bande, in der mit IPTG induzierten Kultur detektiert werden, die drauf hinweist, dass es zur Überexpression kommt. Allerdings zeigte der Funktionstest (Abbildung 4.2.13 C), dass Strep-EIIA^{Glc} exprimiert wird und eine Deletion von *crr* komplementieren kann. Zellen, die kein EIIA^{Glc} besitzen sind nicht in der Lage Trehalose aufzunehmen und es anschließend zu verwerten. Das EIIA^{Glc} ist für die Phosphorylierung des EII^{Tre}-Komplexes und somit für den Import von Trehalose nötig. Nur Zellen, die ein funktionales EIIA^{Glc} besitzen, können das Kohlenhydrat aufnehmen und verwerten. Dies führt auf McConkey/Trehalose-Agar zu einer Rotfärbung der Kolonien. Für Strep-EIIA^{Ntr} konnte eine Bande der erwarteten Größe von 18 kDa detektiert werden (Abbildung 4.2.13 A). Strep-EIIA^{Ntr} scheint somit exprimiert zu werden. Auch der Funktionstest zeigte ein positives Ergebnis (Abbildung 4.2.13 B). Eine Überexpression von EIIA^{Ntr} führt zu einer starken Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion. Während die *kdpFA'-lacZ*-Fusion in der Leervektor-Transformante nur eine geringe Aktivität zeigte (1603 Miller units), führte die Überexpression von Strep-EIIA^{Ntr} zu einer Erhöhung auf 13713 Miller units. Dies zeigt, dass die Expression von Strep-EIIA^{Ntr} die *kdpFA'-lacZ*-Expression wie erwartet stark stimuliert.

4.2.4.2.2. Koaufräinigungen von Strep-EIIA^{Ntr} mit PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG

Um mögliche Interaktionen von EIIA^{Ntr} mit der Sensor kinase PhoR oder dem Response Regulator PhoB in den Ligand-fishing Experimenten nachzuweisen, wurden die Gene der Komponenten des ZKS in ihrem authentischen Locus mit einer Sequenz fusioniert, die für das 3xFLAG-Epitop kodiert. Zusätzlich tragen diese Stämme eine ΔptN Mutation. Die Untersuchung der Mengen an PhoR und PhoB Proteinen in diesen

Stämmen wurde schon in Abschnitt 4.2.3.1. analysiert. In die beiden Stämme mit den chromosomalen 3xFLAG-Allelen wurden jeweils Plasmide, die für Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A kodieren, eingebracht. Die Zellen wurden in LoPi-Medium angezogen. Durch Zugabe von IPTG erfolgte die Induktion der Synthese der Strep-Fusionsproteine. Die Zellen wurden geerntet und anschließend aufgeschlossen. Die Aufreinigung der Strep-EIIA^{Ntr}-Proteine erfolgte über Streptaktin-Säulen. Die Zellextrakte der induzierten Kulturen, sowie definierte Mengen der Elutionsfraktionen der aufgereinigten Proteine wurden in denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Dann wurden Western Blot Analysen durchgeführt (Abbildung 4.2.14).

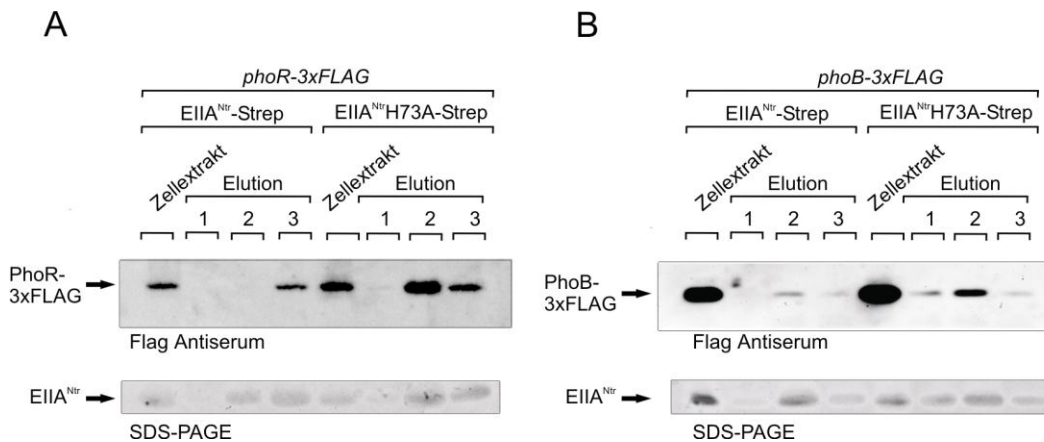


Abbildung 4.2.14: Koaufräufungen von Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A mit PhoR und PhoB. Die Transformanten mit den chromosomalen *phoR*-3xFLAG- und *phoB*-3xFLAG-Allelen wurden in LoPi-Medium angezogen. Die Zellextrakte und Elutionsfraktionen wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. (A) Zellextrakte der Transformanten und Elutionsfraktionen der Strep-Tag Aufreinigungen aus dem Δ *ptsN* Stamm mit chromosomalem *phoR*-3xFLAG-Allel (Z575) mit Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217), Strep-EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A). (B) Zellextrakte der Transformanten und Elutionsfraktionen der Strep-Tag Aufreinigungen aus dem Δ *ptsN* Stamm mit chromosomalem *phoB*-3xFLAG-Allel (Z574) mit Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217), Strep-EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A). Es wurden jeweils 13 μ l der Zellextrakte und 10 μ l der Elutionen geladen. Die Detektion von PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum, EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A wurden durch Coomassie blue Färbung sichtbar gemacht.

EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A konnten sehr gut aufgereinigt werden. In den meisten Elutionsfraktionen befand sich Protein (siehe untere Blots in den Abbildung 4.2.14 A und B). In den oberen Abbildungen ist zu erkennen, dass PhoR-3xFLAG als auch PhoB-3xFLAG in den Zellextrakten detektiert werden konnten. Auch in den Elutionsfraktionen von Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A konnten beide Proteine nachgewiesen werden. Dies ließ vermuten, EIIA^{Ntr} sowohl mit der Sensorkinase PhoR

und als auch mit dem Response Regulator PhoB interagiert. Allerdings sollte in weiteren Experimenten die Interaktion verifiziert werden. Mit einer Leerkontrolle und einem anderen Strep-Protein kann die Spezifität dieser Interaktion untersucht werden.

Deshalb wurden die $\Delta ptsN$ Stämme mit den chromosomalen 3xFLAG-Allelen (*phoB* und *phoR*) mit einem Leervektor, einem Plasmid welches für Strep-EIIA^{Glc} kodiert, sowie mit Plasmiden, die für Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A kodieren, transformiert. Die Zellen wurden in LoPi-Medium angezogen. Durch die Zugabe von IPTG erfolgte die Induktion der Synthese der Strep-Fusionsproteine. Nach einer weiteren Stunde wurden die Kulturen geerntet. Die Zellen aufgeschlossen und die Strep-Proteine wurden über Streptaktin-Säulen aufgereinigt. In den Elutionsfraktionen 2 befand sich die größte Menge an aufgereinigtem Strep-Protein (Daten nicht gezeigt). Diese Elutionsfraktionen wurden für die folgenden Analysen eingesetzt. Die Zellextrakte der induzierten Kulturen, sowie definierte Mengen der Elutionsfraktionen 2 der aufgereinigten Proteine wurden durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden Western Blot Analysen durchgeführt (Abbildung 4.2.15).

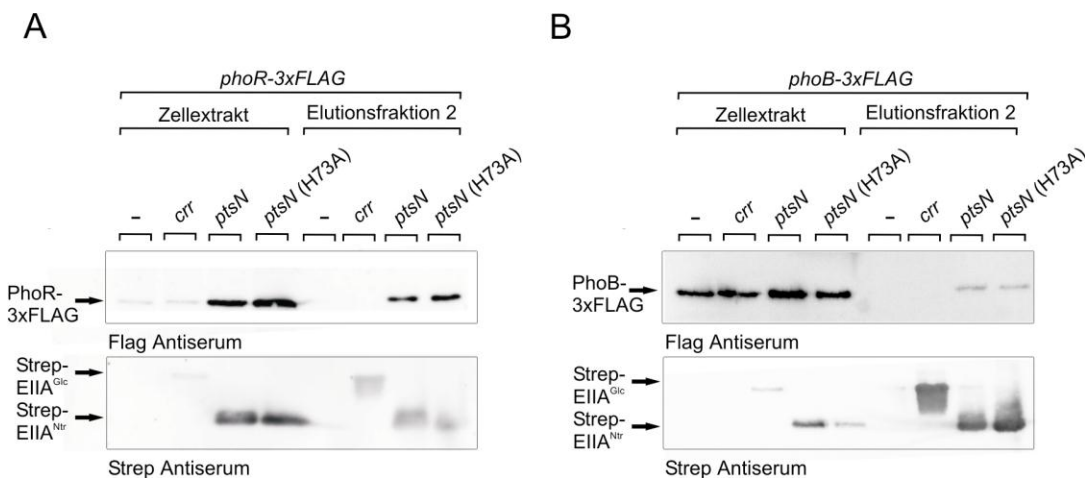


Abbildung 4.2.15: Die Interaktion von Strep-EIIA^{Ntr} mit PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG ist spezifisch. Die Transformanten mit den chromosomalen *phoR*-3xFLAG- und *phoB*-3xFLAG-Allelen wurden in LoPi-Medium angezogen. Die Zellextrakte wurden auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. (A) Die Zellextrakte der Transformanten und Elutionsfraktion 2 der Strep-Tag Aufreinigungen aus dem $\Delta ptsN$ Stamm mit chromosomalen *phoR*-3xFLAG (Z575) mit dem Leervektor (pBGG237), Strep-EIIA^{Glc} (*strep-crr*; pBGG230), Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217), Strep-EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A) wurden analysiert. (B) Die Zellextrakte der Transformanten und Elutionsfraktion 2 der Strep-Tag Aufreinigungen des $\Delta ptsN$ Stammes mit chromosomalen *phoB*-3xFLAG (Z574) mit dem Leervektor (pBGG237), Strep-EIIA^{Glc} (*strep-crr*; pBGG230), Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217), Strep-EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A)

wurden untersucht. Es wurden jeweils 13 μ l der Zellextrakte und 10 μ l der Elution von Strep-EIIA^{Ntr}H73A geladen. Die Mengen der anderen Elutionen wurde der Proteinmenge von Strep-EIIA^{Ntr}H73A angepasst. Die Detektion von PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum, die Detektion von Strep-EIIA^{Glc}, Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A mit Strep Antiserum.

Wie bereits zuvor bei der Analyse von Zellextrakten der Stämme mit *phoR*-3xFLAG- bzw. *phoB*-3xFLAG-Allelen aufgefallen war, bewirkte die Überexpression von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A einen Anstieg der Proteinmengen von PhoR-3xFLAG als auch von PhoB-3xFLAG (Abbildung 4.2.4). Dies konnte in diesen Untersuchungen nochmals bestätigt werden. War nur der Strep-Tag oder Strep-EIIA^{Glc} vorhanden, war die Menge an detektiertem PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG geringer als bei Anwesenheit von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A. Die Ergebnisse der Koaufräufungen zeigten, dass sowohl PhoR-3xFLAG als auch PhoB-3xFLAG nicht in den Aufräufungen der Kontrollansätze (Strep-Tag und Strep- EIIA^{Glc}) detektiert werden konnten. Dem gegenüber konnten in den Elutionsfraktionen von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A eindeutige Banden, die PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG zuzuordnen sind, detektiert werden. Dabei schien die Bandenintensität, also die Menge an koaufräufbarem PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG in den beiden Elutionsfraktionen von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A gleich zu sein. Es konnte allerdings mehr PhoR-3xFLAG als PhoB-3xFLAG koaufräufbar werden. Diesem Experiment zufolge sollten EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A sowohl mit der Sensor kinase PhoR als auch mit dem Response Regulator PhoB interagieren. Alternativ könnte eines der beiden Proteine des ZKS durch die Interaktion mit dem jeweils zweiten Protein des ZKS mitaufräufbar worden sein, ohne dass eine direkte Interaktion mit EIIA^{Ntr} vorlag. Es war nun interessant herauszufinden, ob für die Interaktion mit EIIA^{Ntr} beide Proteine des ZKS nötig sind. EIIA^{Ntr} könnte entweder mit dem PhoR/PhoB Komplex interagieren oder aber das Vorhandensein eines der Regulatorproteine reicht für eine Interaktion mit EIIA^{Ntr} aus.

Um dies zu untersuchen wurde zunächst ein Stamm konstruiert, in dem die beiden Gene *phoB* und *phoR* deletiert wurden. Außerdem wurden Plasmide konstruiert bei denen die Expression von *phoR*-3xFLAG bzw. *phoB*-3xFLAG unter Fremdpromotor-Kontrolle steht. Dies sollte eine Expression von *phoR* bzw. *phoB* unabhängig von der Phosphatkonzentration erlauben. Eine Δ *phoBR* Mutante wurde verwendet, damit nur eines der beiden Proteine des ZKS (welches auf dem eingebrachten Plasmid kodiert ist) in der Zelle vorhanden ist. Die Plasmide mit der P_{Ara} -*phoR*-3xFLAG- (pDL30) oder

P_{Ara} -*phoB*-3xFLAG-Kassette (pDL29) wurden mit jeweils einem der im vorherigen Experiment beschriebenen Strep-Fusionsplasmide in die Δ *phoBR* Mutante eingebracht. Die Kulturen wurden in HiPi-Medium und LoPi-Medium mit 0,2% Arabinose zur Induktion der PhoR-3xFLAG- und PhoB-3xFLAG-Synthese angezogen. Durch Zugabe von IPTG erfolgte die Induktion der Expression der Strep-Fusionsproteine. Nach einer weiteren Stunde wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Die Aufreinigung der Strep-Proteine erfolgte über eine Affinitätschromatographie. Die Zellextrakte der induzierten Kulturen, sowie definierte Mengen der Elutionsfraktionen 2 der aufgereinigten Proteine wurden durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden Western Blot Analysen zur Detektion der FLAG- und Strep-Fusionsproteine durchgeführt (Abbildung 4.2.16).

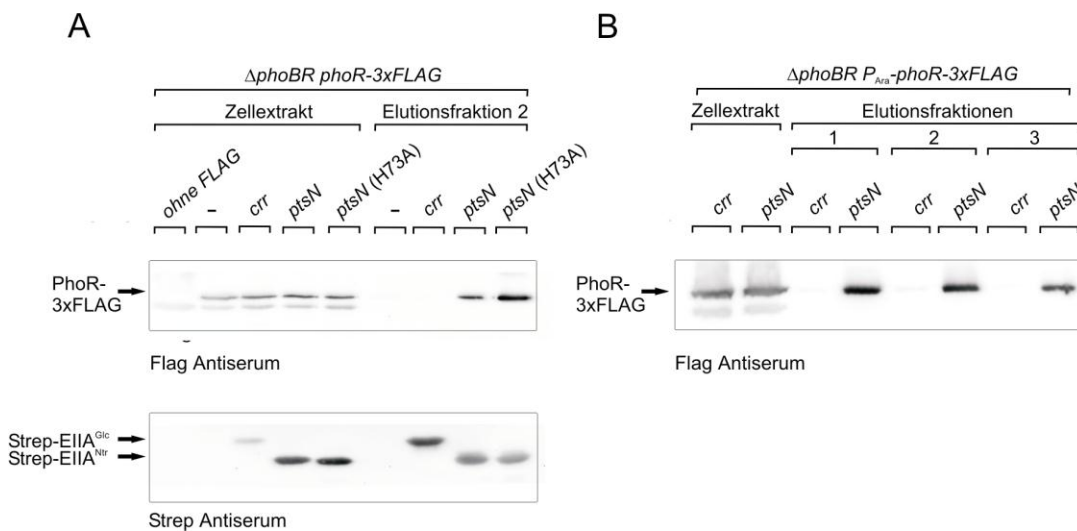


Abbildung 4.2.16: PhoR interagiert direkt mit Strep-EIIA^{Ntr}. Die Transformanten mit P_{Ara} -*phoR*-3xFLAG-(pDL30) wurden in HiPi-Medium (A) und LoPi-Medium (B) angezogen. Die Zellextrakte wurden auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. Die Zellextrakte der Transformanten und die Elutionsfraktion 2 der Strep-Tag Aufreinigungen des Δ *phoBR* Stammes (Z607) mit P_{Ara} -*phoR*-3xFLAG (pDL30) mit dem Leervektor (pBGG237), Strep-EIIA^{Glc} (*strep-crr*; pBGG230), Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217), Strep-EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A) wurden analysiert. Es wurden jeweils 13 μ l der Zellextrakte und 10 μ l der Elution von Strep-EIIA^{Ntr}H73A geladen. Die Mengen der anderen Elutionen wurden der Proteinmenge von Strep-EIIA^{Ntr}H73A angepasst. Die Detektion von PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum, die Detektion von EIIA^{Glc}, EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A mit Strep Antiserum. Als Negativkontrolle wurde der Δ *phoBR* Stamm ohne FLAG-Tag Fusionsplasmide (Z607) benutzt.

PhoR-3xFLAG konnte in allen Zellextrakten der verschiedenen Proben nachgewiesen werden (Abbildung 4.2.16 A). Das bedeutet, dass das Protein auch unter der Kontrolle

des induzierbaren P_{Ara} exprimiert wurde. In den Elutionsfraktionen der Aufreinigungen des Strep-Tags und von Strep-EIIA^{Glc} (den Kontrollansätzen) konnte kein PhoR detektiert werden. In den Elutionsfraktionen von Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A konnten Banden detektiert werden, die PhoR entsprachen. Dabei schien die Bandenintensität, also die Menge an koaufgereinigtem PhoR in den beiden Elutionsfraktionen unterschiedlich zu sein. In der EIIA^{Ntr} Aufreinigung befand sich weniger PhoR als in der EIIA^{Ntr}H73A Aufreinigung. Dies könnte bedeuten, dass das Protein EIIA^{Ntr}H73A stärker mit PhoR interagiert als das Wildtypprotein. In Abbildung 4.2.16 B ist der Western Blot für PhoR-3xFLAG von im LoPi-Medium gezogenen Kulturen dargestellt. Hier wurde Strep-EIIA^{Glc} und Strep-EIIA^{Ntr} aufgereinigt. Es war zu erkennen, dass PhoR-3xFLAG in beiden Zellextrakten zu detektieren ist. In den Elutionsfraktionen war PhoR-3xFLAG nur in der Aufreinigung von Strep-EIIA^{Ntr} zu detektieren, allerdings nicht in der EIIA^{Glc} Aufreinigung. Hier wurde also das gleiche Ergebnis erhalten wie für die Aufreinigung der Strep-Proteine aus in HiPi-Medium gewachsenen Kulturen (Abbildung 4.2.16 A). PhoR-3xFLAG scheint unabhängig vom Vorhandensein von PhoB-3xFLAG mit EIIA^{Ntr} zu interagieren und PhoR-3xFLAG interagiert mit EIIA^{Ntr} bei Phosphatmangel und -überschuss. Die gleichen Experimente wurden mit PhoB-3xFLAG durchgeführt. Allerdings konnte PhoB-3xFLAG weder in den Zellextrakten, noch in den Elutionsfraktionen detektiert werden. Dies bedeutet, dass PhoB nicht oder nur sehr gering exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Für die folgenden Experimente wurde die Expressionskontrolle zur Synthese von PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG geändert, um PhoB-3xFLAG besser detektieren zu können. Hierzu wurden *attB*-Integrationsplasmide konstruiert, welche *phoR* bzw. *phoB* unter der Kontrolle eines IPTG induzierbaren Promotors trugen. Diese P_{tac} -*phoR*-3xFLAG- und P_{tac} -*phoB*-3xFLAG-Fusionen wurden in die *attB*-Stelle der Δ *phoBR* Mutante integriert. Die Gene kommen nun in Einzelkopien im Genom vor und werden somit geringer exprimiert, als von Plasmiden. Dies sollte die Spezifität der Interaktion noch mal zusätzlich erhöhen. Die Stämme wurden dann mit den Plasmiden, die für die verschiedenen Strep-Proteine kodierten, transformiert. Die Kulturen wurden in Medium mit niedriger und hoher Phosphatkonzentration angezogen, um einen möglichen Einfluss der Phosphatkonzentration auf die Interaktionen zu untersuchen. In den in HiPi-Medium angezogenen Kulturen wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,8 die Synthese von PhoR/PhoB und die Synthese der Strep-Fusionsproteine durch Zugabe von IPTG

induziert. Nach drei Stunden wurden die Kulturen geerntet. Die Kulturen in LoPi-Medium wurden, auf Grund ihres langsamen Wachstums bei Phosphatmangel, über Nacht angezogen. Die Expression von PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG wurde durch Zugabe von IPTG am nächsten Morgen gestartet und die Kulturen nach drei Stunden geerntet. Die Aufreinigung der Proteine schloss sich direkt an den Aufschluss der Zellen an. Die Zellextrakte der induzierten Kulturen, sowie Proben der Aufreinigungen der Strep-Fusionsproteine wurden durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden Western Blot Analysen zur Detektion der FLAG- und Strep-Fusionsproteine durchgeführt (Abbildung 4.2.17 und 4.2.18).

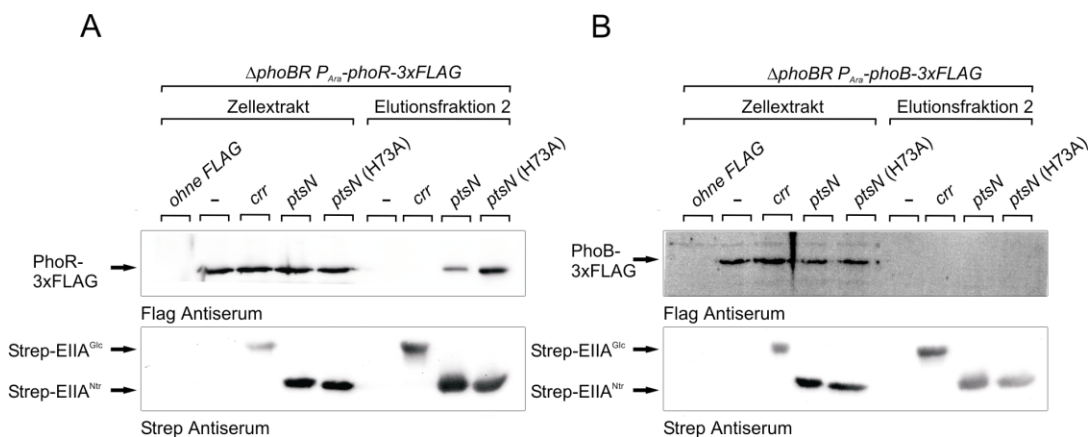


Abbildung 4.2.17: EIIA^{Ntr} interagiert mit PhoR-3xFLAG aber nicht mit PhoB-3xFLAG bei Phosphatüberschuss. Die Transformanten mit den chromosomalen $P_{tac}-phoR-3xFLAG$ - und $P_{tac}-phoB-3xFLAG$ -Fusionen wurden in HiPi-Medium angezogen. Die Zellextrakte wurden auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. (A) Die Zellextrakte der Transformanten und die Elutionsfraktionen 2 der Strep-Tag Aufreinigungen des $\Delta phoBR$ Stammes mit chromosomalen $P_{tac}-phoR-3xFLAG$ -Allel (Z657) mit dem Leervektor (pBGG237), Strep-EIIA^{Glc} (*strep-crr*; pBGG230), Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217) und Strep-EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A) wurden untersucht. (B) Die Zellextrakte der Transformanten und die Elutionsfraktionen 2 der Strep-Tag Aufreinigungen des $\Delta phoBR$ Stammes mit chromosomalen $P_{tac}-phoB-3xFLAG$ -Allel (Z656) mit dem Leervektor (pBGG237), Strep-EIIA^{Glc} (*strep-crr*; pBGG230), Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217) und Strep-EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A) wurden analysiert. Es wurden jeweils 13 μ l der Zellextrakte und 10 μ l der Elution von Strep-EIIA^{Ntr}H73A geladen. Die Mengen der anderen Elutionen wurde der Proteinmenge von Strep-EIIA^{Ntr}H73A angepasst. Die Detektion von PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum, die Detektion von EIIA^{Glc}, EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A mit Strep Antiserum. Als Negativkontrolle wurde der $\Delta phoBR$ Stamm (Z607) ohne FLAG-Allele verwendet.

PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG konnten in den Zellextrakten der entsprechenden Stämme detektiert werden (Fig.4.2.17 A und B). Im Kontrollstamm (jeweils die erste Spur im Blot in Abbildung 4.2.17 und 4.2.18) waren keine Banden für PhoR-3xFLAG

oder PhoB-3xFLAG zu detektieren. Dies zeigt, dass die Banden durch die Expression von *phoR*-3xFLAG und *phoB*-3xFLAG bedingt sind. In den Elutionsfraktionen der Strep-Fusionsproteine konnte nur im Fall von Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A ein Signal für PhoR-3xFLAG detektiert werden. In den Elutionsfraktionen des Strep-Tags und von Strep-EIIA^{Glc} waren keine Banden vorhanden. Weiterhin fiel auf, dass die Menge an koaufgereinigtem PhoR-3xFLAG bei der EIIA^{Ntr}H73A Aufreinigung größer war, als bei der Aufreinigung mit den EIIA^{Ntr} Wildtypprotein. Dies war auch schon in dem Ligand-fishing Experiment in Abbildung 4.2.16 zu erkennen.

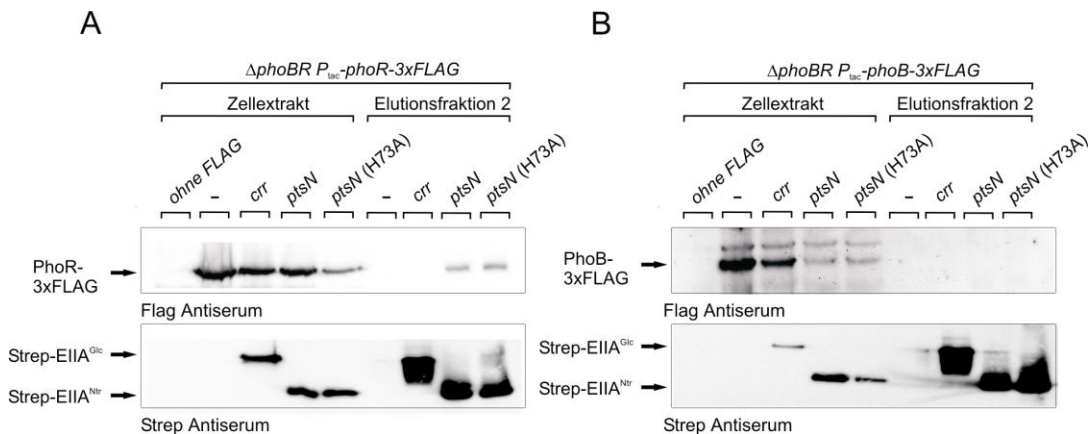


Abbildung 4.2.18: EIIA^{Ntr} interagiert mit PhoR-3xFLAG aber nicht mit PhoB-3xFLAG bei Phosphatmangel. Die Transformanten mit den chromosomalen *P_{tac}-phoR*-3xFLAG- und *P_{tac}-phoB*-3xFLAG-Fusionen wurden in LoPi-Medium angezogen. Die Zellextrakte wurden auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. (A) Die Zellextrakte der Transformanten und die Elutionsfraktionen 2 der Strep-Tag Aufreinigungen des Δ *phoBR* Stammes mit chromosomalen *P_{tac}-phoR*-3xFLAG-Fusion (Z657) mit dem Leervektor (pBGG237), Strep-EIIA^{Glc} (*strep-crr*; pBGG230), Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217), Strep-EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A) wurden analysiert. (B) Die Zellextrakte der Transformanten und die Elutionsfraktionen 2 der Strep-Tag Aufreinigungen des Δ *phoBR* Stammes mit chromosomalen *P_{tac}-phoB*-3xFLAG-Fusion (Z656) mit dem Leervektor (pBGG237), Strep-EIIA^{Glc} (*strep-crr*; pBGG230), Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217), Strep-EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A) wurden untersucht. Es wurden jeweils 13 μ l der Zellextrakte und 10 μ l der Elution von Strep-EIIA^{Ntr}H73A geladen. Die Mengen der anderen Elutionen wurde der Proteinmenge von Strep-EIIA^{Ntr}H73A angepasst. Die Detektion von PhoR-3xFLAG und PhoB-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum, die Detektion von EIIA^{Glc}, EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A mit Strep Antiserum. Als Negativkontrolle wurde der Δ *phoBR* Stamm (Z607) ohne FLAG-Allele verwendet.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass PhoR-3xFLAG mit EIIA^{Ntr} auch unabhängig von PhoB interagieren kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Interaktion von EIIA^{Ntr}H73A mit PhoR-3xFLAG stärker ist als mit dem Wildtyp EIIA^{Ntr}. Im Fall von

PhoB-3xFLAG konnte in keiner der Elutionsfraktionen ein Signal detektiert werden. PhoB-3xFLAG interagiert in Abwesenheit von PhoR also weder mit dem Kontrollprotein, noch mit EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A. Die PhoB-EIIA^{Ntr} Interaktion ist also PhoR abhängig. Eine Interaktion zwischen PhoB-3xFLAG und EIIA^{Ntr} konnte nur in einem Stamm nachgewiesen werden, in dem *phoR*-3xFLAG exprimiert wird (siehe Abbildung 4.2.15). Die Detektion von PhoB-3xFLAG in diesem Experiment beruht also wahrscheinlich auf der Koaufrreinigung des EIIA^{Ntr}-PhoR-PhoB Komplexes und bedeutet, dass es sich hierbei um eine indirekte Interaktion handelt, die von PhoR-3xFLAG vermittelt wird. Die Interaktion zwischen PhoR-3xFLAG und EIIA^{Ntr} konnte sowohl in Kulturen die unter Phosphatmangel angezogen wurden, als auch bei ausreichender Phosphatversorgung beobachtet werden (s. Abb 4.2.17 und 4.2.18). Das lässt darauf schließen, dass diese Interaktion nicht von der Phosphatversorgung oder der Aktivität von PhoR-3xFLAG beeinflusst ist.

4.2.4.2.3. Reverse Ligand-fishing Experimente mit Strep-PhoR und Strep-PhoB als Köderproteine

Um eine direkte Interaktion von PhoR, aber nicht von PhoB, mit EIIA^{Ntr} zu bestätigen, wurden reverse Koaufrreinigungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden Plasmide konstruiert, die *strep-phoR* und *strep-phoB* unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors trugen. Das *strep-phoR* Plasmid wurde in einen Stamm transformiert, der das chromosomale *ptsN*-3xFLAG-Allel im Chromosom trug und in eine isogene Mutante, in der das *phoBR* Operon deletiert war. Durch die Analyse der Interaktion im Δ *phoBR* Stamm sollte bestätigt werden, dass die Interaktion von PhoR mit EIIA^{Ntr} unabhängig von PhoB ist. Da beobachtet wurde, dass die Interaktion von PhoR mit EIIA^{Ntr} nicht von der Phosphatkonzentration im Medium abhängig ist, wurden die Kulturen in LB-Medium angezogen. Die Expression von *phoR* wurde durch die Zugabe von IPTG induziert. Nach der Ernte der Kulturen wurden diese aufgeschlossen und Strep-PhoR aufgereinigt. PhoR konnte nur in sehr geringen Mengen aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Um EIIA^{Ntr} in den Elutionsfraktionen detektieren zu können, wurden diese vereinigt, lyophilisiert und in einer kleinen Menge Proteinauftragspuffer resuspendiert. Die Elutionen wurden zusammen mit den Zellextrakten durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

Anschließend wurde ein Western Blot zur Detektion von EIIA^{Ntr} durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.19 dargestellt.

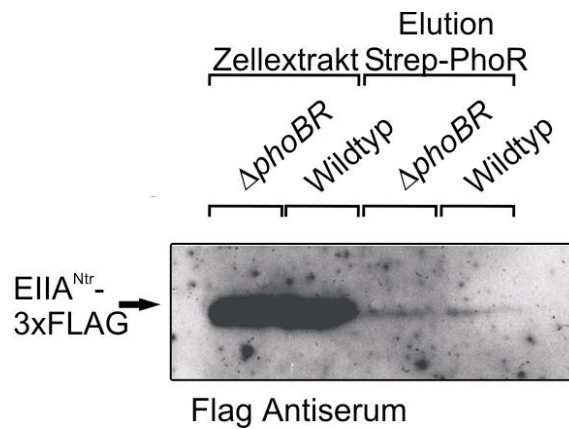


Abbildung 4.2.19: Koaufräufungen von Strep-PhoR mit EIIA^{Ntr}. Die Transformanten des Wildtyps (Z424) und des $\Delta phoBR$ Stammes (Z608) mit den chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allelen und *strep-phoR* (pDL37), wurden in LB-Medium angezogen. Die Zellextrakte der Transformanten und die vereinigten Elutionsfraktionen wurden auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. Es wurden jeweils 13 μ l der Zellextrakte und 50 μ l der Elutionen eingesetzt. Die Detektion von EIIA^{Ntr}-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum.

Wie in dem Western Blot zu erkennen ist, konnte in den Zellextrakten beider Stämme und in beiden Elutionen EIIA^{Ntr}-3xFLAG nachgewiesen werden. Sowohl im Wildtyp als auch in der $\Delta phoBR$ Mutante wurde EIIA^{Ntr} mit Strep-PhoR koeluiert. Dies zeigt, dass die Interaktion der beiden Proteine auch in diesem experimentellen Ansatz PhoB unabhängig ist. PhoR und EIIA^{Ntr} scheinen direkt miteinander zu interagieren.

Für PhoB wurde ähnlich vorgegangen. Das *strep-phoB* Plasmid wurde in einen Stamm mit einer chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allel und die isogene $\Delta phoBR$ Mutante eingebracht. Die $\Delta phoBR$ Mutante wurde zusätzlich mit einem Plasmid kotransformiert, welches *P_{Ara}-phoR*-3xFLAG enthielt. Die drei Kulturen wurden in LB-Medium angezogen. Die Zugabe von IPTG startete die Expression von *phoB*. Im Falle der Kotransformante wurde die Expression von *phoR* durch Zugabe von Arabinose gestartet. Nach der Ernte der Kulturen, wurden diese aufgeschlossen und Strep-PhoB aufgereinigt. Da es sich hier wahrscheinlich um eine indirekte Interaktion von Strep-PhoB mit EIIA^{Ntr}-3xFLAG handelt, könnte die Menge an koaufräufem EIIA^{Ntr}-3xFLAG sehr gering sein. Aus diesem Grund wurden die Elutionsfraktionen vereinigt, lyophilisiert, in einer geringeren Menge Proteinauftragspuffer resuspendiert. Zusammen mit den Zellextrakten wurden die Elutionen durch eine denaturierende

Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und Western Blots zur Detektion von PhoR-3xFLAG und EIIA^{Ntr}-3xFLAG durchgeführt (Abbildung 4.2.20).

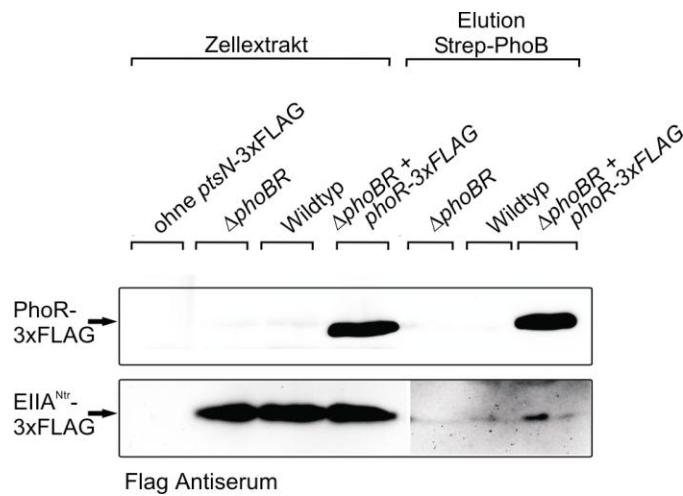


Abbildung 4.2.20: Koaufräinigungen von Strep-PhoB mit EIIA^{Ntr} und PhoR-3xFLAG. Die Transformanten des Wildtyps (Z424) und des $\Delta phoBR$ Stammes (Z608) mit den chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allelen und *strep-phoB* (pDL35), sowie *phoR*-3xFLAG (pDL30) wurden in LB-Medium angezogen. Die Zellextrakte und die vereinigten Elutionsfraktionen durch eine 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. Es wurden jeweils 13 μ l der Zellextrakte und 50 μ l der Elutionen eingesetzt. Die Detektion von EIIA^{Ntr}-3xFLAG und PhoR-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum.

Wie in der Abbildung 4.2.20 zu erkennen ist, konnte EIIA^{Ntr} in den Zellextrakten detektiert werden. Im Stamm ohne *ptsN*-3xFLAG-Allel ist kein Signal zu erkennen. PhoR-3xFLAG konnte in dem Zellextrakt der Transformante detektiert werden, in der PhoR-3xFLAG überproduziert wurde. Ebenso konnte PhoR-3xFLAG mit Strep-PhoB koaufgereinigt werden (Spur 7 im oberen Blot). PhoR-3xFLAG war in der Elutionsfraktion der Strep-PhoB Aufreinigung aus der $\Delta phoBR$ *phoR*-3xFLAG Transformante detektierbar. Gleichzeitig war auch EIIA^{Ntr} in dieser Fraktion detektierbar (Spur 6 und 7 unterer Blot in Abbildung 4.2.20). Die Signale waren sehr schwach zu erkennen. In der Elutionsfraktion der Strep-PhoB Aufreinigung aus der $\Delta phoBR$ Mutante schien kein EIIA^{Ntr} aufzutreten. In der Aufreinigung aus dem Wildtyp konnte eine Bande detektiert werden. Ist zusätzlich im Stamm das Protein PhoR vorhanden, konnte auch für die Aufreinigung aus der $\Delta phoBR$ Mutante EIIA^{Ntr} detektiert werden. Dies bedeutet wiederum, dass PhoB und EIIA^{Ntr} nur koaufgereinigt werden können, wenn auch PhoR in der Zelle vorhanden ist. Dies bestätigt die Ergebnisse der vorher durchgeführten Experimente, in denen auch gezeigt werden

konnte, dass PhoB nur über PhoR mit EIIA^{Ntr} interagiert (siehe Abbildung 4.2.14 und 4.2.15).

4.2.4.3. Analyse der Interaktion von EIIA^{Ntr} mit PhoR und PhoB *in vitro*

Um die direkte Interaktion zwischen EIIA^{Ntr} und PhoR zu beweisen und eine Beteiligung anderer Komponenten, die *in vivo* vorkommen, auszuschließen, wurden *in vitro* Interaktionsstudien (Far Western) durchgeführt. Hierzu wurden PhoR, PhoB, EIIA^{Ntr}, EIIA^{Ntr}H73A und EIIA^{Glc} als aufgereinigte Proteine benötigt (Aufreinigungen der Proteine siehe Abb. 6.21 und 6.22). Nach der Aufreinigung der Proteine wurden mit diesen Far Western-Analysen durchgeführt, um diese Interaktionen *in vitro* zu testen. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen PhoR-His, PhoB-His, sowie BSA (Bovines Serum Albumin) und Dialysepuffer als Negativkontrolle und das jeweils zu untersuchende Strep-Protein als Positivkontrolle auf eine Nylonmembran getropft. Nach dem Trocknen und Blocken der Membran, wurde entweder Strep-EIIA^{Glc}, Strep-EIIA^{Ntr} oder Strep-EIIA^{Ntr}H73A auf die Membran gegeben. So konnten die in Lösung befindlichen Proteine an die immobilisierten Proteine binden. Schließlich wurden die an die His-Tag Proteine gebundenen Strep-Tag Proteine und die Positivkontrolle (aufgetropftes Strep-Protein) mit einem Strep Antiserum detektiert. Auch der umgekehrte Ansatz wurde durchgeführt und Strep-EIIA^{Glc}, Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A auf die Membran getropft und mit PhoR-His inkubiert, hier wurde His-Tag Antiserum für die Detektion verwendet. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Interaktionsanalysen sind in Abbildung 4.2.21 dargestellt.

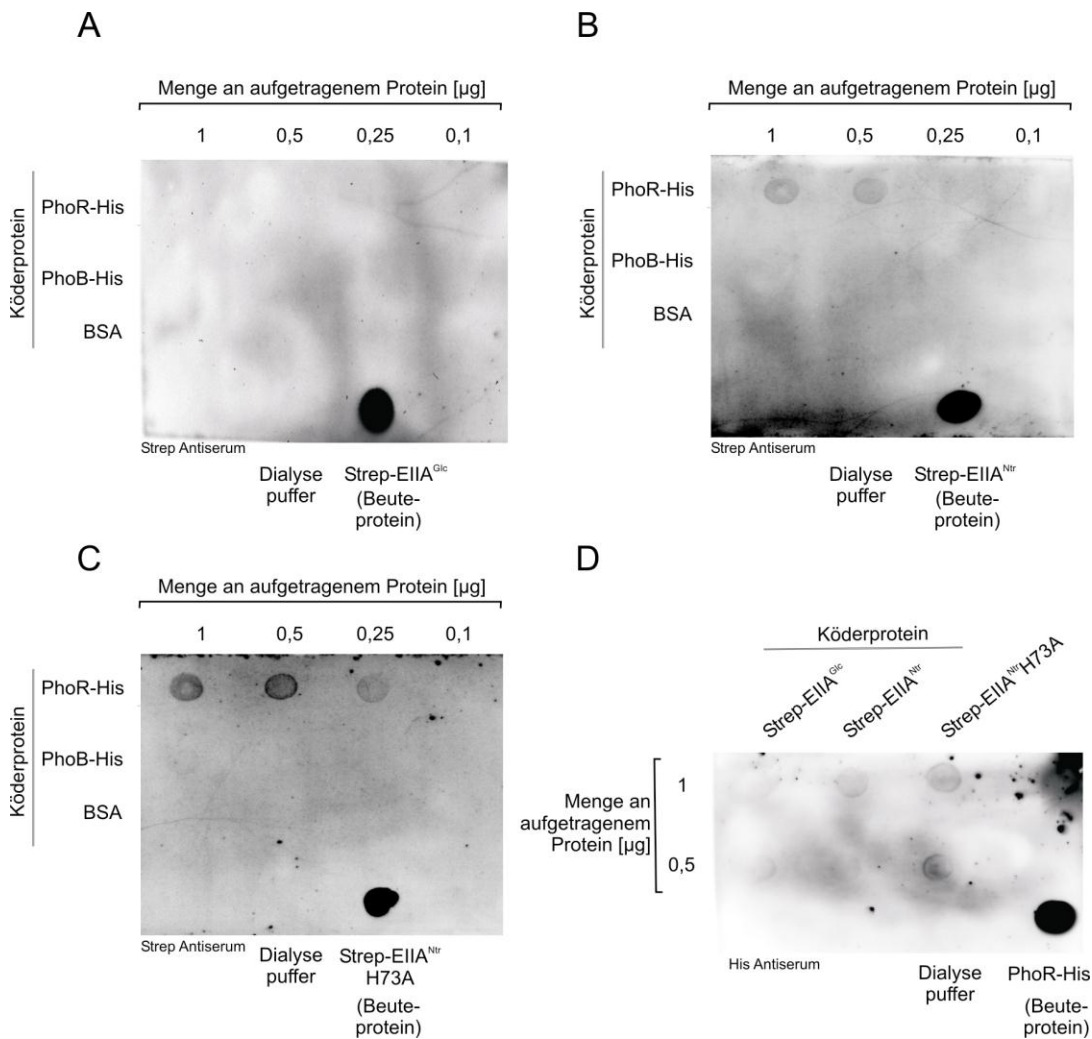


Abbildung 4.2.21: Far Western zum Nachweis der PhoR-EIIA^{Ntr} Interaktion *in vitro*. Definierte Mengen der aufgereinigten His-Tag Proteine PhoR und PhoB, sowie BSA und Dialysepuffer als Kontrolle wurden auf eine Nylonmembran getropft. Nach dem Blocken der Membran wurde (A) Strep-EIIA^{Glc}, (B) Strep-EIIA^{Ntr} und (C) Strep-EIIA^{Ntr}H73A mit der Membran inkubiert. Gebundenes Strep-Protein wurde mit dem Strep Antiserum detektiert. (D) Je 1 μg und 0,5 μg Strep-EIIA^{Glc}, Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A wurden auf die Nylonmembran getropft. Nach dem Blocken der Membran wurde diese mit PhoR-His inkubiert. Gebundenes Protein konnte mit dem His-Tag Antikörper nachgewiesen werden. Als Kontrollen dienten jeweils 0,2 μg des Proteins, welches in Lösung über den Far Western Blot gegeben wurde.

Keines der Strep-Proteine band an den getropften Dialysepuffer oder an das BSA. Auch konnte keine Bindung an den Response Regulator PhoB beobachtet werden (Abbildung 4.2.21 A, B und C). Nur für die getropften Spots von PhoR konnten Signale detektiert werden. Dies bestätigt, dass EIIA^{Ntr} mit PhoR spezifisch interagiert, EIIA^{Glc} schien nicht mit PhoR zu interagieren. Hier waren keine Signale vorhanden (Abbildung A). Demgegenüber konnte eine Interaktion von PhoR mit EIIA^{Ntr} als auch mit EIIA^{Ntr}H73A detektiert werden (Abbildung B und C). Hierbei war die Stärke der Signale von der

aufgetragenen Proteinmenge abhängig. Weiterhin schien es so, als wenn die Interaktion von EIIA^{Ntr}H73A mit PhoR stärker war, als die Interaktion mit dem Wildtypprotein. Während bei einer PhoR-Menge von 0,25 µg für EIIA^{Ntr}H73A noch deutlich ein Signal vorhanden war, konnte dieses bei der Interaktion von EIIA^{Ntr} mit PhoR nicht mehr detektiert werden. In Abbildung 4.2.21 D ist das Ergebnis des reversen Experiments gezeigt. Hier war eindeutig zu erkennen, dass die Interaktion zwischen PhoR und EIIA^{Ntr}H73A am stärksten ist. Hier waren die größten Signalintensitäten zu erkennen. Für EIIA^{Ntr} waren die Signale sehr viel schwächer. Für EIIA^{Glc} waren keine Signale zu detektieren. Die Ergebnisse dieses Experiments korrelieren mit den Beobachtungen der anderen Interaktionsanalysen. Während EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A interagieren spezifische mit PhoR.

4.2.4.4. Einfluss von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A auf die PhoR-PhoB Phosphorylierungskaskade *in vitro*

In den vorherigen Kapiteln konnte eine Interaktion von EIIA^{Ntr} mit PhoR mit unterschiedlichen Methoden *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden. Nun war es interessant zu untersuchen, wie diese Interaktion mechanistisch zur Regulation des Pho-Regulons durch EIIA^{Ntr} führt. Hier waren verschiedene Möglichkeiten denkbar. (1) EIIA^{Ntr} wirkt sich auf die Bildung des PhoR-PhoB-Komplexes aus. (2) EIIA^{Ntr} moduliert die Bindung des Komplexes an die DNA. (3) Eine sehr viel wahrscheinlichere Möglichkeit ist, dass sich EIIA^{Ntr} auf die Aktivität der Kinasefunktion oder der Phosphatasefunktion von PhoR gegenüber dem Response Regulator PhoB auswirkt. Dieser Mechanismus scheint naheliegend, da EIIA^{Ntr} durch die Stimulation der Kinaseaktivität der Sensorkinase KdpD zu einer vermehrten Phosphorylierung des Response Regulators KdpE und Expressionsaktivierung des *kdp*-Operons führt (Abschnitt 4.1.). Eine ähnliche Regulation wäre auch hier möglich. Um die potentielle Auswirkung von EIIA^{Ntr} auf die Autophosphorylierung von PhoR und auf den Phosphoryltransfer auf PhoB zu untersuchen, wurden PhoR-His und PhoB-His, wie in Abschnitt 4.3.3.9. beschrieben, aufgereinigt. Ebenso wurden EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A als His-Tag Proteine aufgereinigt (s. Abb. 6.23). Als Nächstes wurde analysiert, ob PhoR und PhoB *in vitro* aktiv sind und eine Phosphorylierungskaskade bilden, wie bereits beschrieben worden ist (Carmany *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*,

2005). In den Vorversuchen zeigte sich, dass die Methode nach (Carmany *et al.*, 2003) erfolgreicher war. Hier konnten PhoR und PhoB in ihrer phosphorylierten Form detektiert werden. Die Methode wurde diese für die folgenden Experimente benutzt. Nun sollte der Einfluss von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A auf die Autophosphorylierung von PhoR und die Signalweiterleitung auf PhoB analysiert werden. Hierzu wurden jeweils drei Parallelansätze benötigt. In allen wurde PhoR in Reaktionspuffer vorgelegt, anschließend erfolgte die Zugabe von [γ^{32} P]-ATP und unmodifiziertem ATP sowie zeitgleich von EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A, bzw. derselben Menge an Dialysepuffer zum Ansatz. Zu unterschiedlich Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Diese wurden mit Proteinauftragungspuffer gemischt und auf SDS-Gelen aufgetrennt (Abb. 4.2.22 oben). Für die Versuche der Phosphatübertragungsreaktion wurde PhoR mit [γ^{32} P]-ATP und unmodifiziertem ATP in Reaktionspuffer für 10 min inkubiert. Anschließend wurde in alle Ansätze PhoB und zeitgleich EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A, bzw. dieselbe Menge an Dialysepuffer gegeben. Auch hier wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen (Abb. 4.2.22 unten). Nach dem Lauf der SDS-Gele wurden diese getrocknet und anschließend mit dem Phospho-Imager ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.22 dargestellt.

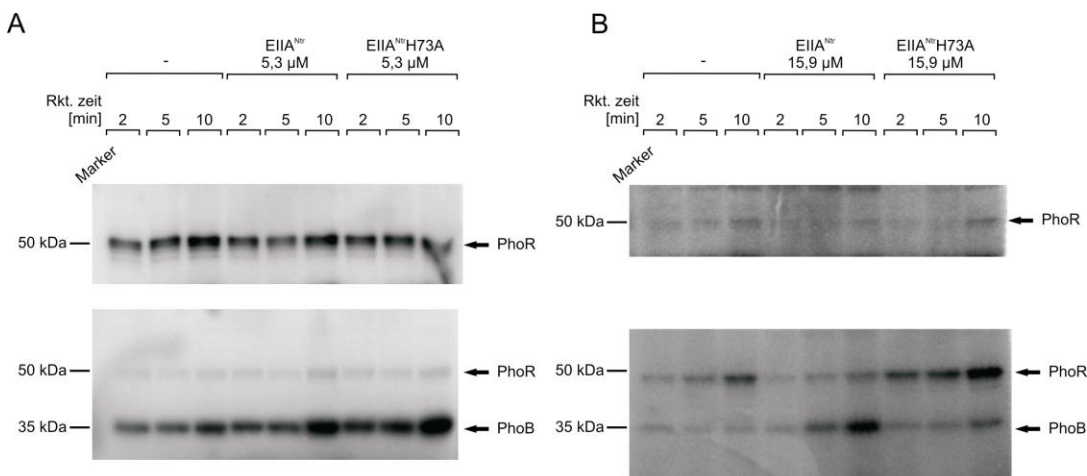


Abbildung 4.2.22: Einfluss von EIIA^{Ntr} auf die *in vitro* Phosphorylierung von PhoR und den Phosphotransfer auf PhoB. Die Proteine wurden ohne oder mit EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A inkubiert und die Autophosphorylierung von PhoR (jeweils oben in A und B) und die Übertragung des Phosphats auf PhoB (jeweils unten in A und B) untersucht. (A) Zugabe von 5,3 µM EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A, (B) Zugabe von 15,9 µM EIIA^{Ntr} oder EIIA^{Ntr}H73A. Die Proben wurden auf 12,5% SDS-Gelen aufgetrennt, die Gele getrocknet und die phosphorylierten Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

In dem Experiment wurden verschiedene Situationen untersucht. Es wurde die Autophosphorylierung von PhoR analysiert (Abbildung 4.2.22 oben). Hier wurde die Autophosphorylierung ohne, mit Zugabe von 5,3 μM oder 15,9 μM EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A (Abbildung 4.2.22 A und B oben). In allen Untersuchungen nahm die Phosphorylierung von PhoR zeitabhängig zu. Die Zugabe von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A zu den Reaktionsansätzen hatte scheinbar keinen signifikanten Einfluss auf die Autophosphorylierung des Proteins. Weder geringe Mengen, noch größere Mengen an EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A zeigten Auswirkungen (Abbildung 4.2.22 A und B oben). Im zweiten Teil des Experiments wurde die Phosphatübertragung von PhoR auf PhoB untersucht (Abbildung 4.2.22 unten). Hier wurde die Phosphatübertragung ohne, mit Zugabe von 5,3 μM oder 15,9 μM EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A (Abbildung 4.2.22 A und B unten). Für PhoB nahm die Phosphorylierung im Laufe der Zeit zu. Das Gleiche war für PhoR der Fall. Es ist wahrscheinlich ausreichend ATP vorhanden, damit sich das Protein nach der Übertragung des Phosphats auf PhoB wieder autophosphorylieren kann. Weiterhin war zu sehen, dass die Anwesenheit von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A einen Einfluss auf den Phosphotransfer hat. In Abbildung A ist zu erkennen, dass sowohl die Zugabe von EIIA^{Ntr} als auch von EIIA^{Ntr}H73A zu einer stärkeren Phosphorylierung von PhoB führte. Waren allerdings größere Mengen an EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A (Abbildung B) vorhanden, war nur für den Ansatz mit EIIA^{Ntr} eine Zunahme der PhoB Phosphorylierung zu erkennen. Diese Zunahme war stärker verglichen zu geringen Mengen an EIIA^{Ntr} im Reaktionsansatz (Abbildung A). Bei der Zugabe großer Mengen an EIIA^{Ntr}H73A war die Phosphorylierung von PhoB ebenfalls stärker als im Ansatz ohne Protein, aber schwächer als mit dem EIIA^{Ntr} Wildtypprotein. Auch war zu beobachten, dass die Autophosphorylierung von PhoR in diesem Fall stark zunahm, obwohl PhoB als Phosphatgruppenakzeptor vorhanden ist. EIIA^{Ntr} scheint keine Auswirkung auf die Autophosphorylierung von PhoR zu haben. EIIA^{Ntr} scheint allerdings den Phosphotransfer auf den Response Regulator PhoB zu stimulieren. So wird in Gegenwart von EIIA^{Ntr} mehr PhoB phosphoryliert. EIIA^{Ntr}H73A hat in geringen Mengen einen ähnlichen Effekt wie das Wildtypprotein. Bei größeren Mengen an EIIA^{Ntr}H73A wird der Phosphotransfer auf PhoB inhibiert.

4.2.5. Auswirkungen einer *ptsN* Deletion auf die Anpassung an Phosphatmangel

Werden der Wildtyp und die $\Delta ptsN$ Mutante einem plötzlichen Kaliummangel ausgesetzt, so ist die Anpassung der Expression des *kdp*-Operons in der $\Delta ptsN$ Mutante an diese Mangelbedingungen langsamer als im Wildtyp (s. Abb. 4.1.23). Um zu untersuchen ob $EIIA^{Ntr}$ auch für die Anpassung der Zellen an einen plötzlichen Phosphatmangel wichtig ist, wurden der Wildtyp und eine isogene $\Delta ptsN$ Mutante in Minimalmedium mit ausreichender Phosphatversorgung (HiPi) bis in die exponentielle Wachstumsphase angezogen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in LoPi-Medium (Phosphatmangelbedingungen) überimpft. Die optische Dichte der Kulturen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt und Proben für einen β -Galaktosidase-Aktivitätstest entnommen. Das Wachstumsverhalten und die Expression der *ugpB'*-*lacZ*-Fusion wurde untersucht. Die Resultate für die Wachstumsexperimente und die β -Galaktosidase-Messungen sind in Abbildung 4.2.23 gezeigt.

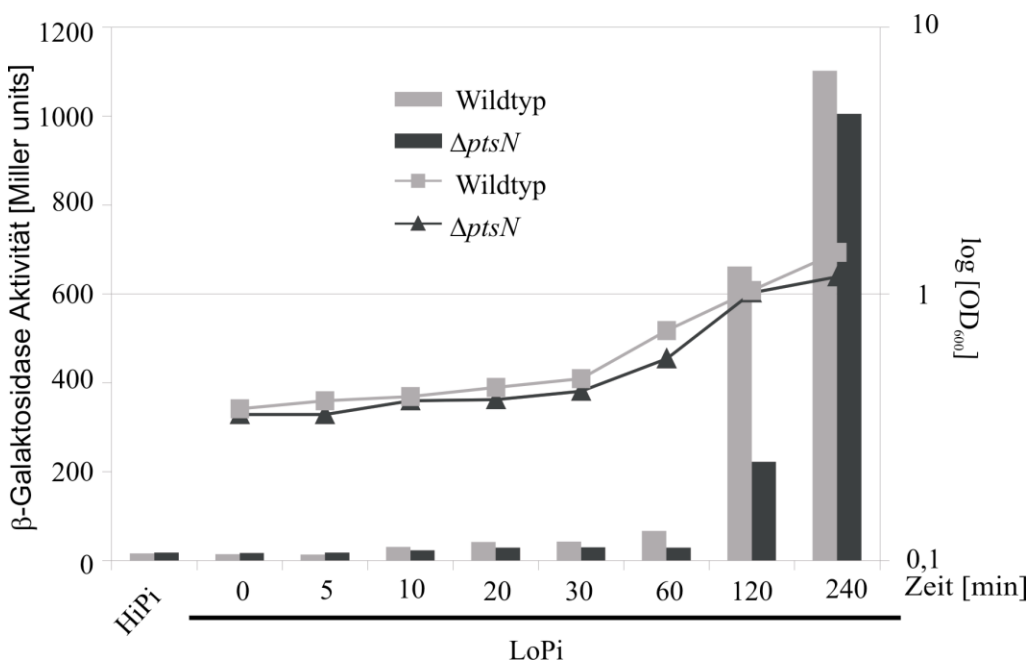


Abbildung 4.2.23: $EIIA^{Ntr}$ wirkt sich auf die Anpassung an Phosphatmangel aus. Die Stämme mit den chromosomalen *ugpB'*-*lacZ*-Fusionen wurden in Minimalmedium mit ausreichender Phosphatversorgung (HiPi) bis in die exponentielle Wachstumsphase (OD_{600} 0,4) angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in LoPi-Medium überimpft. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der OD_{600} und für die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität entnommen. Vergleich des Wachstums des Wildtyps (Z440) mit dem der $\Delta ptsN$ Mutante (Z437) und Bestimmung der LacZ-Aktivität der chromosomalen *ugpB'*-*lacZ*-Fusion.

Das Wachstumsverhalten des Wildtyps und der $\Delta ptsN$ Mutante in Minimalmedium mit limitierender Phosphatversorgung unterschied sich. Die $\Delta ptsN$ Mutante wuchs etwas langsamer. Nach der Induktion von Phosphatmangel begannen beide Stämme etwa nach 30 Minuten wieder mit dem Wachstum. Die Expression der *ugpB'-lacZ*-Fusion war bei in HiPi gezogenen Kulturen sehr gering (Wildtyp 16 Miller units und $\Delta ptsN$ Mutante 18 Miller units). Bei Phosphatmangel veränderte sich die Expression nach 10 Minuten und stieg in beiden Stämmen an. Im Wildtyp war die Induktion der Expression zu den Messzeitpunkten 10, 20 und 30 Minuten etwa 1,5-fach stärker als in der $\Delta ptsN$ Mutante. Nach 60 Minuten stieg sie auf das 2,3-fache, nach 120 Minuten auf das 3-fache der Expression in der $\Delta ptsN$ Mutante an. Erst nach zwei Stunden reagierte die $\Delta ptsN$ Mutante verzögert mit einem starken Anstieg der Expression auf den Phosphatmangel. Die Anwesenheit von EIIA^{Ntr} ist also für die rasche Induktion der Expression der Gene des Pho-Regulons bei plötzlichem Phosphatmangel wichtig. Ein Verlust dieser Regulation führt zu einem leichten Wachstumsdefekt.

4.3. Identifikation weiterer Interaktionspartner von EIIA^{Ntr}

Die zwei Sensorkinase KdpD und PhoR konnten als Interaktionspartner von EIIA^{Ntr} gefunden werden (Abschnitt 4.1.4. und 4.2.4.2.2.). Es wäre möglich, dass EIIA^{Ntr} mit weiteren Proteinen interagiert. Um diese möglichen Interaktionspartner zu finden, wurden Ligand-fishing und SPINE Experimente durchgeführt. In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde eine mögliche Interaktion von EIIA^{Ntr} mit anderen Sensorkinasen untersucht.

4.3.1. Ligand-fishing Experimente mit EIIA^{Ntr} als Köderprotein zur Identifizierung unbekannter Interaktionspartner

In den Ligand-fishing Experimenten konnten verschiedenen Proteine als mögliche Interaktionspartner von EIIA^{Ntr} identifiziert werden. Hierzu gehören GlnS, die Glukosamine-6-Phosphate Synthase und verschiedene metabolische Enzyme. Eine mögliche Interaktion mit den meisten dieser Proteine wurde in dieser Arbeit nicht

weiter verfolgt. Die mögliche Interaktion mit GlnS wurde allerdings weiter untersucht. Es wurden verschiedene Techniken zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen durchgeführt. In den verschiedenen Interaktionsstudien konnte kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden. Das Vorhandensein einer Interaktion konnte nicht eindeutig geklärt werden (Daten nicht gezeigt).

4.3.2. EIIA^{Ntr} interagiert mit weiteren Sensorkinasen in *E. coli*

EIIA^{Ntr} interagiert mit den Sensorkinasen KdpD und PhoR in *E. coli*. Durch die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit KdpD wird die Kinase Aktivität des Proteins stimuliert (Lüttmann *et al.*, 2009 und diese Arbeit). Die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit PhoR stimuliert die Phosphorylierung des Response Regulators PhoB durch die Sensorkinase (diese Arbeit). In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium wird die Aktivität des Response Regulators SsrB durch die direkte Interaktion mit EIIA^{Ntr} reprimiert (Choi *et al.*, 2010). Die Regulation dieser drei Proteine verschiedener Zwei-Komponenten Systeme (ZKS) ließ vermuten, dass EIIA^{Ntr} möglicherweise noch weitere ZKS reguliert. In den folgenden Kapiteln wurde daher die mögliche Interaktion von EIIA^{Ntr} mit Sensorkinasen verschiedener ZKS und der Einfluss von EIIA^{Ntr} auf die von diesen ZKS regulierten Zielgenen untersucht. Von den vielen Zwei-Komponenten Systemen in *E. coli* wurden zwei ausgewählt, die durch Mangel an anorganischen Verbindungen induziert werden (NtrB/NtrC: Stickstoffmangel; PhoQ/PhoP: Magnesiummangel). Weiterhin wurden zwei Systeme ausgewählt die durch Zellhüllstress induziert werden (CpxA/CpxR und BaeS/BaeR), da bereits bekannt war, dass EIIA^{Ntr} die Letalität einer *rpoE* Mutante (kodiert für den Sigma-Faktor für Zellhüllstress) supprimiert (Hayden and Ades, 2008).

4.3.2.1. EIIA^{Ntr} interagiert mit der Sensorkinase NtrB und reguliert die Expression von Genen des Ntr-Regulons

Das NtrB/NtrC Zwei-Komponenten System reguliert die Expression von etwa 2% aller Gene in *E. coli*. Darunter fallen viele Gene, die für die Stickstoffassimilation wichtig sind. Die Expression der Gene von NtrB (*glnL*) und NtrC (*glnG*) ist autoreguliert. Bei Stickstoffmangel wird das gesamte Ntr-Regulon, auch die Expression des *glnALG*-

Operons induziert (Magasanik, 1993). Um zu untersuchen, ob $EIIA^{Ntr}$ sich auf das NtrB/NtrC Zwei-Komponenten System auswirkt, sollte zunächst die Menge von NtrB in Abhängigkeit von $EIIA^{Ntr}$ bestimmt werden. Das authentische Gen der Sensorkinase (*glnL*) wurde mit einer Sequenz fusioniert, welche für das 3xFLAG-Epitop kodiert. Dieses *glnL*-3xFLAG-Allel wurde in das Genom des Wildtyp und der $\Delta ptsN$ Mutante über Elektroporation eingebacht (Durchführung siehe Abschnitt 3.2.4.12.4.). Die neu konstruierten Stämme und die mit plasmidständigem P_{Ara} -*ptsN* komplementierte $\Delta ptsN$ Mutante wurden in Minimalmedium mit Glukose und entweder der bevorzugten Stickstoffquelle (Ammonium) oder der sekundären Stickstoffquelle (Glutamin) angezogen. Es wurde Glutamin als N-Quelle verwendet, da das Ntr-Regulon bei Wachstum der Zellen mit Glutamin induziert ist. In Medium mit Ammonium als Stickstoffquelle wird das Ntr-Regulon hingegen nicht induziert (Magasanik, 1993). Nach der Ernte der Zellen wurden die Gesamtzellextrakte durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde NtrB-3xFLAG mit FLAG Antiserum im Western Blot detektiert (Abbildung 4.3.1).

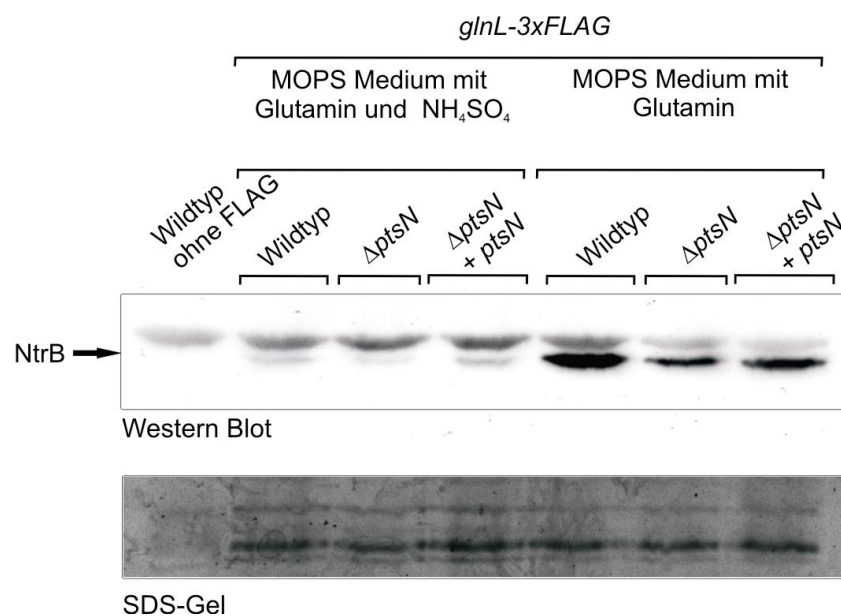


Abbildung 4.3.1: $EIIA^{Ntr}$ reguliert die zellulären Mengen an NtrB-3xFLAG. Der Wildtyp (S4197), der Stamm mit chromosomalem *glnL*-3xFLAG-Allel (Z623) und die isogene $\Delta ptsN$ Mutante (Z625), sowie die mit P_{Ara} -*ptsN* (pBGG86) komplementierte Mutante wurden in MOPS-Medium mit Glutamin (14 mM) und entweder mit oder ohne Ammoniumsulfat (14 mM) angezogen. Die Expression von *ptsN* wurde in der Transformante mit Arabinose induziert. Die Gesamtzellextrakte wurden auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente ein mit Coomassie blue angefärbtes SDS-Gel. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von mehreren unabhängigen Blots.

Es konnte beobachtet werden, dass im Wildtypstamm bei guter Stickstoffversorgung der Zellen (Anzucht mit Ammonium) NtrB-3xFLAG nur in geringen Mengen in der Zelle vorliegt. Beim Wachstum mit einer sekundären N-Quelle wie Glutamin wurde die Expression von *glnL* wie erwartet induziert und es lag mehr Protein in den Zellen vor (vgl. Spur 5 mit 2 in Abbildung 4.3.1). Die An- und Abwesenheit von EIIA^{Ntr} wirkte sich auf die zellulären Mengen an NtrB-3xFLAG aus. Unter beiden Anzuchtbedingungen waren die detektierten Mengen des Proteins NtrB-3xFLAG im Wildtyp und der $\Delta ptsN$ Mutante unterschiedlich. In der Deletionsmutante war stets weniger NtrB-3xFLAG vorhanden (vgl. Spur 3 mit 2 und 6 mit 5). Wurde die $\Delta ptsN$ Deletion durch die Überexpression von *ptsN* komplementiert, war unter beiden Anzuchtbedingungen wieder mehr NtrB-3xFLAG als in der $\Delta ptsN$ Mutante detektierbar (vgl. Spur 4 mit 3 und 7 mit 6). Die zelluläre Menge an NtrB-3xFLAG wird also durch EIIA^{Ntr} moduliert. Ein vorstellbarer Mechanismus für diese Modulation wäre, dass EIIA^{Ntr} über die Interaktion mit NtrB oder NtrC und die Modulation der Proteinaktivitäten auf die Expression von *glnL* wirkt. Um die mögliche Interaktion von EIIA^{Ntr} mit der Sensorkinase NtrB zu untersuchen, wurden Ligand-fishing Experimente durchgeführt. Für die Ligand-fishing Experimente wurde das Köderprotein (EIIA^{Ntr}, EIIA^{Ntr}H73A und EIIA^{Glc}) mit einem Affinitätstag (Strep-Tag) versehen und überproduziert. Anschließend wurde das Protein aufgereinigt (Durchführung Abschnitt und 3.2.6.1.5.). Mögliche Interaktionspartner sollten in den Eluaten der Aufreinigungen nachweisbar sein. Für die Ligand-fishing Experimente wurde, zusätzlich zum Strep-EIIA^{Ntr} und der Strep-EIIA^{Ntr}H73A-Variante, auch das Strep-EIIA^{Glc} bzw. nur der Strep-Tag als Kontrollen verwendet. Für die Versuche wurde die *ptsN* Deletionsmutante mit dem chromosomalen *glnL*-3xFLAG-Allel mit den Plasmiden transformiert, die für die verschiedenen Strep-Proteine kodierte. Die Transformanten wurden in MOPS-Medium mit Glukose als C-Quelle und entweder mit Glutamin oder Ammonium als N-Quelle angezogen. Durch die Zugabe von IPTG wurde die Synthese der Strep-Fusionsproteine induziert. Die Zellen wurden geerntet und aufgeschlossen. Die Strep-Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. In den Elutionsfraktionen 2 befand sich die größte Menge an aufgereinigten Strep-Proteinen (Daten nicht gezeigt). Diese Elutionsfraktionen wurden für die Analysen eingesetzt. Die Gesamtzellextrakte der Transformanten und die Elutionsfraktionen 2 der Aufreinigungen wurden durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

aufgetrennt. NtrB-3xFLAG und die Strep-Fusionsproteine wurden im Western Blot mit Antikörpern detektiert, die gegen diese Epitope gerichtet waren (Abbildung 4.3.2).

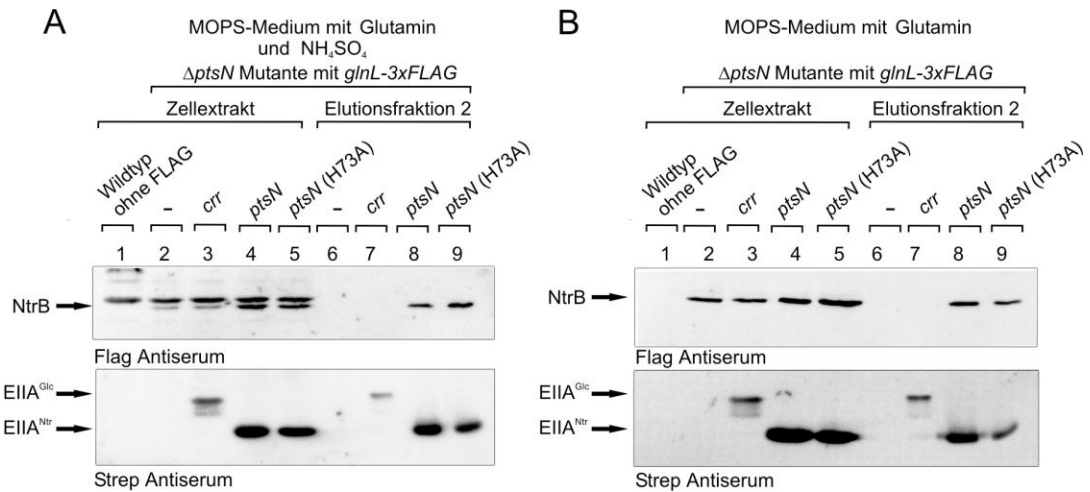


Abbildung 4.3.4: NtrB koeluiert mit Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A. Die $\Delta ptsN$ Mutante mit dem chromosomalen *glnL*-3xFLAG-Allel (Z625) enthielt entweder den Leervektor (pBGG237), oder Plasmide, die für *strep-crr*, *strep-ptsN* oder *strep-ptsN* (H73A) kodierten (pBGG230, pBGG217 und pBGG217-H73A). Die Transformanten wurden in MOPS-Medium mit (A) und ohne (B) Ammoniumsulfat angezogen. Die Gesamtzellextrakte der Kulturen und die Elutionsfraktionen 2 der aufgereinigten Strep-Proteine wurden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. Es wurden jeweils 13 µl der Zellextrakte und 10 µl der Elutionsfraktion 2 geladen. Die Detektion von NtrB-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum, Strep-EIIA^{Glc}, Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A wurden mit Strep Antiserum detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von mehreren unabhängigen Experimenten.

NtrB-3xFLAG war in den Zellextrakten aller Transformanten zu detektieren. Im Kontrollstamm, der kein *glnL*-3xFLAG-Allel enthielt, waren keine Banden detektierbar (vgl. jeweils Spuren 2-5 mit Spur 1 in Abbildung 4.3.2 A und B). In den Elutionsfraktionen der Strep-Fusionsproteine konnte nur im Fall von Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A ein Signal für NtrB detektiert werden. In den Elutionsfraktionen der Kontrollen (Strep-Tag und Strep-EIIA^{Glc}) war NtrB-3xFLAG hingegen nicht detektierbar (vgl. jeweils Spuren 6 und 7 mit Spuren 8 und 9 in Abbildung 4.3.2 A und B). Weiterhin war zu beobachten, dass NtrB-3xFLAG sowohl bei guter Stickstoffversorgung der Zellen (Abbildung 4.3.2 A), als auch bei Stickstoffmangel (Abbildung 4.3.2 B) mit Strep-EIIA^{Ntr} koeluiert werden konnte. NtrB-3xFLAG scheint spezifisch mit Strep-EIIA^{Ntr}, aber auch mit der Strep-EIIA^{Ntr}H73A-Variante zu interagieren. Da die Interaktion sowohl bei guter Stickstoffversorgung, als auch bei

Stickstoffmangel zu erkennen ist, scheint die Versorgung der Zelle mit Stickstoff keinen Einfluss auf die Interaktion zu haben. Da Strep-EIIA^{Ntr} mit NtrB-3xFLAG interagiert, wäre es vorstellbar, dass durch die Interaktion die Aktivität der Proteine des ZKS verändert wird. Dies sollte sich auf die Expression von NtrB/NtrC-abhängigen Genen auswirken. Die Expression von *glnA* ist direkt vom NtrB/NtrC ZKS reguliert (Magasanik, 1993). Es sollte nun untersucht werden, ob EIIA^{Ntr} einen Einfluss auf die Expression von *glnA* hat. Hierzu wurde ein Plasmid konstruiert, welches für eine transkriptionelle *glnA'*-*lacZ*-Fusion kodiert. Dieses Plasmid wurde in den Wildtyp, die $\Delta ptsN$ Mutante und die mit dem Wildtyp *ptsN*-Gen oder den *ptsNH73A*- oder *ptsNH73E*-Allelen komplementierte Mutante eingebracht. Die Zellen wurden in MOPS-Medium mit Glutamin oder Ammonium als N-Quelle angezogen. Die Expression der verschiedenen *ptsN*-Allele wurde in den Transformanten mit Arabinose induziert. Nach der Ernte der Zellen wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.3.3).

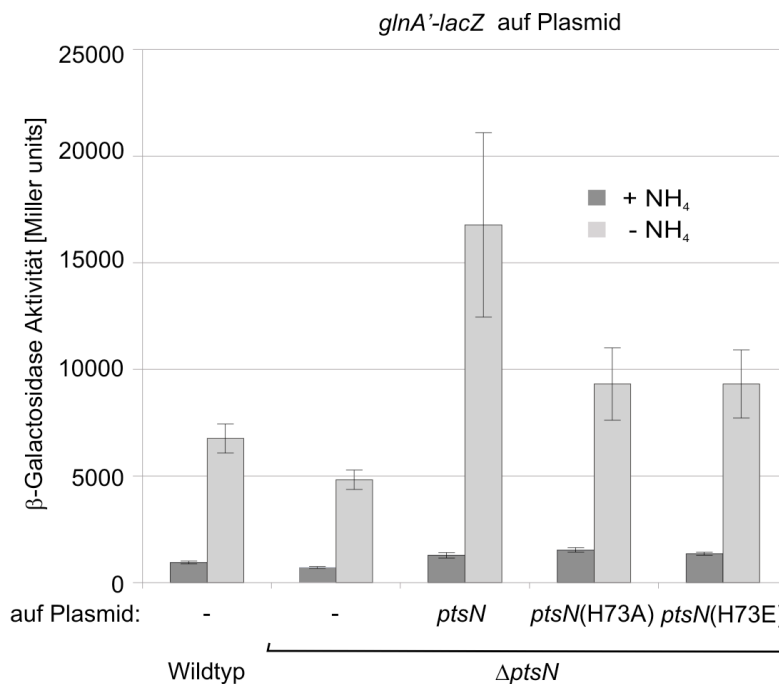


Abbildung 4.3.3: Die Expression der *glnA'*-*lacZ*-Fusion wird durch EIIA^{Ntr} stimuliert. Die Transformanten mit der plasmidisch lokalisierten Reportergenfusionen (pDL43) wurden in MOPS-Medium mit Glutamin (-NH₄) oder Ammonium (+NH₄) angezogen. Die Zellen wurden geerntet und LacZ-Aktivitätsmessungen durchgeführt. Die Aktivität der *glnA'*-*lacZ*-Fusion im Wildtyp (S4197); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z406), sowie der mit den Wildtyp *ptsN* (pBGG86); *ptsN*(H73A)- (pBGG93) und *ptsN*(H73E)-Allel (pBGG334) komplementierten $\Delta ptsN$ Mutante sind gezeigt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind

Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die *glnA'-lacZ*-Fusion wurde bei guter N-Versorgung gering exprimiert. Bei Anzucht in Glutamin erhöhte sich die β -Galaktosidase-Aktivität (vgl. beide Säulen des Wildtyps miteinander Abbildung 4.3.3). Die *glnA'-lacZ* Expression ist wie erwartet durch Stickstoffmangel induzierbar. Die Deletion von *ptsN* bewirkte unter beiden Anzuchtbedingungen eine geringfügige Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität (vgl. jeweils helle Säule 1 mit 2 und dunkle Säule 1 mit 2). Wurden die verschiedenen *ptsN*-Allele überexprimiert, stiegen die gemessenen Aktivitäten im Vergleich zur *ptsN* Deletionsmutante an (vgl. jeweils helle Säulen 3-5 mit 2 und dunkle Säulen 3-5 mit 2). Die Aktivitäten waren auch höher als im Wildtyp (vgl. jeweils helle Säulen 3-5 mit 1 und dunkle Säulen 3-5 mit 1). Dies konnte unter beiden Anzuchtbedingungen beobachtet werden. Die Expression der *glnA'-lacZ*-Fusion war bei der Überproduktion der verschiedenen EIIA^{Ntr}-Varianten ähnlich. Die *glnA'-lacZ*-Expression wird durch den Mangel an Stickstoff induziert und EIIA^{Ntr} wirkt stimulierend auf die Expression. Die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} spielte bei der Aktivierung der *glnA'-lacZ*-Expression scheinbar keine so starke Rolle. Die Überexpression der beiden mutanten *ptsN*-Allele resultiert in ähnlichen β -Galaktosidase-Aktivitäten, obwohl diese EIIA^{Ntr}-Varianten einmal die unphosphorylierte und einmal die phosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} simulieren. Der Einfluss des Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} sollte durch die Analyse der Expression der *glnA'-lacZ*-Fusion in den $\Delta ptsP$ und $\Delta ptsO$ Mutanten weiter untersucht werden. Durch die Deletion der Gene für EI^{Ntr} und NPr sollte mehr von der unphosphorylierten Form von EIIA^{Ntr} in der Zelle vorliegen. Die Deletionsstämme wurden mit einem Plasmid, welches für die *glnA'-lacZ*-Fusion kodiert, transformiert. Die Transformanten wurden zusammen mit den Transformanten des Wildtyps und der $\Delta ptsN$ Mutante in MOPS-Medium mit Glutamin bzw. mit Ammonium angezogen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivitäten (Abbildung 4.3.4).

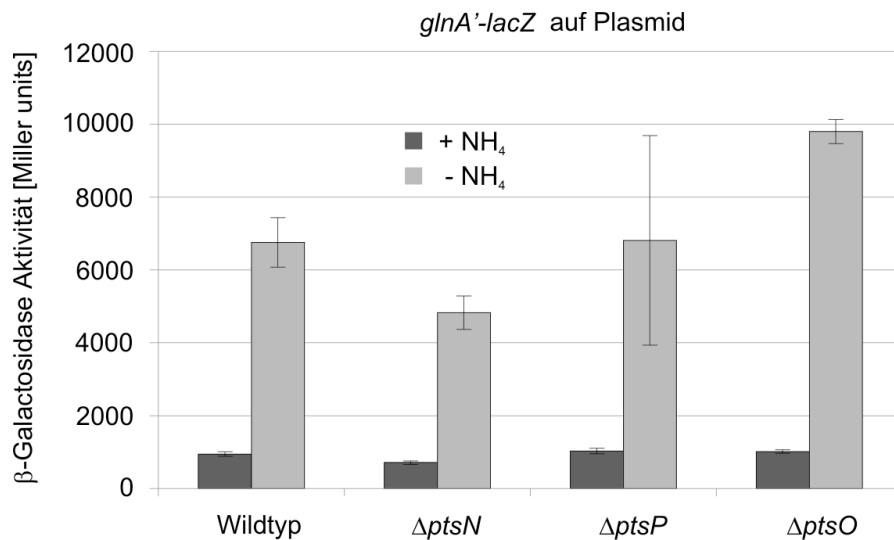


Abbildung 4.3.4: Die Expression der *glnA'*-*lacZ*-Fusion wird durch das PTS^{Ntr} beeinflusst. Die Transformanten mit der plasmidisch lokalisierten *glnA'*-*lacZ*-Reporterfusionen (pDL43) wurden in MOPS-Medium mit Glutamin (-NH₄) oder Ammonium (+NH₄) angezogen. Die Zellen wurden geerntet und eine LacZ-Aktivitätsmessung durchgeführt. Die Aktivität der *glnA'*-*lacZ*-Fusion im Wildtyp (S4197); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z406), der $\Delta ptsP$ (Z404) und $\Delta ptsO$ Mutante (Z507) wurde analysiert. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die Deletionen von *ptsP* und *ptsO* hatten bei guter Stickstoffversorgung keinen Einfluss auf die Expression der *glnA'*-*lacZ*-Fusion. Hier wurden ähnliche β -Galaktosidase-Aktivitäten wie im Wildtyp gemessen (vgl. dunkle Säulen 3 und 4 mit 1). Für die bei Stickstoffmangel angezogenen Kulturen zeigte sich, dass sich die Deletion von *ptsP* nicht auf die β -Galaktosidase-Aktivität auswirkt (vgl. helle Säule 3 mit 1 in Abbildung 4.3.4). In der $\Delta ptsO$ Mutante war die β -Galaktosidase-Aktivität höher als im Wildtyp (vgl. helle Säule 4 mit 1). Die Abwesenheit von NPr aktiviert also die *glnA'*-*lacZ*-Expression, während EI^{Ntr} keinen Einfluss auf die Expression zeigt. Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass das PTS^{Ntr} an der Regulation der Expression der *glnA'*-*lacZ*-Fusion beteiligt ist. Der Einfluss der Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} auf die *glnA'*-*lacZ*-Expression bedarf weiterer Untersuchungen.

4.3.2.2. EIIA^{Ntr} interagiert mit der Sensorkinase PhoQ und reguliert die Expression eines PhoQ/P-abhängigen Gens

Das PhoQ/PhoP Zwei-Komponenten System wird durch einen Mangel an Magnesium induziert. Unter diesen Stressbedingungen wird durch das ZKS der Magnesiumtransport, aber auch die RpoS Stressantwort aktiviert (Eguchi *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 1999; Minagawa *et al.*, 2003). Zur Analyse eines Einflusses von EIIA^{Ntr} auf dieses ZKS wurde ähnlich vorgegangen wie bei den Untersuchungen zum NtrB/NtrC ZKS (Abschnitt 4.3.2.1.). Vor dem Operon, in dem *phoQ* und *phoP* kodiert sind, befindet sich eine PhoP-Bindestelle, das System könnte also autoreguliert sein. Also sollte zunächst untersucht werden, ob sich EIIA^{Ntr} auf die Menge des Proteins PhoQ auswirkt. Hierzu wurde das authentische Gen der Sensorkinase (*phoQ*) mit einer Sequenz fusioniert, welche für das 3xFLAG-Epitop kodiert. Dieses *phoQ*-3xFLAG-Allel wurde in das Genom des Wildtyps und der $\Delta ptsN$ Mutante eingebracht. Diese Stämme sowie die mit P_{Ara} -*ptsN* komplementierte Mutante wurden in Minimalmedium mit Glukose und entweder ausreichender Magnesiumkonzentration (10 mM MgCl₂) oder limitierender Magnesiumkonzentration (10 μ M MgCl₂) angezogen. Nach der Ernte der Zellen wurden die Gesamtzellextrakte durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot analysiert. PhoQ-3xFLAG wurde mit FLAG Antiserum detektiert (Abbildung 4.3.5).

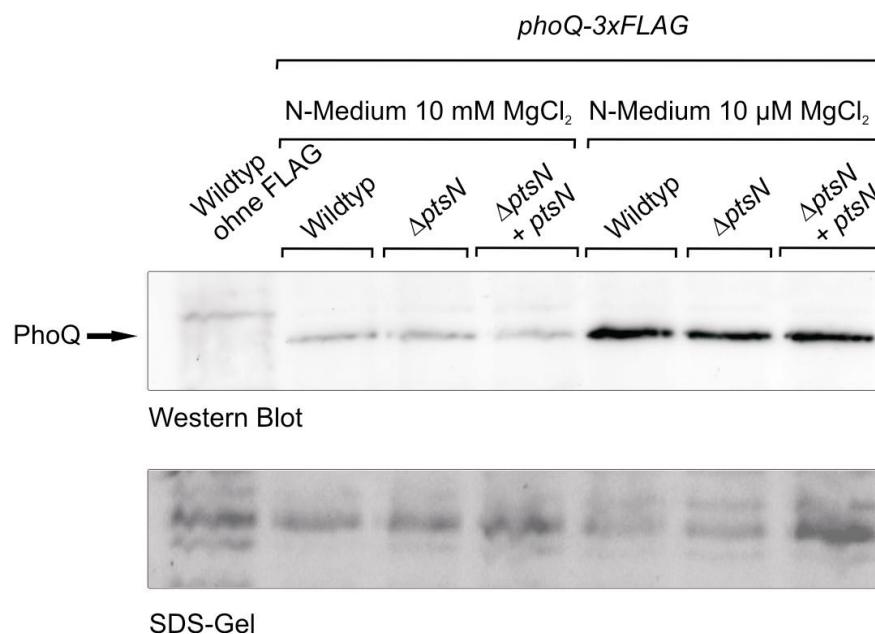


Abbildung 4.3.5: Die zellulären Mengen an PhoQ-3xFLAG werden nicht durch EIIA^{Ntr} beeinflusst. Der Wildtyp (S4197), der Stamm mit dem chromosomalen *phoQ*-3xFLAG-Allel (Z639), die isogene $\Delta ptsN$ Mutante (Z641), sowie die mit P_{Ara} -*ptsN* (pBGG86) komplementierte Mutante wurden in N-Medium mit Glukose und entweder mit 10 mM oder 10 μ M $MgCl_2$ angezogen. Die Expression von *ptsN* wurde in der Transformante mit Arabinose induziert. Die gewonnenen Zellextrakte wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente ein mit Coomassie blue angefärbtes SDS-Gel.

Es kann beobachtet werden, dass PhoQ-3xFLAG spezifisch detektiert werden konnte. In dem Stamm ohne *phoQ*-3xFLAG-Allel konnte das Protein nicht detektiert werden (vgl. Spur 1 mit Spuren 2-7 in Abbildung 4.3.5). Bei ausreichender Magnesiumversorgung der Zellen lag PhoQ-3xFLAG nur in geringen Mengen vor. Bei einem Wachstum unter Magnesiummangel wurde die Expression von *phoQ* induziert und es lag viel PhoQ-3xFLAG vor (vgl. Spuren 5-7 mit 2-4). Die An- und Abwesenheit von EIIA^{Ntr} wirkt sich nicht auf die zellulären Mengen an PhoQ-3xFLAG aus. Unter beiden Anzuchtbedingungen unterschieden sich die detektierten Mengen an PhoQ-3xFLAG im Wildtyp, der $\Delta ptsN$ Mutante und bei *ptsN* Überproduktion nicht (vgl. Spur 2 mit 3 und 4, sowie Spur 5 mit 6 und 7 in Abbildung 4.3.5). Zusammenfassend ist die Menge an PhoQ-3xFLAG von der Magnesiumversorgung der Zelle beeinflusst, EIIA^{Ntr} hat allerdings keinen Einfluss auf die Mengen an PhoQ-3xFLAG gezeigt. Trotzdem wurde die mögliche Interaktion von EIIA^{Ntr} mit der Sensorkinase PhoQ in einem Ligand-fishing Experiment untersucht. Hierzu wurden die oben erwähnten Plasmide, welche für die verschiedenen Strep-Fusionsproteine kodieren in die $\Delta ptsN$ Mutante mit chromosomalen *phoQ*-3xFLAG-Allel eingebracht. Die Transformanten wurden in LB-Medium angezogen. Durch die Zugabe von IPTG wurde die Synthese der Strep-Fusionsproteine induziert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und aufgeschlossen. Der Strep-Tag und die Fusionsproteine wurden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Zellextrakte der Transformanten und die Elutionsfraktionen 2 der Aufreinigungen wurden durch ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. PhoQ-3xFLAG und die Strep-Fusionsproteine wurden mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert (Abbildung 4.3.6).

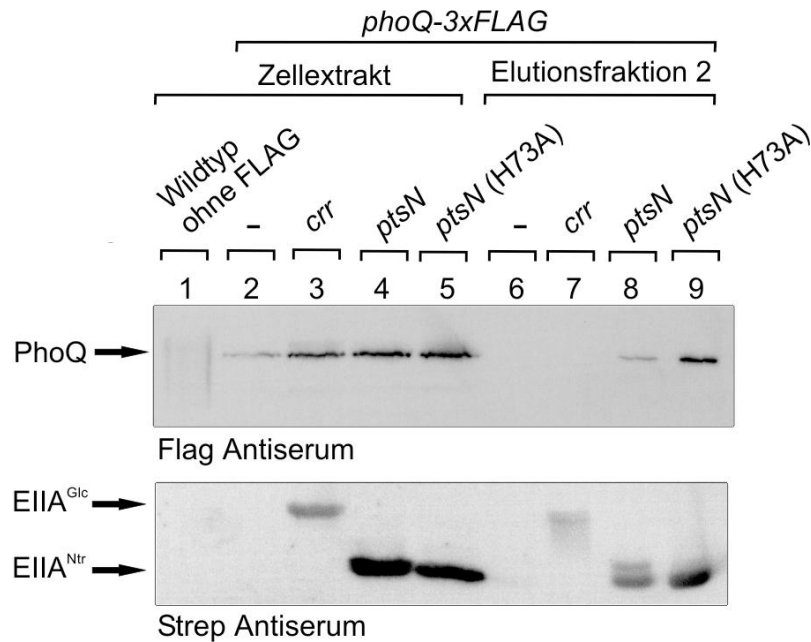


Abbildung 4.3.6: PhoQ koeluiert mit Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A. Die $\Delta ptsN$ Mutante mit dem chromosomalen *phoQ*-3xFLAG-Allel (Z641) enthielt entweder den Leervektor (pBGG237), oder Plasmide, die für *strep-crr*, *strep-ptsN* oder *strep-ptsN* (H73A) kodierte (pBGG230, pBGG217 und pBGG217-H73A). Die Transformanten wurden in LB-Medium angezogen. Die Gesamtzellextrakte der Kulturen und Elutionen der aufgereinigten Strep-Proteine wurden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. Es wurden jeweils 13 μ l der Zellextrakte und 10 μ l der Elutionsfraktion 2 geladen. Die Detektion von PhoQ-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum, Strep-EIIA^{Glc}, Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A wurden mit Strep Antiserum detektiert.

PhoQ-3xFLAG konnte in allen Zellextrakten der Transformanten detektiert werden. Im Kontrollstamm ohne *phoQ*-3xFLAG-Allel war keine Bande zu detektieren (vgl. Spuren 2-5 mit Spur 1 in Abbildung 4.3.6). In den Elutionsfraktionen der Strep-Fusionsproteine konnte nur im Fall von Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A ein Signal für PhoQ-3xFLAG beobachtet werden. In den Elutionsfraktionen des Strep-Tags und von Strep-EIIA^{Glc} war kein PhoQ-3xFLAG vorhanden (vgl. Spuren 6 und 7 mit 8 und 9). Weiterhin fiel auf, dass in der Elutionsfraktion der Strep-EIIA^{Ntr}H73A-Variante mehr PhoQ-3xFLAG detektiert werden konnte als bei der Aufreinigung von Strep-EIIA^{Ntr} (vgl. Spur 9 mit 8 in Abbildung 4.3.6). PhoQ scheint spezifisch mit Strep-EIIA^{Ntr} zu interagieren. PhoQ scheint vermehrt an der Strep-EIIA^{Ntr}H73A-Variante zu binden, die das unphosphorylierte Protein simuliert. Die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit PhoQ könnte, wie schon für KdpD und PhoR beobachtet, die Aktivität von PhoQ beeinflussen. Sollte sich EIIA^{Ntr} auf die Aktivität des Zwei-Komponenten Systems auswirken, so sollte die Expression der Zielgene beeinflusst sein. Dies wurde im Folgenden untersucht. Die

Expression des Gens *yneM* ist vom PhoQ/PhoP Zwei-Komponenten System reguliert (Moon and Gottesman, 2009). Für die Analysen wurde ein Plasmid konstruiert, welches für eine transkriptionelle *yneM'*-*lacZ*-Fusion kodiert. Dieses Plasmid wurde in den Wildtyp, die $\Delta ptsN$ Mutante und die mit *ptsN*, *ptsNH73A* oder *ptsNH73E* komplementierte Mutante eingebracht. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit Glukose und entweder mit hoher oder niedriger Magnesiumkonzentration angezogen. Die Expression der verschiedenen *ptsN*-Allele wurde in den Transformanten mit Arabinose induziert. Nach der Ernte der Zellen wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.3.7).

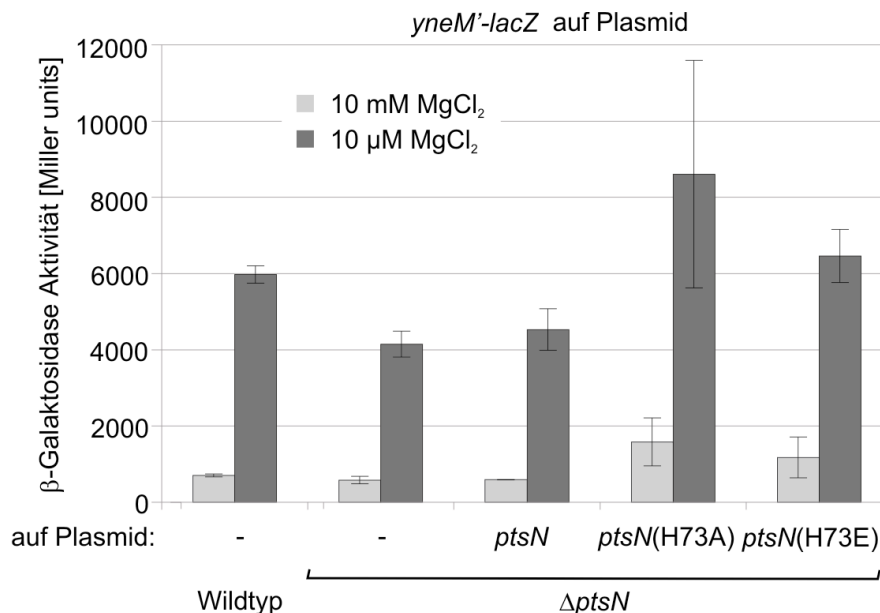


Abbildung 4.3.7: Die Expression der *yneM'*-*lacZ*-Fusion wird durch EIIA^{Ntr} beeinflusst. Die Transformanten mit der plasmidisch lokalisierten *yneM'*-*lacZ*-Reporterfusionen (pDL48) wurden in N-Medium mit 10 mM oder 10 µM MgCl₂ angezogen. Die Zellen wurden geerntet und LacZ-Aktivitätsmessungen durchgeführt. Die Aktivität der *yneM'*-*lacZ*-Fusion im Wildtyp (S4197); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z406), sowie der mit dem Wildtyp *ptsN* (pBGG86); oder *ptsN*(H73A)- (pBGG93) und *ptsN*(H73E)-Allel (pBGG334) komplementierten $\Delta ptsN$ Mutante wurden analysiert. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Bei einer ausreichenden Versorgung der Zellen mit Magnesium wurde die *yneM'*-*lacZ*-Fusion nur sehr gering exprimiert. Die Expression konnte durch einen Mangel an Magnesium induziert werden (vgl. jeweils dunkle mit hellen Säulen). Die gemessenen Aktivitäten für den Wildtyp, die $\Delta ptsN$ Mutante und die mit *ptsN* komplementierte Mutante waren bei ausreichender Magnesiumversorgung ähnlich. Die Überexpression

der mutanten *ptsN*-Allele (*ptsNH73A* und *ptsNH73E*) führte zu einem Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivitäten (vgl. helle Säulen 4 und 5 mit 1-3 in Abbildung 4.3.7). Die Überproduktion der EIIA^{Ntr}-Varianten zeigte also auch unter uninduzierten Bedingungen (bei guter Magnesiumversorgung) bereits einen Einfluss auf die *yneM'*-*lacZ* Expression. Bei der Anzucht unter Magnesiummangel bewirkte die Deletion von *ptsN* eine Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (vgl. dunkle Säule 2 mit 1). Die Überexpression von *ptsN* konnte den Effekt der Deletion von *ptsN* allerdings nicht komplementieren (vgl. dunkle Säule 3 mit 1 und 2 in Abbildung 4.3.7). Durch die Überproduktion der EIIA^{Ntr}H73A- und EIIA^{Ntr}H73E-Varianten stieg die Aktivität über bzw. auf das Niveau des Wildtyps an (vgl. dunkle Säule 4 und 5 mit 1 in Abbildung 4.3.7). Die Anwesenheit von EIIA^{Ntr} ist also für volle Expression des PhoQ/PhoP-abhängigen Gens *yneM* unter induzierten Bedingungen (bei Magnesiummangel) nötig. Es konnte kein Einfluss der Mutation der Phosphorylierungsstelle von EIIA^{Ntr} auf die Expression von *yneM'*-*lacZ* festgestellt werden. Um weiter zu untersuchen, ob der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} hier eine Rolle spielt, wurde die Expression der *yneM'*-*lacZ*-Fusion in den Δ *ptsP* und Δ *ptsO* Mutanten analysiert. Durch die Deletion der Gene für EI^{Ntr} und NPr sollte mehr von der unphosphorylierten Form von EIIA^{Ntr} in der Zelle vorliegen. Die Deletionsstämme wurden mit der *yneM'*-*lacZ*-Fusion transformiert. Die Transformanten wurden zusammen mit den Transformanten des Wildtyps und der Δ *ptsN* Mutante unter Magnesiummangel angezogen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivitäten (Abbildung 4.3.8).

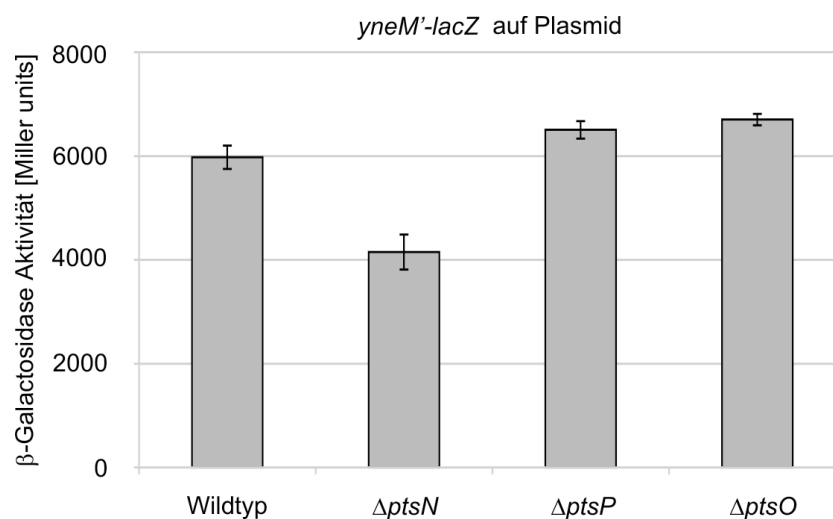


Abbildung 4.3.8: Die Expression von *yneM'*-*lacZ*-Fusion wird nicht durch EI^{Ntr} und NPr beeinflusst. Die Transformanten mit der plasmidisch lokalisierten *yneM'*-*lacZ*-Reporterengenfusionen (pDL48) wurden in N-Medium mit 10 μ M MgCl₂ angezogen. Die Zellen wurden geerntet und LacZ-Aktivitätsmessungen durchgeführt. Die Aktivität der *yneM'*-*lacZ*-Fusion im Wildtyp (S4197); der isogenen Δ *ptsN* Mutante (Z406), der Δ *ptsP* (Z404) und Δ *ptsO* Mutante (Z507) wurde analysiert. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die β -Galaktosidase-Aktivitäten für die beiden Deletionsstämme (Δ *ptsP* und Δ *ptsO*) waren ähnlich zu denen des Wildtyps (vgl. Säulen 3 und 4 mit 1 in Abbildung 4.3.8). Die Deletionen der Gene für die zwei Phosphotransferasen bewirkt die Dephosphorylierung von EIIA^{Ntr}. Dies hat allerdings keinen Einfluss auf die *yneM'*-*lacZ*-Expression. Der Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} scheint also für diese Regulation nicht entscheidend zu sein.

4.3.2.3. EIIA^{Ntr} interagiert mit der Sensorkinase CpxA und reguliert die Expression von *cpxP*

Das CpxA/CpxR Zwei-Komponenten System wird durch Zellwandstress, z. B. durch das Entstehen von falsch gefalteten Proteinen und einen alkalischen pH induziert (Vogt and Raivio, 2011). Durch die Aktivierung des Stress-Sigma Faktor RpoS werden die Gene des CpxA/CpxR ZKS besonders stark in der stationären Wachstumsphase exprimiert (De Wulf *et al.*, 1999).

Um den Einfluss von EIIA^{Ntr} auf dieses Zwei-Komponenten System zu untersuchen, wurde ebenfalls so vorgegangen wie bereits für die anderen ZKS beschrieben (NtrB/NtrC und PhoQ/PhoP). Zuerst wurde untersucht, ob sich EIIA^{Ntr} auf die Proteinmenge von CpxA unter verschiedenen Anzuchtbedingungen auswirkt. Anschließend wurde die mögliche Interaktion von EIIA^{Ntr} mit PhoQ und die Auswirkung von EIIA^{Ntr} auf die CpxA-abhängige Genexpression untersucht.

Für die ersten Untersuchungen wurde das authentische Gen der Sensorkinase (*cpxA*) mit einer Sequenz fusioniert, welche für das 3xFLAG-Epitop kodiert. Dieses *cpxA*-3xFLAG-Allel wurde in das Genom des Wildtyp und der Δ *ptsN* Mutante eingebacht. Diese Stämme sowie die mit plasmidständigem *P*_{Ara}-*ptsN* komplementierte Mutante wurden einmal in LB-Medium mit einem pH von 7 angezogen und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. In einer zweiten Untersuchung wurden die

Zellen in LB-Medium mit verschiedenen pH-Werten angezogen (pH 7 bzw. pH 8). Hier wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Synthese von CpxA sollte sowohl in der stationären Phase, als auch bei einem alkalischen pH-Wert induziert werden. Die Gesamtzellextrakte beider Anzuchten wurden durch ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. CpxA-3xFLAG wurde mit FLAG Antiserum in einen Western Blot detektiert. Die zellulären Mengen an CpxA-3xFLAG veränderten sich durch die unterschiedlichen Wachstumsphasen, in denen die Zellen geerntet wurden kaum. Weder die Veränderung des pH-Wertes des Mediums, noch EIIA^{Ntr} zeigte keinen Einfluss auf die Menge an CpxA-3xFLAG (Daten nicht gezeigt).

Um allerdings einen möglichen Einfluss von EIIA^{Ntr} auf dieses ZKS genauer zu untersuchen wurde ein Ligand-fishing Experiment durchgeführt. Die $\Delta ptsN$ Mutante mit dem chromosomalen *cpxA*-3xFLAG-Allel wurde mit Plasmiden transformiert, die für Strep-EIIA^{Ntr} oder Strep-EIIA^{Ntr}H73A Fusionsproteine kodierten. Die Transformanten wurden in LB-Medium angezogen. Durch die Zugabe von IPTG wurde die Synthese der Strep-Fusionsproteine induziert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und aufgeschlossen. Die Strep-Fusionsproteine wurden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Zellextrakte der Transformanten und die Elutionsfraktionen der Aufreinigungen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. CpxA-3xFLAG und die Strep-Fusionsproteine wurden mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert (Abbildung 4.3.9).

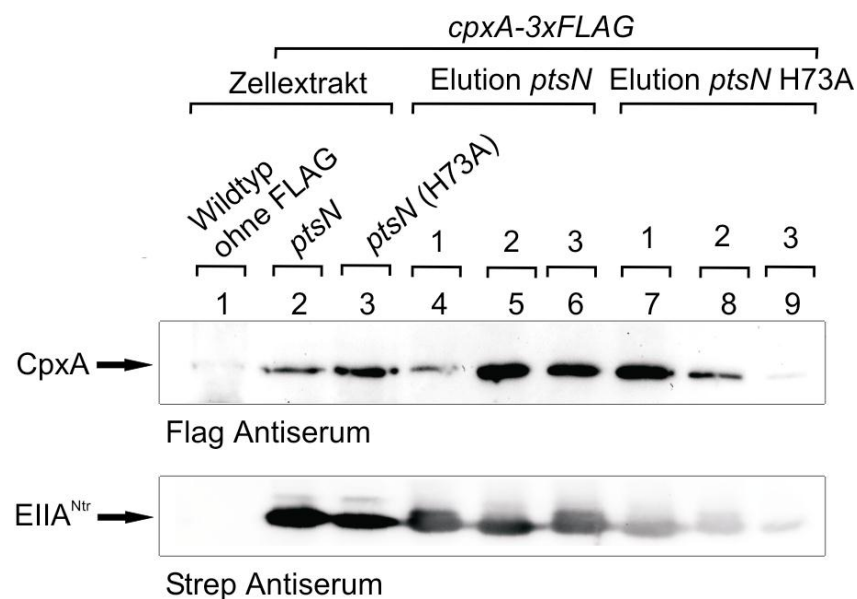


Abbildung 4.3.9: CpxA koeluiert mit Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A. Die Transformanten des $\Delta ptsN$ Stammes mit dem chromosomalen *cpxA*-3xFLAG-Allel (Z629) und den Plasmiden, die für Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217) und Strep-

EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A) kodieren, wurden in LB-Medium angezogen. Die Strep-Fusionsproteine wurden mit Streptaktin-Säulen aufgereinigt. Die Gesamtzellextrakte der Kulturen und Elutionen der aufgereinigten Strep-Proteine wurden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. Es wurden jeweils 13 µl der Zellextrakte und 10 µl der Elutionsfraktion 2 geladen. Die Detektion von CpxA-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum, Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A wurden mit Strep Antiserum detektiert.

CpxA-3xFLAG konnte in den Zellextrakten der Stämme mit *cpxA*-3xFLAG-Allel nachgewiesen werden. In dem Stamm ohne dieses Allel konnte nur eine sehr schwache Bande auf gleicher Höhe detektiert werden (vgl. Spuren 2 und 3 mit 1 in Abbildung 4.3.9). CpxA-3xFLAG konnte in den Elutionsfraktionen von Strep-EIIA^{Ntr} und der Strep-EIIA^{Ntr}H73A-Variante nachgewiesen werden (Spuren 4-9). Dies impliziert eine Interaktion von EIIA^{Ntr} mit der Sensorkinase CpxA. Eine Aussage über die Wichtigkeit der Phosphorylierungsstelle von EIIA^{Ntr} für die Interaktion zu treffen, war nicht möglich, da sehr unterschiedliche Mengen an Protein der einzelnen Elutionsfraktionen aufgetragen wurden. Die Interaktion lässt vermuten, dass sich EIIA^{Ntr}, wie bei den bereits untersuchten Sensorkinasen auch, auf die Expression CpxA/CpxR regulierter Gene auswirkt. Die Expression von *cpxP* wird durch das CpxA/CpxR ZKS gesteuert (Danese and Silhavy, 1998). Für die Analysen wurde ein Plasmid konstruiert, welches für eine transkriptionelle *cpxP'*-*lacZ*-Fusion kodiert. Der Wildtypstamm, die $\Delta ptsN$ Mutante und die mit dem Wildtyp *ptsN*, oder den *ptsNH73A*- und *ptsNH73E*-Allelen komplementierte Mutante wurde mit dem kompatiblen Plasmid, welches für die *cpxP'*-*lacZ*-Fusion kodiert, transformiert. Die Transformanten wurden in LB-Medium mit einem pH-Wert von 7 bzw. 8 angezogen. Die Expression der verschiedenen *ptsN*-Allele wurde in den Transformanten mit Arabinose induziert. Von den Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen. Anschließend wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.3.10 und 4.3.11).

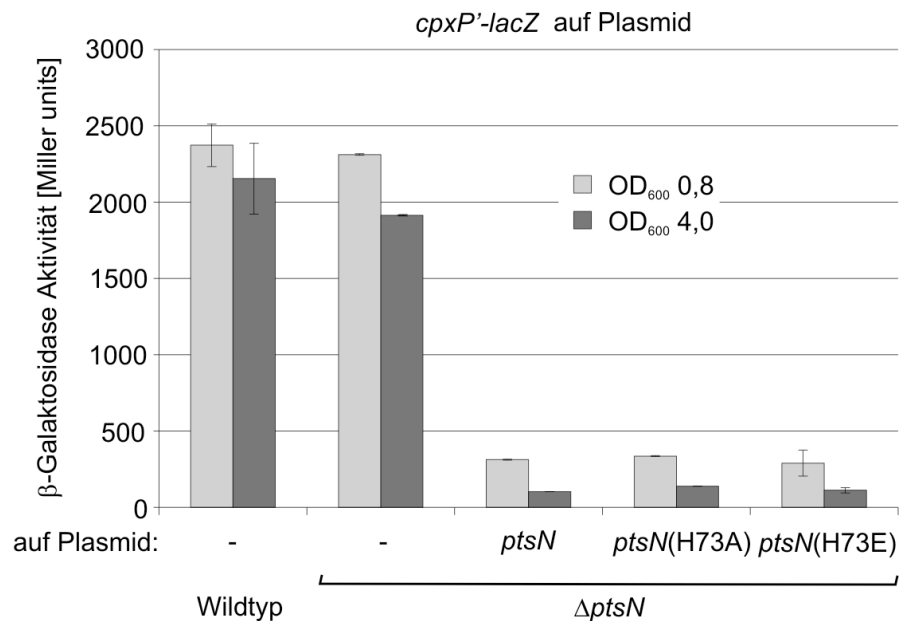


Abbildung 4.3.10: Die Überproduktion von EIIA^{Ntr} reduziert die Expression von *cpxP*. Die Transformanten mit der plasmidisch lokalisierten *cpxP'-lacZ*-Reporterfusionen (pDL41) wurden in LB-Medium mit pH-Wert von 7 angezogen, die Zellen wurden geerntet und eine LacZ-Aktivitätsmessung durchgeführt. Die Aktivität der *cpxP'-lacZ*-Fusion im Wildtyp (S4197); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z406), sowie die mit Wildtyp *ptsN* (pBGG86) oder den *ptsN*(H73A)- (pBGG93) und *ptsN*(H73E)-Allelen (pBGG334) komplementierte $\Delta ptsN$ Mutante wurde analysiert. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die β -Galaktosidase-Aktivitäten für den Wildtyp und die $\Delta ptsN$ Mutante in unterschiedlichen Wachstumsphasen waren sehr ähnlich (vgl. Wildtyp und $\Delta ptsN$ Mutante jeweils helle und dunkle Säulen in Abbildung 4.3.10). Die Deletion von *ptsN* hatte also keinen Einfluss auf die Expression der *cpxP'-lacZ*-Fusion. Die Überexpression der verschiedenen *ptsN*-Allele zeigte einen starken Einfluss auf die Expression der *cpxP'-lacZ*-Fusion. Für alle drei Überexpressionen ist die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp in der exponentiellen Wachstumsphase auf etwa ein Zehntel reduziert (vgl. helle Säulen 3-5 mit 1 in Abbildung 4.3.10). In der stationären Wachstumsphase war der Effekt noch stärker sichtbar (vgl. dunkle Säulen 3-5 mit 1 in Abbildung 4.3.10). Bei Anzucht der Zellen in Medium mit einem pH-Wert von 7 war die Expression von *cpxP* in der stationären Wachstumsphase nicht induziert. Die Überproduktion von EIIA^{Ntr} führte zu einer drastischen Reduktion der Expression der *cpxP'-lacZ*-Fusion in beiden Wachstumsphasen. Für die in LB-Medium mit pH 8 gezogen Zellen zeigte sich, dass die β -Galaktosidase-Aktivitäten in beiden Stämmen

(Wildtyp und $\Delta ptsN$ Mutante) in der stationären Wachstumsphase im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase anstiegen (vgl. jeweils helle Säulen 1 und 2 mit dunklen Säulen 1 und 2 in Abbildung 4.3.11). Die β -Galaktosidase-Aktivitäten des Wildtyps und der $\Delta ptsN$ Mutante unterschieden sich weder in der exponentiellen, noch in der stationären Wachstumsphase (vgl. jeweils helle und dunkle Säulen 1 und 2 miteinander in Abbildung 4.3.11). Auch in diesem experimentellen Ansatz zeigte sich eine Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivitäten bei der Überexpression der verschiedenen *ptsN*-Allele. Dieser Effekt war wiederum in der stationären Wachstumsphase verstärkt (vgl. helle und dunkle Säulen 3-5 mit 1 in Abbildung 4.3.11). Bei Anzucht der Zellen in Medium mit einem pH-Wert von 8 ist die Expression der *cpxP'*-*lacZ*-Fusion in der stationären Wachstumsphase stark induziert. Die Überproduktion von EIIA^{Ntr} führte zu einer drastischen Reduktion der Expression der *cpxP'*-*lacZ*-Fusion in beiden Wachstumsphasen. Die Überproduktion von EIIA^{Ntr} hatte somit einen anderen Effekt als auf die bisher untersuchten *lacZ*-Fusionen, welche von den anderen EIIA^{Ntr}-regulierten Zwei-Komponenten Systemen abhängig sind. Die Expression der *cpxP'*-*lacZ*-Fusion wurde durch Überproduktion von EIIA^{Ntr} reduziert, in den anderen Fällen führte die Überproduktion immer zur Aktivierung der Expression.

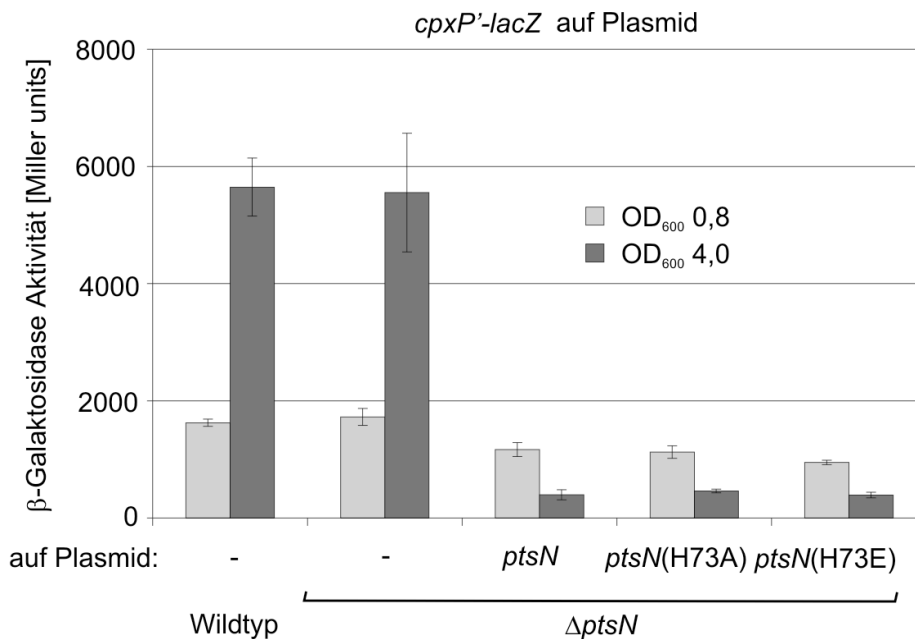


Abbildung 4.3.11: Die Expression von *cpxP* wird durch die EIIA^{Ntr} Überproduktion reduziert. Die Transformanten mit der plasmidisch lokalisierten *cpxP'*-*lacZ*-Reportergenfusionen (pDL41) wurden in LB-Medium mit pH-Wert von 8 angezogen. Die Zellen wurden geerntet und eine LacZ-Aktivitätsmessung durchgeführt. Die Aktivität der *cpxP'*-*lacZ*-Fusion im Wildtyp (S4197); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z406), sowie die mit Wildtyp *ptsN* (pBGG86) oder den *ptsN(H73A)*- (pBGG93) und

ptsN(H73E)-Allelen (pBGG334) komplementierte $\Delta ptsN$ Mutante wurde analysiert. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Da die Überexpression der verschiedenen *ptsN*-Allele einen so drastischen Effekt auf die Expression der *cpxP*'-lacZ-Fusion hat, sollte nun untersucht werden, ob sich auch die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} auf die Expression der *cpxP*'-lacZ-Fusion auswirken könnte. Es wurde die Wirkung von EI^{Ntr} und NPr untersucht. Durch die Deletion der Gene für EI^{Ntr} und NPr sollte mehr von der unphosphorylierten Form von EIIA^{Ntr} in der Zelle vorliegen. Hierzu wurden die Deletionsstämme ($\Delta ptsP$ und $\Delta ptsO$) mit dem Plasmid, welches für die *cpxP*'-lacZ-Fusion kodiert, transformiert. Die Kulturen wurden in LB-Medium mit pH 8 angezogen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivitäten (Abbildung 4.3.12).

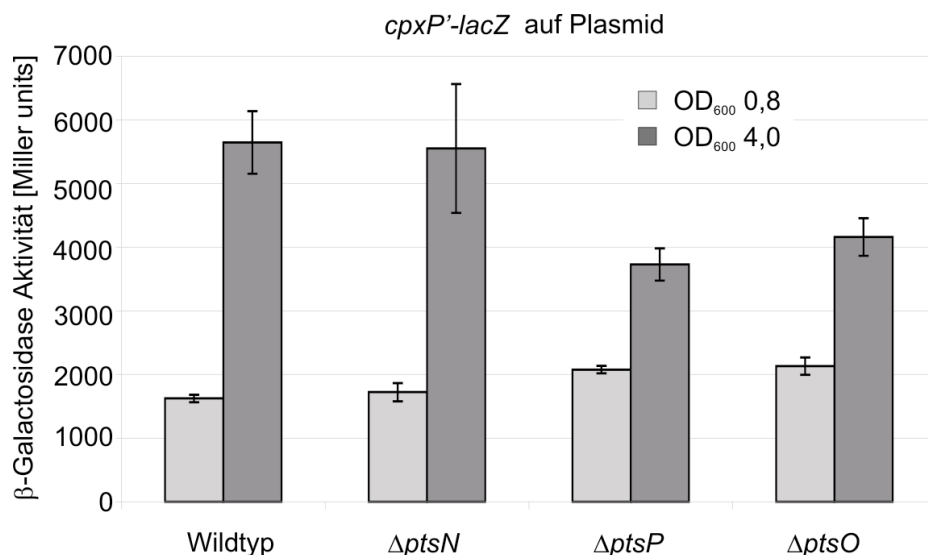


Abbildung 4.3.12: Die Expression von *cpxP* wird durch das PTS^{Ntr} beeinflusst. Die Transformanten mit der plasmidisch lokalisierten *cpxP*'-lacZ-Reporterfusionen (pDL41) wurden in LB-Medium mit einem pH von 8 angezogen. Die Zellen wurden geerntet und LacZ-Aktivitätsmessungen durchgeführt. Die Aktivität der *cpxP*'-lacZ-Fusion im Wildtyp (S4197); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z406), der $\Delta ptsP$ (Z404) und $\Delta ptsO$ Mutante (Z507) wurde untersucht. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Da die Auswirkungen der Überexpression der verschiedenen *ptsN*-Allele für die in LB-Medium mit pH 8 gewachsenen Kulturen drastisch war, wurde diese Anzuchtbedingung auch für diese Untersuchung gewählt. Wie schon vorher beobachtet (Abbildung 4.3.11) waren auch hier die β -Galaktosidase-Aktivitäten in der exponentiellen Wachstumsphase

geringer als in der stationären Wachstumsphase. Dies traf auch für die β -Galaktosidase-Aktivitäten der $\Delta ptsP$ und $\Delta ptsO$ Mutanten zu (vgl. jeweils helle mit dunklen Säulen in Abbildung 4.3.12). In der exponentiellen Wachstumsphase unterschieden sich die gemessenen Werte der Deletionsmutanten kaum von dem des Wildtyps (vgl. helle Säulen 3 und 4 mit 1 in Abbildung 4.3.12). In der stationären Wachstumsphase stieg die β -Galaktosidase-Aktivität im Wildtyp und der $\Delta ptsN$ Mutante an. In den $\Delta ptsP$ und $\Delta ptsO$ Mutanten war ein geringerer Anstieg zu beobachten (vgl. dunkle Säulen 3 und 4 mit 1 und 2). In der exponentiellen Wachstumsphase scheint die Phosphorylierung von $EIIA^{Ntr}$ keine Auswirkung auf die Expression der $cpxP^2$ - $lacZ$ -Fusion zu haben. In der stationären Wachstumsphase sind EI^{Ntr} und NPr wichtig für Induktion der $cpxP^2$ - $lacZ$ -Expression. Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass das $EIIA^{Ntr}$ über die Interaktion mit der Sensorkinase CpxA wahrscheinlich auf die Expression CpxA/CpxR-regulierter Gene wirkt. Dabei wirkt unphosphorylierte Form von $EIIA^{Ntr}$ scheinbar reprimierend. Dies könnte bedeuten, dass $EIIA^{Ntr}$ durch ähnliche Mechanismen verschiedene Zwei-Komponenten Systeme unterschiedlich reguliert.

4.3.2.4. $EIIA^{Ntr}$ interagiert mit der Sensorkinase BaeS

Das BaeS/BaeR Zwei-Komponenten System wird durch Zellhüllstress induziert. Die Expression des *baeSR*-Operons ist autoreguliert (Leblanc *et al.*, 2011). Um zu untersuchen, ob sich das PTS^{Ntr} auf dieses Zwei-Komponenten System auswirkt, wurde das Gen der Sensorkinase (*baeS*) mit einer Sequenz fusioniert, welche für das 3xFLAG-Epitop kodiert. Dieses *baeS*-3xFLAG-Allel wurde in das Genom des Wildtyp und der $\Delta ptsN$ Mutante durch Elektroporation eingebacht. Diese Stämme, sowie die mit P_{Ara} -*ptsN* komplementierte Mutante wurden in LB-Medium angezogen. Nach der Ernte der Zellen wurden die Proteine durch eine denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. BaeS-3xFLAG wurde mit FLAG Antiserum im Western Blot detektiert (Abbildung 4.3.13).

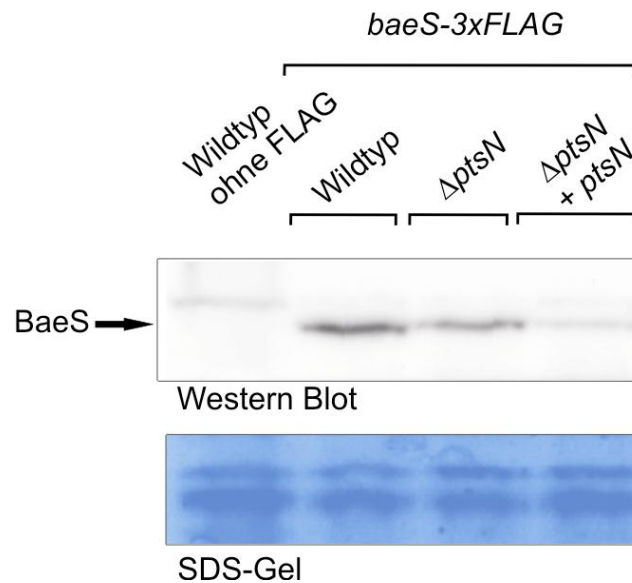


Abbildung 4.3.13: EIIA^{Ntr} reguliert die zelluläre Menge an BaeS-3xFLAG. Die Stämme Wildtyp (S4197), der Wildtyp mit dem chromosomalen *baeS*-3xFLAG-Allel (Z635) und die isogene $\Delta ptsN$ Mutante (Z637), sowie die mit P_{Ara} -*ptsN* (pBGG86) komplementierte Mutante wurden in LB-Medium angezogen. Die Expression von *ptsN* wurde in der Transformante mit Arabinose induziert. Die Gesamtzellextrakte wurden auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente ein mit Coomassie blue angefärbtes SDS-Gel.

Es kann beobachtet werden, dass BaeS-3xFLAG spezifisch detektiert werden konnte. In dem Stamm ohne *baeS*-3xFLAG konnte das Protein nicht detektiert werden (vgl. Spur 1 mit Spuren 2-4 in Abbildung 4.3.13). Die Menge an BaeS-3xFLAG war durch die Überproduktion von EIIA^{Ntr} im Vergleich zum Wildtyp und der $\Delta ptsN$ Mutante reduziert (vgl. Spur 4 mit 2 und 3 in Abbildung 4.3.13). Während die Deletion von *ptsN* keinen starken Einfluss hat, reduziert die Überproduktion von EIIA^{Ntr} die Menge an BaeS-3xFLAG. Da EIIA^{Ntr} die Menge an BaeS-3xFLAG in der Zelle moduliert, sollte nun die Interaktion zwischen EIIA^{Ntr} und BaeS untersucht werden. Die Plasmide, welche für den Strep-Tag, oder die Strep-EIIA^{Glc}, Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A Fusionsproteine kodieren, wurden in die $\Delta ptsN$ Mutante mit chromosomalem *baeS*-3xFLAG-Allel eingebracht. Die Zellen wurden in LB-Medium angezogen. Die Synthese der Strep-Fusionsproteine wurde durch die Zugabe von IPTG induziert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und die Strep-Proteine aufgereinigt. Die Gesamtzellextrakte der Transformanten und die Elutionsfraktionen 2 der Aufreinigungen wurden durch ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. BaeS-3xFLAG und die Strep-Fusionsproteine wurden mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert (Abbildung 4.3.14).

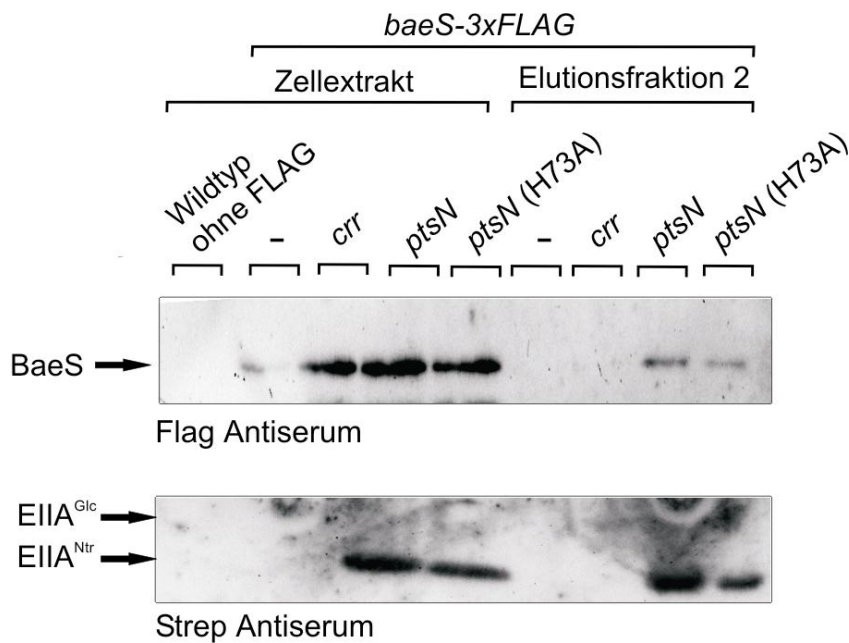


Abbildung 4.3.14: BaeS koeluiert mit Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A. Die Transformanten des $\Delta ptsN$ Stammes mit dem chromosomalen *baeS-3xFLAG*-Allel (Z637) und den Plasmiden (Leervektor (pBGG237), Strep-EIIA^{Glc} (*strep-crr*; pBGG230), Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217), Strep-EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A)) wurden in LB-Medium angezogen. Die Strep-Fusionsproteine wurden mit Streptaktin-Säulen aufgereinigt. Die Gesamtzellextrakte der Kulturen und Elutionen wurden auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. Es wurden jeweils 13 μ l der Zellextrakte und 10 μ l der Elutionen geladen. Die Detektion von BaeS-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum, Strep-EIIA^{Glc}, Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr} H73A wurden mit Strep Antiserum detektiert.

BaeS-3xFLAG konnte nur in sehr geringen Mengen im Zellextrakt der Transformante mit Leervektor detektiert werden. In den anderen Zellextrakten wurde mehr BaeS-3xFLAG detektiert. In dem Kontrollstamm ohne *baeS-3xFLAG*-Allel konnte kein BaeS-3xFLAG detektiert werden (vgl. jeweils Spuren 1 und 2 mit 3-5 in Abbildung 4.3.14). Strep-EIIA^{Glc} konnte nur sehr schlecht aufgereinigt werden. In dem Blot mit Strep Antiserum ist nur eine schwache Bande für Strep-EIIA^{Glc} in der Aufreinigung zu erkennen. In dieser Aufreinigung konnte kein BaeS-3xFLAG detektiert werden (siehe Spur 7 im oberen und unteren Blot). Nur in den Aufreinigungen von Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr} H73A konnte BaeS-3xFLAG nachgewiesen werden (Spuren 8 und 9 in Abbildung 4.3.14). Die Interaktion von BaeS-3xFLAG mit Strep-EIIA^{Ntr} scheint spezifisch zu sein, in den Kontrollaufreinigungen konnte kein BaeS-3xFLAG detektiert werden. Auch diese Sensorkinase scheint mit EIIA^{Ntr} interagieren. Es kann vermutet

werden, dass EIIA^{Ntr} über die Interaktion mit BaeS die Expression von *baeS* steuert. Hier wäre ein Mechanismus denkbar wie für das CpxA/CpxR ZKS, da auch hier die Anwesenheit von EIIA^{Ntr} negativ wirkt. Dies sollte zukünftig untersucht werden.

4.3.2.5. EIIA^{Ntr} interagiert nicht mit der Sensorkinase AtoS

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen KdpD und EIIA^{Ntr} (Abschnitt 4.1.4.) diene die Untersuchung der Interaktion zwischen der Sensorkinase AtoS und EIIA^{Ntr} als Negativkontrolle. Auch für die Koaufräunigungen von EIIA^{Ntr} mit verschiedenen Sensorkinasen aus den vorherigen Experimenten wurde ein Kontrollprotein benötigt. Dies war nötig, um zu zeigen, dass die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit den verschiedenen Sensorkinasen spezifisch ist. Für diese Untersuchungen wurde *atoS* mit einer Sequenz fusioniert, welche für das 3xFLAG-Epitop kodiert. Dieses *atoS*-3xFLAG-Allel wurde in das Genom des Wildtyps und der $\Delta ptsN$ Mutante eingebacht. Es ist bekannt, dass die Synthese und Aktivität von AtoS durch Acetoacetat induziert werden kann (Jenkins and Nunn, 1987). Also wurden die Stämme sowie die mit plasmidständigem *P_{Ara}-ptsN* komplementierte Mutante in LB-Medium mit Acetoacetat (10 mM) angezogen. Die Expression von *ptsN* in den Transformanten wurde durch Arabinose induziert. Anschließend wurden die Gesamtzellextrakte auf einem SDS-Gel aufgetrennt und AtoS-3xFLAG mit FLAG Antiserum im Western Blot detektiert (Abbildung 4.3.15).

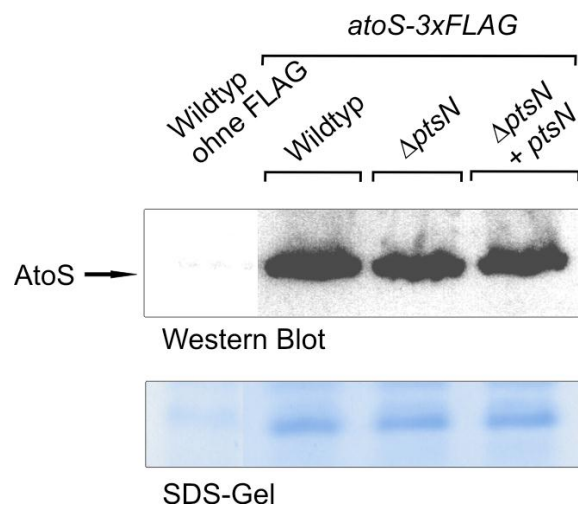


Abbildung 4.3.15: EIIA^{Ntr} hat keinen Einfluss auf die zellulären Mengen an AtoS-3xFLAG. Die Stämme Wildtyp (S4197), der Wildtyp mit dem chromosomalen *atoS*-3xFLAG-Allel (Z669) und die isogene $\Delta ptsN$ Mutante (Z671), sowie die mit *P_{Ara}-ptsN* (pBGG86) komplementierte Mutante wurden in LB-Medium mit 10 mM Acetoacetat angezogen. Die Gesamtzellextrakte wurden mittels einer 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt

und durch einen Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente ein mit Coomassie blue angefärbtes SDS-Gel.

AtoS-3xFLAG konnte in den Zellextrakten der Stämme, die über das *atoS*-3xFLAG-Allel verfügten, nachgewiesen werden (vgl. Spuren 2 bis 4 mit 1 in Abbildung 4.3.15). Die Deletion oder Überexpression von *ptsN* hatte keinen starken Einfluss auf die Menge an AtoS-3xFLAG (vgl. Spuren 3 und 4 mit 2 in Abbildung 4.3.15). EIIA^{Ntr} scheint die Menge an AtoS-3xFLAG nicht zu beeinflussen. Um zu zeigen, dass EIIA^{Ntr} nicht mit allen Sensorkinasen, sondern mit einigen spezifisch interagiert, sollte eine Interaktion zwischen EIIA^{Ntr} und AtoS ausgeschlossen werden. Hierzu wurde in einem Ligand-fishing Experiment die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit der Sensorkinase AtoS untersucht. Die oben erwähnten Plasmide, welche für die verschiedenen Strep-Fusionsproteine kodieren, wurden in einen Stamm mit *ptsN* Deletion und dem chromosomalen *atoS*-3xFLAG-Allel eingebracht. Die Transformanten wurden in LB-Medium mit Acetoacetat angezogen. Durch die Zugabe von IPTG konnte die Synthese der Strep-Fusionsproteine induziert werden. Die Zellen wurden geerntet und aufgeschlossen. Es folgte eine Affinitätschromatographie um den Strep-Tag und die Fusionsproteine aufzureinigen. Die Gesamtzellextrakte und die Elutionsfraktionen 2 der Aufreinigungen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. AtoS-3xFLAG und die Strep-Fusionsproteine konnten mit spezifischen Antikörpern in Western Blot detektiert werden (Abbildung 4.3.-16).

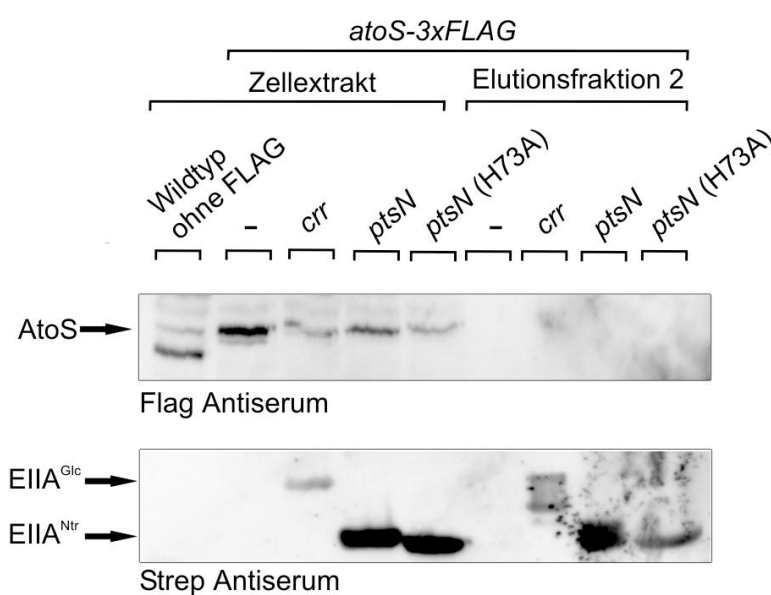


Abbildung 4.3.16: AtoS-3xFLAG interagiert nicht mit Strep-EIIA^{Ntr} oder Strep-EIIA^{Ntr}H73A. Die Transformanten des $\Delta ptsN$ Stammes mit dem chromosomalen *atoS*-

3xFLAG-Allel (Z671) und den Plasmiden (Leervektor (pBGG237), Strep-EIIA^{Glc} (*strep-crr*; pBGG230), Strep-EIIA^{Ntr} (*strep-ptsN*; pBGG217), Strep-EIIA^{Ntr}H73A (*strep-ptsN* (H73A); pBGG217-H73A)) wurden in LB-Medium mit Acetoacetat angezogen. Die Strep-Fusionsproteine wurden mit Streptaktin-Säulen aufgereinigt. Zellextrakte der Kulturen und Elutionen wurden mittels einer 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blots analysiert. Es wurden jeweils 13 µl der Zellextrakte und 10 µl der Elutionen geladen. Die Detektion von AtoS-3xFLAG erfolgte mit FLAG Antiserum, EIIA^{Glc}, EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr} H73A wurden mit Strep Antiserum detektiert.

AtoS-3xFLAG konnte in den Gesamtzellextrakten der Transformanten detektiert werden, die über das *atoS*-3xFLAG-Allel verfügten. Im Kontrollstamm ohne dieses Allel konnten mehrere Banden, allerdings nicht direkt auf der Höhe von AtoS-3xFLAG detektiert werden (vgl. Spuren 2-5 mit 1 in Abbildung 4.3.16). AtoS-3xFLAG konnte in keiner der Elutionen der verschiedenen Strep-Proteine detektiert werden (Spuren 6-9 in Abbildung 4.3.16). Die Sensor kinase AtoS zeigt keine Interaktion mit EIIA^{Ntr}. Dies bedeutet, dass wahrscheinlich die anderen getesteten Sensor kinasen spezifisch mit EIIA^{Ntr} interagieren.

4.4. Regulation des Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} in *E. coli*

Viele der Regulationen des Stickstoff-PTS werden durch die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} ausgeführt. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass unter Laborbedingungen EIIA^{Ntr} im Wildtyp hauptsächlich phosphoryliert vorliegt (s. Abb. 4.1.10 und 4.2.8). Nur ein geringer Anteil von EIIA^{Ntr} kann unter diesen Bedingungen folglich regulatorisch aktiv sein. Daher war es interessant zu untersuchen, wie und ob der Phosphorylierungsstatus der Proteine des PTS^{Ntr} in der Zelle veränderbar ist. Aus *Pseudomonas putida* ist bekannt, dass es Kreuzphosphorylierung mit dem Fruktose-spezifischen Transport-PTS gibt (Pflüger and de Lorenzo, 2008). In *E. coli* konnte eine Kreuzphosphorylierung mit den Proteinen des kanonischen PTS *in vitro* nachgewiesen werden (Powell *et al.*, 1995; Rabus *et al.*, 1999). Zu dem wurde beschrieben, dass die Proteine des kanonischen PTS zur Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} *in vivo* beitragen, zumindest dann wenn EIIA^{Ntr} in der Zelle überproduziert wurde (Zimmer *et al.*, 2008). Weiterhin ist es möglich, dass die N-terminale GAF Domäne von EI^{Ntr} an der Regulation des Phosphorylierungszustandes der PTS^{Ntr}-Proteine beteiligt ist (Pflüger-Grau and Görke, 2010). Die Bindung von niedermolekularen Stoffen oder auch

Proteinen an GAF Domänen verändert in vielen Fällen die Aktivität der assoziierten Proteindomänen. Auch könnten Interaktionen mit anderen Proteinen dazu führen, dass die Aktivitäten oder der Phosphorylierungsstatus der PTS^{Ntr}-Proteine verändert werden. Im Folgenden wurde daher die Bedeutung des kanonischen PTS, der Kohlenhydratversorgung der Zelle, der GAF Domäne von EI^{Ntr} und anderer Einflüsse auf den Phosphorylierungsstatus des PTS^{Ntr} untersucht.

4.4.1. Untersuchungen zur Wechselwirkung des PTS^{Ntr} mit dem Transport-PTS

Der Phosphorylierungsstatus der Proteine des kanonischen PTS (Transport-PTS) wird durch die Kohlenstoffversorgung der Zelle bestimmt. Nimmt der Organismus präferierte C-Quellen auf und metabolisiert diese (z. B. Glukose oder Mannitol), so erlaubt dies ein schnelles Zellwachstum. Unter diesen Bedingungen wird die Aufnahme und die Verwertung untergeordneter C-Quellen durch die Kohlenstoff Kataboliten Repression blockiert. Die Proteine des kanonischen PTS liegen dann hauptsächlich unphosphoryliert vor (Görke and Stülke, 2008). Bei der Verstoffwechslung von weniger bevorzugten C-Quellen (z. B. Galaktose und Glyzerin) nimmt die Phosphorylierung der PTS Proteine zu. Somit hängt das Phospho-/Dephospho-Verhältnis von der Qualität der verfügbaren C-Quelle ab (Bettenbrock *et al.*, 2007).

Als Erstes wurde untersucht, ob und inwieweit die Kreuzphosphorylierung zwischen den PTS^{Ntr} und den Transport-PTS stattfindet, wenn alle beteiligten Proteine von ihnen authentischen Loci im Chromosom kodiert werden. Im zweiten Schritt wurde untersucht, wie sich die Wechselwirkung zwischen den beiden PTS auf die von EIIA^{Ntr} kontrollierten Prozesse auswirkt. Für diese Analysen wurde der Stamm S4197 (*ilvG*⁺) und seine Derivate verwendet. In diesem Stamm wurde das *ilvG*-Gen „kuriert“. Somit ist ausgeschlossen, dass die artifiziellen Wachstumsdefekte eines Stammes mit Mutationen in *ilvG* sekundäre Effekte auslösen könnten, die möglicherweise die Ergebnisse der Untersuchungen verfälschen könnten (Reaves and Rabinowitz, 2011).

Wie bereits oben beschrieben, verändert sich der Phosphorylierungsstatus der Proteine des kanonischen PTS durch die Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen. Sollte es Kreuzphosphorylierungen zwischen dem kanonischen PTS und dem PTS^{Ntr} *in vivo* geben, sollte sich durch die Verwendung unterschiedlicher C-Quellen also auch der

Phosphorylierungsstatus der Proteine des PTS^{Ntr} verändern. Dies wurde nun im Folgenden untersucht. Hierzu sollte nun das Phospho-/Dephospho-Verhältnis von EIIA^{Ntr} mittels nativer Gelelektrophorese und Western Blot analysiert werden. Ein polyklonales Antiserum, das gegen EIIA^{Ntr} gerichtet war, konnte das Protein nur schlecht im Zellextrakt detektieren (Daten nicht gezeigt). Um dieses Problem zu umgehen, wurde *ptsN* im authentischen chromosomalen Lokus mit einer Sequenz fusioniert, welche für das 3xFLAG-Epitop kodiert. Dieses *ptsN*-3xFLAG-Allel wurde in das Genom des Wildtyps und der ΔptsP Mutante durch Elektroporation eingebracht (Durchführung siehe Abschnitt 3.2.4.12.4.). Durch die C-terminale Verlängerung des Proteins (EIIA^{Ntr} -3xFLAG) konnte zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivität des Protein beeinträchtigt ist. Die Funktionalität des Proteins musste also überprüft werden. EIIA^{Ntr} stimuliert die Expression des *kdpFABC*-Operons (Abschnitt 4.1.2). Daher wurde die transkriptionelle *kdpFA*'-lacZ-Fusion als Reporter für die Funktionalität von EIIA^{Ntr} -3xFLAG verwendet. Für diese Untersuchungen wurden der Wildtypstamm, die ΔptsN Mutante, sowie der Stamm mit dem *ptsN*-3xFLAG-Allel getestet. Zudem wurde eine ΔptsP Mutante, welche ebenfalls das *ptsN*-3xFLAG-Allel im Chromosom trug, untersucht. Alle diese Stämme wurden mit einem Plasmid transformiert, welches für die *kdpFA*'-lacZ-Fusion kodierte. Die Transformanten wurden in Minimalmedium mit Glukose und einer Kaliumkonzentration von 5 mM angezogen. Die Zellen wurden geerntet und β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.4.1).

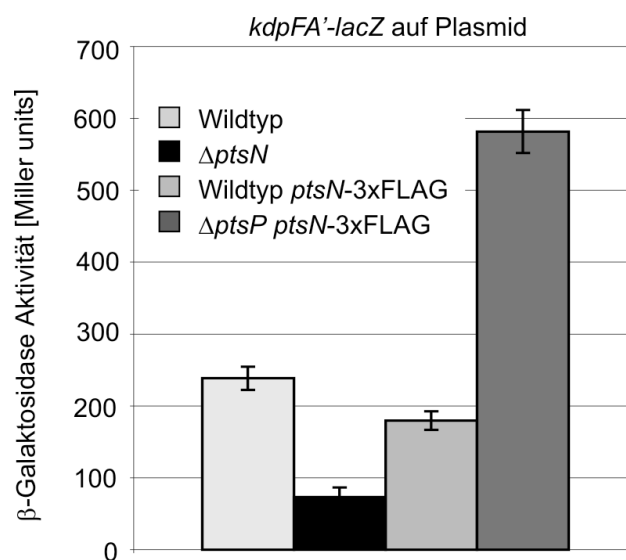


Abbildung 4.4.1: Das EIIA^{Ntr} -3xFLAG Fusionsprotein stimuliert die Expression der *kdpFA*'-lacZ-Fusion. Der Wildtyp (S4197), die isogene ΔptsN Mutante (Z405),

sowie der Wildtyp mit dem *ptsN*-3xFLAG-Allel (Z424) und die Δ *ptsP* Mutante mit dem *ptsN*-3xFLAG-Allel (Z436) wurden mit einem Plasmid, welches für eine *kdpFA'*-*lacZ*-Fusion kodiert (pBGG158), transformiert. Die Kulturen wurden in Minimalmedium mit Glukose und einer Kaliumkonzentrationen von 5 mM angezogen. Die Zellen wurden geerntet und es wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die gemessene β -Galaktosidase-Aktivität lag für den Wildtyp bei 239 Miller units. Für den Wildtyp mit dem *ptsN*-3xFLAG-Allel konnte, mit 180 Miller units, ein ähnlicher Wert gemessen werden. Die Δ *ptsN* Mutante zeigte mit 73 Miller units eine vergleichsweise niedrige Aktivität (vgl. Säule 2 mit 1 und 3 in Abbildung 4.4.1.). Die β -Galaktosidase-Aktivität der Δ *ptsP* Mutante mit dem *ptsN*-3xFLAG-Allel betrug 582 Miller units. In diesem Stamm wurde die *kdpFA'*-*lacZ*-Fusion im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert (vgl. Säule 4 mit Säule 1 in Abbildung 4.4.1). Zusammenfassend konnte geschlossen werden, dass der C-terminale 3xFLAG-Tag die Aktivität von EIIA^{Ntr} nicht beeinträchtigt. In der Analyse verhielten sich der Wildtypstamm und der Stamm mit dem *ptsN*-3xFLAG-Allel sehr ähnlich. Die Funktionalität des EIIA^{Ntr}-3xFLAG Funktionsproteins wurde zusätzlich durch die hohe Expression der *kdpFA'*-*lacZ*-Fusion in der Δ *ptsP* Mutante mit dem *ptsN*-3xFLAG-Allel bestätigt. In der Δ *ptsP* Mutante sollte EIIA^{Ntr}-3xFLAG weniger stark phosphoryliert sein und daher die Expression der *kdpFA'*-*lacZ*-Fusion stärker aktivieren. Daher sollte das EIIA^{Ntr}-3xFLAG funktionell sein (Abschnitt 4.1.2.).

Um nun zu untersuchen, ob der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr}-3xFLAG durch die C-Quelle beeinflusst wird, wurde der Stamm mit dem chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allel und die ansonsten isogene Δ *ptsP* Mutante in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glukose, Mannitol, N-Acetylglukosamin, Galaktose, Glyzerin und Succinat) angezogen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet und die Proteine durch native Gelelektrophorese aufgetrennt (Durchführung siehe Abschnitt 3.2.6.3.3.). Anschließend wurde EIIA^{Ntr}-3xFLAG im Western Blot FLAG Antiserum detektiert (Abbildung 4.4.2 A und B).

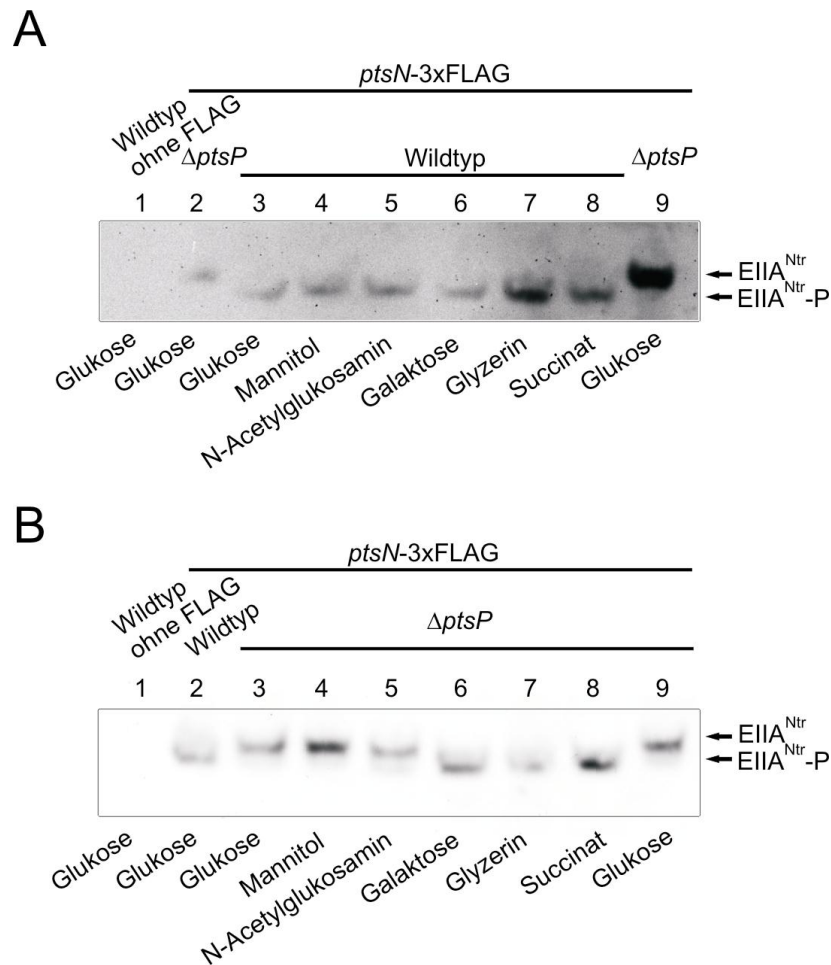


Abbildung 4.4.2: Einfluss der C-Quelle auf die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}-3xFLAG. (A) Der Wildtyp mit dem chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allel (Z424) wurde in Minimalmedium mit 5 mM Kalium und unterschiedlichen Kohlenhydraten als alleinige C-Quelle angezogen. Die Gesamtzellextrakte wurden auf einem 12,5%igem Prosieve Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. Der Wildtyp (S4197) sowie der isogene $\Delta ptsP$ Stamm mit dem *ptsN*-3xFLAG-Allel (Z436) dienen als Kontrollen. (B) Die $\Delta ptsP$ Mutante mit dem chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allel (Z436) wurde in Minimalmedium mit 5 mM Kalium und unterschiedlichen Kohlenhydraten als alleinige C-Quelle angezogen. Die Gesamtzellextrakte wurden auf einem 12,5%igem Prosieve Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. Der Wildtyp (S4197) sowie der Wildtypstamm mit dem *ptsN*-3xFLAG-Allel (Z424) dienen als Kontrollen. EIIA^{Ntr}-3xFLAG wurde mit einem FLAG Antiserum detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von mehreren Experimenten.

EIIA^{Ntr}-3xFLAG konnte in den Zellextrakten der Stämme, die das *ptsN*-3xFLAG-Allel enthielten, detektiert werden. In dem Zellextrakt des Kontrollstammes ohne *ptsN*-3xFLAG-Allel konnte das Protein nicht detektiert werden (vgl. Spuren 2-9 mit Spur 1 in Abbildung 4.4.2 A und B). Es konnte schon früher beobachtet werden, dass bei Anzucht in Medium mit Glukose, EIIA^{Ntr}-3xFLAG im Wildtyp hauptsächlich phosphoryliert vorliegt (s. Abb 4.1.10 und 4.2.8). In der $\Delta ptsP$ Mutante ist EIIA^{Ntr}-3xFLAG unter

gleichen Anzuchtbedingungen unphosphoryliert (s. Abb 4.1.10 und 4.2.8). Dies konnte in diesem unabhängigen Experiment bestätigt werden (jeweils Spuren 2 und 3 in Abbildung 4.4.2 A und B). Die Verwendung von unterschiedlichen C-Quellen hatte im Wildtypstamm scheinbar keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}-3xFLAG. Unter allen Bedingungen konnte nur die phosphorylierte Form von EIIA^{Ntr}-3xFLAG detektiert werden (Spuren 3-8 in Abbildung 4.4.2 A). In der $\Delta ptsP$ Mutante hingegen beeinflusste die Wahl der Kohlenstoffquelle die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}-3xFLAG. Wurden die Zellen mit bevorzugten C-Quellen, wie Glukose oder Mannitol angezogen, so lag EIIA^{Ntr}-3xFLAG in der $\Delta ptsP$ Mutante unphosphoryliert vor (Spuren 3 und 4 in Abbildung 4.4.2 B). Bei Anzucht in N-Acetylglukosamin war EIIA^{Ntr}-3xFLAG hauptsächlich unphosphoryliert. Es konnte allerdings auch eine geringe Menge phosphoryliertes EIIA^{Ntr}-3xFLAG detektiert werden (Spur 5 in Abbildung 4.4.2 B). Bei der Anzucht in sekundären C-Quellen, wie Galaktose, Glycerin und Succinat konnte kein oder nur sehr wenig unphosphoryliertes EIIA^{Ntr}-3xFLAG detektiert werden (Spuren 6-8 in Abbildung 4.4.2 B). Es zeigte sich also, dass in einer $\Delta ptsP$ Mutante die Kohlenstoffquelle für die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}-3xFLAG entscheidend ist. Im Wildtyp hat die Wahl der C-Quelle scheinbar keinen sichtbaren Einfluss auf die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}-3xFLAG. Das bedeutet, dass die Kreuzphosphorylierung im Wildtyp augenscheinlich keine Rolle spielt. Fehlt allerdings das Phosphotransferase Protein EI^{Ntr} in der Zelle, können die Proteine des kanonischen PTS zur Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}-3xFLAG beitragen. Aber nur dann, wenn eine untergeordnete C-Quelle genutzt wird. Da die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}-3xFLAG in der $\Delta ptsP$ Mutante durch die Verwendung von unterschiedlichen Kohlenstoffquellen beeinflusst wird, sollte diese Veränderung sich auch auf die von EIIA^{Ntr}-regulierte Expression des *kdpFABC*-Operons auswirken. Um die Wichtigkeit des Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} für die Regulation des *kdpFABC*-Operons in dem S4197-Stamm und seinen Derivaten zu untersuchen, wurde die Reporterfusion (*kdpFA'-lacZ*) ektopisch in die *attB*-Stelle in das Chromosom des Wildtyps und der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante integriert (Durchführung siehe Abschnitt 3.2.4.12.2). Die $\Delta ptsN$ Mutante mit chromosomaler *kdpFA'-lacZ*-Fusion wurde mit Plasmiden transformiert, die entweder das Wildtyp *ptsN* oder die mutanten *ptsN*-H73A- oder *ptsN*-H73E-Allele unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors trugen. Die Stämme und Transformanten wurden in Minimalmedium mit Glukose und einer

Kaliumkonzentrationen von 0,1, 1 und 5 mM angezogen. Die Zellen wurden geerntet und β -Galaktosidase Messungen durchgeführt. In Abbildung 4.4.3 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

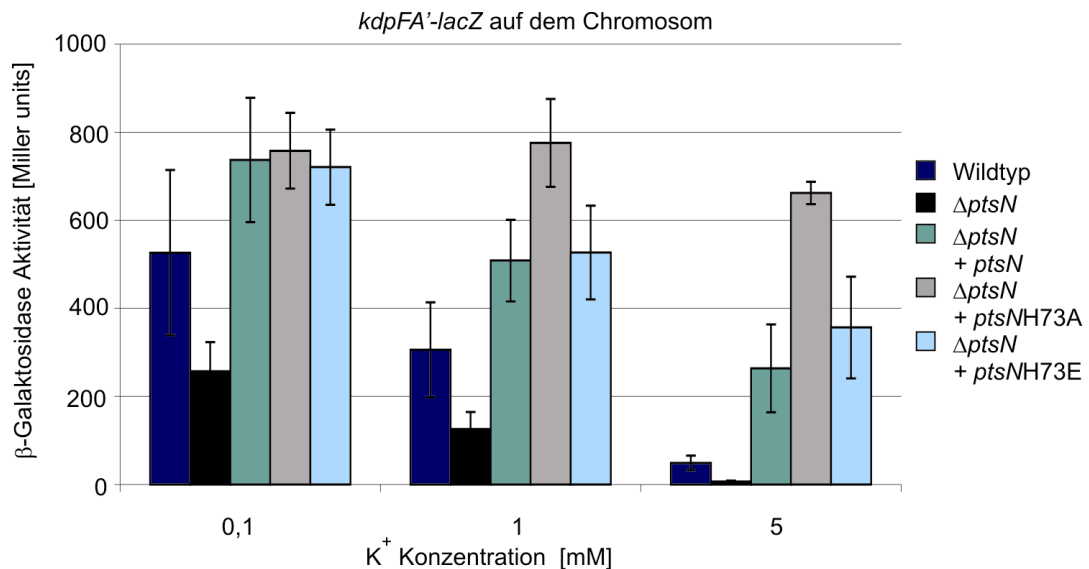


Abbildung 4.4.3: Die Expression von *kdpFABC* wird durch die Überproduktion der verschiedenen EIIA^{Ntr}-Varianten stimuliert. Der Wildtyp (Z367), die $\Delta ptsN$ Mutante (Z406) mit chromosomaler *kdpFA'-lacZ*-Fusion, sowie die $\Delta ptsN$ Mutante transformiert mit Plasmiden die für Wildtyp *ptsN*-, oder die mutanten *ptsN*-H73A- und *ptsN*-H73E-Allele kodieren (pBGG86; pBGG93 und pBGG334) wurden in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen unter Zugabe von 0,2% Arabinose angezogen. Die Zellen wurden geerntet und es wurden β -Galaktosidase Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind Mittelwerte von mehreren Messungen und sind in Miller units angegeben.

Die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion war im Wildtyp und der $\Delta ptsN$ Mutante bei niedrigen Kaliumkonzentrationen hoch und nahm mit steigenden Kaliumkonzentrationen des Mediums ab. Die gemessenen Werte des Wildtyps lagen immer höher als die Aktivität in der $\Delta ptsN$ Mutante (526 gegenüber 257, 366 versus 126 und 49 versus 6 Miller units) bei den verschiedenen Kaliumkonzentrationen (vgl. dunkelblaue und schwarze Säulen). Auch bei der Überexpression von Wildtyp *ptsN* und des *ptsNH73E*-Allels nahm die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion mit steigenden Kaliumkonzentrationen ab (grüne und hellblaue Säulen). Bei der Überexpression des *ptsNH73A*-Allels wurde die *kdpFA'-lacZ*-Fusion bei allen Kaliumkonzentrationen gleich stark exprimiert (graue Säulen). Die β -Galaktosidase-Aktivitäten aller drei Transformanten waren höher als die des Wildtyps (vgl. grüne, graue und hellblaue

Säulen mit dunkelblauen Säulen in Abbildung 4.4.3). Auch im Stamm S4197 ist die Expression des *kdpFABC*-Operons also von $EIIA^{Ntr}$ beeinflusst. Bei einer Kaliumkonzentration von 5 mM konnte der größte Unterschied der β -Galaktosidase-Aktivität zwischen Überproduktion des Wildtyp $EIIA^{Ntr}$ und der $EIIA^{Ntr}H73A$ -Variante, welche die unphosphorylierte Form des Protein simuliert, festgestellt werden (ca. Faktor 2,5). Da der Phosphorylierungsstatus bei dieser Kaliumkonzentrationen besonders entscheidend für die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion ist, war diese Anzuchtbedingung für das folgende Experiment sehr geeignet. Die Wahl der Kohlenstoffquelle sollte über die Veränderung des Phosphorylierungsstatus von $EIIA^{Ntr}$ einen Einfluss auf die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion haben. Um die Kreuzphosphorylierung zwischen den PTS-Systemen zu untersuchen, wurden der Wildtyp, die $\Delta ptsN$ Mutante und die $\Delta ptsP$ Mutante mit chromosomalen *kdpFA'-lacZ*-Fusionen in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM und unterschiedlichen C-Quellen angezogen. Die Zellen wurden geerntet und β -Galaktosidase Messungen durchgeführt (Abbildung. 4.4.4).

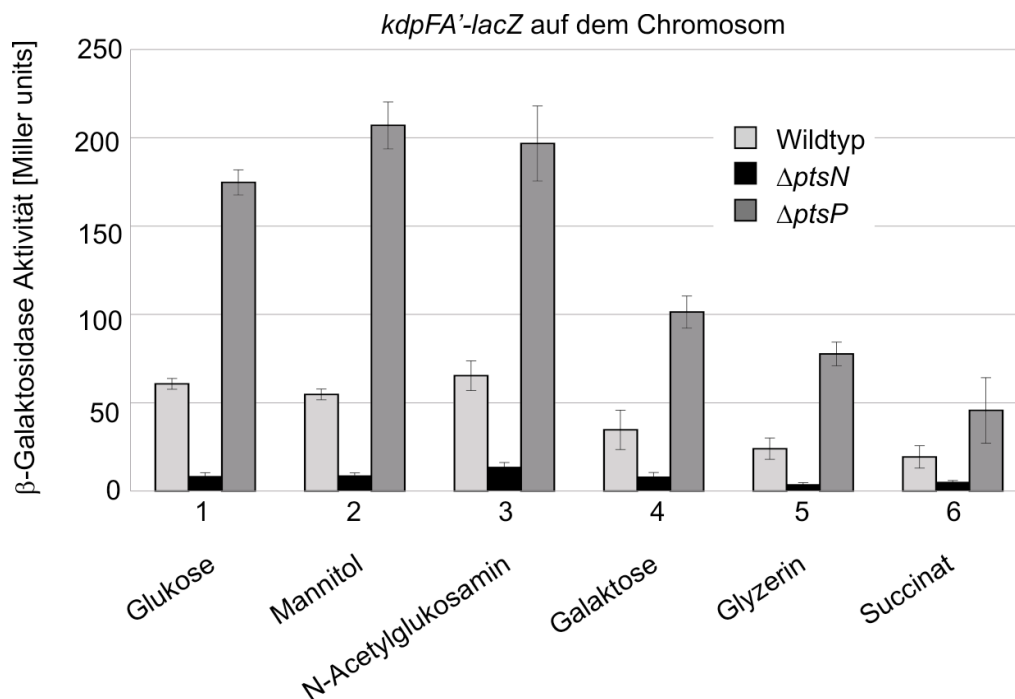


Abbildung 4.4.4: Die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen wirkt sich auf die Expression des *kdpFABC*-Operons aus. Der Wildtyp (Z367), die isogene $\Delta ptsN$ Mutante (Z406) und die $\Delta ptsP$ Mutante (Z520) mit chromosomalen *kdpFA'-lacZ*-Fusionen wurden in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentrationen von 5 mM und unterschiedlichen C-Quellen (Glukose, Mannitol, N-Acetylglukosamin, Galaktose, Glyzerin und Succinat) angezogen. Die Zellen wurden geerntet und anschließend

wurden β -Galaktosidase Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die β -Galaktosidase-Aktivität in der $\Delta ptsN$ Mutante veränderte sich bei unterschiedlichen C-Quellen kaum und die Aktivitäten waren sehr niedrig (schwarze Säulen). Die Expression der *kdpFA'*-*lacZ*-Fusion in der $\Delta ptsN$ Mutante war also wesentlich geringer als im Wildtyp und der $\Delta ptsP$ Mutante (vgl. schwarze Säulen mit hellgrauen und dunkelgrauen Säulen in Abbildung 4.4.4). Die Ergebnisse der β -Galaktosidase-Messungen zeigten weiterhin, dass die Expression der *kdpFA'*-*lacZ*-Fusion im Wildtyp als auch der $\Delta ptsP$ Mutante durch die verfügbare Kohlenstoffquelle, beeinflusst wurde (vgl. jeweils hellgraue und dunkelgraue Säulen untereinander). Im Wildtypstamm konnten hohe β -Galaktosidase-Werte gemessen werden, wenn dieser mit bevorzugten C-Quellen (Glukose, Mannitol und N-Acetylglukosamin) angezogen wurde. Bei Anzucht in untergeordneten C-Quellen (Galaktose, Glycerin und Succinat) war die Expression der *kdpFA'*-*lacZ*-Fusion im Vergleich zu den hochwertigen C-Quellen reduziert (vgl. hellgraue Säulen 4-6 mit 1-3 in Abbildung 4.4.4). Für die $\Delta ptsP$ Mutante war ein ähnliches Verhalten zu beobachten. Auch hier waren die β -Galaktosidase-Aktivitäten für die mit hochwertigen C-Quellen angezogenen Kulturen höher, als für die mit schlechteren C-Quellen angezogenen Kulturen (vgl. dunkelgraue Säulen 1-3 mit 4-6 in Abbildung 4.4.4). Die Expression der *kdpFA'*-*lacZ*-Fusion war in der $\Delta ptsP$ Mutante stets stärker als im Wildtyp. Außerdem hatte die Kohlenstoffquelle in der $\Delta ptsP$ Mutante einen stärkeren Einfluss auf die Expression der *kdpFA'*-*lacZ*-Fusion als im Wildtypstamm (vgl. jeweils dunkelgraue mit hellgrauen Säulen). Im Wildtyp als auch in der $\Delta ptsP$ Mutante wird die Expression des *kdpFABC*-Operon durch die Verwertung von bevorzugten C-Quellen stimuliert. In der $\Delta ptsN$ Mutante hat die Wahl der Kohlenstoffquelle keinen starken Einfluss. Folglich ist EIIA^{Ntr} notwendig, damit die Expression des *kdpFABC*-Operons durch die verwendete Kohlenstoffquelle beeinflusst wird. Dies korreliert mit Ergebnissen von anderen *E. coli* Stammsystemen, in denen die Einfluss der C-Quelle auf die Expression der *kdpFA'*-*lacZ*-Fusion untersucht worden war (Lüttmann *et al.*, 2009 und Daten nicht gezeigt). Zusammen mit den Beobachtungen der Veränderung des Phosphorylierungszustandes von EIIA^{Ntr} durch unterschiedliche C-Quellen (Abbildung 4.4.3) kann geschlossen werden, dass

durch Kreuzphosphorylierungen der beiden PTS-Systeme (kanonisches PTS und PTS^{Ntr}) die Expression EIIA^{Ntr}-abhängiger Gene reguliert wird. Durch die LacZ-Messungen zeigt sich, dass diese Kreuzphosphorylierung nicht nur in der $\Delta ptsP$ Mutante, sondern auch im Wildtyp eine Rolle spielt. EIIA^{Ntr} kann so in Antwort auf die Qualität der Kohlenstoffquelle die Synthese der Proteine des Kaliumtransporters KdpFABC modulieren. Im Wildtyp konnte keine sichtbare Veränderung des Phosphorylierungszustandes von EIIA^{Ntr} durch die Verwendung unterschiedlicher C-Quellen beobachtet werden. Allerdings hatte die Wahl der C-Quelle einen Einfluss auf die Expression der EIIA^{Ntr}-regulierten *kdpFA'-lacZ*-Fusion. Dies steht im Widerspruch zueinander. Es wird vermutet, dass ein sehr geringer, nicht nachweisbarer Anteil von EIIA^{Ntr} im Wildtyp unphosphoryliert vorliegt. Dieser geringe Anteil von unphosphoryliertem EIIA^{Ntr} ist wahrscheinlich für die Regulation der Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion verantwortlich. Der Phosphorylierungszustand dieses geringen Anteils von EIIA^{Ntr} wird im Wildtyp scheinbar durch die C-Quelle moduliert.

4.4.2. Der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} wird durch die Wachstumsphase bestimmt

Für *Pseudomonas putida* wurde beschrieben, dass sich der Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} in verschiedenen Wachstumsphasen unterscheidet. Während das Protein in der exponentiellen Wachstumsphase sowohl phosphoryliert als auch unphosphoryliert vorliegt, akkumuliert in der stationären Wachstumsphase die phosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} (Pflüger and de Lorenzo, 2007). Es wäre vorstellbar, dass sich auch in *E. coli* die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} in den Wachstumsphasen verändert. Um dies zu analysieren wurde die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} im Wildtyp und in der $\Delta ptsP$ Mutante untersucht.

Der Wildtypstamm und die $\Delta ptsP$ Mutante mit chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allelen wurden in LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Nach 1,5, 2, 4, 6 und 10 Stunden Wachstum wurden Proben entnommen. Die Proteine wurden durch eine native Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. EIIA^{Ntr}-3xFLAG wurde mit FLAG Antiserum im Western Blot detektiert (Abbildung 4.4.5).

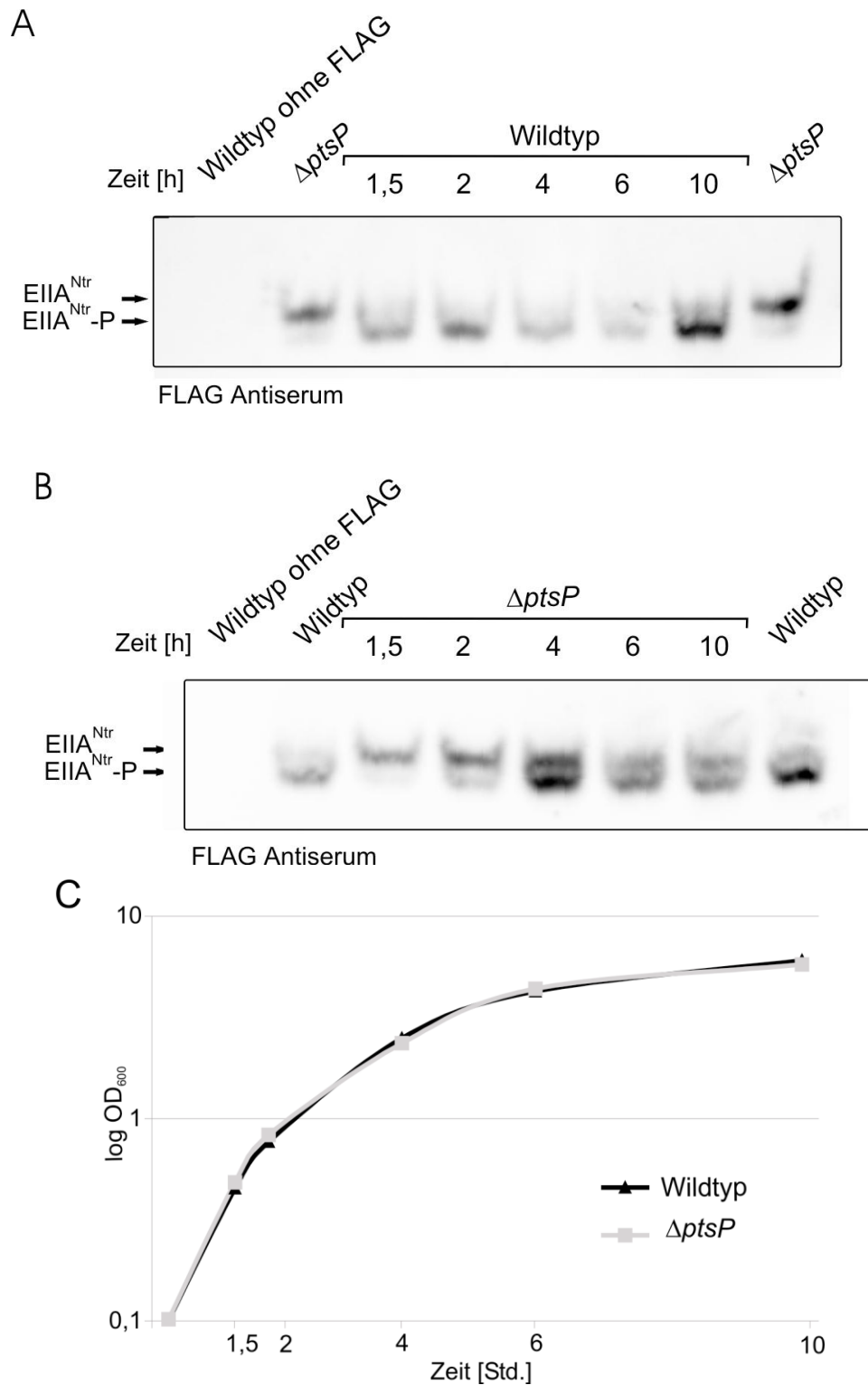


Abbildung 4.4.5: Die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}-3xFLAG wird durch die Wachstumsphase beeinflusst. Die Stämme mit dem chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allelen (Wildtyp Z424 und $\Delta ptsP$ Mutante Z436) wurden in LB-Medium angezogen (Wachstumskurve in (C)). Die Zellen wurden auf einem 12,5%igem Prosieve Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. EIIA^{Ntr}-3xFLAG wurde mit einem FLAG Antiserum detektiert. Als Kontrollen dienten der Wildtypstamm ohne Flag-Tag (S4197), sowie Wildtyp und $\Delta ptsP$ Mutante mit *ptsN*-3xFLAG-Allel.

Es konnte bereits in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden, dass EIIA^{Ntr}-3xFLAG im Wildtyp hauptsächlich phosphoryliert vorkommt, in der $\Delta ptsP$ Mutante allerdings vor allem im unphosphorylierten Zustand. Bei diesen Analysen wurden stets Extrakte von Zellen verwendet, die in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden. Hier wurde nun untersucht, ob sich die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}-3xFLAG in den Wachstumsphasen unterscheidet. Im Wildtyp konnte zu allen Messzeitpunkten augenscheinlich nur die phosphorylierte Form von EIIA^{Ntr}-3xFLAG detektiert werden (Spuren 3-7 in Abbildung 4.4.5 A). Hier scheint es keine offensichtliche Veränderung der Phosphorylierung EIIA^{Ntr}-3xFLAG zu geben. In der $\Delta ptsP$ Mutante lag EIIA^{Ntr}-3xFLAG in der exponentiellen Wachstumsphase (nach 1,5 Stunden) unphosphoryliert vor. Nach etwa zwei Stunden Wachstum war ein Teil des Proteins phosphoryliert (vgl. Spur 3 mit Spur 4 in Abbildung 4.4.5 B). Zu späteren Messzeitpunkten (4; 6 und 10 Stunden) waren beide Formen des Proteins in etwa gleichen Mengen vorhanden (Spuren 5-7 in Abbildung 4.4.5 B). Der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr}-3xFLAG verändert sich im Wildtyp entlang der Wachstumskurve scheinbar nicht. In der $\Delta ptsP$ Mutante liegt EIIA^{Ntr}-3xFLAG in der exponentiellen Wachstumsphase eher unphosphoryliert vor. In der späteren exponentiellen Phase und in der stationären Phase akkumuliert die phosphorylierte Form von EIIA^{Ntr}-3xFLAG. Die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}-3xFLAG wird also scheinbar an die Wachstumsbedingungen angepasst. Auch hier ist wie im Fall der Untersuchung des Einflusses der C-Quellen (Abschnitt 4.4.1.) zu vermuten, dass im Wildtyp eine sehr geringe, nicht nachweisbare Menge von EIIA^{Ntr} unphosphoryliert vorliegt. Auch in diesem Falle könnte der Phosphorylierungszustand dieses geringen Anteils durch die Wachstumsphase beeinflusst sein. Ein vorstellbarer Mechanismus wäre, dass die Verarmung an C-Quellen zu einer stärkeren Phosphorylierung der Proteine des kanonischen PTS führt. Dies könnte wiederum die stärkere Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} zur Folge haben.

4.4.3. Regulation des Phosphorylierungsstatus des PTS^{Ntr} durch die N-terminale GAF Domäne von EI^{Ntr}

4.4.3.1. Die GAF Domäne von EI^{Ntr} beeinflusst die Expression des *kdpFABC*-Operons

EI^{Ntr} besitzt, zusätzlich zu der konservierten EI Domäne, eine GAF Domäne am N-Terminus. Wie bereits beschrieben können GAF Domänen auf andere Domänen des Proteins wirken und die Aktivität dieser Domänen beeinflussen. Die GAF Domäne von EI^{Ntr} könnte daher die Phosphorylierung der EI Domäne regulieren. Die Änderung des Phosphorylierungszustandes von EI^{Ntr} sollte sich wiederum auch auf die Phosphorylierung von NPr und EIIA^{Ntr} auswirken. Der Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} ist für viele der durch EIIA^{Ntr} ausgeführten Regulationen wichtig. In Abschnitt 4.1.1. wurde gezeigt, dass sich der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} direkt auf die zellulären Mengen an KdpB und KdpC auswirkt. Nun sollte untersucht werden, ob die GAF Domäne von EI^{Ntr} wichtig für die EIIA^{Ntr} -vermittelte Modulation der zellulären Mengen an KdpB und KdpC ist. Hierfür wurde eine Mutante konstruiert, in der die Sequenz für N-terminale GAF Domäne und den Linker, welcher die GAF Domäne mit der EI Domäne verbindet, in *ptsP* deletiert wurde. Dieses verkürzte EI^{Ntr} -Protein war im authentischen *ptsP*-Locus kodiert und ersetzte das Wildtyp *ptsP*-Gen. Die 5'-UTR von *ptsP* blieb dabei erhalten (Durchführung siehe Abschnitt 3.2.4.12.3.). Der Wildtyp, die ΔptsP Mutante und der neu konstruierte Stamm mit der *ptsP\Delta*GAF Deletion wurden in Minimalmedium mit Glukose und einer Kaliumkonzentrationen von 1, 5 oder 10 mM angezogen. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und die Proteinextrakte durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. KdpB und KdpC wurden mit einem spezifischen Antiserum im Western Blot detektiert (Abbildung.4.4.6).

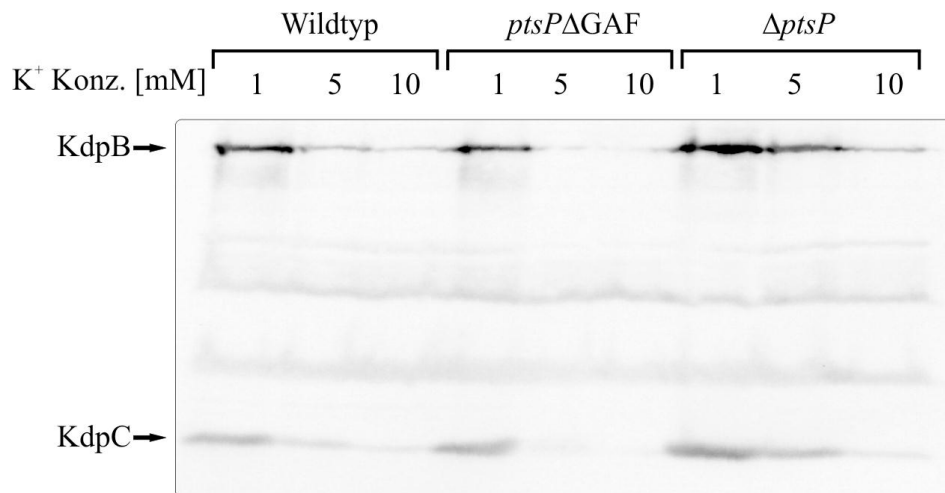


Abbildung 4.4.6: Die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} bewirkt eine Reduktion der Mengen an KdpB und KdpC. Der Wildtyp (R1279), die *ptsPΔGAF* Mutante (Z156) und die $\Delta ptsP$ Mutante (R2404) wurden in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen (1, 5 und 10 mM) angezogen. Die Gesamtzellextrakte wurden durch eine denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und KdpB und KdpC durch einen Western Blot mit KdpB/KdpC Antiserum sichtbar gemacht. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von mehreren unabhängigen Western Blots.

Wie bereits mehrfach gezeigt (s. Abb. 4.1.1) wurde die Synthese von KdpB und KdpC durch hohe Kaliumkonzentrationen gehemmt. Die Menge an KdpB und KdpC nahm stets mit steigenden Kaliumkonzentrationen ab. Dies war im Wildtyp, als auch in den beiden Mutanten zu beobachten (vgl. jeweils K⁺ Konz. 1 mit 5 und 10 mM). Wie schon zuvor gezeigt, konnte in der $\Delta ptsP$ Mutante bei allen Kaliumkonzentrationen mehr KdpB und KdpC detektiert werden als im Wildtyp unter gleichen Bedingungen (Abbildung 4.4.6 und Abschnitt 4.1.1.). Die *ptsPΔGAF* Mutante zeigte das gegenteilige Verhalten. Hier war bei allen Kaliumkonzentrationen weniger KdpB und KdpC vorhanden als im Wildtyp. Folglich wird durch die Deletion der GAF Domäne die Akkumulation von KdpB und KdpC verhindert. Dies könnte auf eine verminderte Transkription des *kdpFABC*-Operons zurückgeführt werden.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde über die *attB*-Stelle eine *kdpFA'-lacZ*-Fusion in das Chromosom der *ptsPΔGAF* Mutante integriert. Der Wildtyp, die $\Delta ptsN$ -, die $\Delta ptsP$ -, sowie die *ptsPΔGAF*-Mutante, jeweils mit chromosomaler *kdpFA'-lacZ*-Fusion, wurden in Minimalmedium mit Glukose und verschiedenen

Kaliumkonzentrationen bis in die exponentielle Phase angezogen. Die Zellen wurden geerntet und β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.4.7).

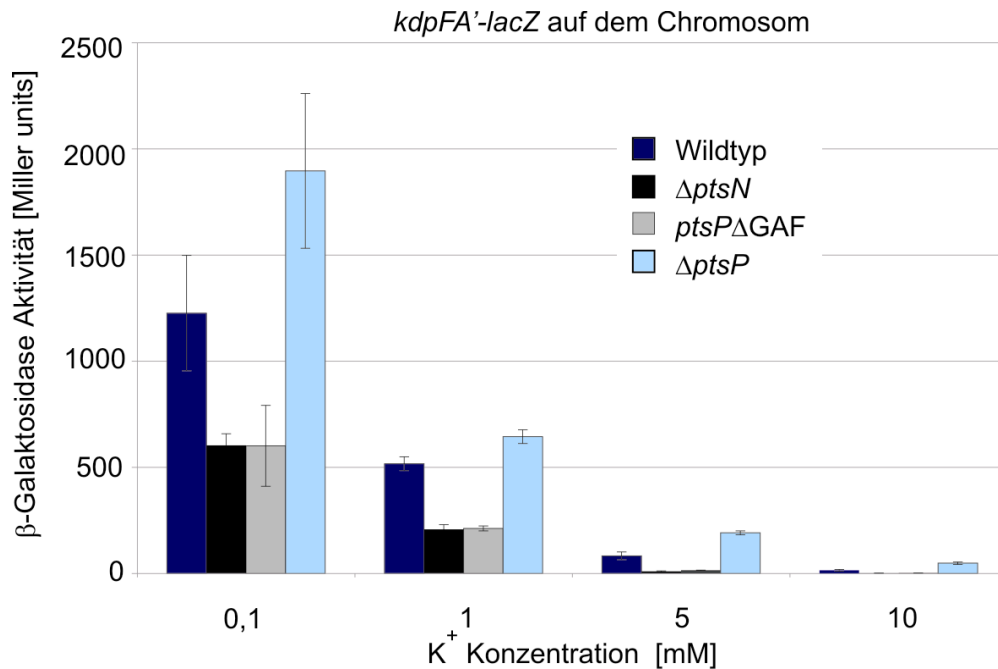


Abbildung 4.4.7: Die GAF Domäne von EI^{Ntr} stimuliert die Expression des *kdp*-Operons. Der Wildtyp (Z367), die $\Delta ptsN$ Mutante (Z406), die *ptsP* Δ GAF Mutante (Z381) und die $\Delta ptsP$ Mutante (Z520) mit chromosomalen *kdpFA'-lacZ*-Fusionen wurden in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen angezogen. Die Zellen wurden geerntet und es wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und Messungen.

In allen Stämmen nahm die β -Galaktosidase-Aktivität mit steigender Kaliumkonzentration ab. Dies konnte auch für die *ptsP* Δ GAF Mutante beobachtet werden (graue Säulen in Abbildung 4.4.7). Die *kdpFA'-lacZ*-Fusion wurde in der $\Delta ptsP$ Mutante bei allen Kaliumkonzentrationen stärker als im Wildtyp exprimiert (vgl. hellblaue mit dunkelblauen Säulen in Abbildung 4.4.7). Wie schon in vorherigen Experimenten gezeigt, waren die β -Galaktosidase-Aktivitäten in der $\Delta ptsN$ Mutante bei allen Kaliumkonzentrationen geringer als im Wildtyp (vgl. schwarze mit dunkelblauen Säulen). Für die *ptsP* Δ GAF Mutante wurden sehr ähnliche Werte wie für die $\Delta ptsN$ Mutante erhalten (vgl. graue mit schwarzen Säulen in Abbildung 4.4.7). Ist die GAF Domäne von EI nicht vorhanden, so ist die Expression des *kdpFABC*-Operons reduziert. Die in Abbildung 4.4.6 beobachtete Reduktion der Mengen an KdpB und KdpC beruht

also auf einer verminderten Expression des *kdp*-Operons in der *ptsPΔGAF* Mutante. Da bereits gezeigt wurde, dass EI^{Ntr} durch die Steuerung von $EIIA^{Ntr}$ auf die Expression des *kdpFABC*-Operons wirkt (siehe Abschnitt 4.1.1.), sollte die Reduktion der Expression des *kdpFABC*-Operons in der *ptsPΔGAF* Mutante von $EIIA^{Ntr}$ abhängen.

Hierzu wurde überprüft, ob die Überexpression von *ptsN* den negativen Effekt der Deletion der GAF Domäne auf die *kdp*-Expression komplementieren kann. Hierzu wurden der Wildtyp, die *ptsPΔGAF* Mutante und die Transformanten der beiden Stämme mit einem Plasmid, welches *ptsN* unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors trug, in Minimalmedium mit Glukose und einer Kaliumkonzentration von 1, 10 oder 115 mM angezogen. Die Kulturen wurden geerntet und β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.4.8).

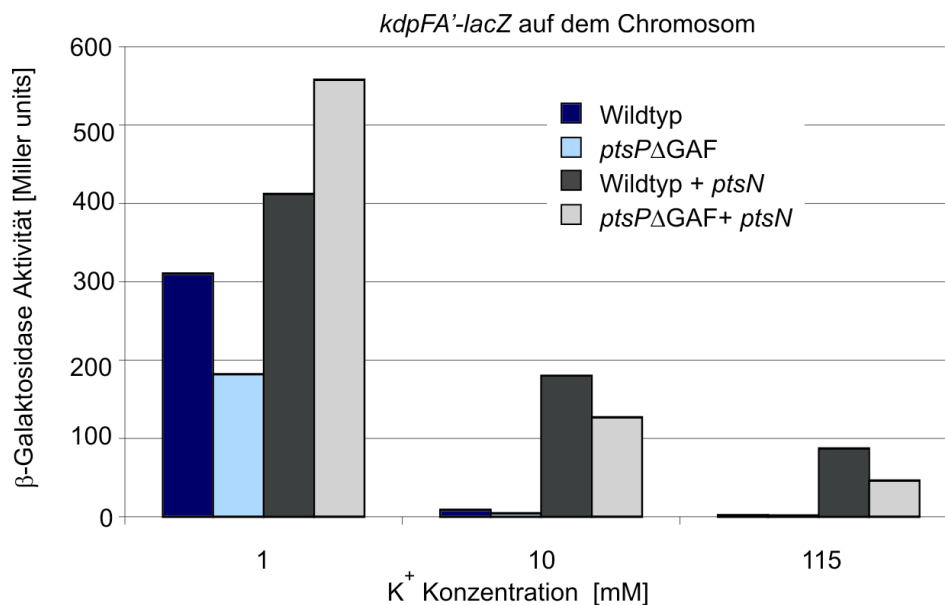


Abbildung 4.4.8: Die Überexpression von *ptsN* komplementiert die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} . Der Wildtyp (Z367) und die *ptsPΔGAF* Mutante (Z381) mit chromosomalen *kdpFA'-lacZ*-Fusionen wurden mit einem Arabinose-induzierbaren *ptsN*-Überexpressionsplasmid (pBGG86) transformiert. Die Stämme und Transformanten wurden in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen angezogen. Die Expression von *ptsN* wurde durch Zugabe von Arabinose induziert. Die Zellen wurden geerntet und es wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben.

Die Messungen zeigen, dass die β -Galaktosidase-Aktivitäten in beiden Stämmen durch die Überexpression von *ptsN* stark anstiegen. Die erhaltenen Aktivitäten für beide komplementierten Stämme waren sehr ähnlich und waren je nach Kaliumkonzentration

circa 2- bis 20-fach höher als in den Ausgangsstämmen (vgl. dunkelgraue mit dunkelblauen und hellgraue mit hellblauen Säulen in Abbildung 4.4.8). Der negative Effekt einer Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} kann also durch die Überproduktion von EIIA^{Ntr} ausgeglichen werden. Es wäre also möglich, dass die GAF Domäne die Phosphorylierung von EI^{Ntr} reguliert und so auch auf den Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} wirkt. Die *ptsPΔGAF* Mutante zeigt die gleichen Auswirkungen auf die Expression des *kdpFABC*-Operons wie die *ΔptsN* Mutante. Es ist zu vermuten, dass bei Abwesenheit der GAF Domäne von EI^{Ntr} EIIA^{Ntr} vollständig phosphoryliert vorliegt und somit die Expression des *kdpFABC*-Operons nicht mehr stimulieren kann. Da die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} in dieser Mutante also zunehmen sollte, sollte die Interaktion von EIIA^{Ntr} und der Sensor kinase KdpD abgeschwächt sein. Über diesen Mechanismus sollte dann folglich die Expression des *kdpFABC*-Operons reduziert sein. Um diese Theorie zu beweisen, wurde die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit der Sensor kinase KdpD in der *ptsPΔGAF* Mutante untersucht.

4.4.3.2. Die GAF Domäne von EI^{Ntr} ist für die KdpD-EIIA^{Ntr} Interaktion essentiell

Für die Untersuchungen wurde eine Mutante des Analysestammes BTH101 für das Two-Hybrid System mit einer *ptsPΔGAF* Deletion konstruiert. Der Wildtyp, die *ptsPΔGAF* Mutante und die *ΔptsP* Mutante wurden mit kompatiblen Plasmiden kotransformiert, die für T25-*ptsN* und T18-*kdpD* kodieren. Um zu untersuchen, ob nicht durch die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} generell Interaktionen beeinflusst werden, wurde auch die Interaktion der Positivkontrolle dieses Systems, die Interaktion des Leucin-Zippers von Gcn4 in der *ptsPΔGAF* Mutante untersucht. Hierzu wurde der Wildtyp und die *ptsPΔGAF* Mutante mit den Plasmiden pKT25-*zip* und pUT18C-*zip* kotransformiert. Die Interaktionen wurden zunächst phänotypisch analysiert. Geeignete Verdünnungen der Kulturen der verschiedenen Transformanten wurden auf LB-Selektionsplatten mit X-Gal und IPTG getropft und die Interaktion von KdpD und EIIA^{Ntr} analysiert (Abbildung 4.4.9).

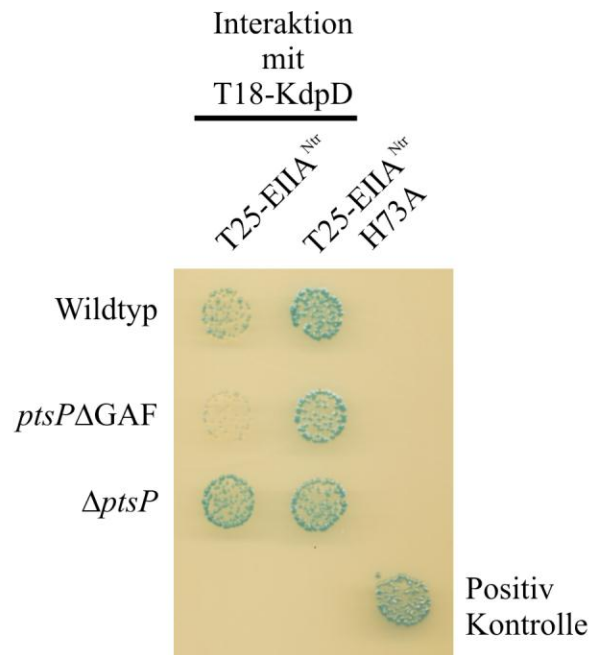


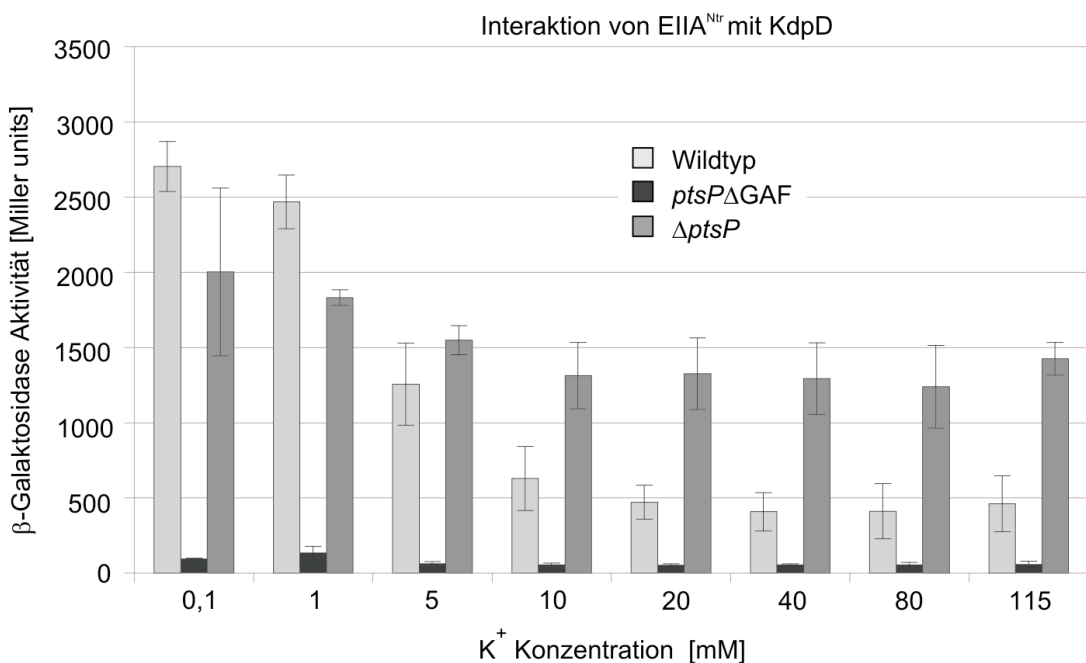
Abbildung 4.4.9: Interaktionsanalyse von KdpD mit EIIA^{Ntr}. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (T25-*ptsN*: pBGG261; T25-*ptsNH73A*: pBGG261; T18-*kdpD*: pBGG264) wurden in den Stamm BTH101 und die *ptsP*ΔGAF-(Z346) und die Δ*ptsP*-Derivate von BTH101 (Z337) kotransformiert. Die Plasmide der Positivkontrolle (pKT25-*zip* und pUT18C-*zip*) wurden in BTH101 eingebracht. Die erhaltenen Kolonien wurden phänotypisch auf LB-Selektionsplatten mit X-Gal und IPTG analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel des Experiments.

In dieser phänotypischen Analyse der Interaktion zeigte sich durch die Blaufärbung der Kolonien, dass EIIA^{Ntr} und KdpD im Wildtyp und in der Δ*ptsP* Mutante interagierten. Ebenso war in beiden Stämmen eine Interaktion von EIIA^{Ntr}H73A und KdpD zu beobachten. In einer *ptsP*ΔGAF Mutante verhielt sich dies anders. Eine Interaktion von EIIA^{Ntr}H73A und KdpD war auch in diesem Stamm zu erkennen. Eine Interaktion zwischen EIIA^{Ntr} und KdpD war nicht zu beobachten. Die Kolonien bleiben weiß.

Zur quantitativen Untersuchung der Interaktion wurden die oben erwähnten Two-Hybrid Plasmide in die verschiedenen BTH101 Derivate transformiert und die Kulturen in Minimalmedium mit Glukose und einer Kaliumkonzentration von 1, 10 und 115 mM angezogen. Die Zellen wurden geerntet und es wurden anschließend β-Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung.4.4.10). Die β-Galaktosidase-Aktivitäten waren im Wildtyp und der Δ*ptsP* Mutante bei geringen Kaliumkonzentrationen wie 0,1 und 1 mM sehr hoch. Dies sprach für eine starke Interaktion zwischen den EIIA^{Ntr} und KdpD (hell-

und dunkelgraue Säulen 1 und 2 in Abbildung 4.4.10 A). Die β -Galaktosidase-Aktivität, also die Interaktion nahm im Wildtyp mit steigender Kaliumkonzentration ab (vgl. hellgraue Säulen untereinander). In der $\Delta ptsP$ Mutante blieb die Interaktion bei allen Kaliumkonzentrationen sehr stark (vgl. dunkelgraue Säulen untereinander). In der Mutante mit Deletion der GAF Domäne hingegen ging die Interaktion fast vollständig verloren. Die gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten waren bei allen Kaliumkonzentrationen sehr gering (schwarze Säulen in Abbildung 4.4.10 A). Dies deutet darauf hin, dass es in dieser Mutante zu keiner oder einer nur sehr schwachen Interaktion zwischen $EIIA^{Ntr}$ und KdpD kommt. Als Kontrollen wurde die Interaktion des Gcn4-Leucin Zippers in der $ptsP\Delta GAF$ Mutante analysiert. Die Deletion wirkte sich auf die Interaktion der Positivkontrolle des Two-Hybrid Systems nicht aus. Im Wildtyp und der $ptsP\Delta GAF$ Mutante wurden ähnliche Werte erhalten (vgl. graue mit schwarzen Säulen in Abbildung 4.4.10 B). Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die GAF Domäne von EI^{Ntr} für die Interaktion von $EIIA^{Ntr}$ mit KdpD essentiell ist. Durch den Verlust der Interaktion in dieser Mutante ist auch die Reduktion der Expression des kdp -Operons erklärbar (Abbildung 4.4.7).

A



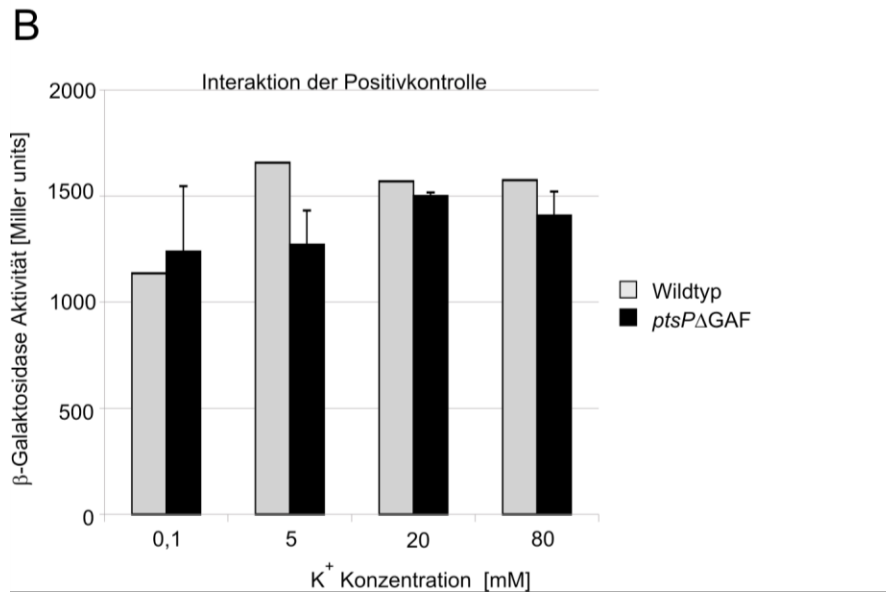


Abbildung 4.4.10: Die GAF Domäne von EI^{Ntr} ist für die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} essentiell. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (T18-*kdpD*: pBGG264; T25-*ptsN*: pBGG261), wurden in den Stamm BTH101, die *ptsP*Δ*GAF* Mutante (Z346) und die Δ*ptsP* Mutante (Z337) kotransformiert. Von den erhaltenen Kolonien wurden Kulturen in Kaliummedium angezogen und LacZ-Messungen durchgeführt. (A) β-Galaktosidase-Messungen der Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} in den verschiedenen Stämmen. (B) β-Galaktosidase-Messungen der Positivkontrolle (pKT25-*zip* und pUT18C-*zip*) in BTH101 und BTH101 *ptsP*Δ*GAF* (Z346) in Medium mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen. Die β-Galaktosidase-Aktivitäten sind Mittelwerte von unabhängigen Messungen und in Miller units angegeben.

Weiterhin bestand die Vermutung, dass die GAF Domäne die Phosphorylierung der Proteine des PTS^{Ntr} beeinflusst. Der Verlust der Interaktion von EIIA^{Ntr} mit KdpD in der *ptsP*Δ*GAF* Mutante wäre durch eine Hyperphosphorylierung von EIIA^{Ntr} zu erklären (wie in Abbildung 4.4.10 festgestellt). In diesem Fall sollte die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} keine Auswirkung auf die Interaktion von KdpD mit den mutanten EIIA^{Ntr}H73A- und EIIA^{Ntr}H73E-Varianten haben.

Im Folgenden wurde daher die Interaktion von KdpD mit dem verschiedenen EIIA^{Ntr}-Varianten im Wildtypstamm und der *ptsP*Δ*GAF* Mutante untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden Transformanten in Minimalmedium mit Glukose und verschiedenen Kaliumkonzentrationen angezogen. Anschließend wurden β-Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.4.11).

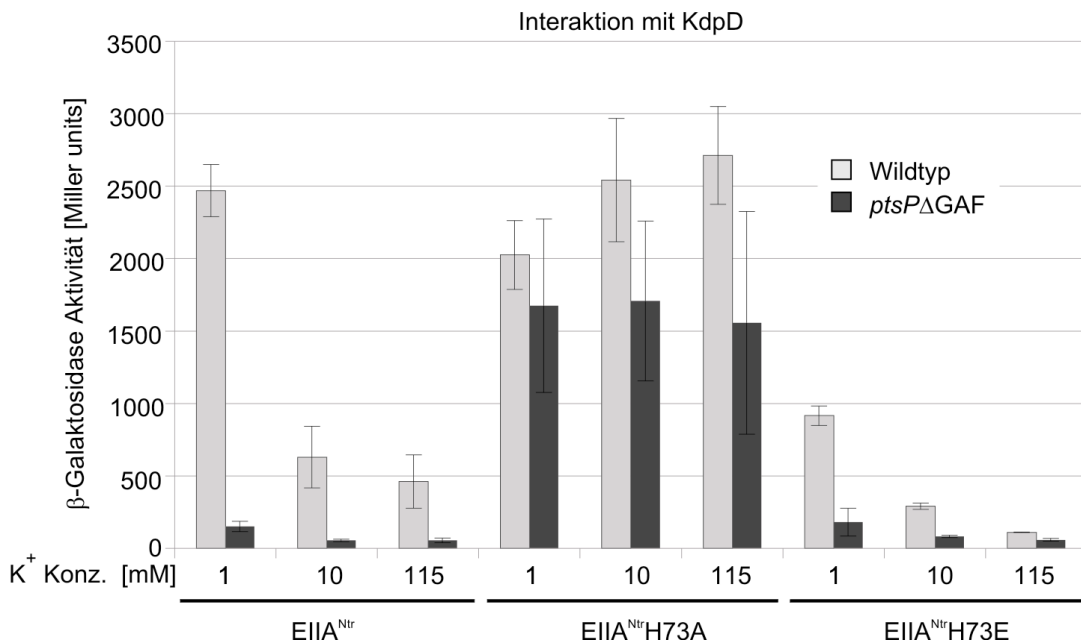


Abbildung 4.4.11: Nur die Interaktionen von KdpD mit EIIA^{Ntr} und der EIIA^{Ntr}H73E-Variante werden von der GAF Domäne von EI^{Ntr} beeinflusst. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (T18-*kdpD*: pBGG264; T25-*ptsN*: pBGG261; T25-*ptsNH73A*: pBGG262; T25-*ptsNH73E*: pBGG336), wurden in den Stamm BTH101 und die *ptsPΔGAF* Mutante (Z346) kotransformiert. Von den erhaltenen Kolonien wurden Kulturen in Medium mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen angezogen und LacZ-Messungen durchgeführt. Die β-Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und Messungen.

Die Interaktion zwischen den EIIA^{Ntr}-Varianten und KdpD war bei einer sehr geringen Kaliumkonzentrationen wie 1 mM im Wildtypstamm sehr stark. Bei steigenden Kaliumkonzentrationen unterschied sich das Interaktionsverhalten der verschiedenen EIIA^{Ntr}-Proteine voneinander (vgl. jeweils hellgraue Säulen in Abbildung 4.4.11). Die Interaktion von KdpD mit dem EIIA^{Ntr} Wildtypprotein nahm mit steigenden Kaliumkonzentrationen ab. Das EIIA^{Ntr}H73E-Protein zeigte ein ähnliches Verhalten, auch hier wurde die Interaktion mit steigenden Kaliumkonzentrationen schwächer. Dabei war zu beobachten, dass die Interaktion von EIIA^{Ntr}H73E mit KdpD bei allen untersuchten Kaliumkonzentrationen schwächer war als die Interaktion zwischen KdpD und dem EIIA^{Ntr} Wildtypprotein unter gleichen Bedingungen. Die Stärke der Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr}H73A veränderte sich durch die unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen nicht. Die Interaktion war bei allen Kaliumkonzentrationen in etwa gleich stark und war vergleichbar mit der Interaktion von Wildtyp EIIA^{Ntr} mit KdpD bei einer Kaliumkonzentration von 1 mM. In einer *ptsPΔGAF* Mutante zeigte die

Interaktion der EIIA^{Ntr}H73A-Variante mit KdpD keinen drastischen Unterschied zum Wildtypstamm. Die LacZ-Aktivitäten waren bei allen Kaliumkonzentrationen gleich und waren etwas niedriger als die Werte für den Wildtyp. Die Interaktionen von Wildtyp EIIA^{Ntr} und der EIIA^{Ntr}H73E-Variante mit KdpD waren dem gegenüber in der *ptsPΔGAF* Mutanten stark reduziert. Während bei einer Kaliumkonzentration von 1mM noch eine schwache Interaktion beobachtet wurde, ging diese bei höheren Kaliumkonzentrationen verloren. Also wird neben der Interaktion von Wildtyp EIIA^{Ntr} mit KdpD auch die Interaktion der EIIA^{Ntr}H73E-Variante mit KdpD durch die Abwesenheit der GAF Domäne von EI^{Ntr} beeinflusst. Die H73E Mutation sollte die phosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} vortäuschen und verhielt sich in allen bisherigen Experimenten dem entsprechend. Da das EIIA^{Ntr}H73E-Protein durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung nicht mehr beeinflussbar sein sollte, sollte eigentlich auch die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} keinen Einfluss auf die Interaktion mit KdpD haben. Eine Möglichkeit um diesen Einfluss zu erklären, wäre, dass in diesen Versuchen auch das authentische EIIA^{Ntr} in der Zelle vorliegt und die Ergebnisse der Interaktionsanalyse beeinflusst. Die andere Möglichkeit wäre, dass die Proteine des PTS^{Ntr} einen Komplex bilden, sobald die Phosphorylierungskaskade abläuft. EIIA^{Ntr}H73A sollte hiervon nicht beeinflusst sein, da diese Variante die unphosphorylierte Form des Proteins simuliert und so möglicherweise nicht Teil des Komplexes ist. Das Wildtyp EIIA^{Ntr} und die EIIA^{Ntr}H73E-Variante wären Teil dieses Komplexes. Über die Bildung des Komplexes könnte die Interaktion mit KdpD verhindert werden. Diese Vermutung wurde in Abschnitt 4.4.4.2. untersucht.

4.4.3.3.1. Die GAF Domäne von EI^{Ntr} hat einen positiven Einfluss auf die Regulation des Pho-Regulons

Wie bereits in Abschnitt 4.2. beschrieben, wirkt sich das Stickstoff-PTS auf die Expression der Gene des Pho-Regulons aus. Durch die direkte Interaktion von EIIA^{Ntr} mit der Sensorkinase PhoR wird die Aktivität des PhoR/PhoB Zwei-Komponenten Systems stimuliert und die Gene des Pho-Regulons werden stärker exprimiert. Da der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} eine entscheidende Rolle für diese Regulation hat, sollte auch hier der Einfluss der GAF Domäne von EI^{Ntr} untersucht werden. Hierzu wurde in den Stämmen mit den verschiedenen *pho-lacZ*-Fusionen die *ptsPΔGAF*

Deletion eingebracht. Der Wildtyp, die $\Delta ptsN$ Mutante, sowie die $ptsP\Delta GAF$ und $\Delta ptsP$ Mutanten mit den verschiedenen chromosomalen Reporterfusionen wurden in HiPi- und LoPi-Medium angezogen. Die Zellen wurden geerntet und LacZ-Aktivitätsmessung durchgeführt (Abbildung 4.4.12).

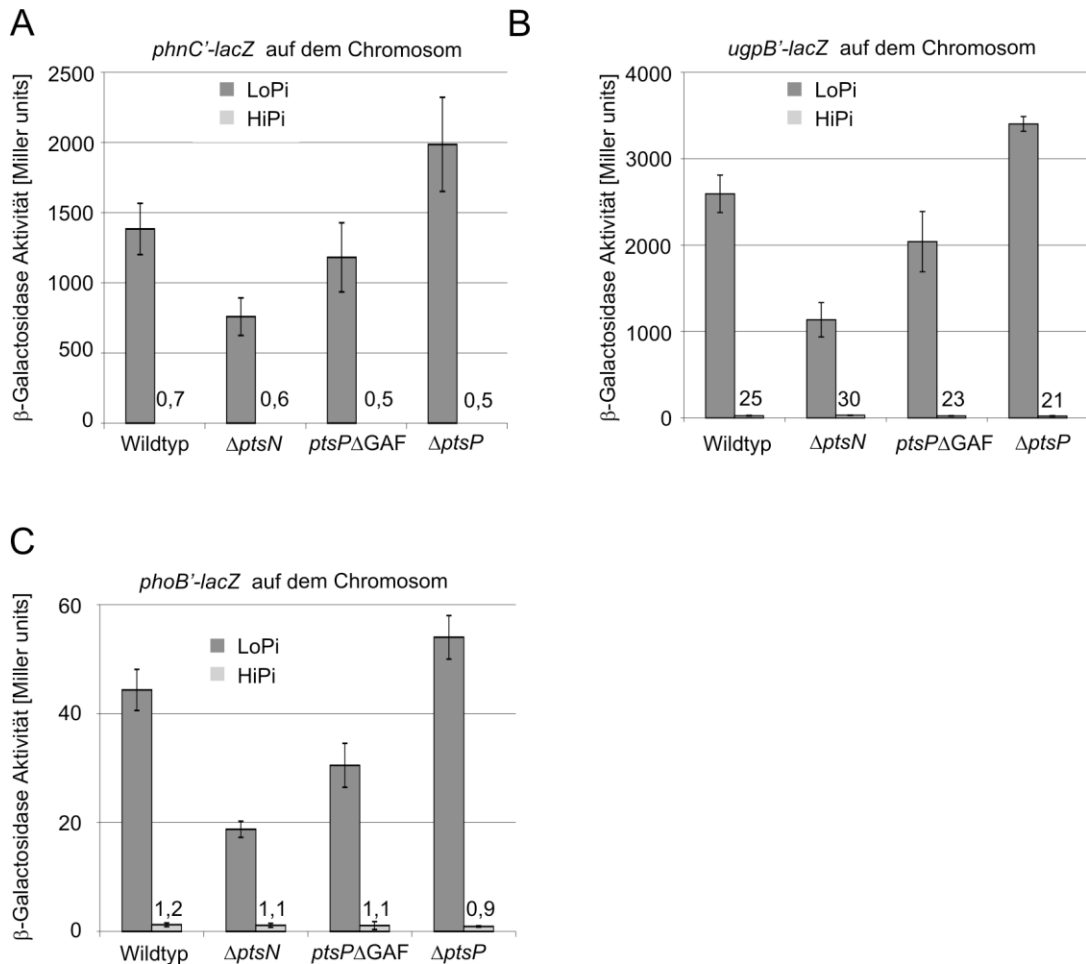


Abbildung 4.4.12: Die Deletion der GAF Domäne reduziert die Expression der Gene des Pho-Regulons bei Phosphatmangel. Die Stämme mit den chromosomal lokalisierten *phnC*-5'-*lacZ*-, *ugpB*-5'-*lacZ*- und *phoB*-5'-*lacZ*-Reporterfusionen wurden in HiPi- und LoPi-Medium mit Glukose angezogen. Die Zellen wurden geerntet und eine LacZ-Aktivitätsmessung durchgeführt. (A) Die Aktivität der chromosomalen *phnC*-5'-*lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z344); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z413), sowie den $ptsP\Delta GAF$ (Z474) und $\Delta ptsP$ (Z475) Mutanten wurde untersucht. (B) Die Aktivität der chromosomalen *ugpB*-5'-*lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z440); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z437), sowie den $ptsP\Delta GAF$ (Z465) und $\Delta ptsP$ (Z466) Mutanten wurde untersucht. (C) Die Aktivität der chromosomalen *phoB*-5'-*lacZ*-Fusion im Wildtyp (Z441); der isogenen $\Delta ptsN$ Mutante (Z438), sowie den $ptsP\Delta GAF$ (Z468) und $\Delta ptsP$ (Z469) Mutanten wurde analysiert. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und Messungen.

Für in HiPi-Medium gezogene Kulturen zeigte sich, dass in allen Fällen die β -Galaktosidase-Aktivitäten sehr gering waren. Unter diesen Anzuchtbedingungen wurden die Gene des Pho-Regulons nicht exprimiert. Die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} zeigte unter diesen Bedingungen keine Auswirkungen (hellgraue Balken in Abbildung 4.4.12 A, B und C). Die Ergebnisse, für die in LoPi-Medium gezogenen Kulturen zeigten, dass in allen Fällen die Expression der *lacZ*-Fusionen durch die Deletion von *ptsN* im Vergleich zum Wildtyp stark abnahm (vgl. jeweils dunkle Säule 2 mit 1). Dies bedeutet, dass die Anwesenheit von $EIIA^{Ntr}$ auf alle *lacZ*-Fusionen einen positiven Effekt hat. Die Deletion von *ptsP* bewirkte einen Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivitäten aller Fusionen im Vergleich zum Wildtyp (vgl. jeweils dunkle Säule 4 mit 1 in Abbildung 4.4.12 A, B und C). Dieser Anstieg betrug bei allen verwendeten *lacZ*-Fusionen etwa 30%. Die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} zeigte einen anderen Einfluss auf die Expression der *lacZ*-Fusionen. Hier sank die Aktivität für alle getesteten Reporterfusionen im Vergleich zum Wildtyp um 15 bis 30% ab (vgl. jeweils dunkle Säule 3 mit 1 in Abbildung 4.4.12 A, B und C). Folglich kann geschlossen werden, dass die GAF Domäne von EI^{Ntr} auch für die vollständige Expression der Gene des Pho-Regulons benötigt wird. Dies korreliert mit den Beobachtungen für den Einfluss der GAF Domäne von EI^{Ntr} auf die Expression des *kdp*-Operons (siehe Abschnitt 4.4.3.1.) Für die Regulation der Expression der Gene des Pho-Regulons wäre daher ein ähnlicher Mechanismus wie für die Regulation der Expression des *kdp*-Operons denkbar. Die Hyperphosphorylierung von $EIIA^{Ntr}$ in der *ptsP* Δ GAF Mutante könnte die Interaktion zwischen PhoR und $EIIA^{Ntr}$ vermindern.

4.4.3.4. Die Rolle der GAF Domäne in EI^{Ntr} für die Phosphorylierung von $EIIA^{Ntr}$

Die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} wirkt sich auf die $EIIA^{Ntr}$ -vermittelten Regulationsprozesse aus. Es konnte in den vorherigen Experimenten gezeigt werden, dass die Expression von Genen des Kaliumtransporters KdpFABC und des Pho-Regulons durch die Abwesenheit der GAF Domäne von EI^{Ntr} reprimiert werden. Es ist möglich, dass die Änderung des Phosphorylierungszustandes der PTS^{Ntr} Proteine zu dieser Veränderung führt. Um dem auf den Grund zu gehen, wurde der Phosphorylierungszustand von $EIIA^{Ntr}$ in der *ptsP* Δ GAF Mutante untersucht. Hierzu

wurde ein Stamm konstruiert, welcher eine *ptsP* Δ GAF Deletion und ein chromosomales *ptsN*-3xFLAG-Allel besitzt. Zusammen mit dem isogenen Wildtyp und der Δ *ptsP* Mutante wurde der Stamm in Minimalmedium mit Glukose und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen (0,1, 10 und 115 mM) und in Medium mit wenig (LoPi) und viel Phosphat (HiPi) angezogen. Diese Medien waren in den vorangegangenen Versuchen verwendet worden. Die Zellen wurden geerntet und die Zellextrakte sowohl durch denaturierende als auch durch native Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. EIIA^{Ntr}-3xFLAG wurde im Western Blot mit FLAG Antiserum nachgewiesen (Abbildung 4.4.13 und 4.4.14).

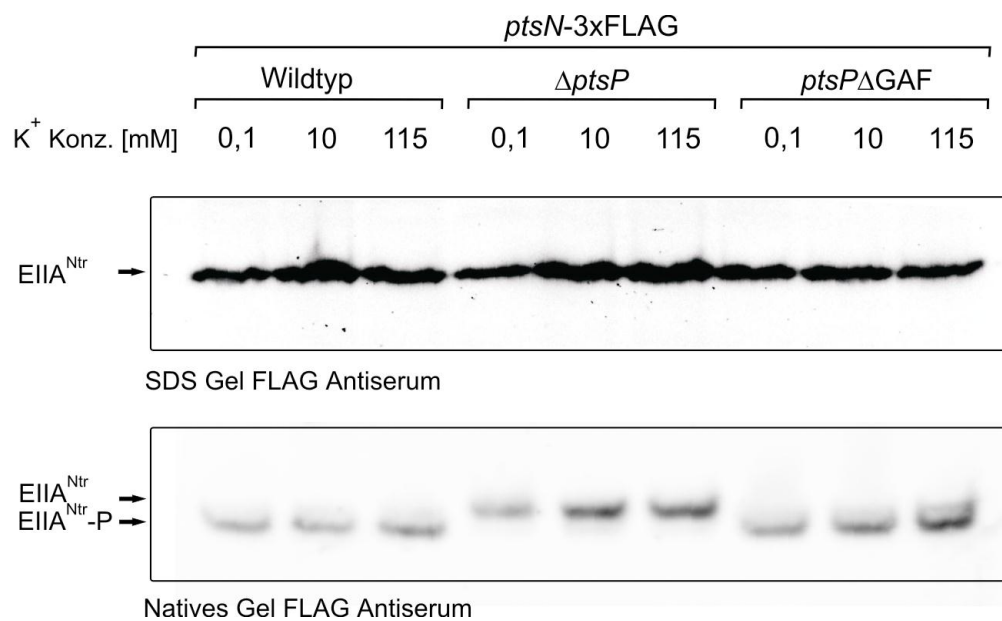


Abbildung 4.4.13: Die Phosphorylierung und Proteinmenge von EIIA^{Ntr}-3xFLAG wird durch die GAF Domäne von EI^{Ntr} augenscheinlich nicht beeinflusst. Die Stämme mit den chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allelen wurden in Minimalmedium mit 0,1, 10 und 115 mM Kalium angezogen, Zellextrakte auf einer 12,5% SDS-PAGE und einem 12,5%igem Prosieve Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. Der Wildtyp mit *ptsN*-3xFLAG-Fusion (Z424), sowie die Δ *ptsP* Mutante (Z436) und die *ptsP* Δ GAF Mutante (Z435) mit *ptsN*-3xFLAG-Fusionen wurden untersucht. EIIA^{Ntr}-3xFLAG wurde mit einem FLAG Antiserum detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von unabhängigen Western Blots.

Im Blot des denaturierenden Gels ist zu erkennen, dass die Proteinmenge an EIIA^{Ntr} in allen drei getesteten Stämmen und bei den unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen in etwa gleich war (oberer Blot in Abbildung 4.4.13). Die zelluläre Menge an EIIA^{Ntr} wird folglich durch die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} nicht verändert. Der Blot des nativen Gels (unterer Blot in Abbildung 4.4.13) zeigte, dass EIIA^{Ntr} im Wildtyp und auch in der *ptsP* Δ GAF Mutante hauptsächlich phosphoryliert vorlag. In der Δ *ptsP*

Mutante war das Protein vollständig unphosphoryliert. Die Phosphorylierung von $EIIA^{Ntr}$ wurde durch die verwendete Kaliumkonzentration im Anzuchtmedium nicht verändert. Die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} hat augenscheinlich keinen Einfluss auf den Phosphorylierungszustand von $EIIA^{Ntr}$. Die Ergebnisse für die in LoPi- und HiPi-Medium angezogenen Kulturen waren ähnlich (Abbildung 4.4.14). Die Phosphorylierung und Proteinmenge wurde durch Phosphatmangel oder -überschuss und die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} nicht beeinflusst. Dies stimmt nicht mit den Erwartungen überein. Durch die Auswirkungen der GAF Domäne von EI^{Ntr} auf die $EIIA^{Ntr}$ -regulierten Prozesse sollte die GAF Domäne von EI^{Ntr} in der Lage sein die Phosphorylierung von $EIIA^{Ntr}$ zu modulieren. Es kann vermutet werden, dass im Wildtyp noch ein sehr geringer, nicht detektierbarer Anteil an $EIIA^{Ntr}$ unphosphoryliert vorliegt. Dieser Anteil sollte in der $ptsP\Delta GAF$ Mutante nicht mehr vorhanden sein, da $EIIA^{Ntr}$ hier nicht mehr die regulatorischen Funktionen wie im Wildtyp ausüben kann. Die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} führt also scheinbar zu einer Hyperphosphorylierung von $EIIA^{Ntr}$.

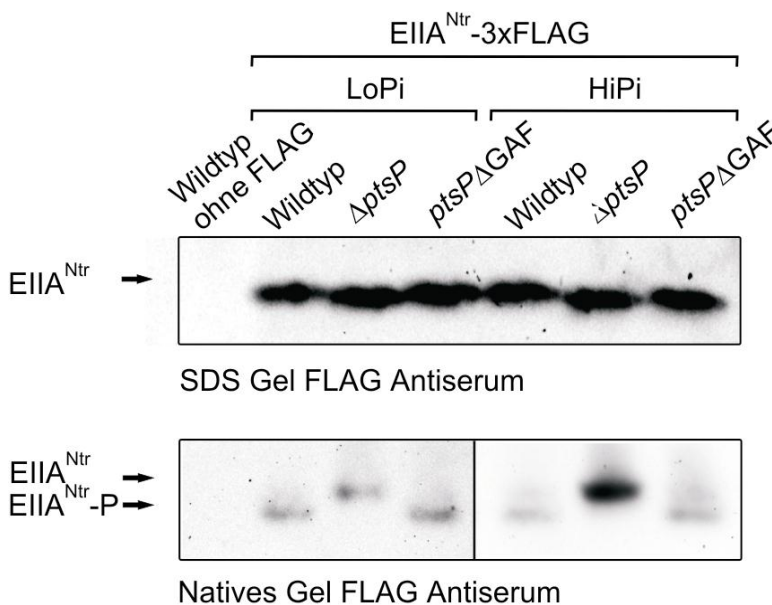


Abbildung 4.4.14: Die Phosphorylierung und Proteinmenge von $EIIA^{Ntr}$ -3xFLAG wird durch die GAF Domäne von EI^{Ntr} augenscheinlich nicht beeinflusst. Die Stämme mit den chromosomalen $ptsN$ -3xFLAG-Allelen wurden in HiPi- und LoPi-Medium mit Glukose angezogen. Die Zellextrakte wurden auf einer 12,5% SDS-PAGE und einem 12,5%igem Prosieve Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. Der Wildtyp (S4197) sowie der isogene Stamm mit $ptsN$ -3xFLAG-Allel (Z424), die $\Delta ptsP$ (Z436) und die $ptsP\Delta GAF$ Mutante (Z435) mit $ptsN$ -3xFLAG-

Allelen wurden untersucht. EIIA^{Ntr}-3xFLAG wurde mit einem FLAG Antiserum detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von unabhängigen Western Blots.

4.4.4. Identifikation von Interaktionspartner und Liganden der GAF Domäne von EI^{Ntr}

4.4.4.1. Konstruktion von Strep-EI^{Ntr}-Varianten für Ligand-fishing Experimente

Durch Bindung von Liganden oder anderen Proteinen können GAF Domänen die Aktivität von anderen Domänen im Protein beeinflussen. In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die GAF Domäne in EI^{Ntr} Auswirkungen auf EIIA^{Ntr}-vermittelte Regulationen hat. Um Interaktionspartner und Liganden der GAF Domäne zu finden, wurden *ptsP* und *ptsP*ΔGAF in Vektoren kloniert, die sich zur Proteinüberexpression eignen. Mit diesen Vektoren können Strep-Fusionsproteine überproduziert werden, die später aufgereinigt werden können. Zunächst musste die Funktionalität der Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF Fusionsproteine überprüft werden. Die Funktionalität der Proteine ist für die Untersuchungen essentiell, da die Bindung von Proteinen und niedermolekularen Liganden analysiert werden sollte. Der Stamm Δ*ptsP* wurde mit dem Strep-Leervektor und den beiden neu konstruierten Plasmiden transformiert. Der Stamm und die Transformanten wurden in LB-Medium angezogen und die Aktivität der chromosomalen *kdpFA'*-*lacZ*-Fusion gemessen (Abbildung 4.4.-26).

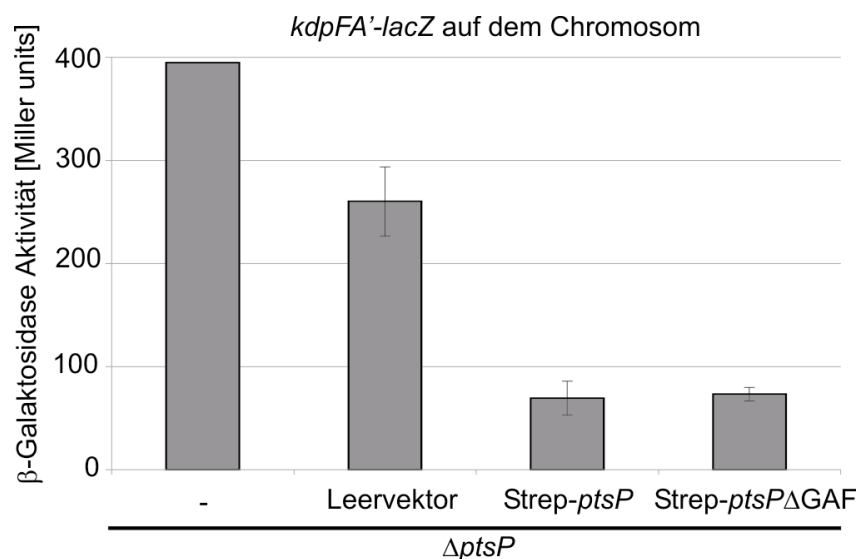


Abbildung 4.4.15: Die Überproduktion der Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF Fusionsproteine reduziert die *kdp*-Expression. Die $\Delta ptsP::kan$ Mutante (Z423) mit chromosomaler *kdpFA*-*lacZ*-Fusion wurde mit *strep-ptsP* (pBGG228) und *strep-ptsP*ΔGAF Überexpressionsvektoren (pDL18) und dem Leervektor (pBGG237) transformiert. Der Stamm und die Transformanten wurden in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden geerntet und es wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben.

Der Stamm $\Delta ptsP$ zeigte eine Aktivität von 395 Miller units in LB-Medium. In der Leervektor-Transformante ging die LacZ-Aktivität auf 260 Miller units zurück. Die Überproduktion von Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF bewirkte eine Reduktion der Aktivität auf 70 und 73 Miller units. Dies zeigte, dass der Leervektor einen schwach reprimierenden Effekt auf die *kdp*-Expression hat. Allerdings ist der reprimierende Effekt durch die Überexpression der Fusionsproteine wesentlich stärker. In beiden Fällen war die *kdp*-Expression stark reprimiert. Das bedeutet, dass beide Fusionsproteine funktional waren. Die Überexpression von *ptsP* und *ptsP*ΔGAF (kodiert nur die EI Domäne von EI^{Ntr}) sollte zu einer verstärkten Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} und somit zu einer Repression der *kdp*-Expression führen. Der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} wurde durch eine native Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließendem Western Blot analysiert (Abbildung 4.4.16).

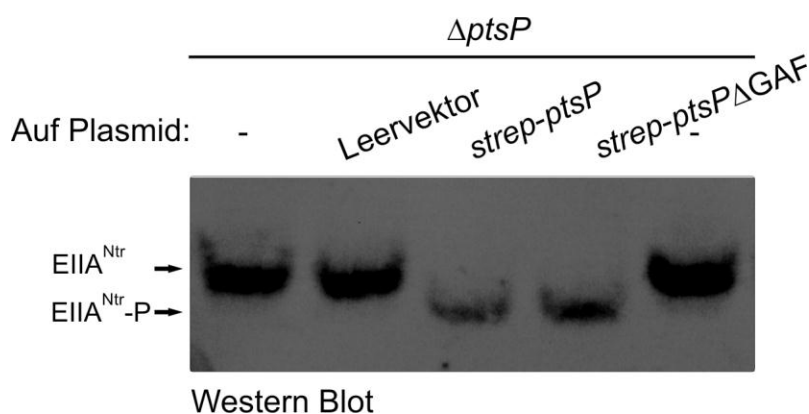


Abbildung 4.4.16: Die Fusionsproteine Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF katalysieren die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}. Die $\Delta ptsP$ Mutante (Z436) mit chromosomalem *ptsN*-3xFLAG-Allel wurde mit *strep-ptsP* (pBGG228) und *strep-ptsP*ΔGAF Überexpressionsplasmiden (pDL18) und dem Leervektor (pBGG237) transformiert. Der Stamm und die Transformanten wurden in LB-Medium angezogen und geerntet. Die Zellextrakte wurden auf einem 12,5%igem Prosieve Gel aufgetrennt. EIIA^{Ntr}-3xFLAG wurde mit einem FLAG Antiserum detektiert.

In der $\Delta ptsP$ Mutante und in der Leervektor-Transformante lag EIIA^{Ntr} im unphosphorylierten Zustand vor (Spuren 1, 2 und 5 in Abbildung 4.4.16). Wie erwartet bewirkte die Überproduktion von Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr} Δ GAF, dass die phosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} akkumulierte (Spuren 3 und 4 in Abbildung 4.4.16).

Nach der Überprüfung der Funktionalität, sollten nun mögliche Interaktionspartner untersucht werden, die spezifisch für die GAF Domäne von EI^{Ntr} sind. Die Identifikation von Liganden und Proteinen, die an die GAF Domäne von EI^{Ntr} binden, ist wichtig um die regulatorische Rolle der GAF Domäne aufzuklären. Es wurden Ligand-fishing Experimente durchgeführt. Die Überexpressionsplasmide und der Leervektor wurden hierzu in einen $\Delta ptsP$ Stamm transformiert. Es wurden LB-Kulturen der Transformanten angezogen. Durch die Zugabe von IPTG wurde die Überproduktion der Fusionsproteine induziert. Die Zellen wurden geerntet, aufgeschlossen und die Proteine über eine Streptaktin Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Aufreinigungen wurden durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft (siehe Abbildung 6.24). Die beiden Proteine (Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr} Δ GAF) konnten in großen Mengen aufgereinigt werden.

Um nun die Eluate auf mögliche Protein-Interaktionspartner zu untersuchen, wurden je 20 μ l der Elutionsfraktionen zusammen mit einem Größenstandard auf ein SDS-Gel geladen. Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese durch die Anfärbung mit Silbernitrat sichtbar gemacht. Nun sollte analysiert werden, welche Proteine nur in den Strep-EI^{Ntr} Elutionsfraktionen, aber nicht in der Strep-Tag Aufreinigung und Strep-EI^{Ntr} Δ GAF Aufreinigung vorkommen (Abbildung 4.4.17). Es konnten keine Banden eindeutig identifiziert werden, die spezifisch für die Strep-EI^{Ntr} Aufreinigung waren.

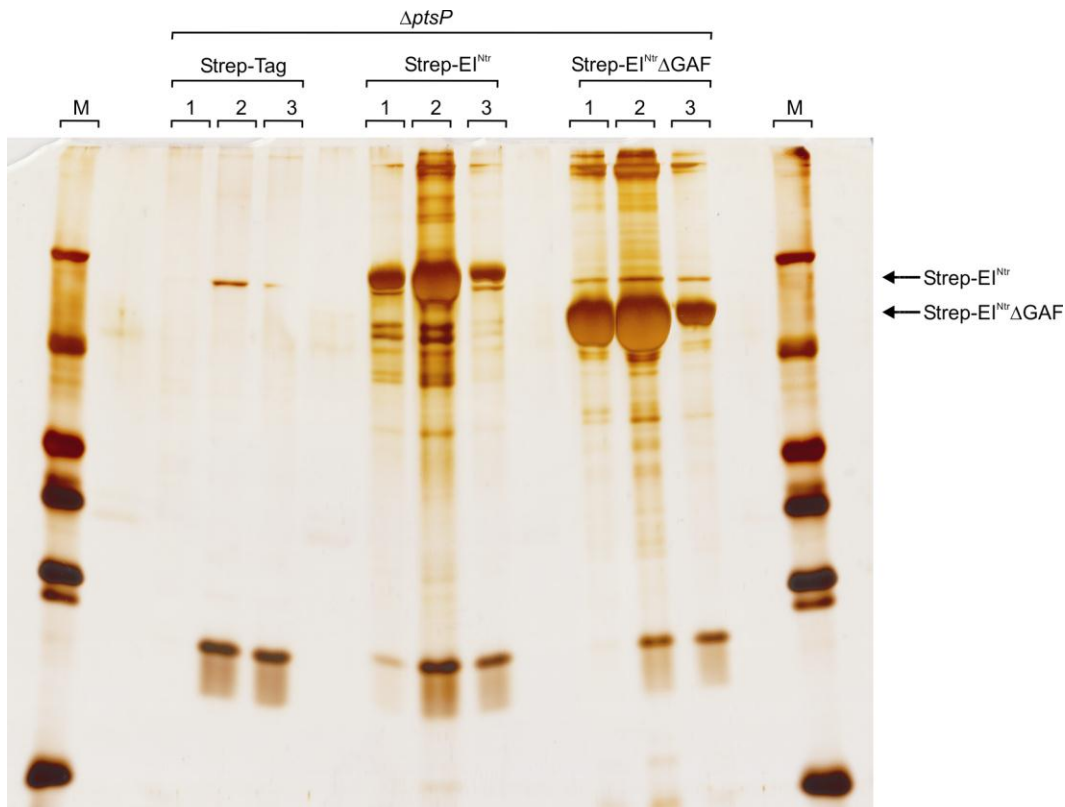


Abbildung 4.4.17: Analyse von möglichen Interaktionspartnern der GAF Domäne von EI^{Ntr} durch Ligand-fishing. Die drei Elutionsfraktionen der Aufreinigungen des Strep-Tags, Strep-EI^{Ntr} und von Strep-EI^{Ntr}ΔGAF wurden zusammen mit dem Page King Marker (M) auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen, die Proteine wurden aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

4.4.4.2. Es gibt vermutlich keinen PTS^{Ntr} Komplex in *E.coli*

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Proteine des PTS^{Ntr} einen Komplex in der Zelle bilden (siehe Abschnitt 4.4.3.4). Hierzu wurden die Proteine EI^{Ntr} und EI^{Ntr}ΔGAF aus einem Stamm aufgereinigt, der eine *ptsN*-3xFLAG-Fusion im Chromosom trug (Abschnitt 4.4.4.1.). Hiermit könnten Interaktionen der PTS^{Ntr}-Proteine miteinander, vor Allem zwischen EI^{Ntr} und EIIA^{Ntr} nachgewiesen werden. Um dies zu analysieren, wurden Zellextrakte und Elutionsfraktionen der EI^{Ntr} und der EI^{Ntr}ΔGAF Aufreinigung auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das EIIA^{Ntr}-3xFLAG im Western Blot mit FLAG Antiserum sichtbar gemacht (Abbildung 4.4.-32).

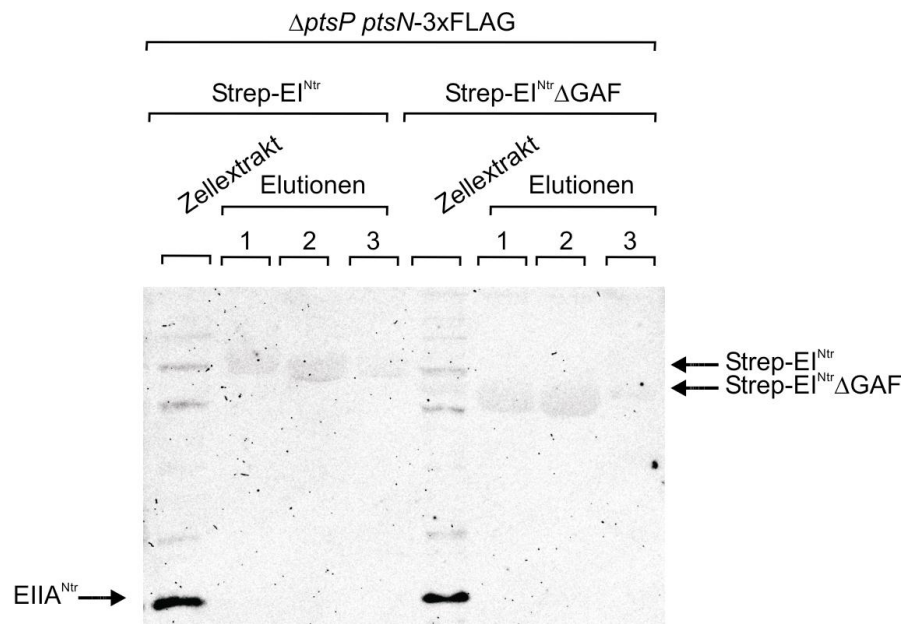


Abbildung 4.4.18: EI^{Ntr} bzw. EI^{Ntr}ΔGAF und EIIA^{Ntr} können nicht koaufgereinigt werden. Aus der $\Delta ptsP$ Mutante (Z436) mit chromosomalem *ptsN*-3xFLAG-Allel wurden die Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF Fusionsproteine aufgereinigt. 13 μ l der jeweiligen Zellextrakte und 20 μ l der Elutionsfraktionen wurden auf einem 12,5%igem SDS-Gel aufgetrennt. EIIA^{Ntr}-3xFLAG wurde mit einem FLAG Antiserum detektiert.

In beiden Zellextrakten konnte EIIA^{Ntr} detektiert werden. In den Elutionsfraktionen konnte keine Bande für EIIA^{Ntr} beobachtet werden. Durch diesem experimentellen Ansatz konnte also keine Interaktion zwischen EI^{Ntr} und EIIA^{Ntr} nachgewiesen werden.

4.4.4.3. Identifikation niedermolekularer Liganden, die möglicherweise an die GAF Domäne von EI^{Ntr} binden

Für die Suche nach Liganden der GAF Domäne von EI^{Ntr} wurden das EI^{Ntr} und das Protein ohne GAF Domäne aufgereinigt. Anschließend wurden die Eluate massenspektrometrisch auf niedermolekulare Liganden untersucht. Hierbei erfolgte die Aufreinigung der Proteine im BATCH Verfahren (Material und Methoden 3.2.6.1.6.). Wie für die vorherigen Experimente auch, wurden die Strep-Überexpressionsplasmide in geeignete Stämme transformiert. Hier wurde eine $\Delta ptsP$ Mutante und ein Stamm, in dem das *sspA* deletiert war, benutzt. Ein $\Delta sspA$ Stamm wurde verwendet, da sich die Deletion dieses Gens auf die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} auswirkt. Diese Regulation der Phosphorylierung könnte EI^{Ntr}-vermittelt geschehen (siehe Abschnitt 4.4.5.). Die Transformanten der beiden Stämme wurden in LB-Medium angezogen. Durch die

Zugabe von IPTG wurde die Synthese der Strep-Fusionsproteine induziert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und aufgeschlossen. Das Zellysate wurde mit Streptaktin-Beads zur Bindung der Strep-Tag Proteine an die Matrix inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschschriffe von der Streptaktin-Matrix entfernt. Von 10 μ l der Streptaktin-Beads wurde Protein aufgereinigt. Die Aufreinigungen wurden mit einem SDS-Gel überprüft (siehe Abbildung 6.24). Beide Proteine konnten in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden. Von den verbliebenen 990 μ l Streptaktin-Beads mit gebundenem Strep-Fusionsproteinen wurde eine Methanolfällung durchgeführt. Die polare und unpolare Phase der Fällung wurde massenspektrometrisch (LC-MS gekoppelt mit positiven und negativen ESI TOF Massenspektrometer) untersucht. Die massenspektrometrische Analyse und die Auswertung erfolgte durch Kirstin Feußner, Georg-August Universität Göttingen. In der polaren Fraktion konnten keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Proben festgestellt werden (siehe Abschnitt 6.4.1.1.). In der unpolaren Phase konnten Abweichungen in den Proben gefunden werden. Hier wurden Signale detektiert, die hohe Intensitäten für Strep-EI^{Ntr}, aber nur geringe Signalstärken für Strep-EI^{Ntr} Δ GAF zeigten (siehe Abschnitt 6.4.1.2). Die Fraktionen der jeweiligen Proteine aus den beiden Stämmen Δ *ptsP* und Δ *ptsP/\Delta**sspA* sollten hierbei ähnliche Signale erzeugen. Es wurden drei massenspektrometrische Signale identifiziert, die diese Verteilung zeigten. Den Signalen konnten durch die Molekulargewichte verschiedene Substanzen zugeordnet werden (siehe Abschnitt 6.4.1.2). Die Signalintensitäten der verschiedenen Substanzen in den unterschiedlichen Proteinproben sind in Abbildung 4.4.19 dargestellt.

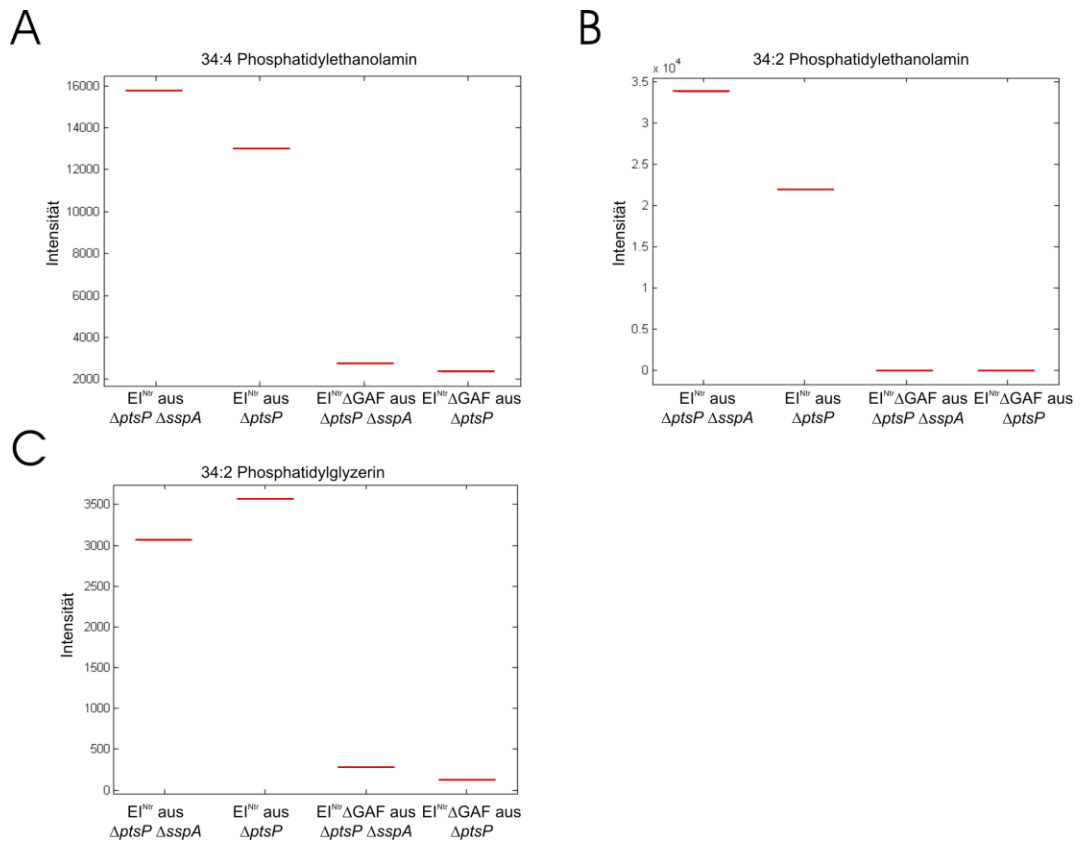


Abbildung 4.4.19: Signalintensitäten möglicher Liganden der GAF Domäne von EI^{Ntr} in der massenspektrometrischen Untersuchung. Ergebnisse der Auswertung der massenspektrometrischen Analyse. (A) Signalintensitäten von 34:4 Phosphatidylethanolamin. (B) Signalintensitäten von 34:2 Phosphatidylethanolamin. (C) Signalintensitäten von 34:2 Phosphatidylglyzerin. Es sind relative Intensitäten der Signale als Einheit angegeben. Die Signalstärken der einzelnen Proben sind durch rote Balken markiert.

Bei den drei Substanzen handelt es sich um 34:4 Phosphatidylethanolamin (Abbildung 4.4.19 A), 34:2 Phosphatidylethanolamin (Abbildung 4.4.19 B) und 34:2 Phosphatidylglyzerin (Abbildung 4.4.19 C). Dies sind Fettsäuren mit unterschiedlichen Kopfgruppen. 34:4 Phosphatidylethanolamin wurde in den Proben von EI^{Ntr} aus den Stämmen $\Delta ptsP$ und $\Delta ptsP/\Delta sspA$ mit einer relativen Signalintensität von circa 16000 und 13000 bestimmt. In den Proben des Proteins $EI^{Ntr} \Delta GAF$ aus den beiden Stämmen kamen sie nur mit einer Intensität von circa 3000 und 2500 vor (vgl. rote Balken in Abbildung 4.4.19 A). Für 34:2 Phosphatidylethanolamin erhielt man ähnliche Ergebnisse. Hier lagen die Intensitäten für EI^{Ntr} bei 34000 und 23000. Für $EI^{Ntr} \Delta GAF$ konnte kein 34:2 Phosphatidylethanolamin identifiziert werden (vgl. rote Balken in Abbildung 4.4.19 B). Für die EI^{Ntr} Proben konnte eine weitere Fettsäure mit Phosphatidylglyzerin-Kopfgruppe identifiziert werden. Die erhaltenen Intensitäten

lagen für EI^{Ntr} bei circa 3100 und 3600. In den $EI^{Ntr}\Delta GAF$ Fraktionen konnten nur Intensitäten von rund 250 und 100 bestimmt werden (vgl. rote Balken in Abbildung 4.4.19 C). Die Fettsäuren mit diesen Kopfgruppen konnten als mögliche Liganden der GAF Domäne von EI^{Ntr} identifiziert werden. Um diese Beobachtungen zu überprüfen sollte die Bindung von Strep- EI^{Ntr} und Strep- $EI^{Ntr}\Delta GAF$ an reine Lipidkopfgruppen untersucht werden.

4.4.4.3.1. Bindung von EI^{Ntr} an verschiedene Lipide

In den massenspektrometrischen Analysen konnten Lipidkopfgruppen als Liganden von EI^{Ntr} bestimmt werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Interaktion von Strep- EI^{Ntr} und Strep- $EI^{Ntr}\Delta GAF$ mit verschiedenen Lipidkopfgruppen getestet. Hierzu wurden Lipid Strips™ der Firma Echelon, Salt Lake City U.S.A. laut Herstellerangaben verwendet. Es handelt sich um Membranen die, ähnlich zum Far Western mit Lipiden gespottet sind. Nach dem Blocken der Membranen wurden Strep- EI^{Ntr} und Strep- $EI^{Ntr}\Delta GAF$ mit der Membran inkubiert. Durch Waschschrte und der Behandlung der Membran mit Strep-Antikörpern, konnte spezifisch gebundenes Strep- EI^{Ntr} oder Strep- $EI^{Ntr}\Delta GAF$ im Lumi Imager nachgewiesen werden (Abbildung 4.4.20).

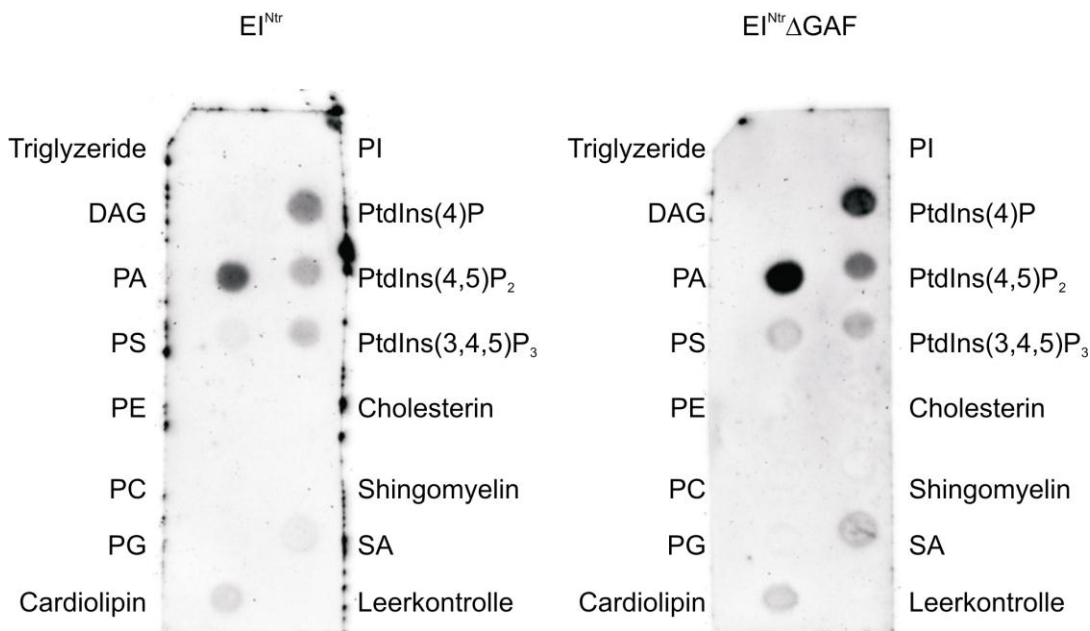


Abbildung 4.4.20: Bindung von Strep- EI^{Ntr} und Strep- $EI^{Ntr}\Delta GAF$ an verschiedene Lipide. Die Lipid Strips wurden mit je 5 $\mu\text{g/ml}$ Strep- EI^{Ntr} und Strep- $EI^{Ntr}\Delta GAF$ inkubiert und anschließend gewaschen. Die Detektion von gebundenem Strep-Protein

erfolgte mit Strep Antiserum. DAG: Diazylglyzerin, PA: Phosphatidsäure, PS: Phosphatidylserin, PE: Phosphatidylethanolamin, PC: Phosphatidylcholin, PG: Phosphatidylglyzerin, PI: Phosphatidylinositol, SA: 3-Sulfo-Galaktosylceramid, PtdIns(n)P: Phosphatidylinositol-Phosphat.

Für beide Proteine konnte die Bindung an Cardiolipin, Phosphatidsäure, 3-Sulfo-Galaktosylceramid und verschiedene Phosphatidylinositol-Phosphate festgestellt werden. Strep-EI^{Ntr}ΔGAF schien dabei stärker an die Lipide zu binden als das Wildtypprotein. Mit Triglyzeriden, DAG, PS, PE, PC, PG PI, Shingomyelin und Cholesterin zeigte keines der Proteine eine Interaktion. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen konnten also nicht bestätigt werden. Es war keine Bindung der Proteine an Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylglyzerin detektierbar. Die massenspektrometrischen Analysen müssten wiederholt werden und es sollte mit einer anderen Methode die Bindung von EI^{Ntr} an die Lipide untersucht werden.

4.4.5. Regulation der Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} durch Modulatoren des PTS^{Ntr}

Mit einem neuartigen Screening System können über eine Transposonmutagenese Insertionen in Genen detektiert werden, die den Phosphorylierungszustand oder die Stabilität der Proteine des PTS^{Ntr} beeinflussen (Bahr *et al.*, 2011). In einer solchen Untersuchung wurden eine Reihe von Transposonsinsertionen in mehreren Genen gefunden. Dabei handelte es sich um Insertionen in den Genen für die PTS^{Ntr} Proteine selbst, *ptsP* (kodiert für EI^{Ntr}) oder in *ptsO* (kodiert für NPr). Weiterhin konnten Insertionen im *gal*-Operon, in *pcnB*, in *sspA*, *lsrF* und *ycgS* identifiziert werden. Diese Arbeiten wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Rak Universität Freiburg durchgeführt. Diese Mutationen könnten möglicherweise die Aktivität des EI^{Ntr} Proteins beeinflussen (Bahr *et al.*, 2011) und so möglicherweise den Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} regulieren. Um dies zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten der oben genannten Gene, sowie Deletionsmutanten von *sspB*, *lsrG* und *sspAB* hergestellt. Zusätzlich wurde ein chromosomales *ptsN*-3xFLAG Allel in die Stämme eingebracht um EIIA^{Ntr} in Western Blots zu detektieren. Die neu konstruierten Stämme wurden zusammen mit

dem Wildtyp und einer isogenen $\Delta ptsP$ Mutante in Minimalmedium mit Glukose angezogen. Die Zellextrakte wurden durch eine native Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und EIIA^{Ntr}-3xFLAG im Western Blot mit FLAG Antiserum sichtbar gemacht (Abbildung 4.4.21).

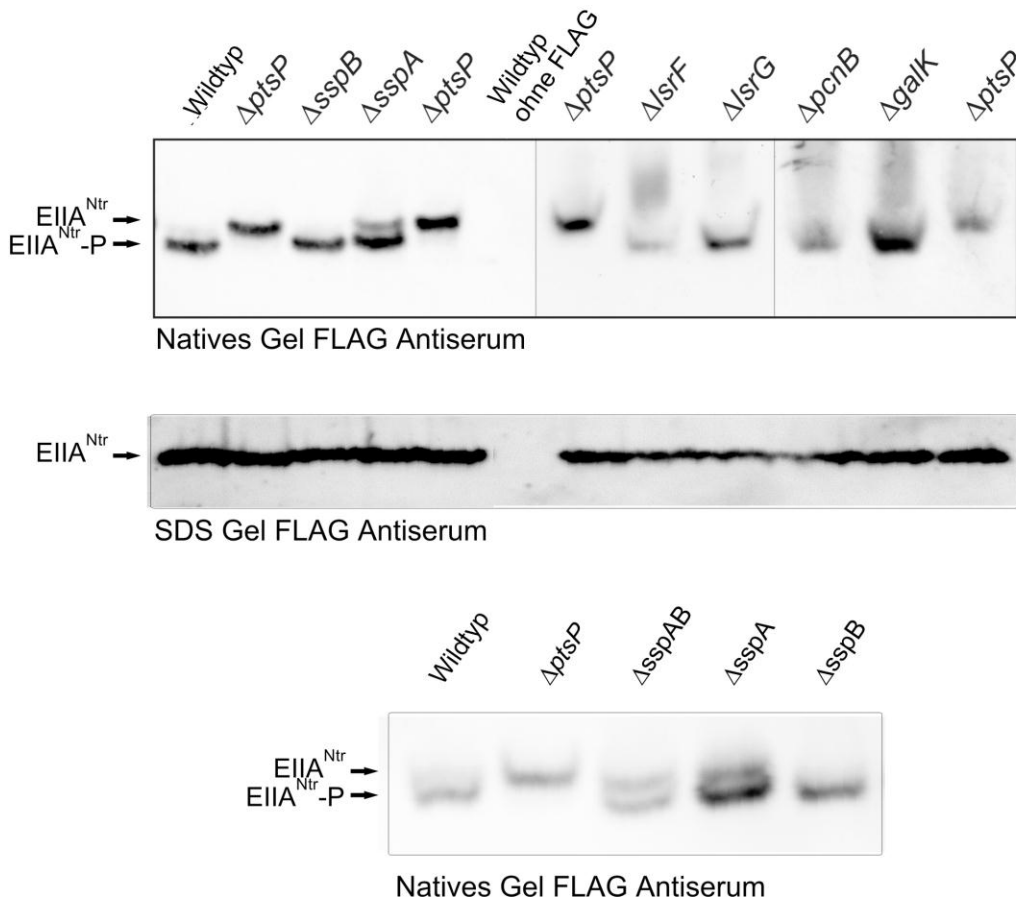


Abbildung 4.4.21: Die Deletion von *sspA* und *sspAB* verändert den Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} (Bahr *et al.*, 2011 und diese Arbeit). Die Stämme mit den chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Allelen (Wildtyp (Z424), $\Delta ptsP$ Mutante (Z436), $\Delta sspB::kan$ Mutante (Z522), $\Delta sspA::kan$ Mutante (Z523), $\Delta lsrF::kan$ Mutante (Z540), $\Delta lsrG::kan$ Mutante (Z541), $\Delta pcnB::kan$ Mutante (Z549), $\Delta galK::kan$ Mutante (Z548) und $\Delta sspAB::kan$ Doppelmutante (Z571)) wurden in Minimalmedium mit Glukose angezogen. Die Zellextrakte wurden auf einem 12,5%igem Prosieve Gel und SDS-Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. EIIA^{Ntr}-3xFLAG wurde mit einem FLAG Antiserum detektiert. Als Kontrolle diente der Wildtypstamm ohne Flag-Tag (S4197). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von unabhängigen Western Blots.

Obwohl die Deletionen von *sspB*, *lsrF*, *lsrG*, *pcnB* und *galK* in dem oben genannten Screen gefunden wurden, zeigten sie keinen Einfluss auf die Phosphorylierung oder Stabilität von EIIA^{Ntr}. In einer *sspA* Mutante unterschied sich die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} jedoch von der im Wildtyp. Eine *sspAB* Doppelmutante verhielt sich ähnlich wie eine *sspA* Einfachmutante. EIIA^{Ntr} lag in diesen Stämmen in seiner phosphorylierten und unphosphorylierten Form vor. Interessanterweise war EIIA^{Ntr} weniger phosphoryliert als im Wildtyp, aber stärker phosphoryliert als in der Δ *ptsP* Mutante. Nur die Deletion von *sspA*, aber nicht die Deletionen der anderen im Screen gefundenen Gene beeinflusste den Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr}. Es war nun interessant herauszufinden, ob sich die Veränderung des Phosphorylierungszustandes von EIIA^{Ntr} in dieser Mutante auch auf EIIA^{Ntr}-vermittelte Regulationen auswirkt. Hierzu wurden die oben erwähnten Deletionsstämme mit chromosomalen *kdpFA*'-lacZ-Fusionen in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM angezogen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet und β -Galaktosidase Messungen angeschlossen (Abbildung 4.4.22).

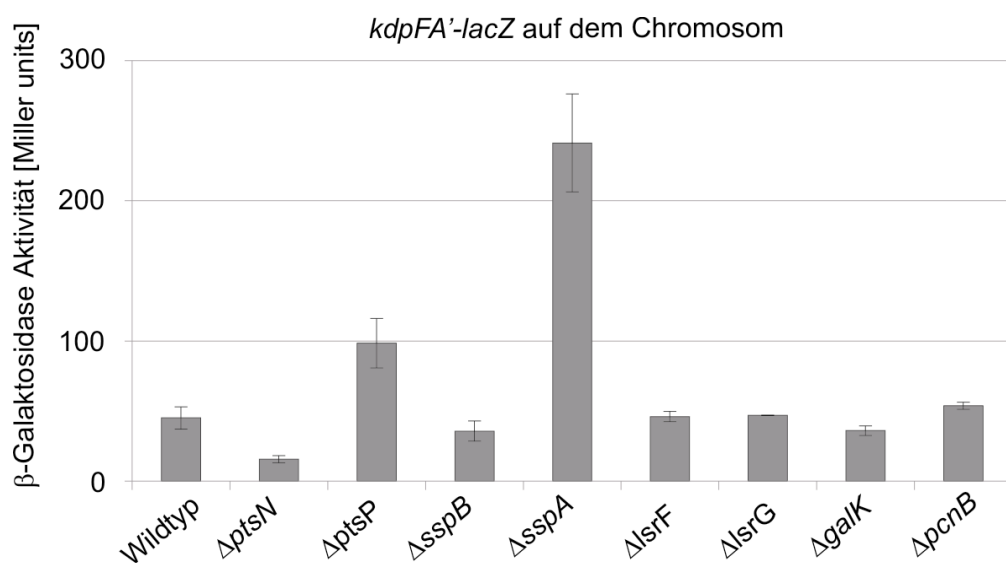


Abbildung 4.4.22: Die *sspA* Deletion wirkt sich auf die *kdp* Expression aus. Die verschiedenen Stämme mit chromosomalen *kdpFA*'-lacZ-Fusionen (Wildtyp (Z504), Δ *ptsN* Mutante (Z552), Δ *ptsP* Mutante (Z505), Δ *sspB::kan* Mutante (Z522), Δ *sspA::kan* Mutante (Z523), Δ *lsrF::kan* Mutante (Z540), Δ *lsrG::kan* Mutante (Z541), Δ *galK::kan* Mutante (Z548) und Δ *pcnB::kan* Mutante (Z549)) wurden in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM angezogen. Die Zellen wurden geerntet und anschließend wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und durchgeführten Messungen.

Die Deletionen von *sspB*, *lsrF*, *lsrG*, *galK* und Δ *pcnB* veränderten die Aktivität in den β -Galaktosidase-Messungen nicht. Diese Mutanten zeigten ähnliche Aktivitäten wie der Wildtyp (36, 46, 47, 36 und 54 Miller units gegenüber 45 Miller units im Wildtyp). Diese Mutanten zeigten auch keine Veränderung der Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} (siehe Abbildung 4.4.21). Um die β -Galaktosidase-Aktivitäten der verschiedenen Mutanten besser einzuordnen, wurden auch die Aktivitäten in der Δ *ptsP* Mutante und Δ *ptsN* Mutante bestimmt. Die Δ *ptsP* Mutante zeigte wie erwartet eine höhere β -Galaktosidase-Aktivität als der Wildtyp (98 versus 45 Miller units). Durch die Deletion von *ptsN* war die β -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp reduziert (16 gegenüber 45 Miller units). In einer *sspA* Mutante stieg die β -Galaktosidase-Aktivität auf 241 Miller units an. Die gemessene Aktivität lag weit über der einer Δ *ptsP* Mutante (241 versus 98 Miller units). In einer Δ *sspA* Mutante wird die Expression der *kdpFA*-*lacZ*-Fusion stärker stimuliert als in einer Δ *ptsP* Mutante. Dies widersprach der eigentlichen Erwartung. In der Δ *ptsP* Mutante lag EIIA^{Ntr} hauptsächlich unphosphoryliert vor, in einer Δ *sspA* Mutante aber nur etwa zu 30-40% (siehe Abbildung 4.4.21). Von daher wäre zu erwarten gewesen, dass die Expression der *kdpFA*-*lacZ*-Fusion geringer ist als in der Δ *ptsP* Mutante, aber stärker als im Wildtyp. Um diese Diskrepanz zwischen den LacZ-Messungen und dem Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} genauer zu untersuchen, wurde eine Δ *ptsP*/ Δ *sspA* Doppelmutante konstruiert und die *sspA* Deletionsstämme mit plasmidständigem *sspA* unter P_{Ara} -Kontrolle komplementiert (Abbildung 4.4.23).

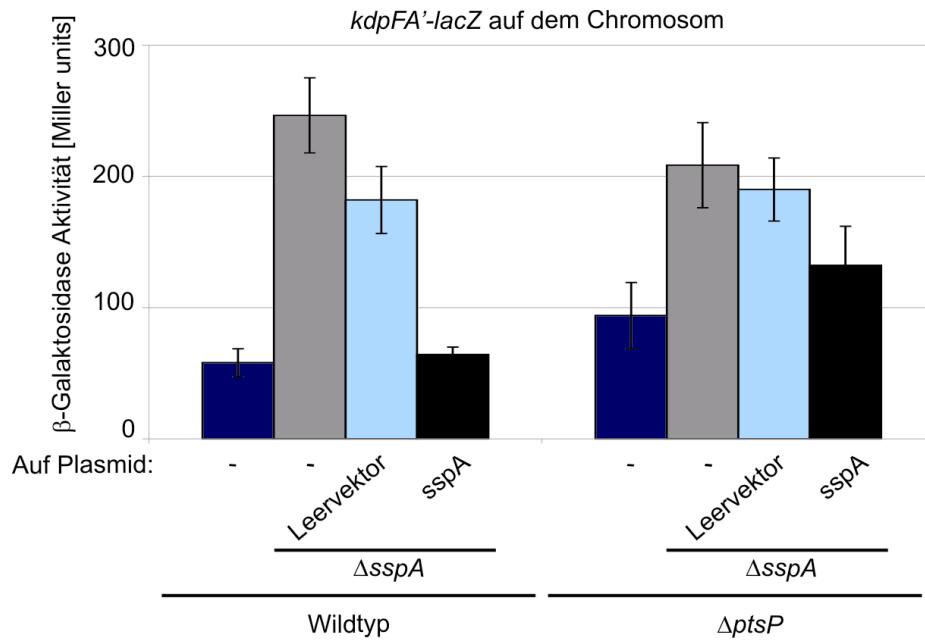


Abbildung 4.4.23: SspA reguliert die Expression von *kdpFABC* im Wildtyp und der $\Delta ptsP$ Mutante. Die verschiedenen Stämme mit chromosomalen *kdpFA'-lacZ*-Fusionen (Wildtyp (Z504), $\Delta sspA::kan$ Mutante (Z523), $\Delta ptsP$ Mutante (Z505) und die $\Delta ptsP/\Delta sspA::kan$ Doppelmutante (Z568), sowie die $\Delta sspA::kan$ Stämme komplementiert mit dem Leervektor (pBAD33) und $P_{Ara}-sspA$ (pDL26) wurden in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM angezogen. In den Transformanten wurde die Expression von *sspA* durch Arabinose induziert. Die Zellen wurden geerntet und es wurden β-Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β-Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Kulturen und Messungen.

Wie schon vorher beschrieben, führte die Deletion von *sspA* zu einer ca. 4-fachen Erhöhung der β-Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (vgl. graue mit dunkelblauer Säule links in Abbildung 4.4.23). Der Leervektor hatte auf die β-Galaktosidase-Aktivität nur einen geringen Einfluss. Die Überproduktion von SspA bewirkte eine Reduktion der LacZ-Aktivität auf Wildtypniveau (vgl. schwarze mit dunkelblauer Säule links in Abbildung 4.4.23 miteinander). Die Aktivität der *kdpFA'-lacZ*-Fusion lag in einer $\Delta ptsP$ Mutante immer höher als im Wildtyp (vgl. dunkelblaue Säulen miteinander). In der $\Delta ptsP \Delta sspA$ Doppelmutante stieg die LacZ-Aktivität im Vergleich zur $\Delta ptsP$ Einzelmutante um den Faktor 2 an (vgl. graue mit dunkelblauer Säule rechts). Der Leervektor zeigte auch hier nur einen geringen Einfluss auf die gemessene LacZ-Aktivität. Die Überexpression von *sspA* bewirkte wiederum die Reduktion der β-Galaktosidase-Aktivität (vgl. schwarze mit dunkelblauer und grauer Säule rechts in Abbildung 4.4.23). Der Einfluss einer *sspA* Deletion war im

Wildtyphintergrund stärker ist als in einer $\Delta ptsP$ Mutante. Der Unterschied der Expression der $kdpFA'-lacZ$ -Fusion in der $\Delta ptsP/\Delta sspA$ Doppelmutante im Vergleich zur $\Delta ptsP$ Einzelmutante war geringer als der Unterschied zwischen Wildtyp und der isogenen $\Delta sspA$ Mutante (vgl. beide grauen mit dunkelblauen Säulen). Zusammenfassend kann also geschlossen werden, dass für die $sspA$ Deletion auch in der $\Delta ptsP$ Mutante noch einen Einfluss auf die Expression der $kdpFA'-lacZ$ -Fusion hat, allerdings ist dieser Einfluss geringer als im Wildtyp. Es wäre möglich, dass SspA über zwei verschiedene Regulationswege auf die Expression des kdp -Operons wirkt. Dabei wäre für die eine Regulation EI^{Ntr} notwendig, für die andere allerdings nicht. Dies würde auch die Diskrepanz zwischen den Phosphorylierungsanalysen und den β -Galaktosidase-Messungen erklären. Dieses Phänomen sollte zur weiteren Aufklärung zukünftig analysiert werden.

Da das SspA in einem der Regulationsmechanismen über die GAF Domäne von EI^{Ntr} auf die Phosphorylierung und Aktivität der PTS^{Ntr} Proteine wirken könnte (Untersuchungen zum Einfluss der GAF Domäne in Abschnitt 4.4.3), wurde die $sspA$ Deletion in eine $ptsP\Delta GAF$ Mutante mit chromosomaler $kdpFA'-lacZ$ -Fusion eingebracht. Der Stamm wurde mit plasmidständigem $P_{Ara-sspA}$ komplementiert und zusammen mit den anderen Deletionsstämmen und dem Wildtyp angezogen. Die LacZ-Aktivität wurde gemessen (Abbildung 4.4.24).

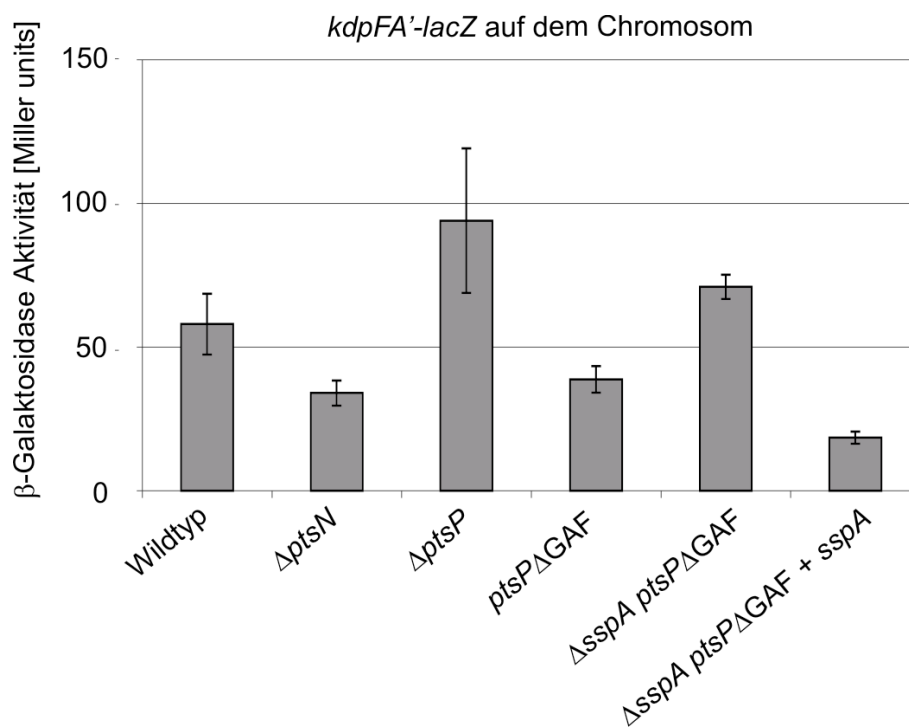


Abbildung 4.4.24: SspA reguliert die Expression von *kdpFABC* unabhängig von der GAF Domäne in EI^{Ntr}. Die verschiedenen Stämme mit chromosomalen *kdpFA'-lacZ*-Fusionen (Wildtyp (Z504), $\Delta ptsN$ Mutante (Z552), $\Delta ptsP$ Mutante (Z505), *ptsP* Δ GAF Mutante (Z506) und die *ptsP* Δ GAF $\Delta sspA::kan$ Doppelmutante (Z586), sowie die mit *P_{Ara}-sspA* (pDL26) komplementierte *ptsP* Δ GAF $\Delta sspA::kan$ Mutante wurden in Minimalmedium mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM und gegebenenfalls Arabinose angezogen. Die Zellen wurden geerntet und es wurden β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind Mittelwerte von unabhängigen Messungen und sind in Miller units angegeben.

Der *ptsP* Δ GAF Deletionsstamm verhielt sich ähnlich wie eine $\Delta ptsN$ Mutante. In beiden Stämmen waren die gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten geringer als im Wildtyp (39 und 34 gegenüber 58 Miller units). In der *ptsP* Δ GAF/ $\Delta sspA$ Doppelmutante stieg die LacZ-Aktivität auf 71 Miller units an. Die Komplementation des Stammes mit *P_{Ara}-sspA* bewirkte die Reduktion der Aktivität auf 19 Miller units. Damit war die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion noch geringer als in der $\Delta ptsN$ Mutante. In der *ptsP* Δ GAF Mutante zeigt die Deletion von *sspA* immer noch Auswirkungen auf die Expression der *kdpFA'-lacZ*-Fusion. Dies bedeutet, dass die GAF Domäne von EI^{Ntr} für diese Regulation nicht essentiell ist.

5. Diskussion

5.1. Das PTS^{Ntr} reguliert Kaliumtransporter in *E. coli*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das PTS^{Ntr} die zellulären Mengen der Proteine des Kaliumtransporters KdpFABC über die Stimulation der Expression des *kdpFABC*-Operons reguliert. Die Gene des *kdpFABC*-Operons kodieren für die verschiedenen Untereinheiten des Kaliumtransporters KdpFABC. Der Kaliumtransporter KdpFABC ist für den Kaliumimport unter Kaliummangelbedingungen (≤ 20 mM K⁺) und osmotischem Stress wichtig. Er ist dabei in der Lage die Ionen mit einer hohen Affinität in die Zelle zu transportieren (Altendorf *et al.*, 2009). Der Kaliumtransporter Kdp wird nur bei Kaliummangel benötigt, die Synthese der Untereinheiten des Kaliumtransporters ist an diesen Bedarf angepasst (Walderhaug *et al.*, 1992). EIIA^{Ntr} wirkt stimulatorisch auf die Transkription des *kdpFABC*-Operons und führt so zur Akkumulation der Untereinheiten des Kaliumtransporters (s. Abb. 4.1.1 und 4.1.2). Die Überproduktion von EIIA^{Ntr} führt sogar zu einer Akkumulation der Proteine bei hohen Kaliumkonzentrationen (s. Abb. 4.1.4). Durch die Anwesenheit der EIIA^{Ntr}-spezifischen Phosphotransferasen EI^{Ntr} und NPr wird die Transkription des *kdp*-Operons allerdings reprimiert. Hierbei handelt es sich um einen indirekten Prozess. EI^{Ntr} reguliert über die Modulation des Phosphorylierungszustandes von EIIA^{Ntr} die Expression des *kdp*-Operons (s. Abb. 4.1.2, 4.1.3 sowie 4.1.10). Das bedeutet, dass der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} für diese Regulation entscheidend ist. Es stellte sich heraus, dass EIIA^{Ntr}-Varianten, die *in vivo* nicht mehr phosphorylierbar sind, die Expression des *kdpFABC*-Operons stärker stimulieren, als das Wildtyp EIIA^{Ntr} und eine EIIA^{Ntr}-Variante, die wahrscheinlich die phosphorylierte Form des Proteins simuliert. Dies war vor allem bei hohen Kaliumkonzentrationen zu beobachten (s. Abb. 4.1.4 und 4.1.5). Interessanterweise war die Expression des *kdp*-Operons bei Überproduktion von EIIA^{Ntr}-Varianten, welche die unphosphorylierte Form des Proteins simulierten nicht mehr durch hohe Kaliumkonzentrationen reprimierbar (s. Abb. 4.1.5). Für diesen und viele andere regulatorische Prozesse, die von EIIA^{Ntr} ausgeführt werden, ist die unphosphorylierte Form des Proteins verantwortlich (diese Arbeit und Pflüger-Grau and Görke, 2010). PTS Proteine üben ihre regulatorischen Einflüsse häufig über Protein-Protein-

Interaktionen aus (Deutscher *et al.*, 2006). Dies wurde auch schon für EIIA^{Ntr} gezeigt. EIIA^{Ntr} interagiert in seiner unphosphorylierten Form mit der TrkA Untereinheit des niedrig-affinen Kaliumtransporters Trk und inhibiert den Kaliumimport (Lee *et al.*, 2007). In *S. enterica* serovar Typhimurium interagiert unphosphoryliertes EIIA^{Ntr} mit dem Response Regulator SsrB und inhibiert dessen DNA-Bindeaktivität (Choi *et al.*, 2010). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch im Falle des Kdp-Systems gefunden (diese Arbeit). Die Expression des *kdp*-Operons steht unter der Kontrolle des KdpD/KdpE Zwei-Komponenten Systems. Bei limitierender Kaliumkonzentration oder bei Salzstress ist das Zwei-Komponenten System aktiv und induziert die Expression des *kdp*-Operons (Walderhaug *et al.*, 1992). Durch *in vivo* Interaktionsstudien (bakterielles Two-Hybrid System) konnte gezeigt werden, dass EIIA^{Ntr} mit der C-terminalen Output Domäne der Sensorkinase KdpD interagiert. Es zeigte sich, dass die Histidinkinase Domäne (HisKA Domäne) von KdpD essentiell für die Interaktion mit EIIA^{Ntr} ist. Die HATPase Domäne und ein Bereich in KdpD, der möglicherweise für die Signalwahrnehmung von KdpD wichtig ist, scheinen auch wichtig für die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} zu sein. Mutationen in der möglichen Signalwahrnehmungsdomäne, dem Arginin-Cluster, führten sogar zu einem Verlust der Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr}. Interessanterweise zeigte die EIIA^{Ntr}H73A-Variante, welche die unphosphorylierte Form des Proteins simuliert, eine noch viel stärkere Interaktion mit KdpD (s. Abb. 4.1.7, 4.1.12, 4.1.13 und 4.1.18). Die HisKA und HATPase Domäne in KdpD sind wichtig für die Bindung des Response Regulator KdpE, für die Bindung von ATP und die ATP-Hydrolyse (Heermann and Jung, 2010). Bislang identifizierte Modulatoren der Sensorkinase KdpD, wie UspC in *E. coli* und LprJ und LprF in *Mycobacterium tuberculosis*, interagieren mit dem N-Terminus von KdpD (Heermann *et al.*, 2009; Steyn *et al.*, 2003). Die Bindung von EIIA^{Ntr} an die Output Domäne von KdpD impliziert, dass die Signaltransduktion von KdpD auf KdpE durch die Interaktion mit EIIA^{Ntr} reguliert wird. Tatsächlich aktiviert EIIA^{Ntr} die KdpD/KdpE Phosphorylierungskaskade durch die Stimulation der Kinase Aktivität der Sensorkinase KdpD. Auch hier bewirkte vor allem die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} die Aktivierung dieser Signaltransduktionskaskade (s. Abb. 4.1.20 und 4.1.22).

Es konnte allerdings festgestellt werden, dass die Interaktion zwischen EIIA^{Ntr} und KdpD nicht unter allen untersuchten Bedingungen gleich ist. Die umgebende Kaliumkonzentration hat einen entscheidenden Einfluss auf die Interaktionsstärke. Die

Stärke der Interaktion nimmt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit steigender Kaliumkonzentration ab (s. Abb. 4.1.8 und 4.1.11). Dies könnte verschiedene Ursachen haben: (1) Die Stabilität oder der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} könnte von der Kaliumkonzentration beeinflusst werden. Diese Möglichkeiten konnten allerdings ausgeschlossen werden (s. Abb. 4.1.10). (2) Die Konformation von KdpD ist bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen unterschiedlich und die Domänen, die unterstützend auf die Interaktion wirken, verändern ihre Position. Dies könnte einen Verlust der Stabilität der Interaktion hervorrufen. Dagegen spricht allerdings, dass die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr}H73A durch hohe Kaliumkonzentrationen nicht mehr inhibierbar ist. (3) EIIA^{Ntr} bindet an Stellen in KdpD, welche für die Wahrnehmung des Stimulus nötig sind. Geht man davon aus, dass Kaliumionen selbst von der Sensorkinase gebunden werden, so könnten Kaliumionen und das EIIA^{Ntr} um identische oder dicht beieinander liegende Bindestellen in KdpD konkurrieren. Hierfür sprechen die *in vitro* Interaktionsanalysen, die zeigten, dass Kalium die Interaktion zwischen KdpD und EIIA^{Ntr} hemmt (s. Abb. 4.1.11). Bei niedrigen Kaliumkonzentrationen wäre also die Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} bevorzugt. Steigt die Kaliumkonzentration an, so wird EIIA^{Ntr} durch die steigende Menge an Kalium von seiner Bindestelle an KdpD verdrängt. Die Tatsache, dass die mögliche Signalwahrnehmungsdomäne, das Arginin-Cluster in KdpD, an der Interaktion von KdpD mit EIIA^{Ntr} beteiligt ist, unterstützt diese Annahme (s. Abb. 4.1.12). Das Interaktionsverhalten von ZKS-Modulatoren mit den Proteinen der Zwei-Komponenten Systeme ist noch wenig untersucht. Eine Abhängigkeit der Interaktion von dem Stimulus der Sensorkinase konnte noch in keinem Fall beobachtet werden. Es scheint also hier der erste Fall zu sein, in dem das eigentliche Signal und ein Modulator des Zwei-Komponenten Systems in Konkurrenz miteinander stehen. Beide Interaktionen der Sensorkinase, die mit EIIA^{Ntr} und die mit Kalium, wirken hierbei gegensätzlich. Die hohe Kaliummenge löst eine Repression des Systems aus, während die Bindung von EIIA^{Ntr} das System stimuliert. Es wäre auch interessant die Interaktion zwischen TrkA und EIIA^{Ntr} näher zu untersuchen. Es ist vorstellbar, dass auch die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit dem Kaliumtransporter Trk durch die Kaliumkonzentration moduliert wird. Über die Veränderung der Transportgeschwindigkeit und eine dadurch beeinflusste Konformationsänderung der Proteine des Kaliumtransporters Trk wäre auch hier eine Kaliumabhängigkeit der Interaktion denkbar. Die möglicherweise durch Kalium

beeinflussten Interaktionen zwischen EIIA^{Ntr} und KdpD bzw. TrkA könnten somit die Einstellung einer stabilen intrazellulären Kaliumkonzentration bewirken. Bei hohen Kaliumkonzentrationen würde der Kaliumimport durch den Kaliumtransporter Trk durch die Interaktion mit der unphosphorylierten Form von EIIA^{Ntr} blockiert, um die Kaliumkonzentration in der Zelle stabil zu halten. Kommt es allerdings zu Mangelbedingungen, würde sich die Interaktion zwischen TrkA und EIIA^{Ntr} verschlechtern. Der unphosphorylierte Anteil von EIIA^{Ntr} in der Zelle könnte nun an die Sensorkinase KdpD binden und so den Kaliumimport unter Mangelbedingungen begünstigen. Die Modulation zweier Kaliumtransportsysteme durch EIIA^{Ntr} impliziert, dass das PTS^{Ntr} die Kaliumhomoöstate in *E. coli* reguliert und so einen intrazellulären Überfluss oder Mangel an Kalium verhindert. Kalium wird als Osmoprotektans, für den zellulären pH und die Aufrechterhaltung des Zellurgors benötigt (Cayley *et al.*, 1991; McLaggan *et al.*, 1994). Zusätzlich beeinflusst es die Genexpression und die Aktivität von Proteinen (Cayley *et al.*, 1991; McLaggan *et al.*, 1994). Es ist also von besonderer Wichtigkeit die intrazelluläre Kaliumkonzentration stabil zu halten. Möglicherweise wird die EIIA^{Ntr}-vermittelte Regulation der Kaliumtransporter benötigt um sich effizient an schnell verändernde Umweltbedingungen anzupassen. Erste Analysen zeigten, dass die Expression des *kdpFABC*-Operons in einer $\Delta ptsN$ Mutante nur verzögert an die Stresssituation (Kaliummangel und Salzstress) angepasst wird (s. Abb. 4.1.23 und 4.1.24). Es konnte sogar ein leichter Wachstumsdefekt der $\Delta ptsN$ Mutante bei plötzlichem Salzstress beobachtet werden (s. Abb. 4.1.24).

5.2. Regulation des Pho-Regulons durch das PTS^{Ntr} in *E. coli*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das PTS^{Ntr} die Expression der Gene des Pho-Regulons bei Phosphatmangelbedingungen reguliert (Abschnitt 4.2.). Das Pho-Regulon umfasst etwa 30 Gene. Viele von ihnen kodieren für Proteine, die für die Aufnahme und Verwertung von Phosphatverbindungen wichtig sind. Die Expression der Gene des Pho-Regulons wird durch das PhoR/PhoB Zwei-Komponenten System reguliert (Hsieh and Wanner, 2010). Durch Expressionsanalysen verschiedener Gene und Operons des Pho-Regulons wurde beobachtet, dass die Deletion von *ptsN* auf die Expression aller untersuchten Gene des Pho-Regulons negativ wirkt. Die Deletion der Gene der anderen Komponenten des PTS^{Ntr} (*ptsP* und *ptsO*) hatte immer eine

Stimulation der Expression der Gene des Pho-Regulons zur Folge (s. Abb. 4.2.5 und 4.2.7). In der $\Delta ptsP$ Mutante akkumuliert die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} und aktiviert die Expression der Gene des Pho-Regulons. Dieser Mechanismus ist auch für die $\Delta ptsO$ Mutante vorstellbar. Diese Ergebnisse, zusammen mit der stimulatorischen Wirkung der Überproduktion von Wildtyp EIIA^{Ntr} und der unphosphorylierbaren Variante des Proteins (EIIA^{Ntr}H73A) auf die Expression der Gene des Pho-Regulons, weisen auf einen ähnlichen Mechanismus wie bei der Regulation des Kdp-Systems hin. Auch hier ist die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} für die Regulation verantwortlich. Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Regulation um indirekte Effekte durch die EIIA^{Ntr}-vermittelte Regulation der Kaliumtransportsysteme handelt (s. Abb. 4.2.9). Wie schon erwähnt, moduliert EIIA^{Ntr} die Expression einer Vielzahl von PhoR/PhoB regulierten Genen. Für diese Regulation ist die Sensorkinase PhoR essentiell (s. Abb. 4.2.10). Die Stärke des Einflusses von EIIA^{Ntr} auf die verschiedenen Gene des Pho-Regulons unterscheidet sich allerdings (s. Abb. 4.2.5 und 4.2.7). Das könnte dadurch begründet sein, dass sich die Promotorregionen der einzelnen Gene und Operons durch die Anzahl und Konserviertheit der PhoB-Bindestellen unterscheiden (Diniz *et al.*, 2011). Dies wäre tatsächlich ein vorstellbarer Mechanismus, da nachgewiesen werden konnte, dass EIIA^{Ntr} durch direkte Interaktion die Aktivität des PhoR/PhoB Zwei-Komponenten System reguliert. EIIA^{Ntr} interagiert mit der Sensorkinase PhoR, aber nicht mit dem Response Regulator PhoB. Diese spezifische Interaktion konnte *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (s. Abb. 4.2.15-21). Die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} interagiert stärker mit der Sensorkinase PhoR als das Wildtyp EIIA^{Ntr}, welches im Wildtyp hauptsächlich phosphoryliert vorliegt (s. Abb. 4.2.10). Dies korreliert mit den Beobachtungen für die EIIA^{Ntr}-vermittelte Regulation des KdpD/KdpE Zwei-Komponenten Systems (Lüttmann *et al.*, 2009 und diese Arbeit). Es gibt aber auch einen Unterschied zwischen beiden Regulationsmechanismen. Während EIIA^{Ntr} die Autophosphorylierung der Sensorkinase KdpD stimuliert, ist dies für die Autophosphorylierungsreaktion von PhoR nicht zu beobachten (s. Abb. 4.1.20, 4.1.21 und 4.2.22). Erste *in vitro* Analysen weisen darauf hin, dass die Aktivität der PhoR/PhoB Phosphorylierungskaskade durch EIIA^{Ntr} stimuliert wird (s. Abb. 4.2.22). Die EIIA^{Ntr}-Variante, welche die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} simuliert (EIIA^{Ntr}H73A), zeigte stärkere Interaktion mit PhoR als das Wildtypprotein. Beide Proteine wirken sich allerdings ähnlich auf die PhoR/PhoB Phosphorylierungskaskade

aus. Hier war kein Unterschied zwischen den beiden EIIA^{Ntr}-Varianten zu erkennen. Interessanterweise unterschieden sie sich aber in ihrer Wirkung, wenn hohe Molaritäten der EIIA^{Ntr}-Proteine vorlagen. Während das Wildtyp EIIA^{Ntr} die Phosphorylierungskaskade stimulierte, war die Phosphatübertragung von PhoR auf den Response Regulator PhoB durch die Anwesenheit von EIIA^{Ntr}H73A nicht mehr begünstigt. Obwohl PhoB als Phosphorylgruppenakzeptor vorhanden war, akkumulierte die Sensor kinase PhoR in der phosphorylierten Form (s. Abb. 4.2.22). *In vitro* scheint EIIA^{Ntr}H73A in großen Mengen also einen negativen Einfluss auf die Phosphorylierung des Response Regulators zu haben. *In vivo* konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden. *In vivo* liegt EIIA^{Ntr} im Wildtyp unter keinen Versuchsbedingungen in großen Mengen unphosphoryliert vor. Eine Situation, wie sie *in vitro* getestet wurde, kommt unter physiologischen Bedingungen also wahrscheinlich nicht vor.

Die Aktivität des PhoR/PhoB Zwei-Komponenten Systems wird *in vivo* durch den Phosphattransporter Pst und das Protein PhoU reguliert (Hsieh and Wanner, 2010). EIIA^{Ntr} ist der erste entdeckte Modulator des PhoR/PhoB Zwei-Komponenten Systems, dessen Expression nicht durch die Phosphatkonzentration reguliert wird (s. Abb. 4.2.8).

Genau wie bei der Kaliumaufnahme wird auch die Aufnahme von anorganischen Phosphat durch mehrere Transporter gesichert. Das Transportsystem PstABCS hat eine hohe Affinität zu Phosphat und ist für die Aufnahme unter Phosphatmangelbedingungen zuständig. Die Expression der zugehörigen Gene steht unter der Kontrolle des PhoR/PhoB Zwei-Komponenten Systems (Amemura *et al.*, 1985). PitA ist ein Transporter mit geringer Affinität zum Substrat. Die Synthese des Transporters ist nur unter speziellen Mediumsbedingungen von der Phosphatkonzentration abhängig, ansonsten ist die Expression von *pitA* konstitutiv (Harris *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2008). Die Expression des Gens eines weiteren niedrig-affinen Phosphattransporters PitB wird wahrscheinlich durch das PhoR/PhoB Zwei-Komponenten System reguliert (Bardin and Finan, 1998; Harris *et al.*, 2001). Es ist möglich, dass EIIA^{Ntr} über die Regulation der Aktivität des PhoR/PhoB Zwei-Komponenten Systems auch die Menge des Transporters PitB reguliert. Für die Phosphathomöostase wäre ein Mechanismus denkbar, der ähnlich wie die Aufrechterhaltung der Kaliumhomöostase durch EIIA^{Ntr} funktioniert. EIIA^{Ntr} steuert über die Interaktion mit PhoR die Expression von *pstABCS* und *pitB*. Andererseits könnte EIIA^{Ntr} auch den Transport von anorganischem Phosphat durch direkte Interaktion mit PitA inhibieren. In diesem Fall würde die

Phosphataufnahme bei ausreichender Versorgung reduziert und bei Mangel induziert werden. EIIA^{Ntr} könnte somit auch eine Phosphathomöostase vermitteln.

5.3. Regulation weiterer ZKS durch das PTS^{Ntr} in *E. coli*

Ligand-fishing Experimente deuten darauf hin, dass EIIA^{Ntr} mit weiteren Sensorkinasen in *E. coli* interagiert. Es konnten Interaktionen mit der Sensorkinase NtrB, PhoQ, CpxA und BaeS, aber nicht mit der Sensorkinase AtoS beobachtet werden (s. Abb. 4.3.2, 4.3.6, 4.3.9 bzw. 4.3.14). Dies sollte aber zukünftig noch genauer untersucht werden, da sowohl Köder- als auch Beuteprotein in den Ligand-fishing Experimenten überproduziert wurden. Es müsste ausgeschlossen werden, dass die verschiedenen Sensorkinasen nur aufgrund ähnlicher Domänenstrukturen mit EIIA^{Ntr} interagieren. Durch die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit den Sensorkinasen KdpD und PhoR werden deren Aktivitäten reguliert (Lüttmann *et al.*, 2009 und diese Arbeit). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für die oben genannten Sensorkinasen vorstellbar. EIIA^{Ntr} wirkt sich wahrscheinlich durch die Interaktion mit den Sensorkinasen auf deren Aktivität aus. In Folge dessen werden die Gene, die unter Kontrolle der jeweiligen ZKS stehen, durch EIIA^{Ntr} reguliert. Dies konnte für NtrB/NtrC-, PhoQ/PhoP- und CpxA/CpxR-abhängige Gene in dieser Arbeit gezeigt werden (s. Abb. 4.3.1, 4.3.3, 4.3.4, 4.3.7, 4.3.8, 4.3.10 – 4.3.12). EIIA^{Ntr} wirkt stimulatorisch auf die Expression NtrB/NtrC- und PhoQ/PhoP-regulierter Gene. Demgegenüber hat die Überproduktion von EIIA^{Ntr} einen drastischen negativen Effekt auf die Expression eines CpxA/CpxR-regulierten Gens (s. Abb. 4.3.10 und 4.3.11). Alle hier untersuchten Systeme, auf die EIIA^{Ntr} einen stimulatorischen Effekt hat, werden nur leicht durch das PTS^{Ntr} moduliert. Die Anwesenheit von EIIA^{Ntr} bewirkt für die unterschiedlichen Systeme einen Anstieg des Expressionsniveaus um ca. 50 bis 300 %. EIIA^{Ntr} ist in diesen Fällen für eine Feinregulation der Genexpression zuständig. Dies ist typisch für ZKS-Modulatoren (Heermann *et al.*, 2009, Carlyon *et al.*, 2010). Interessanterweise hat das PTS^{Ntr} auf Systeme, die negativ durch EIIA^{Ntr} reguliert werden, einen größeren Einfluss. Das CpxA/CpxP System wird durch Überproduktion von EIIA^{Ntr} ca. 14-fach reprimiert (s. Abb. 4.3.10 und 4.3.11). Dementsprechend wird die Expression von SsrB-kontrollierten Genen durch Überproduktion von EIIA^{Ntr} ca. um den Faktor 12 reduziert (Choi *et al.*, 2010).

Bei den verschiedenen untersuchten Zwei-Komponenten Systemen auf die EIIA^{Ntr} stimulatorisch wirkt (KdpD/KdpE, PhoR/PhoB, NtrB/NtrC und PhoQ/PhoP) handelt es sich um Systeme, die durch Mangel an wichtigen und essentiellen anorganischen Stoffen (Kalium, Phosphat, Stickstoff und Magnesium) induziert werden. Demgegenüber wird das CpxA/CpxR System durch die Veränderung des pH-Wertes und durch die Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen induziert und reguliert dann die Synthese von Chaperonen aber auch von Faktoren, die zur Virulenz beitragen (Hunke *et al.*, 2011; Otto and Silhavy, 2002). Ebenfalls konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass EIIA^{Ntr} die Expression der kleinen RNA GlmY reguliert (s. Abb. 6.16 – 6.18). Dabei ist die Transkription des σ^{54} -Promotors von *glmY* durch EIIA^{Ntr} reprimiert. Interessanterweise wird die Expression von *glmY* durch die Aktivität der Sensor kinase GlrK und den phosphorylierten Response Regulators GlrR gesteuert. GlrR ist gleichzeitig ein σ^{54} -Aktivatorprotein (Göpel *et al.*, 2011; Reichenbach *et al.*, 2008). EIIA^{Ntr} könnte über die Interaktion mit GlrK oder GlrR die Aktivitäten der ZKS Proteine inhibieren und so die Expression von *glmY* durch die Modulation der Aktivität des σ^{54} -Promotors reduzieren. Der Stimulus für das GlrK/GlrR Zwei-Komponenten System ist noch nicht identifiziert.

Es ist von besonderer Wichtigkeit zu erfahren, aus welchem Grund diese verschiedenen Systeme durch EIIA^{Ntr} reguliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass es in einer $\Delta ptsN$ Mutante zu einer verlangsamten Anpassung, der für spezifische Stresssituationen nötigen Genexpression, der Zellen an einen Kalium- und Phosphatmangel kommt (s. Abb. 4.1.23 und 4.2.23). Es wäre denkbar, dass sich eine $\Delta ptsN$ Mutante auch schlechter an Stickstoff- und Magnesiummangel anpassen kann. Das würde bedeuten, dass bei plötzlichem Mangel an Nährstoffen das EIIA^{Ntr} für die voll induzierte Synthese von Komponenten benötigt wird, welche diesen Mangel ausgleichen. Bei einer drastischen Veränderung der Umweltbedingungen, z. B. wenn *E. coli* aus dem Darm ausgeschieden wird, sollte sich die Konzentration der Nährstoffe drastisch ändern. Es wäre denkbar, dass die Anwesenheit von EIIA^{Ntr} in seiner unphosphorylierten Form eine schnelle Anpassung an diese veränderten Bedingungen garantiert. In diesem Fall wäre es auch sinnvoll, wenn Systeme, die nicht unmittelbar mit der Reaktion auf Nährstoffmangel zu tun haben (das CpxA/CpxR ZKS und das SsrA/SsrB ZKS in *S. enterica*) durch die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} reprimiert werden. Ist *E. coli* nicht mehr in seinen Wirt, werden wahrscheinlich die gesamte Virulenzinduktion und

assoziierte Funktionen wie z. B. das Cpx-System reprimiert. In *Legionella pneumophila* und *Pseudomonas aeruginosa* ist das PTS^{Ntr}-Protein EI^{Ntr} essentiell für die Virulenz der Bakterien (Pflüger-Grau and Görke, 2010).

In *E. coli* kann die Überexpression von *ptsN* die Letalität einer *rpoE* Deletion (kodiert für σ^E) supprimieren. Dabei führt die Überproduktion von EIIA^{Ntr} wahrscheinlich zu einer Reduktion von Zellwandstress. Der Mechanismus dieser Regulation war bisher ungeklärt (Hayden and Ades, 2008). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass EIIA^{Ntr} wahrscheinlich direkt mit den Sensorkinasen CpxA und BaeS interagiert. CpxA-abhängige Gene werden bei *ptsN* Überexpression reprimiert (Hayden and Ades, 2008 und diese Arbeit). Dies trifft auch für BaeS-regulierte Gene zu (Hayden and Ades, 2008). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion der Gene der Response Regulatoren die EIIA^{Ntr}-vermittelte Regulation zum Teil verloren geht (Hayden and Ades, 2008). Auch dies spricht für die Regulation der Aktivität der Zwei-Komponenten Systeme (CpxA/CpxR und BaeS/BaeR) durch EIIA^{Ntr}. Schon Hayden und Ades vermuteten, dass die Wahrnehmung von Zellwandstress durch die Überproduktion von EIIA^{Ntr} reduziert wird. Genau dieser Mechanismus scheint hier zuzutreffen. EIIA^{Ntr} reguliert vermutlich über direkte Protein-Protein Interaktion die Aktivitäten der ZKS und die Stresswahrnehmung wird so reduziert.

ZKS-Modulatoren wirken unterschiedlich auf Sensorkinasen. Die Beeinflussung der Autophosphorylierung der Kinase, der Phosphatübertragung auf den Response Regulator oder der Stabilisierung des Sensorkinase-Response Regulator Komplexes sind bekannte Mechanismen, wie solche Modulatoren ZKS beeinflussen können (Buelow and Raivio, 2009). Andere Modulatoren wirken auf die Aktivität von Response Regulatoren (Mitrophanov and Groisman, 2008). EIIA^{Ntr} scheint ein ganz besonderer Modulator zu sein. Zum Einen ist EIIA^{Ntr} in der Lage die Aktivität von Sensorkinasen und Response Regulatoren zu modulieren (Choi *et al.*, 2010, Lüttmann *et al.*, 2009 und diese Arbeit). Zum Zweiten ist EIIA^{Ntr} der erste ZKS-Modulator, der fähig ist mehrere ZKS zu regulieren (diese Arbeit).

5.4. Regulation des Phosphorylierungszustandes von EIIA^{Ntr} in *E. coli*

Über die Regulation des Phosphorylierungszustandes der Proteine des PTS^{Ntr} in *E. coli* war wenig bekannt. Es wurden *in vivo* und *in vitro* Analysen durchgeführt, die zeigten,

dass EIIA^{Ntr} des PTS^{Ntr} sowohl durch die Phosphorylierungskaskade EI^{Ntr} → NPr, als auch von EI → HPr phosphoryliert wird (Powell *et al.*, 1995; Rabus *et al.*, 1999; Zimmer *et al.*, 2008). Es konnten auch Kreuzphosphorylierungen zwischen den einzelnen Proteinen der beiden Systeme gezeigt werden (Powell *et al.*, 1995). In *P. putida* ist ein ähnlicher Mechanismus gefunden worden. Hier trägt das Fruktose-spezifische Transport-PTS zusätzlich zum EI^{Ntr} und NPr zu der Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} bei (Pflüger and de Lorenzo, 2008). In *E. coli* wurde gezeigt, dass das Stickstoff-PTS und das kanonische PTS System zu etwa gleichen Teilen an der Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} *in vivo* beitragen, wenn das Protein überproduziert wird und die Zellen auf einem Nicht-PTS-Substrat wie Glycerin als C-Quelle wachsen. (Zimmer *et al.*, 2008). EI kann das Transport-PTS Protein HPr, aber auch das PTS^{Ntr}-Protein NPr phosphorylieren. Des Weiteren kann HPr *in vitro* EIIA^{Ntr} phosphorylieren (Powell *et al.*, 1995). Aufgrund der früher beobachteten Kreuzphosphorylierungen war zu erwarten gewesen, dass auch durch die Deletion der Gene des kanonischen PTS bzw. durch die Verwendung von unterschiedlichen C-Quellen im Medium die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} beeinflusst wird. Dies könnte sich auch auf die EIIA^{Ntr}-vermittelten Regulationen auswirken. Für viele der vom PTS^{Ntr} ausgeübten Regulationen ist der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} entscheidend. Für die Repression des Kaliumtransporters Trk, die Regulation des Kdp-Systems und des Pho-Regulons ist die unphosphorylierte Form des Proteins wichtig (Lee *et al.*, 2007 und diese Arbeit). Um die Letalität einer *rpoE* Mutation zu supprimieren, ist wahrscheinlich auch die unphosphorylierte Form des Proteins notwendig (Hayden and Ades, 2008). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das kanonische PTS bei einem Wachstum der Zellen in Minimalmedium mit Glukose keinen Einfluss auf EIIA^{Ntr}-vermittelte regulatorische Prozesse besitzt (s. Abb. 4.1.6). Sie können nicht zur Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} beitragen, da die Proteine des kanonischen PTS unter diesen Bedingungen hauptsächlich unphosphoryliert vorliegen (Bettenbrock *et al.*, 2007). Durch die Verwendung von unterschiedlichen C-Quellen bei der Anzucht der *E. coli* Kulturen, zeigte sich, dass die Qualität der C-Quellen eine entscheidende Rolle für die Expression EIIA^{Ntr}-abhängiger Gene spielt (s. Abb. 4.4.4). Im Wildtypstamm konnte allerdings kein Unterschied der Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} bei unterschiedlichen C-Quellen festgestellt werden (s. Abb. 4.4.2). Obwohl die Expression des *kdp*-Operons über EIIA^{Ntr} durch die Kohlenstoffquelle reguliert ist (s. Abb. 4.4.4), liegt EIIA^{Ntr} im

Wildtyp unter allen Bedingungen überwiegend phosphoryliert vor. Vermutlich ist nur eine sehr geringe Menge von unphosphoryliertem EIIA^{Ntr} im Wildtyp und bei Anzucht in bevorzugten Zuckern (Glukose, Mannitol und N-Acetylglukosamin) vorhanden. Diese Fraktion könnte unter der Detektionsgrenze der verwendeten Methode liegen. Aus den Daten muss man postulieren, dass die Phosphorylierung dieser Fraktion durch die C-Quelle moduliert wird. Der Einfluss der C-Quelle auf die Expression des *kdp*-Operons lässt diese Vermutung sehr plausibel erscheinen. In einer $\Delta ptsP$ Mutante ist nicht nur der Einfluss der C-Quelle auf die *kdp*-Expression deutlicher, sondern hier wird auch der Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} durch die Kohlenstoffquelle sichtbar reguliert (s. Abb. 4.4.2 und 4.4.4). Interessanterweise liegt EIIA^{Ntr} bei Wachstum der Zellen in Medium mit bevorzugten C-Quellen in diesem Stamm hauptsächlich unphosphoryliert vor. Werden sekundäre Kohlenstoffquellen für die Anzucht der Bakterien verwendet, kann auch die phosphorylierte Form des Proteins detektiert werden. Dabei stimmt die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} gut mit dem publizierten Phospho-/Dephospho-Verhältnis von EIIA^{Glc} überein. In Glukose, Mannitol und N-Acetylglukosamin sind 5, 14 und 17 % von EIIA^{Glc} phosphoryliert (Bettenbrock *et al.*, 2007). Für EIIA^{Ntr} kann in diesen Fällen nur die unphosphorylierte Form des Proteins nachgewiesen werden. Bei Galaktose, Glycerin und Succinat beträgt die Phosphorylierung von EIIA^{Glc} 59, 45 und 65 % (Bettenbrock *et al.*, 2007). Ähnliche Beobachtungen wurden von einer anderen Gruppe bei Anzucht von *E. coli* in Minimalmedium mit Glukose, Mannitol, Galaktose, Glycerin, Succinat gemacht. Hier waren 3, 31, 77, 84, 94 % des EIIA^{Glc} Proteins bei Verwendung der zuvor genannten C-Quellen phosphoryliert (Hogema *et al.*, 1998). Bei Anzucht der Zellen mit sekundären Kohlenhydratquellen liegt auch EIIA^{Ntr} in der phosphorylierten und unphosphorylierten Form vor. Damit kann zum ersten Mal gezeigt werden, dass nicht nur die Phosphorylierung der Proteine des kanonischen PTS, sondern auch der Phosphorylierungsstatus des paralogen EIIA^{Ntr} (in der $\Delta ptsP$ Mutante) von der Qualität der Kohlenstoffquelle abhängt (diese Arbeit und Lüttmann *et al.*, 2009). Damit sind sowohl die Regulationsprozesse der Proteine des kanonischen PTS, als auch die der PTS^{Ntr} Proteine, vom metabolischen und physiologischen Status der Zelle abhängig. Der metabolische Status der Zellen ist auch in den unterschiedlichen Wachstumsphasen der Zellen verändert. In *Bacillus subtilis* ist bei der Versorgung der Zellen mit bevorzugten C-Quellen in der exponentiellen Wachstumsphase das PTS-Protein HPr am

Histidin¹⁵ unphosphoryliert. In der stationären Phase wird die Kohlenstoffquelle dann allerdings limitierend und es werden keine Phosphatgruppen mehr für den Import von Kohlenhydraten gebraucht. In diesem Fall nimmt die Phosphorylierung von HPr am Histidin¹⁵ zu (Landmann *et al.*, 2011b). In *E. coli* wird die β -Galaktosidase Aktivität wachstumsphasenabhängig gesteuert (Ishizuka *et al.*, 1993). Durch den stetigen Verbrauch von Glukose im Medium wird in späten Wachstumsphasen die C-Quelle limitierend, EIIA^{Glc} geht wahrscheinlich in seine phosphorylierte Form über und die Kohlenstoff Kataboliten Repression wird abgeschwächt. In diesem Fall sollte die Aktivität der β -Galaktosidase ansteigen. In *P. putida* wurde beschrieben, dass die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} von der Wachstumsphase abhängt. Die Phosphorylierung wurde in Komplexmedium, aber auch in Minimalmedium mit unterschiedlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen getestet. In allen Untersuchungen zeigte sich, dass das Protein in der exponentiellen Wachstumsphase sowohl phosphoryliert als auch unphosphoryliert vorliegt. Im Übergang in die stationäre Wachstumsphase kann das Protein nur noch in seiner phosphorylierten Form nachgewiesen werden (Pflüger and de Lorenzo, 2007). In *E. coli* hängt die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} in der $\Delta ptsP$ Mutante auch von der Wachstumsphase ab. Im Wildtyp liegt EIIA^{Ntr} in allen Wachstumsphasen phosphoryliert vor. Ähnlich wie für die Analyse des Phosphorylierungsstatus bei Wachstum in unterschiedlichen C-Quellen kann auch hier nur die phosphorylierte Form detektiert werden (s. Abb. 4.4.5). Allerdings ist zu beobachten, dass EIIA^{Ntr} trotzdem fähig ist KdpD und PhoR zu regulieren. Das bedeutet, auch hier müssen geringe Mengen an unphosphoryliertem EIIA^{Ntr}-Protein im Wildtyp vorliegen, welche für die Regulationen verantwortlich sind. Auch hier ist es möglich, dass diese geringen Mengen an unphosphoryliertem Protein durch die verwendete Methode nicht sichtbar sind. In einer $\Delta ptsP$ Mutante ist der Einfluss der Wachstumsphase auf die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} allerdings stark zu erkennen (s. Abb. 4.4.5). Während EIIA^{Ntr} in frühen Wachstumsphasen unphosphoryliert vorliegt, verschiebt sich das Phospho-/Dephospho-Verhältnis in späteren Wachstumsphasen hin zu einer Akkumulation der phosphorylierten Form. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen der Untersuchung der wachstumsabhängigen Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} in *P. putida* (Pflüger and de Lorenzo, 2007). Ebenfalls scheint die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} mit der wachstumsphasenabhängigen Phosphorylierung anderer PTS Proteine übereinzustimmen (Ishizuka *et al.*, 1993).

Das EI^{Ntr} des PTS^{Ntr} besitzt ein strukturelles Element, das im EI des kanonischen PTS fehlt. Das Protein besitzt zusätzlich zu der konservierten EI Domäne eine GAF Domäne am N-Terminus. GAF Domänen sind wichtige Signalwahrnehmungs-domänen und binden verschiedenste niedermolekulare Stoffe. Sie regulieren oft die Aktivität anderer Domänen des jeweiligen Proteins. In dem σ^{54} -Regulator NorR ist die GAF Domäne und der daran gebundene Ligand (Stickoxid) wichtig für die Funktion des Proteins als σ^{54} -Aktivator (Gardner *et al.*, 2003). In dem σ^{54} -Regulator NifA aus *Azotobacter vinelandii* wird über die Bindung von 2-Oxoglutarat an die GAF Domäne die Nukleotidhydrolyse zur RNAP- σ^{54} Aktivierung stimuliert (Little and Dixon, 2003). Auch für EI^{Ntr} wäre es möglich, dass durch die Bindung eines Liganden die Aktivität der EI Domäne reguliert wird. Hierdurch könnte sich die Autophosphorylierung und/oder der Transfer der Phosphatgruppe auf NPr verändern. In diesem Fall sollte auch der Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} verändert sein. Tatsächlich zeigt die Deletion der GAF Domäne von EI^{Ntr} Auswirkungen auf die Expression EIIA^{Ntr}-regulierter Gene (s. Abb. 4.4.7 und 4.4.12). Die Expression der Gene des KdpFABC-Systems und auch die Expression der Gene des Pho-Regulons wird durch die Deletion der GAF Domäne inhibiert. Weiterhin bewirkt die Deletion einen fast vollständigen Verlust der Interaktion zwischen EIIA^{Ntr} und KdpD (s. Abb. 4.4.9 – 4.4.11). Die GAF Domäne scheint also die Autophosphorylierung von EI^{Ntr} und/oder den Phosphotransfer auf NPr zu stimulieren. Eine sichtbare Auswirkung der Deletion der GAF Domäne auf den Phosphorylierungszustand von EIIA^{Ntr} konnte allerdings nicht beobachtet werden (s. Abb. 4.4.13 und 4.4.14). Im Wildtyp ist der sehr geringe Anteil an unphosphoryliertem EIIA^{Ntr} nicht zu detektieren. Folglich ist auch die Verstärkung der Phosphorylierung des Proteins in einer *ptsPΔGAF* Mutante nicht sichtbar. Durch die Deletion der GAF Domäne kommt es zu einer Hyperphosphorylierung von EIIA^{Ntr}, dies kann allerdings nur indirekt über die Verringerung der Expression EIIA^{Ntr}-regulierter Gene geschlossen werden. In der Arbeit wurde versucht Interaktionen der GAF Domäne mit anderen Proteinen nachzuweisen. Durch Ligand-fishing Experimente konnten allerdings keine Proteine gefunden werden, die spezifisch für die GAF Domäne waren, aber nicht an die EI Domäne gebunden waren (s. Abb. 4.4.17). In einem weiteren experimentellen Ansatz konnten Phosphatidylethanolamin- und Phosphatidylglyzerinhaltige Fettsäuren als mögliche Liganden der GAF Domäne von EI^{Ntr} identifiziert werden (s. Abb. 4.4.19). Diese Phospholipide sind Bestandteile von bakteriellen Membranen. Bakterien

verändern ihre Membranzusammensetzung in Folge von veränderten Umweltbedingungen. Es kann die Zusammensetzung der Lipide, aber auch die Struktur der Kopfgruppen der Fettsäuren verändert werden. Zur Anpassung an einen veränderten pH-Wert, Salzstress oder bei Eintritt in die stationäre Phase werden mehr saure Kopfgruppen wie Cardiolipin in die Membran eingebaut als neutrale Kopfgruppen, wie z. B. Phosphatidylethanolamin (Zhang and Rock, 2008). Dadurch verändert sich wahrscheinlich die typische Verteilung von Phospholipiden in der Membran (70-80 % Phosphatidylethanolamin, 20-25 % Phosphatidylglyzerin und 5-10 % Cardiolipin) (Dowhan, 2009). Durch die Reduktion der Verwendung von Phosphatidylethanolamin als Lipidkopfgruppe werden z. B. Enzym- und Transporterfunktionen gehemmt (Bogdanov *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2005). Möglicherweise ist EI^{Ntr} ein Sensor für Veränderungen der Membran bei Stresssituationen. Interagiert die GAF Domäne von EI^{Ntr} mit den Lipidkopfgruppen, könnten sich durch Stress ausgelöste Veränderungen in der Phosphorylierung von EI^{Ntr} widerspiegeln. In diesem Falle würde sich auch der Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} ändern und somit die EIIA^{Ntr}-vermittelten Regulationen angepasst werden.

In einem Transposonscreen konnte *sspA* als möglicher Regulator des PTS^{Ntr} identifiziert werden (Bahr *et al.*, 2011). Das Protein SspA (stringent starvation Protein A) ist ein RNA-Polymerase assoziiertes Protein (Ishihama and Saitoh, 1979). Es reguliert die Expression verschiedenster Gene und zusammen mit anderen Regulatoren die Expression der Gene des Bakteriophagen P1 (Hansen *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1994). Die Expression von *sspA* wird durch Kohlenstoffmangel, Mangel an Aminosäuren, Stickstoff und Phosphat ausgelöst (Williams *et al.*, 1994). Weiterhin wurde gezeigt, dass SspA für die Säurestressantwort in *E. coli* wichtig ist. Es reguliert über einen unbekanntem Mechanismus die globalen Regulatoren HNS und RpoS (Hansen *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SspA die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} reguliert (s. Abb. 4.4.21). Durch die Deletion von *sspA* liegt EIIA^{Ntr} nicht wie im Wildtyp fast vollständig phosphoryliert vor, sondern beide Formen des Proteins können nachgewiesen werden. Dies geschieht wahrscheinlich über die Regulation der Aktivitäten oder der Phosphorylierung der Phosphotransferasen EI^{Ntr} und NPr (Bahr *et al.*, 2011). Die veränderte Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} zeigt *in vivo* einen starken Einfluss auf die EIIA^{Ntr}-regulierten Gene (s. Abb. 4.4.22). Interessanterweise ist die Aktivierung der *kdp*-Expression durch eine Deletion von *sspA* stärker als in der $\Delta ptsP$

Mutante, obwohl nur ein geringerer Anteil von EIIA^{Ntr} in der *sspA*-Mutante unphosphoryliert ist. Es wird vermutet, dass *sspA* die Expression des *kdpFABC*-Operons zusätzlich über einen EIIA^{Ntr}-unabhängigen Mechanismus steuert (s. Abb. 4.4.23). Im Wildtyp sollte also durch das Vorhandensein von *sspA* die Phosphorylierung von EIIA^{Ntr} stimuliert werden. Dies steht im Widerspruch zu den eigentlichen Erwartungen. Unter Nährstoffmangelbedingungen wird die unphosphorylierte Form von EIIA^{Ntr} benötigt um die verschiedenen Zwei-Komponenten System zu induzieren. Unter diesen Bedingungen wird allerdings auch *sspA* stärker exprimiert und verringert somit wahrscheinlich die Menge an unphosphoryliertem EIIA^{Ntr}. Der genaue Mechanismus der Modulation des Phosphorylierungszustandes von EIIA^{Ntr} durch SspA ist noch nicht geklärt. Erste Analysen zeigten, dass SspA-regulierte Proteine, wie H-NS, RpoS oder der Säurestressregulator GadE den Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Ntr} nicht verändern (Daten nicht gezeigt).

5.5. Ausblick

EIIA^{Ntr} reguliert wahrscheinlich eine Vielzahl an Zwei-Komponenten Systemen in *E. coli* und verändert somit die Expression der ZKS-abhängigen Gene. Für den EIIA^{Ntr} regulierten Kaliumtransport konnte gezeigt werden, dass zwei wichtige Transporter direkt von EIIA^{Ntr} reguliert werden. EIIA^{Ntr} ist wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung der Kaliumhomöostase verantwortlich. In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, ob die Interaktion zwischen EIIA^{Ntr} und TrkA auch von der Kaliumkonzentration der Umgebung moduliert wird. Dies würde die Theorie der Regulation der Kaliumhomöostase durch EIIA^{Ntr} unterstützen. Ähnliche Experimente wären auch für die Regulation des Phosphathushaltes durch EIIA^{Ntr} vorstellbar. Hier sollte analysiert werden, ob EIIA^{Ntr} sich auf durch die Regulation der Synthese der Transportproteine auch auf den Import von Phosphatverbindungen auswirkt. Weiterhin wäre wichtig zu erfahren, ob auch die Phosphathomöostase durch EIIA^{Ntr} reguliert wird. Hier sollte neben der Untersuchung einer möglichen Regulation der Interaktion von EIIA^{Ntr} mit PhoR durch Phosphat auch die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit dem Phosphattransporter PitA analysiert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EIIA^{Ntr} eines der Systeme (CpxA/CpxR ZKS) für die Wahrnehmung von Zellwandstress reguliert. Hier sollte untersucht werden, ob durch die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit der Sensorkinase BaeS auch ein

zweites Zellwandstress-System betroffen ist. Im Weiteren sollte analysiert werden, ob auch das dritte, am Zellwandstress beteiligte System, das Rcs ZKS durch EIIA^{Ntr} reguliert wird. Könnten diese Experimente erfolgreich durchgeführt werden, sollte der Mechanismus, wie die Überproduktion EIIA^{Ntr} die σ^E -Lethalität supprimiert, aufgeklärt werden können.

EIIA^{Ntr} wirkt auf die GlnYZS Regulationskaskade. Die Expression der kleinen RNA GlnY wird durch EIIA^{Ntr} reprimiert. Da die Aktivität der σ^{54} -abhängigen Transkription reguliert wird, sollte untersucht werden, ob EIIA^{Ntr} auf das GlnK/GlnR Zwei-Komponenten System wirkt. Der Response Regulator ist ein Aktivatorprotein und wichtig für die σ^{54} -abhängige Transkription von *glnY*.

In dieser Arbeit konnte die Interaktion von EIIA^{Ntr} mit einigen der in *E. coli* vorkommenden Zwei-Komponenten Systeme gezeigt werden. Wichtig ist es nun auch die weiteren ZKS auf Interaktion mit EIIA^{Ntr} zu untersuchen. Hierdurch könnten neue Regulationsmechanismen gefunden werden und die globale Rolle von EIIA^{Ntr} als Regulatorprotein weiter untermauert werden. Viele, der bereits untersuchten regulatorischen Funktionen von EIIA^{Ntr} werden durch die unphosphorylierte Form des Proteins ausgeführt. Es wurde gezeigt, dass EIIA^{Ntr} im Wildtyp hauptsächlich phosphoryliert vorliegt. Daher ist es wichtig, die Regulation des Phosphorylierungsstatus der PTS^{Ntr} Proteine weiter zu untersuchen. Die GAF Domäne von EI^{Ntr} wirkt sich scheinbar auf die EIIA^{Ntr}-vermittelten Regulationen aus. Bei der Identifikation von Liganden der GAF Domäne wurden Membranlipide mit verschiedenen Kopfgruppen als mögliche Liganden gefunden. In weiteren Experimenten sollte diese mögliche Interaktion weiter verfolgt werden. Hilfreich hierbei wäre sicherlich auch die Lokalisation von EI^{Ntr} mit und ohne GAF Domäne in der Zelle zu analysieren.

Das Protein SspA bewirkt durch einen noch ungeklärten Mechanismus die Änderung der Phosphorylierung von EIIA^{Ntr}. Hier sollte durch Interaktionsstudien untersucht werden, ob SspA durch direkte Interaktion mit einem Protein des PTS^{Ntr} auf dieses System wirkt oder, ob weitere Proteine in die Regulation involviert sind. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich SspA auch auf andere der EIIA^{Ntr}-vermittelten Regulationen auswirkt.

6. Anhang

6.1. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Konstruktion/Herkunft	Referenz
BTH101	<i>F</i> , <i>cyaA-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> (<i>Str^r</i>), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i> BACTH reporter strain	Laborsammlung	EUROMEDEX BACTH Kit
DH5 α	ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_{K}^- , m_{K}^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$	Laborsammlung	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
HAK006	Δ <i>kdpABCD::neo</i> $\Delta(\text{lac-pro})$ <i>ara thi</i> ; <i>kdp--lacZ</i> Fusion	Laborsammlung	(Nakashima <i>et al.</i> , 1993)
IBPC903	N3433 Δ <i>pcnB::kan</i>	Laborsammlung	(Joanny <i>et al.</i> , 2007)
JW0389	<i>F</i> -, $\Delta(\text{araD-araB})567$, Δ <i>lacZ4787::rmb-3, Δ<i>phoB763::kan</i>, &$\lambda$$\bar{}$, <i>rph-1</i>, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i></i>	Laborsammlung	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW0390	<i>F</i> -, $\Delta(\text{araD-araB})567$, Δ <i>lacZ4787::rmb-3, Δ<i>phoR764::kan</i>, &$\lambda$$\bar{}$, <i>rph-1</i>, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i></i>	Laborsammlung	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW0740	<i>F</i> -, $\Delta(\text{araD-araB})567$, Δ <i>lacZ4787::rmb-3, Δ<i>galK729::kan</i>, $\lambda$$\bar{}$, <i>rph-1</i>, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i></i>	Laborsammlung	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW1510	<i>F</i> -, $\Delta(\text{araD-araB})567$, Δ <i>lacZ4787::rmb-3, $\lambda$$\bar{}$, Δ<i>lsrF738::kan</i>, <i>rph-1</i>, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i></i>	Laborsammlung	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW1511	<i>F</i> -, $\Delta(\text{araD-araB})567$, Δ <i>lacZ4787::rmb-3, $\lambda$$\bar{}$, Δ<i>lsrG739::kan</i>, <i>rph-1</i>, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i></i>	Laborsammlung	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW2797	<i>F</i> -, $\Delta(\text{araD-araB})567$, Δ <i>lacZ4787::rmb-3, $\lambda$$\bar{}$, Δ<i>ptsP753::kan</i>,</i>	Laborsammlung	(Baba <i>et al.</i> , 2006)

	<i>rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>		
JW3171	F-, <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rmB-3), λ̄, ΔptsN753::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Laborsammlung	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW3197	F-, <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rmB-3), LAM-, ΔsspB756::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Laborsammlung	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW3198	F-, <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rmB-3), λ̄, ΔsspA757::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Laborsammlung	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW3480	F-, <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rmB-3), λ̄, ΔgadE767::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Laborsammlung	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW5437	F-, <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rmB-3), λ̄, Δr::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Laborsammlung	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
R1279 (= CSH50-Derivat)	<i>Δ(pho-bglGFBHIK)201 Δ(lac-pro) ara thi</i>	Laborsammlung	(Schnetz <i>et al.</i> , 1996)
R1653	R1279 <i>Δ(ptsH ptsI crr)::neo</i>	Laborsammlung	(Görke and Rak, 1999)
R2404	R1279 <i>ΔptsP</i>	Laborsammlung	(Kalamorz <i>et al.</i> , 2007)
R2409	R1279 <i>ΔptsP Δ(ptsH ptsI crr)::neo</i>	Laborsammlung	(Kalamorz <i>et al.</i> , 2007)
R1213	R1279 <i>ΔptsN-O</i>	Laborsammlung	(Kalamorz <i>et al.</i> , 2007)
S162	<i>ΔbglGFBHIK, Δ(lac-pro) strA ara thi</i>	Laborsammlung	(Caramel and Schnetz, 1998)
S4197	MG1655 <i>rph⁺ ilvG⁺ ΔlacZ-pFDY217</i>	Laborsammlung	(Venkatesh <i>et al.</i> , 2010)
TP2862	F ⁻ <i>xyl argHI ΔlacX74 aroB ilvA Δcrr::neo</i>	Laborsammlung	(Levy <i>et al.</i> , 1990)
W3110	F ⁻ <i>λ IN(rrnD-rrnE)1</i>	Laborsammlung	(Bachmann, 1972; Kohara <i>et al.</i> , 1987)

XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZAM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Laborsammlung	
Z37	R1279 $\Delta yhbJ$	Laborsammlung	(Kalamorz <i>et al.</i> , 2007)
Z77	R1279 $\Delta ptsN::cat$	Laborsammlung	(Zimmer <i>et al.</i> , 2008)
Z78	R1279 $\Delta ptsO::cat$	Laborsammlung	(Zimmer <i>et al.</i> , 2008)
Z79	R1279 $\Delta ptsN$	Laborsammlung	(Zimmer <i>et al.</i> , 2008)
Z80	R1279 $\Delta ptsO$	Laborsammlung	(Zimmer <i>et al.</i> , 2008)
Z99	R1279 $\Delta ptsHIerr::kan \Delta ptsO::cat$	Laborsammlung	
Z101	R1279 $\Delta ptsO \Delta ptsHIerr::kan$	Laborsammlung	
Z154	R1279 <i>ptsP</i> Δ GAF::cat	Laborsammlung	
Z156	R1279 <i>ptsP</i> Δ GAF	Laborsammlung	
Z157	R1653 <i>ptsP</i> Δ GAF	Laborsammlung	
Z158	R1279 <i>attB</i> :: [<i>kdpFA</i> '- <i>lacZ</i>] <i>ptsP</i> Δ GAF::cat	Transduktion mit T4GT7 (Z154→Z267)	Diese Arbeit
Z159	R1279 <i>attB</i> :: [<i>kdpFA</i> '- <i>lacZ</i>] <i>ptsP</i> Δ GAF	Z158 aber Verlust der <i>cat</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z166	R1279 $\Delta trkA::cat$	Laborsammlung	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
Z185	HAK006 $\Delta ptsN::cat$	Laborsammlung	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
Z186	HAK006 $\Delta ptsN$	Laborsammlung	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
Z230	S162 $\Delta ptsN::cat$	Transduktion mit T4GT7 (Z77→S162)	Diese Arbeit
Z267	R1279 <i>attB</i> :: [<i>kdpFA</i> '- <i>lacZ</i>]	Laborsammlung	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
Z268	R1279 $\Delta ptsN \Delta attB$:: [<i>kdpFA</i> '- <i>lacZ</i>]	Laborsammlung	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
Z269	R1279 $\Delta ptsP \Delta attB$:: [<i>kdpFA</i> '- <i>lacZ</i>]	Laborsammlung	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)

Z283	R1279 $\Delta glmY$, $attB::[glmY-5' (-238 to +22) lacZ]$	Laborsammlung	
Z284	\square R1279 $\Delta glmY$, $attB::[glmY-5' (-238 to +22) lacZ$, -24 mutiert]	Laborsammlung	
Z285	R1279 $\Delta glmY$, $attB::[glmY-5' (-238 to +22) lacZ$, -10 mutiert]	Laborsammlung	
Z287	R1279 $\Delta ptsO$ $attB::[kdpFA`-lacZ]$	pBGG158/BamHI \rightarrow Z80 (Integration in $attB$)	Diese Arbeit
Z288	R1279 $\Delta ptsP$ $\Delta ptsN::cat$	Transduktion mit T4GT7 (Z77 \rightarrow R2404)	Diese Arbeit
Z290	S4197 $\Delta ptsN::cat$	Transduktion mit T4GT7 (Z77 \rightarrow S4197)	Diese Arbeit
Z336	BTH101 $\Delta ptsP::kan$	Transduktion mit T4GT7 (JW2797 \rightarrow BTH101)	Diese Arbeit
Z337	BTH101 $\Delta ptsP$	Z336 aber Verlust der kan -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z338	S4197 $attB::[phnC (-300 to +50) lacZ]$ $\Delta trkA::cat$	Transduktion mit T4GT7 (Z166 \rightarrow Z344)	Diese Arbeit
Z344	S4197 $attB::[phnC (-300 to +50) lacZ]$	pBGG290/BamHI \rightarrow S4197 (Integration in $attB$)	Diese Arbeit
Z345	BTH101 $ptsP\Delta GAF::cat$	Laborsammlung	
Z346	BTH101 $ptsP\Delta GAF$	Laborsammlung	
Z360	R1279 $attB::[glmZ (-424 bis +32)' - lacZ]$	Laborsammlung	(Göpel <i>et al.</i> , 2011)
Z366	HAK006 $ptsP\Delta GAF::cat$	Transduktion mit T4GT7 (Z154 \rightarrow HAK006)	Diese Arbeit
Z367	S4197 $attB::[kdpFA` to lacZ]$	Transduktion mit T4GT7 (Z267 \rightarrow S4197)	Diese Arbeit
Z368	S4197 $\Delta ptsN::cat$ $attB::[kdpFA` to lacZ]$	Transduktion mit T4GT7 (Z267 \rightarrow Z290)	Diese Arbeit

Z374	R1279 <i>ptsN::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3171→R1279)	Diese Arbeit
Z375	R1279 $\Delta ptsN$	Z374 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z376	S4197 $\Delta ptsP::kan$	Transduktion mit T4GT7 (JW2797→S4197)	Diese Arbeit
Z377	HAK006 <i>ptsPΔGAF</i>	Z366 aber Verlust der <i>cat</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z378	S4197 <i>ptsPΔGAF::cat</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z154→S4197)	Diese Arbeit
Z379	S4197 <i>ptsPΔGAF</i>	Z378 aber Verlust der <i>cat</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z380	S4197 <i>attB::[kdpFA` - lacZ] ptsPΔGAF::cat</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z154→Z367)	Diese Arbeit
Z381	S4197 <i>attB::[kdpFA` - lacZ] ptsPΔGAF</i>	Z380 aber Verlust der <i>cat</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z382	R1279 <i>ptsPΔGAF ΔptsO::cat</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z78→Z156)	Diese Arbeit
Z383	R1279 <i>attB:: [kdpFA`-lacZ] ptsPΔGAF ΔptsO::cat</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z78→Z159)	Diese Arbeit
Z386	BTH101 $\Delta ptsO::cat$	Transduktion mit T4GT7 (Z78→BTH101)	Diese Arbeit
Z402	S4197 $\Delta ptsN::kan$	Transduktion mit T4GT7 (JW3171→S4197)	Diese Arbeit
Z403	S4197 <i>attB::[kdpFA` - lacZ] ΔptsN::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3171→	Diese Arbeit

		Z367)	
Z404	S4197 $\Delta ptsP$	Z376 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z405	S4197 $\Delta ptsN$	Z402 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z406	S4197 <i>attB::[kdpFA` - lacZ] $\Delta ptsN$</i>	Z403 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z407	S4197 <i>attB::[kdpFA` - lacZ] $\Delta ptsO::cat$</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z78→ Z367)	Diese Arbeit
Z408	S4197 <i>attB::[kdpFA` - lacZ] ptsPΔGAF $\Delta ptsO::cat$</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z78→ Z381)	Diese Arbeit
Z413	S4197 $\Delta ptsN$ <i>attB::[phnC (-300 to +50) - lacZ]</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z344→ Z405)	Diese Arbeit
Z416	S4197 <i>ptsN-3xFLAG-kan</i>	<i>ptsN-3xFLAG-kan</i> Konstruktion durch PCR mit Primern BG741 and BG742 von pSUB11 (Wanner and Datsenko, 2000)	Diese Arbeit
Z417	R1279 $\Delta glmY$, <i>attB::[glmY-5' (-238 to +22) lacZ] $\Delta ptsN::kan$</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3171→ Z283)	Diese Arbeit
Z418	□ R1279 $\Delta glmY$, <i>attB::[glmY-5' (-238 to +22) lacZ, -24 mutiert] $\Delta ptsN::kan$</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3171→ Z284)	Diese Arbeit
Z419	R1279 $\Delta glmY$, <i>attB::[glmY-5' (-238 to +22) lacZ, -10 mutiert] $\Delta ptsN::kan$</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3171→ Z285)	Diese Arbeit
Z420	S4197 <i>attB::[phnC (-300 to +50) - lacZ] $\Delta trkA::cat$ $\Delta ptsN::kan$</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3171→ Z338)	<u>Diese Arbeit</u>
Z423	S4197 <i>attB::[kdpFA` - lacZ] $\Delta ptsP::kan$</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW2797→	Diese Arbeit

		Z367)	
Z424	S4197 <i>ptsN</i> -3xFLAG	Z416 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z428	R1279 Δ <i>glmY</i> , <i>attB</i> ::[<i>glmY</i> -5' (-238 to +22) <i>lacZ</i>] Δ <i>ptsN</i>	Z417 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z429	□ R1279 Δ <i>glmY</i> , <i>attB</i> ::[<i>glmY</i> -5' (-238 to +22) <i>lacZ</i> , -24 mutiert] Δ <i>ptsN</i>	Z418 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z430	R1279 Δ <i>glmY</i> , <i>attB</i> ::[<i>glmY</i> -5' (-238 to +22) <i>lacZ</i> , -10 mutiert] Δ <i>ptsN</i>	Z419 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z431	S4197 <i>attB</i> ::[<i>phnC</i> (-300 to +50) to <i>lacZ</i>] Δ <i>trkA</i> :: <i>cat</i> Δ <i>ptsN</i>	Z420 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z432	S4197 <i>ptsN</i> -3xFLAG Δ (<i>ptsH ptsI crr</i>):: <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (TP2811→ Z424)	Diese Arbeit
Z433	S4197 <i>ptsP</i> Δ <i>GAF ptsN</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z416→ Z379)	Diese Arbeit
Z434	S4197 Δ <i>ptsP ptsN</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z416→ Z404)	Diese Arbeit
Z435	S4197 <i>ptsP</i> Δ <i>GAF ptsN</i> -3xFLAG	Z433 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z436	S4197 Δ <i>ptsP ptsN</i> -3xFLAG	Z434 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z437	S4197 Δ <i>ptsN attB</i> ::[<i>ugpB</i> (-300 to +50)	pBGG292/BamHI→	Diese Arbeit

	- <i>lacZ</i>]	Z405 (Integration in <i>attB</i>)	
Z438	S4197 $\Delta ptsN$ <i>attB</i> ::[<i>phoBR</i> (-1113 to +50) - <i>lacZ</i>]	pBGG295/BamHI→ Z405 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z439	S4197 $\Delta ptsN$ <i>attB</i> ::[<i>pstS</i> (-400 to +50) - <i>lacZ</i>]	pBGG329/BamHI→ Z405 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z440	S4197 <i>attB</i> ::[<i>ugpB</i> (-300 to +50) - <i>lacZ</i>]	pBGG292/BamHI→ S4197 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z441	S4197 <i>attB</i> ::[<i>phoBR</i> (-1113 to +50) - <i>lacZ</i>]	pBGG295/BamHI→ S4197 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z442	S4197 <i>attB</i> ::[<i>pstS</i> (-400 to +50) - <i>lacZ</i>]	pBGG329/BamHI→ S4197 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z450	S4197 $\Delta ptsO$:: <i>cat</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z78→ S4197)	Diese Arbeit
Z451	S4197 $\Delta phoR$:: <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW0390→ S4197)	Diese Arbeit
Z452	S4197 $\Delta phoB$:: <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW0389→ S4197)	Diese Arbeit
Z453	S4197 $\Delta ptsN$ <i>attB</i> ::[<i>phnC</i> (-300 to +50) - <i>lacZ</i>] $\Delta phoR$:: <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW0390→ Z413)	Diese Arbeit
Z454	S4197 $\Delta ptsN$ <i>attB</i> ::[<i>ugpB</i> (-300 to +50) - <i>lacZ</i>] $\Delta phoR$:: <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW0390→ Z437)	Diese Arbeit
Z455	S4197 <i>attB</i> ::[<i>phnC</i> (-300 to +50) - <i>lacZ</i>] $\Delta phoR$:: <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW0390→ Z344)	Diese Arbeit
Z456	S4197 <i>attB</i> ::[<i>ugpB</i> (-300 to +50) - <i>lacZ</i>] $\Delta phoR$:: <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW0390→ Z440)	Diese Arbeit

Z465	S4197 <i>ptsPΔGAF attB::[ugpB (-300 to +50) - lacZ]</i>	pBGG292/BamHI→ Z379 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z466	S4197 <i>ΔptsP attB::[ugpB (-300 to +50) - lacZ]</i>	pBGG292/BamHI→ Z404 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z467	S4197 <i>ΔptsO::cat attB::[ugpB (-300 to +50) - lacZ]</i>	pBGG292/BamHI→ Z450 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z468	S4197 <i>ptsPΔGAF attB::[phoBR (-1113 to +50) - lacZ]</i>	pBGG295/BamHI→ Z379 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z469	S4197 <i>ΔptsP attB::[phoBR (-1113 to +50) - lacZ]</i>	pBGG295/BamHI→ Z404 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z470	S4197 <i>ΔptsO::cat attB::[phoBR (-1113 to +50) - lacZ]</i>	pBGG295/BamHI→ Z450 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z471	S4197 <i>ptsPΔGAF attB::[pstS (-400 to +50) - lacZ]</i>	pBGG329/BamHI→ Z379 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z472	S4197 <i>ΔptsP attB::[pstS (-400 to +50) - lacZ]</i>	pBGG329/BamHI→ Z404 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z473	S4197 <i>ΔptsO::cat attB::[pstS (-400 to +50) - lacZ]</i>	pBGG329/BamHI→ Z450 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z474	S4197 <i>ptsPΔGAF attB::[phnC (-300 to +50) - lacZ]</i>	pBGG290/BamHI→ Z379 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z475	S4197 <i>ΔptsP attB::[phnC (-300 to +50) - lacZ]</i>	pBGG290/BamHI→ Z404 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z476	S4197 <i>ΔptsO::cat attB::[phnC (-300 to +50) - lacZ]</i>	pBGG290/BamHI→ Z450 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z484	S4197 <i>ptsN-3xFLAG ΔptsO::cat</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z78→ Z424)	Diese Arbeit

Z499	S4197 $\Delta ptsN$ attB::[<i>ugpB</i> (-300 to +50) - <i>lacZ</i>] $\Delta trkA::cat$	Transduktion mit T4GT7 (Z166→ Z437)	Diese Arbeit
Z500	S4197 attB::[<i>ugpB</i> (-300 to +50) - <i>lacZ</i>] $\Delta trkA::cat$	Transduktion mit T4GT7 (Z166→ Z440)	Diese Arbeit
Z501	R1279 attB:: [<i>kdpFA</i> ` - <i>lacZ</i>] <i>ptsN</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z416→ Z267)	Diese Arbeit
Z502	R1279 attB:: [<i>kdpFA</i> ` - <i>lacZ</i>] $\Delta ptsP$ <i>ptsN</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z416→ Z269)	Diese Arbeit
Z503	R1279 attB:: [<i>kdpFA</i> ` - <i>lacZ</i>] <i>ptsP</i> Δ GAF <i>ptsN</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z416→ Z356)	Diese Arbeit
Z504	R1279 attB:: [<i>kdpFA</i> ` - <i>lacZ</i>] <i>ptsN</i> -3xFLAG	Z501 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z505	R1279 attB:: [<i>kdpFA</i> ` - <i>lacZ</i>] $\Delta ptsP$ <i>ptsN</i> -3xFLAG	Z502 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z506	R1279 attB:: [<i>kdpFA</i> ` - <i>lacZ</i>] <i>ptsP</i> Δ GAF <i>ptsN</i> -3xFLAG	Z503 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z507	S4197 $\Delta ptsO$	Z450 aber Verlust der <i>cat</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z508	S4197 attB::[<i>kdpFA</i> ` - <i>lacZ</i>] $\Delta ydcW::kan$	Transduktion mit T4GT7 (JW 1439→ Z367)	Diese Arbeit
Z510	S4197 attB::[<i>kdpFA</i> ` - <i>lacZ</i>] $\Delta lsrF::kan$	Transduktion mit T4GT7 (JW 1510→ Z367)	Diese Arbeit
Z512	S4197 attB::[<i>kdpFA</i> ` - <i>lacZ</i>] $\Delta lsrG::kan$	Transduktion mit T4GT7 (JW 1511→	Diese Arbeit

		Z367)	
Z514	S4197 <i>attB::[kdpFA`-lacZ]</i> <i>ΔsspB::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3197→ Z367)	Diese Arbeit
Z516	S4197 <i>attB::[kdpFA`-lacZ]</i> <i>ΔsspA::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3198→ Z367)	Diese Arbeit
Z520	S4197 <i>attB::[kdpFA`-lacZ]</i> <i>ΔptsP</i>	Z423 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z521	R1279 <i>attB::[kdpFA`-lacZ]</i> <i>ΔptsN::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3171→ Z267)	Diese Arbeit
Z522	R1279 <i>attB::[kdpFA`-lacZ]</i> <i>ptsN-3xFLAG ΔsspB::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3197→ Z504)	Diese Arbeit
Z523	R1279 <i>attB::[kdpFA`-lacZ]</i> <i>ptsN-3xFLAG ΔsspA::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3198→ Z504)	Diese Arbeit
Z534	R1279 <i>ΔptsO ptsN-3xFLAG-kan</i>	<i>ptsN-3xFLAG-kan</i> Konstruktion durch PCR mit Primern BG741 and BG742 von pSUB11 (Wanner and Datsenko, 2000)	Diese Arbeit
Z535	S4197 <i>ΔptsO ptsN-3xFLAG-kan</i>	<i>ptsN-3xFLAG-kan</i> Konstruktion durch PCR mit Primern BG741 and BG742 von pSUB11 (Wanner and Datsenko, 2000)	Diese Arbeit
Z536	S4197 <i>ΔptsN attB::[phnC (-300 to +50) - lacZ]</i> <i>ΔphoR</i>	Z453 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z537	S4197 <i>ΔptsN attB::[ugpB (-300 to +50) - lacZ]</i> <i>ΔphoR</i>	Z454 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and	Diese Arbeit

		Wanner, 2000)	
Z538	S4197 <i>attB::[phnC (-300 to +50) - lacZ] ΔphoR</i>	Z455 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z539	S4197 <i>attB::[ugxB (-300 to +50) - lacZ] ΔphoR</i>	Z456 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z540	R1279 <i>attB::[kdpFA'- lacZ] ptsN-3xFLAG ΔlsrF::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW 1510→ Z504)	Diese Arbeit
Z541	R1279 <i>attB::[kdpFA'- lacZ] ptsN-3xFLAG ΔlsrG::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW 1511→ Z504)	Diese Arbeit
Z542	S4197 <i>attB::[phnC (-300 to +50) to lacZ] phoQ::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW 1115→ Z344)	Diese Arbeit
Z543	S4197 <i>ΔptsN attB::[phnC (-300 to +50) to lacZ] phoQ::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW 1115→ Z413)	Diese Arbeit
Z544	S4197 <i>ΔptsN attB::[ugxB (-300 to +50) to lacZ] phoQ::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW 1115→ Z437)	Diese Arbeit
Z545	S4197 <i>attB::[ugxB (-300 to +50) to lacZ] phoQ::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW 1115→ Z440)	Diese Arbeit
Z546	S4197 <i>attB::[phnC (-300 to +50) to lacZ] phoP::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW 1116→ Z344)	Diese Arbeit
Z547	S4197 <i>ΔptsN attB::[phnC (-300 to +50) to lacZ] phoP::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW 1116→ Z413)	Diese Arbeit
Z548	R1279 <i>ptsN-3xFLAG attB::[kdpFA'- lacZ] galK::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW 0740→ Z504)	Diese Arbeit
Z549	R1279 <i>ptsN -3xFLAG attB::[kdpFA'- lacZ] pcnB::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (IBPC903→ Z504)	Diese Arbeit

Z550	R1279 <i>ptsN</i> -3xFLAG <i>attB::[kdpFA'-lacZ] rpoS::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW5437→ Z504)	Diese Arbeit
Z551	R1279 <i>ptsN</i> -3xFLAG <i>attB::[kdpFA'-lacZ] gadE::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3480→ Z504)	Diese Arbeit
Z552	R1279 Δ <i>ptsN attB::[kdpFA'-lacZ]</i>	Z521 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z565	S4197 <i>ptsN</i> -3xFLAG Δ <i>ptsP sspA::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3198→ Z436)	Diese Arbeit
Z566	S4197 <i>attB::[phnC (-300 to +50)</i> <i>lacZ] ΔrpoS::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW5437→ Z344)	Diese Arbeit
Z567	S4197 Δ <i>ptsN attB::[phnC (-300 to +50)</i> <i>lacZ] ΔrpoS::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW5437→ Z413)	Diese Arbeit
Z568	R1279 Δ <i>ptsP ptsN</i> -3xFLAG <i>attB::[kdpFA'-lacZ] sspA::kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3198→ Z505)	Diese Arbeit
Z571	R1279 <i>ptsN</i> -3xFLAG <i>attB::[kdpFA'-lacZ] sspAB::cat</i>	<i>sspAB::cat</i> Konstruktion durch PCR mit Primern BG849 and BG850 von pKD3 (Wanner and Datsenko, 2000)	Diese Arbeit
Z572	S4197 Δ <i>ptsN phoB</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	<i>phoB</i> -3xFLAG- <i>kan</i> Konstruktion durch PCR mit Primern BG845 and BG846 von pSUB11 (Wanner and Datsenko, 2000)	Diese Arbeit
Z573	S4197 Δ <i>ptsN phoR</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	<i>phoR</i> -3xFLAG- <i>kan</i> Konstruktion durch PCR mit Primern BG847 and BG848 von pSUB11 (Wanner	Diese Arbeit

		and Datsenko, 2000)	
Z574	S4197 $\Delta ptsN$ <i>phoB</i> -3xFLAG	Z572 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z575	S4197 $\Delta ptsN$ <i>phoR</i> -3xFLAG	Z573 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z576	S4197 <i>phoB</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z572→ S4197)	Diese Arbeit
Z581	S4197 <i>phoR</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z573→ S4197)	Diese Arbeit
Z582	R1279 <i>phoR</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z573→ R1279)	Diese Arbeit
Z583	S162 <i>phoR</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z573→ S162)	Diese Arbeit
Z584	R1279 $\Delta ptsN::cat$ <i>phoR</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z573→ Z77)	Diese Arbeit
Z585	S162 $\Delta ptsN::cat$ <i>phoR</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z573→ Z230)	Diese Arbeit
Z586	R1279 <i>ptsP</i> Δ GAF <i>ptsN</i> -3xFLAG <i>attB</i> ::[<i>kdpFA</i> '- <i>lacZ</i>] Δ <i>sspA</i> :: <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3198→ Z506)	Diese Arbeit
Z594	S4197 <i>phoB</i> -3xFLAG	Z576 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z595	S4197 <i>phoR</i> -3xFLAG	Z581 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z600	S4197 <i>phoBR</i> :: <i>cat</i>	<i>phoBR</i> :: <i>cat</i> Konstruktion durch	Diese Arbeit

		PCR mit Primern BG867 and BG868 von pKD3 (Wanner and Datsenko, 2000)	
Z607	S4197 <i>ΔphoBR</i>	Z600 aber Verlust der <i>cat</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z608	S4197 <i>ΔphoBR ptsN-3xFLAG-kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z416→Z607)	Diese Arbeit
Z609	S4197 <i>ΔphoBR ptsN-3xFLAG</i>	Z608 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z610	R1279 <i>yhbJ-3xFLAG ΔglmY::cat</i>	Laborsammlung	
Z611	R1279 <i>yhbJ-3xFLAG ΔglmY</i>	Z610 aber Verlust der <i>cat</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z622	S4197 <i>nrB-3xFLAG-kan</i>	<i>nrB-3xFLAG-kan</i> Konstruktion durch PCR mit Primern BG882 and BG883 von pSUB11 (Wanner and Datsenko, 2000)	Diese Arbeit
Z623	S4197 <i>nrB-3xFLAG</i>	Z622 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z624	S4197 <i>ΔptsN nrB-3xFLAG-kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z622→Z405)	Diese Arbeit
Z625	S4197 <i>ΔptsN nrB-3xFLAG</i>	Z624 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z626	S4197 <i>cpxA-3xFLAG-kan</i>	<i>cpxA-3xFLAG-kan</i>	Diese Arbeit

		Konstruktion durch PCR mit Primern BG890 and BG891 von pSUB11 (Wanner and Datsenko, 2000)	
Z627	S4197 <i>cpxA-3xFLAG</i>	Z626 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z628	S4197 Δ <i>ptsN cpxA-3xFLAG-kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z626→Z405)	Diese Arbeit
Z629	S4197 Δ <i>ptsN cpxA-3xFLAG</i>	Z628 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z630	S4197 <i>evgS-3xFLAG-kan</i>	<i>evgS-3xFLAG-kan</i> Konstruktion durch PCR mit Primern BG898 and BG899 von pSUB11 (Wanner and Datsenko, 2000)	Diese Arbeit
Z631	S4197 <i>evgS-3xFLAG</i>	Z630 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z632	S4197 Δ <i>ptsN evgS-3xFLAG-kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z630→Z405)	Diese Arbeit
Z633	S4197 Δ <i>ptsN evgS-3xFLAG</i>	Z632 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z634	S4197 <i>baeS-3xFLAG-kan</i>	<i>baeS-3xFLAG-kan</i> Konstruktion durch PCR mit Primern BG886 and BG887 von pSUB11 (Wanner and Datsenko, 2000)	Diese Arbeit

Z635	S4197 <i>baeS</i> -3xFLAG	Z634 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z636	S4197 Δ <i>ptsN</i> <i>baeS</i> -3xFLAG - <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z634→Z405)	Diese Arbeit
Z637	S4197 Δ <i>ptsN</i> <i>baeS</i> -3xFLAG	Z636 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z638	S4197 <i>phoQ</i> -3xFLAG- <i>kan</i>	<i>phoQ</i> -3xFLAG- <i>kan</i> Konstruktion durch PCR mit Primern BG902 and BG903 von pSUB11 (Wanner and Datsenko, 2000)	Diese Arbeit
Z639	S4197 <i>phoQ</i> -3xFLAG	Z638 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z640	S4197 Δ <i>ptsN</i> <i>phoQ</i> -3xFLAG - <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z638→Z405)	Diese Arbeit
Z641	S4197 Δ <i>ptsN</i> <i>phoQ</i> -3xFLAG	Z640 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z656	S4197 Δ <i>phoBR</i> <i>ptsN</i> -3xFLAG <i>attB</i> ::[<i>P</i> _{<i>tac</i>} - <i>SD</i> _{<i>bgIB</i>} - <i>phoB</i> -3xFLAG]	pDL31/BamHI→Z609 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z657	S4197 Δ <i>phoBR</i> <i>ptsN</i> -3xFLAG <i>attB</i> ::[<i>P</i> _{<i>tac</i>} - <i>SD</i> _{<i>bgIB</i>} - <i>phoR</i> -3xFLAG]	pDL32/BamHI→Z609 (Integration in <i>attB</i>)	Diese Arbeit
Z658	R1279 Δ <i>ptsN</i> <i>attB</i> ::[<i>kdpFA</i> '- <i>lacZ</i>] <i>ΔsspA</i> :: <i>kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (JW3198→Z552)	Diese Arbeit
Z665	S4197 Δ <i>phoBR</i> Δ <i>ptsN</i> :: <i>kan</i>	Transduktion mit	Diese Arbeit

		T4GT7 (JW3171→ Z607)	
Z666	S4197 <i>ΔphoBR ΔptsN</i>	Z665 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z667	R1279 <i>yhbJ-3xFLAG ΔglmY</i> <i>ΔglmZ::cat</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z45→ Z611)	Diese Arbeit
Z668	S4197 <i>atoS-3xFLAG-kan</i>	<i>atoS-3xFLAG-kan</i> Konstruktion durch PCR mit Primern BG936 and BG937 von pSUB11 (Wanner and Datsenko, 2000)	Diese Arbeit
Z669	S4197 <i>atoS-3xFLAG</i>	Z668 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit
Z670	S4197 <i>ΔptsN atoS-3xFLAG-kan</i>	Transduktion mit T4GT7 (Z668→ Z405)	Diese Arbeit
Z671	S4197 <i>ΔptsN atoS-3xFLAG</i>	Z670 aber Verlust der <i>kan</i> -Kassette durch pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)	Diese Arbeit

6.2. Plasmide

Plasmidname	Replikationsursprung ¹ / Antibiotikaresistenz	Eigenschaften	Herkunft / Konstruktion
pKES15	A Kanamycin Spectinomycin	Vektor für transkriptionelle <i>lacZ</i> Fusionen durch Insertion eines PCR-Fragments über die Sall und XbaI Schnittstellen	Nagarajavel, 2007
pKEM04	A Kanamycin Spectinomycin	Vektor für translationale <i>lacZ</i> Fusionen durch Insertion eines PCR-Fragments über die Sall	(Nagarajavel <i>et al.</i> , 2007)

		und XbaI Schnittstellen	
pKES99	A Kanamycin Spectinomycin	P_{lacUV5} vor <i>lacZ</i>	(Nagarajavel <i>et al.</i> , 2007)
pBAD18	B <u>Ampicillin</u>	Expressionsvektor; Promotor; MCS; <i>araC</i>	P_{Ara^-} (Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD18-cm	B <u>Chloramphenicol</u>	Expressionsvektor; Promotor; MCS; <i>araC</i>	P_{Ara^-} (Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD30	A Ampicillin	Expressionsvektor; Promotor; MCS; <i>araC</i>	P_{Ara^-} (Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD33	A Chloramphenicol	Expressionsvektor; Promotor; MCS; <i>araC</i>	P_{Ara^-} (Guzman <i>et al.</i> , 1995)
<u>pBD</u>	B Ampicillin	<i>kdpD</i> unter P_{Ara^-} -Kontrolle in pBAD18	(Jung and Altendorf, 1998b)
pCP20	C Ampicillin/ Chloramphenicol	FLP Rekombinase unter Kontrolle eines temperatursensitiven Promotors	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD3	E <u>Chloramphenicol</u>	PCR-Template Plasmid für Deletion in <i>E.coli</i> ; RBS downstream der <i>cat</i> -Kassette, um polare Effekte zu verhindern	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD46	C Ampicillin	Plasmid für die λ RED Rekombinationsgene (unter Kontrolle von P_{Ara})	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKES170	B Ampicillin	Plasmid zur Überproduktion von Proteinen unter P_{lac^-} - Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgarno Sequenz	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
pKT25	A Kanamycin	N-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B.</i> <i>pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter P_{lac^-} -Kontrolle, MCS, Vector für BACTH N-	EUROMEDEX BACTH System Kit

		terminaler T25 Tag	
p-25N	A Kanamycin	N-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter P_{lac} -Kontrolle, MCS, Vector für BACTH C-terminaler T25 Tag	(Claessen <i>et al.</i> , 2008)
pKT25-zip	A Kanamycin	N-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) fusioniert mit dem Leucin-Zipper von GCN4 unter P_{lac} -Kontrolle	EUROMEDEX BACTH System Kit
pLDR8	C Kanamycin	Helferplasmid zur Integration von DNA-Fragmenten in die $\lambda attB$ Seite; λ -Integrase unter λP_R -Kontrolle mit λcI_{857} Repressor	(Diederich <i>et al.</i> , 1992)
pPV5-3 R503Q	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (R503Q) unter P_{Ara} -Kontrolle in pBAD18	(Jung and Altendorf, 1998b)
pPV5-3 R506Q	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (R506Q) unter P_{Ara} -Kontrolle in pBAD18	(Jung and Altendorf, 1998b)
pPV5-3 R508Q	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (R508Q) unter P_{Ara} -Kontrolle in pBAD18	(Jung and Altendorf, 1998b)
pPV5-3 R511Q	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (R511Q) unter P_{Ara} -Kontrolle in pBAD18	(Jung and Altendorf, 1998b)
pPV5-3 R513Q	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (R513Q) unter P_{Ara} -Kontrolle in pBAD18	(Jung and Altendorf, 1998b)
pUT18	B Ampicillin	C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle, MCS, Vector für BACTH C-terminaler T18 Tag	EUROMEDEX BACTH System Kit
pUT18C	B Ampicillin	C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle, MCS,	EUROMEDEX BACTH System Kit

		Vector für BACTH N-terminaler T18 Tag	
pUT18C-zip	B Ampicillin	C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) fusioniert mit dem Leucin-Zipper von GCN4 unter P_{lac} -Kontrolle	EUROMEDEX BACTH System Kit
pSUB11	E Kanamycin	PCR-Template Plasmid für das chromosomale FLAG-Tagging von Genen in <i>E.coli</i> ; RBS downstream der <i>kan</i> -Kassette, um polare Effekte zu verhindern	(Uzzau <i>et al.</i> , 2001)
pGP1660	A Kanamycin	<i>ptsN</i> aus <i>R. eutropha</i> fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter P_{lac} -Kontrolle (T25- <i>ptsN</i>)	Laborsammlung
pGP1674	A Kanamycin	<i>kdpD2</i> aus <i>R. eutropha</i> fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter P_{lac} -Kontrolle (<i>kdpD2</i> -T25)	Laborsammlung
pGP1675	B <u>Ampicillin</u>	<i>kdpD2</i> aus <i>R. eutropha</i> fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (<i>kdpD2</i> -T18)	Laborsammlung
pGP1682	A Kanamycin	<i>ptsN</i> (H67A) aus <i>R. eutropha</i> fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224)	Laborsammlung

		unter P_{lac} -Kontrolle (T25- <i>ptsN</i> (H67A))	
pBGG86	B Ampicillin	<i>ptsN</i> mit einer optimalen Shine-Dalgano Sequenz (AAAGGAGG-7nt-ATG) unter P_{Ara} -Kontrolle	(Zimmer <i>et al.</i> , 2008)
pBGG92	B Ampicillin	<i>ptsN</i> H73D (CAT → GAT) mit einer optimalen Shine-Dalgano Sequenz (AAAGGAGG-7nt-ATG) unter P_{Ara} -Kontrolle	(Zimmer <i>et al.</i> , 2008)
pBGG93	B Ampicillin	<i>ptsN</i> H73A (CAT → GCT) mit einer optimalen Shine-Dalgano Sequenz (AAAGGAGG-7nt-ATG) unter P_{Ara} -Kontrolle	(Zimmer <i>et al.</i> , 2008)
pBGG158	A Kanamycin Spectinomycin	Transkriptionelle Fusion von <i>kdpFA</i> -3' (-312 bis +121) mit <i>lacZ</i>	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
pBGG164	B Ampicillin	<i>yhbJ</i> mit N-terminalem Strep-Tag unter P_{tac} -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pKES170 Δ NdeI-PstI ligiert mit Produkt aus PCR BG399/BG397 (Template: chromosomale DNA)
pBGG190	B Ampicillin	<i>ptsN</i> mit C-terminalem His Tag unter P_{tac} -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
pBGG194	B Ampicillin	<i>yhbJ</i> G8A mit N-terminalem Strep-Tag unter P_{tac} -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Laborsammlung
pBGG211	B	<i>ptsN</i> H73A (CAT → GCT)	(Lüttmann <i>et al.</i> ,

	Ampicillin	mit C-terminalem His Tag unter P_{tac} -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	2009)
pBGG217	B Ampicillin	<i>ptsN</i> mit N-terminalem Strep-Tag unter P_{tac} -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG194 Δ NheI-PstI ligiert mit Produkt aus PCR BG506/BG507 (Template: chromosomale DNA)
pBGG217-H73A	B Ampicillin	<i>ptsN</i> (H73A) mit N-terminalem Strep-Tag unter P_{tac} -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG194 Δ NheI-PstI ligiert mit Produkt aus PCR BG506/BG507 (Template: pBGG93)
pBGG228	B Ampicillin	<i>ptsP</i> mit N-terminalem Strep-Tag unter P_{tac} -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG194 Δ NheI-PstI ligiert mit Produkt aus PCR BG508/BG509 (Template: chromosomale DNA)
pBGG230	B Ampicillin	<i>crr</i> mit N-terminalem Strep-Tag unter P_{tac} -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG194 Δ NheI-PstI ligiert mit Produkt aus PCR BG512/BG513 (Template: chromosomale DNA)
pBGG237	B Ampicillin	Leerplasmid mit N-terminalem Strep-Tag unter P_{tac} -Kontrolle mit T7 gene 10	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG194 Δ NheI-

		Shine-Dalgarno Sequenz	PstI ligiert mit Primerhybridisierung aus BG515/BG516
pBGG258	B Ampicillin	<i>ptsN</i> fusioniert mit C-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>ptsN</i>)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG544/BG545 (Template: pBGG86)
pBGG259	B Ampicillin	<i>ptsN</i> H73A (CAT \rightarrow GCT) fusioniert mit C-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>ptsN</i> H73A)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG544/BG545 (Template: pBGG93)
pBGG260	B Ampicillin	<i>kdpE</i> fusioniert mit C-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpE</i>)	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
pBGG261	A Kanamycin	<i>ptsN</i> fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter P_{lac} -Kontrolle (T25- <i>ptsN</i>)	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
pBGG262	A Kanamycin	<i>ptsN</i> H73A (CAT \rightarrow GCT) fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter P_{lac} -Kontrolle (T25- <i>ptsN</i> H73A)	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
pBGG263	A Kanamycin	<i>kdpE</i> fusioniert mit N-terminalem Teil der	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)

		Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter P_{lac} -Kontrolle (T25- <i>kdpE</i>)	
pBGG264	B Ampicillin	<i>kdpD</i> fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i>)	(Lüttmann <i>et al.</i> , 2009)
pBGG265	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (1-395) fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> 1-395)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG550/BG552 (Template: chromosomale DNA)
pBGG266	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (499-894) fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> 499-894)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG553/BG551 (Template: chromosomale DNA)
pBGG267	A Kanamycin	<i>kdpD</i> fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter P_{lac} -Kontrolle (<i>kdpD</i> -T25)	Diese Arbeit Konstruktion: p-25N Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG550/BG551 (Template: chromosomale DNA)
pBGG268	A Kanamycin	<i>kdpD</i> (1-395) fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224)	Diese Arbeit Konstruktion: p-25N Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR

		unter P_{lac} -Kontrolle (<i>kdpD</i> 1-395-T25)	BG550/BG552 (Template: chromosomale DNA)
pBGG269	A Kanamycin	<i>kdpD</i> (499-894) fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter P_{lac} -Kontrolle (<i>kdpD</i> 499-894-T25)	Diese Arbeit Konstruktion: p-25N Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG553/BG551 (Template: chromosomale DNA)
pBGG282	A Kanamycin	<i>phoB</i> fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter P_{lac} -Kontrolle (T25- <i>phoB</i>)	Diese Arbeit Konstruktion: pKT25 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG572/BG573 (Template: chromosomale DNA)
pBGG283	B Ampicillin	<i>phoB</i> fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>phoB</i>)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG572/BG573 (Template: chromosomale DNA)
pBGG288	A Kanamycin	<i>phoR</i> fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter P_{lac} -Kontrolle (<i>phoR</i> -T25)	Diese Arbeit Konstruktion: p-25N Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG577/BG576 (Template: chromosomale DNA)
pBGG289	B Ampicillin	<i>phoR</i> fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR

		unter P_{lac} -Kontrolle (<i>phoR</i> -T18)	BG577/BG576 (Template: chromosomale DNA)
pBGG290	A Kanamycin Spectinomycin	Transkriptionelle Fusion von <i>phnC</i> -3' (-300 bis +50) mit <i>lacZ</i>	Diese Arbeit Konstruktion: pKES15 Δ SaII-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG561/BG562 (Template: chromosomale DNA)
pBGG291	A Kanamycin Spectinomycin	Transkriptionelle Fusion von <i>phoA</i> -3' (-300 bis +50) mit <i>lacZ</i>	Diese Arbeit Konstruktion: pKES15 Δ SaII-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG563/BG564 (Template: chromosomale DNA)
pBGG292	A Kanamycin Spectinomycin	Transkriptionelle Fusion von <i>ugpB</i> -3' (-300 bis +50) mit <i>lacZ</i>	Diese Arbeit Konstruktion: pKES15 Δ SaII-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG565/BG566 (Template: chromosomale DNA)
pBGG293	A Kanamycin Spectinomycin	Transkriptionelle Fusion von <i>ppa</i> -3' (-300 bis +50) mit <i>lacZ</i>	Diese Arbeit Konstruktion: pKES15 Δ SaII-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG567/BG568 (Template: chromosomale DNA)
pBGG294	A	Transkriptionelle Fusion von	Diese Arbeit

	Kanamycin Spectinomycin	<i>pgk-3'</i> (-1356 bis +50) mit <i>lacZ</i>	Konstruktion: pKES15 Δ Sall-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG569/BG570 (Template: chromosomale DNA)
pBGG295	A Kanamycin Spectinomycin	Transkriptionelle Fusion von <i>phoB-3'</i> (-1113 bis +50) mit <i>lacZ</i>	Diese Arbeit Konstruktion: pKES15 Δ Sall-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG586/BG587 (Template: chromosomale DNA)
pBGG297	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (1-448) fusioniert mit C-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B.</i> <i>pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (<i>kdpD</i> 1-448-T18)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG550/BG588 (Template: chromosomale DNA)
pBGG298	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (444-894) fusioniert mit C-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B.</i> <i>pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (<i>kdpD</i> 444-894-T18)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG589/BG551 (Template: chromosomale DNA)
pBGG329	A Kanamycin Spectinomycin	Transkriptionelle Fusion von <i>pstS-3'</i> (-400 bis +50) mit <i>lacZ</i>	Diese Arbeit Konstruktion: pKES15 Δ Sall-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG612/BG613 (Template:

			chromosomale DNA)
pBGG334	B Ampicillin	<i>ptsN</i> H73E (CAT → GAA) mit einer optimalen Shine-Dalgano Sequenz (AAAGGAGG-7nt-ATG) unter <i>P_{Ara}</i> -Kontrolle	Diese Arbeit Konstruktion: pBAD18 Δ <i>SacI</i> - <i>XbaI</i> ligiert mit Produkt aus CCR-PCR BG238/BG239/BG62 8 (Template: pBGG86)
pBGG336	A Kanamycin	<i>ptsN</i> H73E (CAT → GAA) fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle	Diese Arbeit Konstruktion: pKT25 Δ <i>PstI</i> - <i>XbaI</i> ligiert mit Produkt aus CCR-PCR BG548/BG545/BG62 8 (Template: pBGG86)
pBGG346	A Kanamycin	<i>yhbJ</i> fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (<i>yhbJ</i> -T25)	Laborsammlung
pBGG347	B Ampicillin	<i>yhbJ</i> fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (<i>yhbJ</i> -T18)	Laborsammlung
pBGG348	A Kanamycin	<i>yhbJ</i> fusioniert mit N-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 1-224) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T25- <i>yhbJ</i>)	Laborsammlung
pBGG349	B Ampicillin	<i>yhbJ</i> fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B.</i>	Laborsammlung

		<i>pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>yhbJ</i>)	
pBGG359	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (129-894) fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> 129-894)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG632/BG551 (Template: chromosomale DNA)
pBGG360	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (1-766) fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> 1-766)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG550/BG633 (Template: chromosomale DNA)
pBGG369	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (253-894) fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> 253-894)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG672/BG551 (Template: chromosomale DNA)
pBGG370	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (1-666) fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> 1-666)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG550/BG673 (Template: chromosomale DNA)
pBGG371	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (1-526) fusioniert mit C-terminaler Teil der	Diese Arbeit Konstruktion:

		Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> 1-526)	pUT18C Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG550/BG674 (Template: chromosomale DNA)
pBGG386	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (253-766) fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (<i>kdpD</i> 253-766-T18)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG672/BG633 (Template: chromosomale DNA)
pBGG387	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (444-766) fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (<i>kdpD</i> 444-766-T18)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG591/BG633 (Template: chromosomale DNA)
pBGG388	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (499-766) fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (<i>kdpD</i> 499-766-T18)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG553/BG633 (Template: chromosomale DNA)
pBGG392	B Ampicillin	<i>glmS</i> fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (<i>glmS</i> -T18)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG693/BG694 (Template: chromosomale DNA)
pBGG393	B	<i>glmS</i> fusioniert mit C-	Diese Arbeit

	Ampicillin	terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>glmS</i>)	Konstruktion: pUT18C Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG693/BG695 (Template: chromosomale DNA)
pBGG394	A Kanamycin	<i>glmS</i> fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (<i>glmS</i> -T25)	Diese Arbeit Konstruktion: p-25N Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG693/BG694 (Template: chromosomale DNA)
pBGG395	A Kanamycin	<i>glmS</i> fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T25- <i>glmS</i>)	Diese Arbeit Konstruktion: pKT25 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG693/BG695 (Template: chromosomale DNA)
pDL1	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i>)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG706/BG551 (Template: pBGG264)
pDL2	B Ampicillin	<i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD2</i>)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus PCR KK15/BG708 (Template: pGP1674)

<u>pDL3</u>	B Ampicillin	<i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) 1-712 und <i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 667-894 fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T18- <i>kdpD2</i> (1-712)- <i>kdpD</i> (667-894))	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus FusionsPCR von PCR1 und PCR2 (KK 15/BG551) PCR1 : KK15/BG705 (Template: pGP1674) PCR2 : BG704/BG551 (Template: pBGG264)
<u>pDL4</u>	B Ampicillin	<i>kdpD</i> R503Q fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i>)	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG264 ΔDraIII- StuI ligiert mit DraIII-StuI Fragment aus pPV5-3 R503Q
<u>pDL5</u>	B Ampicillin	<i>kdpD</i> R506Q fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i>)	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG264 ΔDraIII- StuI ligiert mit DraIII-StuI Fragment aus pPV5-3 R506Q
<u>pDL6</u>	B Ampicillin	<i>kdpD</i> R511Q fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i>)	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG264 ΔDraIII- StuI ligiert mit DraIII-StuI Fragment aus pPV5-3 R511Q
<u>pDL8</u>	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 1-252 und <i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) 262-948 fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus FusionsPCR von PCR1 und PCR2

		unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> (1-252) - <i>kdpD</i> 2(262-948))	(BG706/BG708) PCR1 : BG706/BG759 (Template: pBGG264) PCR2 : BG760/BG708 (Template: pGP1674)
<u>pDL9</u>	B Ampicillin	<i>kdpD</i> 2 (<i>R. eutropha</i>) 1-537 und <i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 499-894 fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> 2(1-537)- <i>kdpD</i> (499-894))	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus FusionsPCR von PCR1 und PCR2 (KK 15/BG551) PCR1 : KK15/BG761 (Template: pGP1674) PCR2 : BG762/BG551 (Template: pBGG264)
<u>pDL10</u>	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 1-252 und <i>kdpD</i> 2 (<i>R. eutropha</i>) 262-712 und <i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 667-894 fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter P_{lac} -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> (1-252) - <i>kdpD</i> 2(262-712)- <i>kdpD</i> (667-894))	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus FusionsPCR von PCR1 und PCR2 (BG706/BG551) PCR1 : BG706/BG759 (Template: pBGG264) PCR2 : BG760/BG551 (Template: pDL3)
<u>pDL11</u>	A Chloramphenicol	<i>phoB</i> mit einer optimalen Shine-Dalgano Sequenz (AAAGGAGG-7nt-ATG) unter P_{Ara} -Kontrolle	Diese Arbeit Konstruktion: pBAD33 Δ SacI-XbaI ligiert mit Produkt

			aus PCR BG763/BG764 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL12</u>	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 1-252 und <i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) 262-537 und <i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 499-894 fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> (1-252) - <i>kdpD2</i> (262-537)- <i>kdpD</i> (499-894))	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus FusionsPCR von PCR1 und PCR2 (BG706/BG551) PCR1 : BG706/BG759 (Template: pBGG264) PCR2 : BG760/BG551 (Template: pDL9)
<u>pDL13</u>	B Ampicillin	<i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) 1-537 und <i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 499-666 und <i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) 713-948 fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T18- <i>kdpD2</i> (1-537)- <i>kdpD</i> (499-666)- <i>kdpD2</i> (713-948))	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus FusionsPCR von PCR1 und PCR2 (KK15/BG708) PCR1 : KK15/BG787 (Template: pDL9) PCR2 : BG786/BG708 (Template: pGP1674)
<u>pDL14</u>	B Ampicillin	<i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) 1-537 und <i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 499-526 und <i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) 566-948 fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus FusionsPCR von PCR1 und PCR2 (KK15/BG708) PCR1 :

		Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> 2(1-537)- <i>kdpD</i> (499-526)- <i>kdpD</i> 2(566-948))	KK15/BG789 (Template: pDL9) PCR2 : BG788/BG708 (Template: pGP1674)
<u>pDL16</u>	B Ampicillin	<i>phoR</i> (AS52-431) fusioniert mit C-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyoA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (<i>phoR</i> -T18)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG790/BG576 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL17</u>	B Ampicillin	<i>phoR</i> (AS52-431) fusioniert mit C-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyoA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T18- <i>phoR</i>)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG790/BG576 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL18</u>	B Ampicillin	<i>ptsP</i> ohne GAF Domäne mit N-terminalem Strep-Tag unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG164 Δ NheI-PstI ligiert mit Produkt aus PCR BG808/BG509 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL21</u>	B Ampicillin	<i>pstB</i> fusioniert mit C-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyoA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (<i>pstB</i> -T18)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG811/BG812 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL22</u>	B Ampicillin	<i>pstB</i> fusioniert mit C-terminalem Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyoA</i> 225-399)	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18 Δ PstI-XbaI ligiert mit Produkt

		unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T18- <i>pstB</i>)	aus PCR BG811/BG812 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL23</u>	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 1-395 und <i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) 435-712 und <i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 667-894 fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> (1-395) - <i>kdpD2</i> (435-712)- <i>kdpD</i> (667-894))	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus FusionsPCR von PCR1 und PCR2 (BG706/BG551) PCR1 : BG706/BG840 (Template: pBGG264) PCR2 : BG839/BG551 (Template: pDL3)
<u>pDL24</u>	B Ampicillin	<i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) 1-537 und <i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 499-526 und <i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) 566-712 und <i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 667-849 fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T18- <i>kdpD2</i> (1-537)- <i>kdpD</i> (499-526)- <i>kdpD2</i> (566-712)- <i>kdpD</i> (667-894))	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus FusionsPCR von PCR1 und PCR2 (KK15/BG551) PCR1 : KK15/BG842 (Template: pDL14) PCR2 : BG841/BG551 (Template: pDL3)
<u>pDL25</u>	B Ampicillin	<i>kdpD</i> (<i>E. coli</i>) 1-395 und <i>kdpD2</i> (<i>R. eutropha</i>) 435-948 fusioniert mit C-terminaler Teil der Adenylatcyclase von <i>B. pertussis</i> (<i>cyaA</i> 225-399) unter <i>P_{lac}</i> -Kontrolle (T18- <i>kdpD</i> (1-395) - <i>kdpD2</i> (435-948))	Diese Arbeit Konstruktion: pUT18C Δ XbaI ligiert mit Produkt aus FusionsPCR von PCR1 und PCR2 (BG706/BG708) PCR1 : BG706/BG840

			(Template: pBGG264) PCR2 : BG839/BG708 (Template: ppGP1674)
<u>pDL26</u>	A Chloramphenicol	<i>sspA</i> mit authentischer Shine Dalgano Sequenz unter P_{Ara^-} Kontrolle	Diese Arbeit Konstruktion: pBAD33 Δ SacI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG843/BG844 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL27</u>	B Ampicillin/ Chloramphenicol	<i>phoB</i> -3xFLAG mit <i>bglB</i> Shine Dalgano Sequenz unter P_{Ara^-} Kontrolle, <i>araC</i> (Promotorregulation) und $\lambda attP$ Seite zur Integration in das Chromosom	Diese Arbeit Konstruktion: pYGI3 Δ Sall-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG864/BG865 (Template: chromosomale DNA von Stamm Z574)
<u>pDL28</u>	B Ampicillin/ Chloramphenicol	<i>phoR</i> -3xFLAG mit <i>bglB</i> Shine Dalgano Sequenz unter P_{Ara^-} Kontrolle, <i>araC</i> (Promotorregulation) und $\lambda attP$ Seite zur Integration in das Chromosom	Diese Arbeit Konstruktion: pYGI3 Δ Sall-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG866/BG865 (Template: chromosomale DNA von Stamm Z575)
<u>pDL29</u>	A Chloramphenicol	<i>phoB</i> -3xFLAG mit <i>bglB</i> Shine Dalgano Sequenz unter P_{Ara^-} Kontrolle	Diese Arbeit Konstruktion: pBAD33 Δ BamHI-XbaI ligiert mit BamHI-XbaI Fragment aus pDL27

<u>pDL30</u>	A Chloramphenicol	<i>phoR</i> -3xFLAG mit <i>bglB</i> Shine Dalgano Sequenz unter <i>P_{Ara}</i> -Kontrolle	Diese Arbeit Konstruktion: pBAD33 Δ BamHI-XbaI ligiert mit BamHI-XbaI Fragment aus pDL28
<u>pDL31</u>	A Kanamycin Spectinomycin	<i>phoB</i> -3xFLAG mit <i>bglB</i> Shine Dalgano Sequenz unter <i>P_{tac}</i> -Kontrolle	Diese Arbeit Konstruktion: EcoRI-Fragment aus pDL27 in pKESK23 Δ EcoRI
<u>pDL32</u>	A Kanamycin Spectinomycin	<i>phoR</i> -3xFLAG mit <i>bglB</i> Shine Dalgano Sequenz unter <i>P_{tac}</i> -Kontrolle	Diese Arbeit Konstruktion: EcoRI-Fragment aus pDL28 in pKESK23 Δ EcoRI
<u>pDL33</u>	B Ampicillin	<i>glmS</i> mit N-terminalem Strep-Tag unter <i>P_{tac}</i> -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG164 Δ NheI-PstI ligiert mit Produkt aus PCR BG876/BG877 Δ SpeI-NsiI (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL35</u>	B Ampicillin	<i>phoB</i> mit N-terminalem Strep-Tag unter <i>P_{tac}</i> -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG164 Δ NheI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG878/BG764 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL37</u>	B Ampicillin	<i>phoR</i> mit N-terminalem Strep-Tag unter <i>P_{tac}</i> -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG164 Δ NheI-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR

			BG879/BG880 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL38</u>	B Ampicillin	<i>phoR</i> (Aminosäuren 52-431) mit N-terminalem Strep-Tag unter <i>P_{tac}</i> -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG164 Δ NheI- XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG929/BG880 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL39</u>	B Ampicillin	<i>phoB</i> mit C-terminalem His Tag unter <i>P_{tac}</i> -Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pKES170 Δ NdeI- XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG912/BG913 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL40</u>	B Ampicillin	<i>phoR</i> (AS 52-431) mit C- terminalem His Tag unter <i>P_{tac}</i> - Kontrolle mit T7 gene 10 Shine-Dalgano Sequenz	Diese Arbeit Konstruktion: pKES170 Δ NdeI- XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG914/BG915 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL41</u>	A Kanamycin Spectinomycin	Transkriptionelle Fusion von <i>cpxP</i> -3' (-139 bis +50) mit <i>lacZ</i>	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG59 Δ Sall-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG930/BG931 (Template: chromosomale DNA)

<u>pDL42</u>	A Kanamycin Spectinomycin	Transkriptionelle Fusion von <i>ompC</i> -3' (-334 bis +50) mit <i>lacZ</i>	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG59 Δ Sall-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG932/BG933 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL43</u>	A Kanamycin Spectinomycin	Transkriptionelle Fusion von <i>glnA</i> -3' (-372 bis +50) mit <i>lacZ</i>	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG59 Δ Sall-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG934/BG935 (Template: chromosomale DNA)
<u>pDL48</u>	A Kanamycin Spectinomycin	Transkriptionelle Fusion von <i>yneM</i> -3' (-252bis +53) mit <i>lacZ</i>	Diese Arbeit Konstruktion: pBGG59 Δ Sall-XbaI ligiert mit Produkt aus PCR BG813/BG814 (Template: chromosomale DNA)
<u>pYGI3</u>	B Ampicillin/ Chloramphenicol	<i>yhbJ</i> mit 5'- <i>strep</i> -Tag und authentischer Shine Dalgano Sequenz unter <i>P_{Ara}</i> -Kontrolle, <i>araC</i> (Promotorregulation) und <i>λattP</i> Seite zur Integration in das Chromosom	Laborsammlung

Die Positionen sind bezüglich des 1. Nukleotids des betreffenden Gens angegeben.

¹A = Plasmide mit Replikationsursprung des Plasmides pACYC177 (*p15A*; Chang und Cohen, 1978)

B = Plasmide mit Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (*ColEI*; Bolivar *et al.*, 1977)

C = Replikationsursprung des Plasmides pSC101, jedoch mit Temperatur-sensitiver Replikationsfunktion

(Hashimotoh-Gotoh *et al.*, 1982).

D = Replikationsursprung des Plasmides pSC101 (Hashimotoh-Gotoh *et al.*, 1982).

E = *pir*-abhängiger *oriR γ* (Posfai *et al.*, 1994); benötigt speziellen *pir*⁺ Wirtsstamm für Replikation

6.3. Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
KK15	atttctagagatgcctgatgccgaattgcgc	Forward Primer zur Generierung von <i>R. eutropha kdpD</i> 2 Fusionen mit dem T18 Fragment für des BACTH System, XbaI
KK24	gtgacgatgccgagcagg	Forward Sequenzierungsprimer für <i>kdpD2</i> von <i>R. eutropha</i>
KK25	gtcatcgggcaactgacgg	Forward Sequenzierungsprimer für <i>kdpD2</i> von <i>R. eutropha</i>
BG25	gtgctgcaaggcgattaagtgg	Sequenzierung <i>lacZ</i> -Fusionen
BG146	aagtaatgcaacatccgcatta	Sequenzierung von Insertionen in pKES15
BG151	gatcttcacctagatcctttg	Forward Primer zur Amplifikation des P_{tac}
BG152	gaattttggtgattgcatgttc	Reverse Primer zur Amplifikation des P_{tac}
BG229	agattagcggatcctactcg	Sequenzierung pBAD18/30/33 (fwd)
BG232	tgatttaactgtatcaggctg	Sequenzierung pBAD18/30/33 (rev)
BG389	gcacgc GTCGAC acttttctccccctttgtatc	Forward Primer für <i>kdpFA</i> - <i>lacZ</i> Fusion, Sall
BG390	ggc TCTAGA gtggcgatcagtaagaacc	Reverse Primer für <i>kdpFA</i> - <i>lacZ</i> Fusion, XbaI
BG397	tgg CTGCAGTCTAGA ttatcatggtttacgttttc cagc	Forward Primer zur Generierung von <i>strep-yhbJ</i> , PstI/ <u>XbaI</u>
BG399	ctcgtact CATATG ggagccaccgcagttcgaaa aa GCTAGC atggtactgatgatgctcagcgg	Reverse Primer zur Generierung von <i>strep-yhbJ</i> , NheI/ <u>NdeI</u>
BG409	cgcgttgccgattcattaatgc	Sequenzierung pKES170 (fwd)
BG410	ccatcggcgctacggcgttc	Sequenzierung pKES170 (rev)
BG416	taagctaatcaaaaagtgatgagataacgggtcgcgactg GTFAGGCTGGAGCTGCTTCG	Forward Primer zur Generierung der Kassette zur markerlosen Deletion von <i>trkA</i>
BG417	agggaataataaggcgtcattagacgccttattaatta CA TATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATT CC	Reverse Primer zur Generierung der Kassette zur markerlosen Deletion von <i>trkA</i>
BG421	aactcgcgaattgcagtc	Forward Check Primer für <i>trkA</i> Deletion
BG422	agcccagaggagcatga	Reverse Check Primer für <i>trkA</i> Deletion

BG506	ggct GCTAG Catgacaaaataatgatacaactctac	Forward Primer zur Generierung von <i>strep-ptsN</i> , NheI
BG507	gc CTGCAG ttactacgcttcatccggagtaccttc	Reverse Primer zur Generierung von <i>strep-ptsN</i> , PstI
BG508	ggct GCTAG Catgctcactcgcctgcgcg	Forward Primer zur Generierung von <i>strep-ptsP</i> , NheI
BG509	gc CTGCAG ttactataaccctccggaatcagc	Reverse Primer zur Generierung von <i>strep-ptsP</i> , PstI
BG512	ggct GCTAG Catgggtttgttcgataaactgaaat	Forward Primer zur Generierung von <i>strep-crr</i> , NheI
BG513	gc CTGCAG tattacttcttgatcggataaccg	Reverse Primer zur Generierung von <i>strep-crr</i> , PstI
BG515	P- ctagctagtaa TCTAGA gcat GAGCTC gactctg ca	Forward Primer zur Generierung eines Leervektors für einen <i>strep</i> -Tag, XbaI/SacI
BG516	P- gagtcgagctcatgctctagattactag	Reverse Primer zur Generierung eines Leervektors für einen <i>strep</i> -Tag
BG531	agaagcggcaaacgagtttc	Forward Sequenzierungsprimer für <i>ptsP</i>
BG536	ccgcaaaggtaactctgatcg	Forward Sequenzierungsprimer für <i>kdpD</i>
BG537	atgtagtgagtttcgatctctt	Forward Sequenzierungsprimer für <i>kdpD</i>
BG544	gc CTGCAG gatgacaaaataatgatacaactctac	Forward Primer zur Generierung von <i>ptsN</i> Fusionen mit dem T18 Fragmenten für des BACTH System, PstI
BG545	cgtc TCTAGA gtttacgcttcatccggagtaccttc	Reverse Primer zur Generierung von <i>ptsN</i> Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, XbaI
BG546	gc CTGCAG gggtgacaaacgttctgattgttg	Forward Primer zur Generierung von <i>kdpE</i> Fusionen mit dem T18 Fragmenten für des BACTH System, PstI
BG547	cgtc TCTAGA gtttaagcataaacctgatgccaata c	Reverse Primer zur Generierung von <i>kdpE</i> Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, XbaI
BG548	gc CTGCAG ggatgacaaaataatgatacaactctac	Forward Primer zur Generierung von <i>ptsN</i> Fusionen mit dem T25 Fragmenten für des BACTH System, PstI
BG549	gc CTGCAG gggtgacaaacgttctgattgttg	Forward Primer zur Generierung von <i>kdpE</i> Fusionen mit dem T25 Fragmenten

		für des BACTH System, PstI
BG550	gc CTGCAG gatgaataacgaacccttacg	Forward Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (1-894) Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, PstI
BG551	cg tcTCTAGA gtcatatcctcatgaaattctcaag	Reverse Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (1-894) Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, XbaI
BG552	cg tcTCTAGA gtacgccactgtctttaaagag	Reverse Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (1-395) Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, XbaI
BG553	gc CTGCAG gcggtatcaggcgcgggtag	Forward Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (499-894) Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, PstI
BG561	gcacgc GTCGAC tcgcaacaggtcgaagaag	Forward Primer für <i>phnC`-lacZ</i> Fusion, SalI
BG562	gcg TCTAGA tgtctgattgaaggtttggcg	Reverse Primer für <i>phnC`-lacZ</i> Fusion, XbaI
BG563	gcacgc GTCGAC aactgtgtgcgcaggtagaag	Forward Primer für <i>phoA`-lacZ</i> Fusion, SalI
BG564	gcg TCTAGA ggggtaaacagtaacggtaag	Reverse Primer für <i>phoA`-lacZ</i> Fusion, XbaI
BG565	gcacgc GTCGAC tggcaatatgtgaattgcacg	Forward Primer für <i>ugpB`-lacZ</i> Fusion, SalI
BG566	gcg TCTAGA aacgccagtcgcgagcgcc	Reverse Primer für <i>ugpB`-lacZ</i> Fusion, XbaI
BG586	gcacgc GTCGAC ggcgtaactggcgcgag	Forward Primer für <i>phoBR`-lacZ</i> Fusion, SalI
BG587	gcg TCTAGA caaagtagcagctccagcacc	Reverse Primer für <i>phoBR`-lacZ</i> Fusion, XbaI
BG588	cg tcTCTAGA gttgaaggccagctccataaaatag	Reverse Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (1-448) Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, XbaI
BG589	gc CTGCAG gggacgtggccttcagtgg	Forward Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (444-894) Fusionen mit dem T18

		und T25Fragmenten für des BACTH System, PstI
BG592	gc CTGCAG gatgcattatatgaagtggatttatc	Forward Primer zur Generierung von <i>ptsN</i> Fusionen mit dem T18 Fragmenten für des BACTH System, PstI
BG593	cgtc TCTAGA gttacagtctgattccctgcgg	Reverse Primer zur Generierung von <i>ptsN</i> Fusionen mit dem T18 Fragmenten für des BACTH System, XbaI
BG610	ccttcgcttgccagatcg	Reverse Sequenzierungsprimer für <i>kdpD</i>
BG612	gcacgc GTCGAC gccgcgtaacctggcaaatcg	Forward Primer für <i>pstS</i> - <i>lacZ</i> Fusion, Sall
BG613	gcg TCTAGA gataaggtcggcgacaacag	Reverse Primer für <i>pstS</i> - <i>lacZ</i> Fusion, XbaI
BG614	gccaaaaccacaaaacgcatctgcttatcgacgtaaaaga gg GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Forward Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion der GAF-Domäne und des Linkers von <i>ptsP</i>
BG615	cggcaatcgccacaccaggtgctgcccgtaatgcccggga ttcgcacgactacctc CATATGAATATCCT CCTTAGTTCCTATTC	Reverse Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion der GAF-Domäne und des Linkers von <i>ptsP</i>
BG616	gtggtgatgtcactgcagg	Forward Check Primer für Deletion der GAF-Domäne und des Linkers von <i>ptsP</i>
BG617	gtaacctggcatcctgcc	Reverse Check Primer für Deletion der GAF-Domäne und des Linkers von <i>ptsP</i>
BG628	P- gtattgccattcc gaa ggcaactggaag	Mutation des Histidins 73 in <i>ptsN</i> zu Glutamat (CAT → GAA)
BG630	tgcggggatgccagactcc	Reverse Check Primer für p25-N
BG631	ccggcgcgagcgatttcc	Reverse Check Primer für pUT18
BG632	gc CTGCAG gatggaagaactgctggaagctgg	Forward Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (129-894) Fusionen mit dem T18 und T25Fragmenten für des BACTH System, PstI
BG633	cgtc TCTAGA gtttctggcagagaagattgatg	Reverse Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (1-766) Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, XbaI
BG643	tctegccggatgtactgg	Forward Check Primer für pUT18C
BG644	cggtcgtatgtgtgtgg	Forward Check Primer für pUT18
BG645	gggtgttggcgggtctgc	Reverse Check Primer für pUT18C
BG646	ttccgcgactcggcgcgc	Forward Check Primer für pKT25

BG647	ggggatgtgctgcaaggcg	Reverse Check Primer für pKT25
BG648	ggctcgatgtgtgtgg	Forward Check Primer für p25-N
BG672	gc CTGCAG gacccctttatgcatggccataac	Forward Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (253-894) Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, PstI
BG673	cgtc TCTAGA gtggcgttcggatctgttcacg	Reverse Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (1-666) Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, XbaI
BG674	cgtc TCTAGA gtgcggcccaccgcccagagc	Reverse Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (1-526) Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, XbaI
BG675	cgtc TCTAGA gtcacgccagcagtaaggtccc	Reverse Primer zur Generierung von <i>kdpD</i> (1-498) Fusionen mit dem T18 und T25 Fragmenten für des BACTH System, XbaI
BG704	ggcctgcgccagctcgctgctggcgccgtttc	Forward Primer zur Amplifikation von <i>E.coli kdpD</i> (667-894) für ein <i>E. coli/R. eutropha</i> Hybrid
BG705	gaaagcgcccaccagcagcagctgcgccagcgcc	Reverse Primer zur Amplifikation von <i>R. eutropha kdpD2</i> (1-712) für ein <i>E. coli/R. eutropha</i> Hybrid
BG706	cgg TCTAGA gatgaataacgaacccttacgctc	Forward Primer zur Generierung von <i>E.coli kdpD</i> Fusionen mit dem T18 Fragment für des BACTH System, XbaI
BG708	cgtc TCTAGA gtggcatcagctgctccggctc	Reverse Primer zur Generierung von <i>R. eutropha kdpD 2</i> Fusionen mit dem T18 Fragment für des BACTH System, XbaI
BG722	gcagatagctactggtcatc	Reverse Check Primer für <i>ptsP</i> Deletion
BG741	ctgtatcaaatcattacggataccgaaggtactccggatgagcg GACTACAAAGACCATGACGG	Forward Primer zur Generierung von <i>ptsN</i> mit einem C-terminalen FLAG-Tag
BG742	gacagattacctgaacctgaacgtccgctgacgatcatcagtac CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCC	Reverse Primer zur Generierung von <i>ptsN</i> mit einem C-terminalen FLAG-Tag

BG759	ccgatgcaagccagcaccgcgctcgcgctgtgcc	Reverse Primer zur Amplifikation von <i>E.coli kdpD</i> (1-252) für ein <i>E. coli/R. eutropha</i> Hybrid
BG760	ggcacacgcgcgacgcgggtgctggcttgcacgg	Forward Primer zur Amplifikation von <i>R. eutropha kdpD2</i> (262-948) für ein <i>E. coli/R. eutropha</i> Hybrid
BG761	cccgcgctgataaacgcaaaccggccgctcagttg	Reverse Primer zur Amplifikation von <i>R. eutropha kdpD2</i> (1-537) für ein <i>E. coli/R. eutropha</i> Hybrid
BG762	caactgacggccggttgcgttatcaggcgcggg	Forward Primer zur Amplifikation von <i>E.coli kdpD</i> (499-894) für ein <i>E. coli/R. eutropha</i> Hybrid
BG780	ccagcaccagcctttccac	Reverse Check Primer für <i>phoB</i> Deletion
BG781	cctgcgtaagcactggagc	Forward Check Primer für <i>phoR</i> Deletion
BG782	gtcagtatgacagcacctgaag	Reverse Check Primer für <i>phoR</i> Deletion
BG786	cagatccgcaacgccttgctggccgctgtctccc	Forward Primer zur Amplifikation von <i>R. eutropha kdpD2</i> (713-948) für ein <i>E. coli/R. eutropha</i> Hybrid
BG787	gggagacagcggccagcaaggcgttgcggtatctg	Reverse Primer zur Amplifikation von <i>E.coli kdpD</i> (499-666) für ein <i>E. coli/R. eutropha</i> Hybrid
BG788	gcgagcaacgcacacggacgctgtacgaactggc	Forward Primer zur Amplifikation von <i>R. eutropha kdpD2</i> (553-948) für ein <i>E. coli/R. eutropha</i> Hybrid
BG789	gccagttcgtacagcgtccgtgtgcgttgctcgc	Reverse Primer zur Amplifikation von <i>E.coli kdpD</i> (499-513) für ein <i>E. coli/R. eutropha</i> Hybrid
BG802	ctgccaaatgctgggtattg	Forward Check Primer für <i>sspA</i> und <i>sspB</i> Deletion
BG803	gccgcctgggctgttttg	Reverse Check Primer für <i>sspA</i> und <i>sspB</i> Deletion
BG804	gaageggatgtaatggcatc	Forward Check Primer für <i>lsrF</i> und <i>lsrG</i> Deletion
BG805	cgatcgttcagcggaaaagtg	Reverse Check Primer für <i>lsrF</i> und <i>lsrG</i> Deletion

BG808	ggct GCTAGC atgcgaatccgcgcattaccgg	Forward Primer zur Generierung von Strep- <i>ptsP</i> ΔGAF, NheI
BG813	gcacgc GTCGAC gtagtgctaaccagcctg	Forward Primer für <i>yneM</i> - <i>lacZ</i> Fusion, SalI
BG814	ggc TCTAGA gaaaataaaattattcccagtagc	Reverse Primer für <i>yneM</i> - <i>lacZ</i> Fusion, XbaI
BG821	ctgcgttgccgaaaggcg	Forward Check Primer für <i>pcnB</i> Deletion
BG822	gcgagcgcgaccttgctg	Reverse Check Primer für <i>pcnB</i> Deletion
BG827	gatgattacctgagtgcctac	Forward Check Primer für <i>rpoS</i> Deletion
BG828	ggtgcgtcacatattaatgac	Reverse Check Primer für <i>rpoS</i> Deletion
BG829	gcagtaatccgcaaacgtaac	Forward Check Primer für <i>gadE</i> Deletion
BG830	gttgtcagccagtaaggtggg	Reverse Check Primer für <i>gadE</i> Deletion
BG833	caacctctccagtgctcc	Forward Check Primer für <i>galK</i> Deletion
BG834	gtataacggctattggcgatag	Reverse Check Primer für <i>galK</i> Deletion
BG839	ctttaaagacaagtggggggccacgcgcaaag	Forward Primer zur Amplifikation von <i>R. eutropha kdpD2</i> (435-712) für ein <i>E. coli</i> / <i>R. eutropha</i> Hybrid
BG840	ctttgcgctggccccacttgcttttaaag	Reverse Primer zur Amplifikation von <i>E.coli kdpD</i> (1-395) für ein <i>E. coli</i> / <i>R. eutropha</i> Hybrid
BG841	ctctggcggtggccgcgtgccgaaccagattg	Forward Primer zur Amplifikation von <i>R. eutropha kdpD2</i> (566-712) für ein <i>E. coli</i> / <i>R. eutropha</i> Hybrid
BG842	caatctggttcggcagcggcccaccgagag	Reverse Primer zur Amplifikation von <i>E.coli kdpD</i> (499-526) für ein <i>E. coli</i> / <i>R. eutropha</i> Hybrid
BG843	gc GAGCTC ctgactatactggaggttttc	Forward Primer zur Generierung von einem <i>sspA</i> Überexpressionsplasmid, SacI
BG844	ggc TCTAGA ttaactccggcccagacgc	Reverse Primer zur Generierung von einem <i>sspA</i> Überexpressionsplasmid, XbaI

BG845	gtgcagaccgtgcgcggtacaggatcgttttcaaccg cttt GACTACAAAGACCATGACGG	Forward Primer zur Generierung von <i>phoB</i> mit einem FLAG-Tag
BG846	tagcagctccagcaccagcctttccacgacagccgttcca g CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCT ATTCC	Reverse Primer zur Generierung von <i>phoB</i> mit einem FLAG-Tag
BG847	ttcagttttgttatcccgaacgtttaattgcaaaaacagcg at GACTACAAAGACCATGACGG	Forward Primer zur Generierung von <i>phoR</i> mit einem FLAG-Tag
BG848	agcatcgactggccttaggcaataaaagatgacaaggcg gatta CATATGAATATCCTCCTTAGTTC CTATTCC	Reverse Primer zur Generierung von <i>phoR</i> mit einem FLAG-Tag
BG851	ggctgtagcagtaaaaattcgactatacctggagtttc GTGTAGGCTGGA GCTGCTTCG	Forward Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>sspAB</i>
BG852	attaaaaagacaaaacaggccgcctggcctgtttgtatta CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTA TTCC	Reverse Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>sspAB</i>
BG864	gcacgc GTCGAC gataaaaggagttaattatggcga gacgtattctgctc	Forward Primer zur Generierung eines <i>phoB</i> -3x FLAG-Tag Konstrukts unter P_{Ara} -Kontrolle zur Integration in das <i>E. coli</i> Genom; Sall
BG865	cgtc TCTAG actattatcgtcgtcatctttg	Reverse Primer zur Generierung eines GenX-3x FLAG-Tag Konstrukts unter P_{Ara} -Kontrolle zur Integration in das <i>E. coli</i> Genom; XbaI
BG866	gcacgc GTCGAC gataaaaggagttaattgtgctgg aacggctgctgtg	Forward Primer zur Generierung eines <i>phoR</i> -3x FLAG-Tag Konstrukts unter P_{Ara} -Kontrolle zur Integration in das <i>E. coli</i> Genom; Sall
BG867	gtcgcattaatgatcgcaacctattattacaacaggcaaa tc GTGTAGGCTGGA GCTGCTTCG	Forward Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>phoBR</i>
BG868	gcatcgactggccttaggcaataaaagatgacaaggcgg atta CATATGAATATCCTCCTTAGTTC CTATTCC	Reverse Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>phoBR</i>
BG876	gg ACTAG Tatgttggaattgttggegc	Forward Primer zur Generierung von Strep- <i>glmS</i> , SpeI

BG877	cca ATGCAT tactcaaccgtaaccg	Reverse Primer zur Generierung von Strep- <i>glmS</i> , NsiI
BG878	ggct GCTAGC atggcgagacgtattctggtcg	Forward Primer zur Generierung von Strep- <i>phoB</i> , NheI
BG879	ggct GCTAGC gtgctggaacggctgctg	Forward Primer zur Generierung von Strep- <i>phoR</i> , NheI
BG880	cgct TCTAGA ttaatcgtgttttggcaattaaac	Reverse Primer zur Generierung von Strep- <i>phoR</i> , XbaI
BG882	gccagggcataaccgagtctcgtttacctgcctatcagga aa GACTACAAAGACCATGACGG	Forward Primer zur Generierung von <i>glnL</i> mit einem C-terminalen FLAG-Tag
BG883	ggatggaactatcgtcatcgactaccagactatccctcgt g CATATGAATATCCTCCTTAGTTCC ATTCC	Reverse Primer zur Generierung von <i>glnL</i> mit einem C-terminalen FLAG-Tag
BG884	gtgaaatcattctgctgacc	Forward Check Primer für <i>glnL</i> FLAG-Tag
BG885	ccagatcggaatgtgcgg	Reverse Check Primer für <i>glnL</i> FLAG-Tag
BG886	cagtagagttaccgctggaacgggattacagagagaagt a GACTACAAAGACCATGACGG	Forward Primer zur Generierung von <i>baeS</i> mit einem C-terminalen FLAG-Tag
BG887	gatcaaaatacgcggtgtgttttcgctgattgtaactcgg CATATGAATATCCTCCTTAGTTCTA TTCC	Reverse Primer zur Generierung von <i>baeS</i> mit einem C-terminalen FLAG-Tag
BG888	ctgcaaatctctgccggg	Forward Check Primer für <i>baeS</i> FLAG-Tag
BG889	cttcgattttgcccgtcac	Reverse Check Primer für <i>baeS</i> FLAG-Tag
BG890	ggtttacggctggtgatttggtgccgctgataagcggagt GACTACAAAGACCATGACGG	Forward Primer zur Generierung von <i>cpxA</i> mit einem FLAG-Tag
BG891	gatcgggcgtaaacgccttatcctgcctgcaaatcggaagt tta CATATGAATATCCTCCTTAGTTCC TATTCC	Reverse Primer zur Generierung von <i>cpxA</i> mit einem FLAG-Tag
BG892	gaagattgaagtgggctttg	Forward Check Primer für <i>cpxA</i> FLAG-Tag
BG893	cggtgtgggaaaataac	Reverse Check Primer für <i>cpxA</i> FLAG-Tag
BG902	ggaggtgattttggtgccagcattctgcgccgaaagatg aa GACTACAAAGACCATGACGG	Forward Primer zur Generierung von <i>phoQ</i> mit einem FLAG-Tag

BG903	gattataacggatgcttaacgtaatgcgtgaagtatggcat attha CATATGAATATCCTCCTTAGTTC CTATTCC	Reverse Primer zur Generierung von <i>phoQ</i> mit einem FLAG-Tag
BG904	gagtttgcgaaattctgc	Forward Check Primer für <i>phoQ</i> FLAG-Tag
BG905	gctgacctgccatttgcc	Reverse Check Primer für <i>phoQ</i> FLAG-Tag
BG912	ctcgact CATATG gcgagacgtattctg	Forward Primer zur Generierung von <i>phoB</i> mit einem His Tag
BG913	ggc TCTAGA aaagcgggtgaaaaacg	Reverse Primer zur Generierung von <i>phoB</i> mit einem His Tag
BG914	ctcgact CATATG gcctttcatggtggc	Forward Primer zur Generierung von <i>phoR</i> mit einem His Tag
BG915	ggc TCTAGA aatcgtgttttgcaatta	Reverse Primer zur Generierung von <i>phoR</i> mit einem His Tag
BG929	ggct GCTAGC cgctttcatggtggctg	Forward Primer zur Generierung von <i>strep-phoR</i> (52-431), NheI
BG930	gcacgc GTCGAC cctccgagcagaattac	Forward Primer für <i>cpxP</i> - <i>lacZ</i> Fusion, Sall
BG931	ggc TCTAGA gaactgactgccagcg	Reverse Primer für <i>cpxP</i> - <i>lacZ</i> Fusion, XbaI
BG932	gcacgc GTCGAC gggagttattctagttgc	Forward Primer für <i>ompC</i> - <i>lacZ</i> Fusion, Sall
BG933	ggc TCTAGA cctgctaccagcagag	Reverse Primer für <i>ompC</i> - <i>lacZ</i> Fusion, XbaI
BG934	gcacgc GTCGAC caattgctcaggcattag	Forward Primer für <i>glnA</i> - <i>lacZ</i> Fusion, Sall
BG935	ggc TCTAGA aactcacttctgtctcg	Reverse Primer für <i>glnA</i> - <i>lacZ</i> Fusion, XbaI
BG936	gcttatttaccgatcaaccgcaggaatcagactgta G ACTACAAAGACCATGACGG	Forward Primer zur Generierung von <i>atoS</i> mit einem FLAG-Tag
BG937	attatctcatcatccacaataaggatgcgattaatagcagt CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTA TTCC	Reverse Primer zur Generierung von <i>atoS</i> mit einem FLAG-Tag
BG962	ctggcaatacagcgac	Forward Check Primer für <i>atoS</i> FLAG-Tag
BG963	gccgcatcagaataac	Reverse Check Primer für <i>atoS</i> FLAG-Tag

6.4. Weitere Experimente

6.4.1. Massenspektrometrische Untersuchung von Liganden der Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF Proteine

6.4.1.1. Untersuchung der polaren Phase

Die polare Phase der Fällungen der Proteine Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF von den Streptaktin Sepharose Beads wurde massenspektrometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten die Streptaktin Sepharose Beads ohne gebundenes Protein Abbildung 6.1 A. Für die polaren Fraktionen der unterschiedlichen Proteine konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 6.1 B bis E).

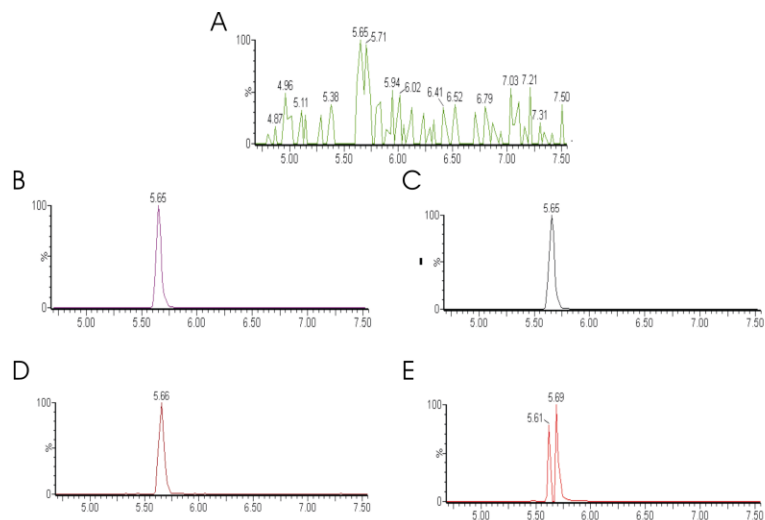


Abbildung 6.1: Massenspektrometrische Ergebnisse der Untersuchung der polaren Phase. Es sind Signalstärken in Prozent in Abhängigkeit von der Zeit 4,5 bis 7,5 abgegeben (A) Ergebnisse für die Streptaktin Sepharose Beads. (B) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm $\Delta ptsP$ aufgereinigt. (C) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt. (D) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr}ΔGAF aus dem Stamm $\Delta ptsP$ aufgereinigt. (E) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr}ΔGAF aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt.

6.4.1.2. Untersuchung der unpolaren Phase

Auch die unpolare Phase wurde nach der Fällung der Proteine von den Streptaktin Sepharose Beads massenspektrometrisch untersucht. Bei dieser Analyse ergaben sich Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinproben. In Abbildung 6.2 sind die Signalintensitäten der einzelnen Peaks im zeitlichen Verlauf dargestellt. Als Kontrolle für die Fraktionen der Strep-Fusionsproteine wurden auch hier die Streptaktin Sepharose Beads eingesetzt (Abbildung 6.2 A).

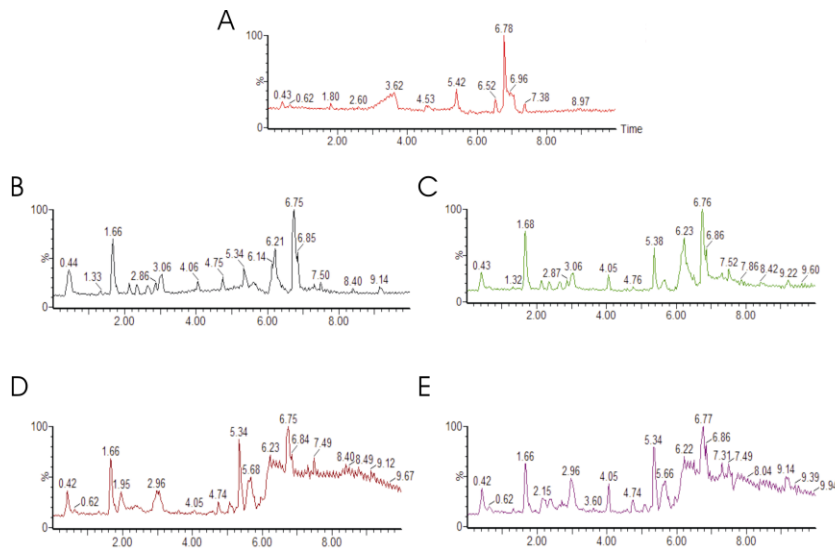


Abbildung 6.2: Massenspektrometrische Ergebnisse der Untersuchung der unpolaren Phase. Es sind Signalstärken in Prozent in Abhängigkeit von der Zeit 0 bis 10 abgegeben (A) Ergebnisse für die Streptaktin Sepharose Beads. (B) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm $\Delta ptsP$ aufgereinigt. (C) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt. (D) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} Δ GAF aus dem Stamm $\Delta ptsP$ aufgereinigt. (E) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} Δ GAF aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt.

Für die Streptaktin Sepharose Beads konnten nur wenige, schwache Ausschläge detektiert werden. Für alle Proteinaufreinigungen sind wesentlich mehr und höhere Peaks detektierbar. Es ist zu beobachten, dass die Graphen der EI^{Ntr} Aufreinigungen aus den $\Delta ptsP$ und $\Delta ptsP \Delta sspA$ Stämmen ähnlich zueinander sind (Abbildung 6.2 B und C). Das Gleiche zeigt sich für das EI^{Ntr} Δ GAF Protein aus beiden Stämmen (Abbildung 6.2 D und E). Ein Ausschnitt dieser Diagramme wurde noch einmal graphisch dargestellt (Abbildung 6.3). Hier wurde nach Signalen gesucht, die hohe Intensitäten für Strep-EI^{Ntr} (rote, orange oder gelbe Färbung), aber nur geringe Signalstärken für Strep-EI^{Ntr} Δ GAF zeigten (blaue Färbung). Die Fraktionen der jeweiligen Proteine aus den beiden Stämmen $\Delta ptsP$ und $\Delta ptsP \Delta sspA$ sollten hierbei ähnliche Farbbereiche ausweisen. In Abbildung 6.3 und Abbildung 6.6 sind solche Bereiche vergrößert dargestellt. Ausschnitte der massenspektrometrischen Analyse sind für diese beiden Bereiche in Abbildung 6.4 und Abbildung 6.7 dargestellt. Ebenfalls wurde von diesen Bereichen eine Graphik der detektierten Molekulargewichte erstellt. Diese sind in Abbildung 6.5 und Abbildung 6.8 gezeigt. Aus diesen zwei Bereichen konnten die drei Stoffe: 34:4 Phosphatidylethanolamin, 34:2 Phosphatidylethanolamin und 34:2 Phosphatidylglycerin identifiziert werden (siehe Ergebnisse Abschnitt 4.4.4.3.). Bei diesen Fettsäurederivaten handelt es sich möglicherweise um Liganden der GAF Domäne von EI^{Ntr}.

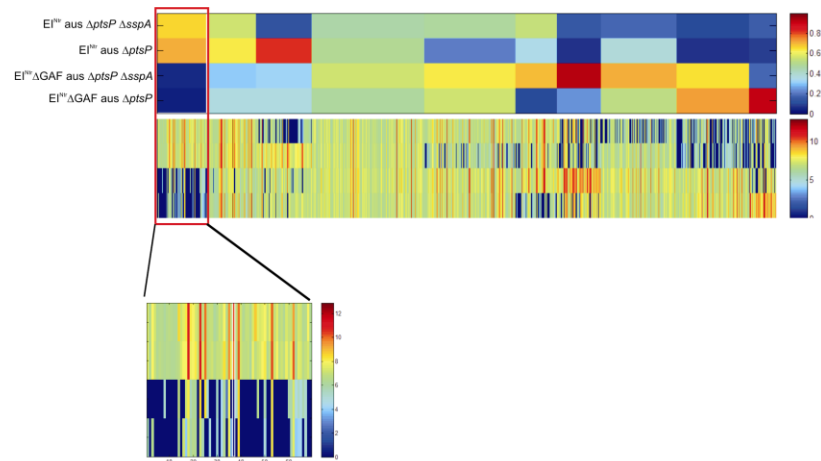


Abbildung 6.3: Graphische Darstellung der Signalintensitäten aus Abbildung 6.2. Den Signalintensitäten wurden Farben zugeordnet. Der Bereich von Interesse ist vergrößert dargestellt.

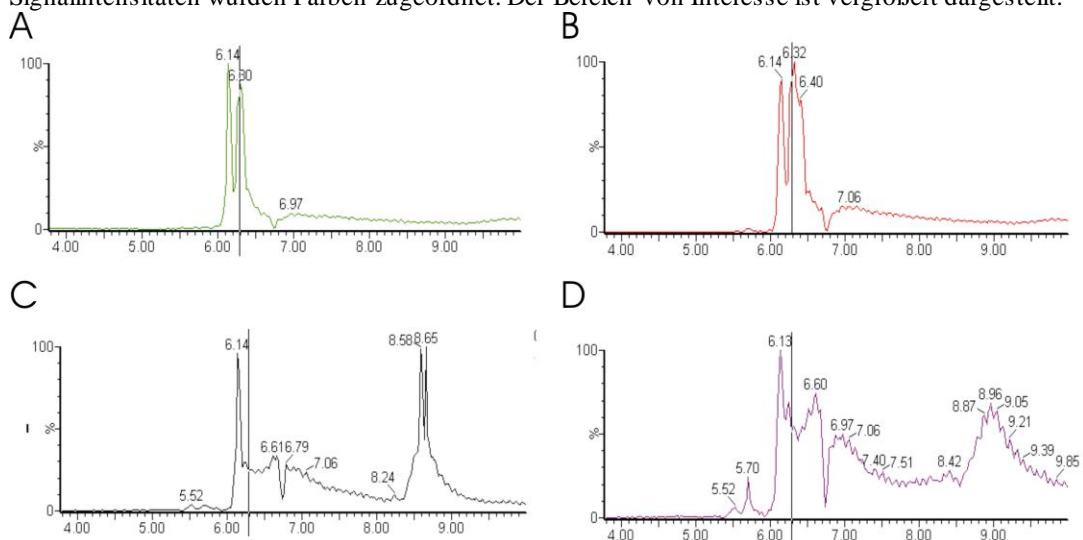


Abbildung 6.4: Massenspektrometrische Ergebnisse der Untersuchung der unpolaren Phase. Es sind Signalstärken in Prozent in Abhängigkeit von der Zeit 0 bis 10 abgelesen (A) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm $\Delta ptsP$ aufgereinigt. (B) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt. (C) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} ΔGAF aus dem Stamm $\Delta ptsP$ aufgereinigt. (D) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} ΔGAF aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt.

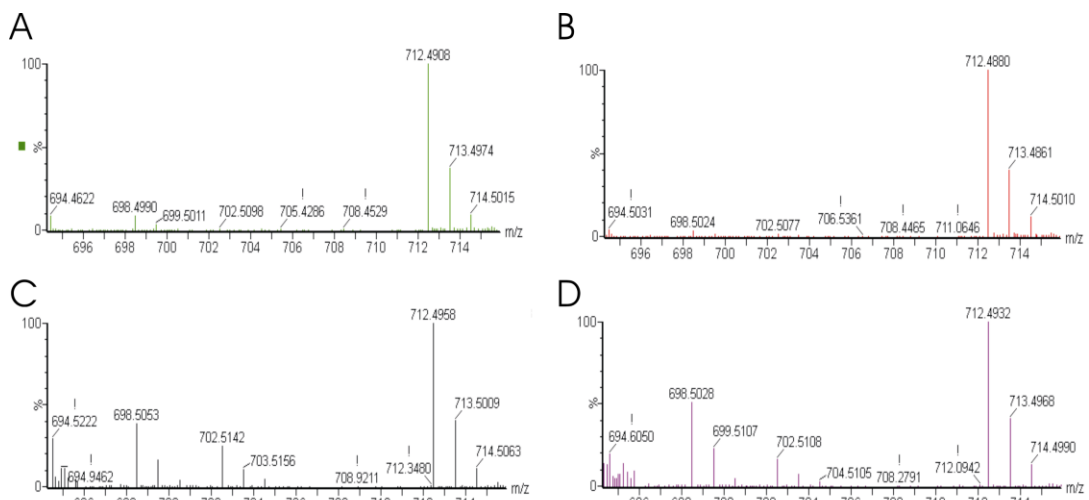


Abbildung 6.5: Massenspektrometrische Ergebnisse der Untersuchung der unpolaren Phase. Es sind detektierten Molekulargewichte (Da) dargestellt. (A) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm

$\Delta ptsP$ aufgereinigt. (B) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt. (C) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} ΔGAF aus dem Stamm $\Delta ptsP$ aufgereinigt. (D) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} ΔGAF aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt.

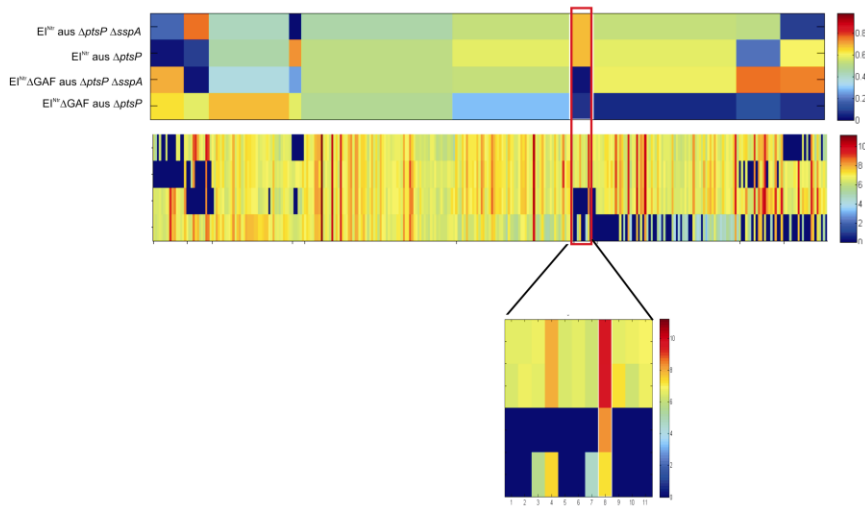


Abbildung 6.6: Graphische Darstellung der Signalintensitäten aus Abbildung 6.2. Den Signalintensitäten wurden Farben zugeordnet. Der Bereich von Interesse ist vergrößert dargestellt.

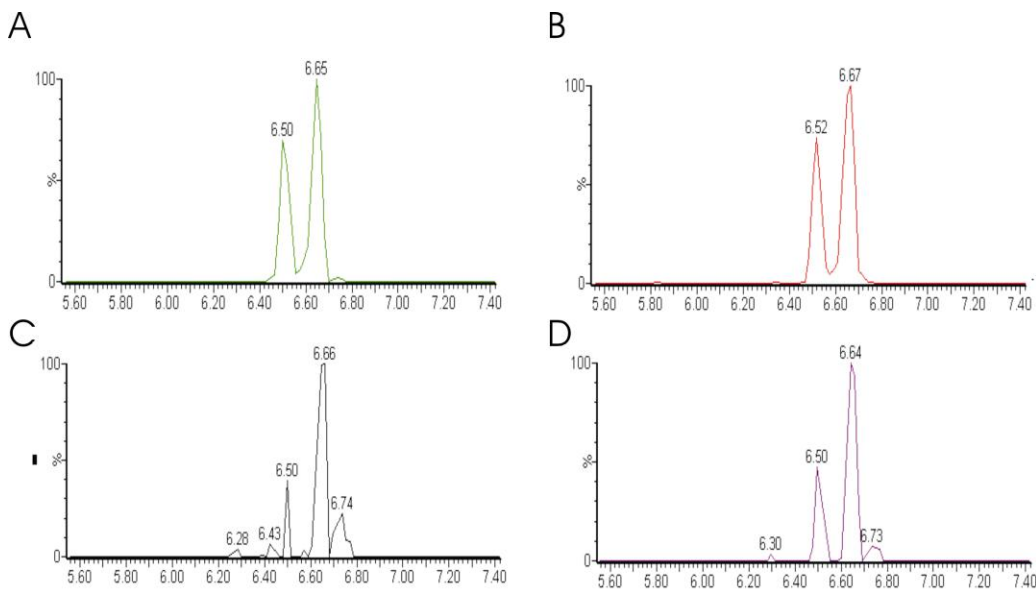


Abbildung 6.7: Massenspektrometrische Ergebnisse der Untersuchung der unpolaren Phase. Es sind Signalstärken in Prozent in Abhängigkeit von der Zeit 0 bis 10 abgegeben (A) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm $\Delta ptsP$ aufgereinigt. (B) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt. (C) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} ΔGAF aus dem Stamm $\Delta ptsP$ aufgereinigt. (D) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} ΔGAF aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt.

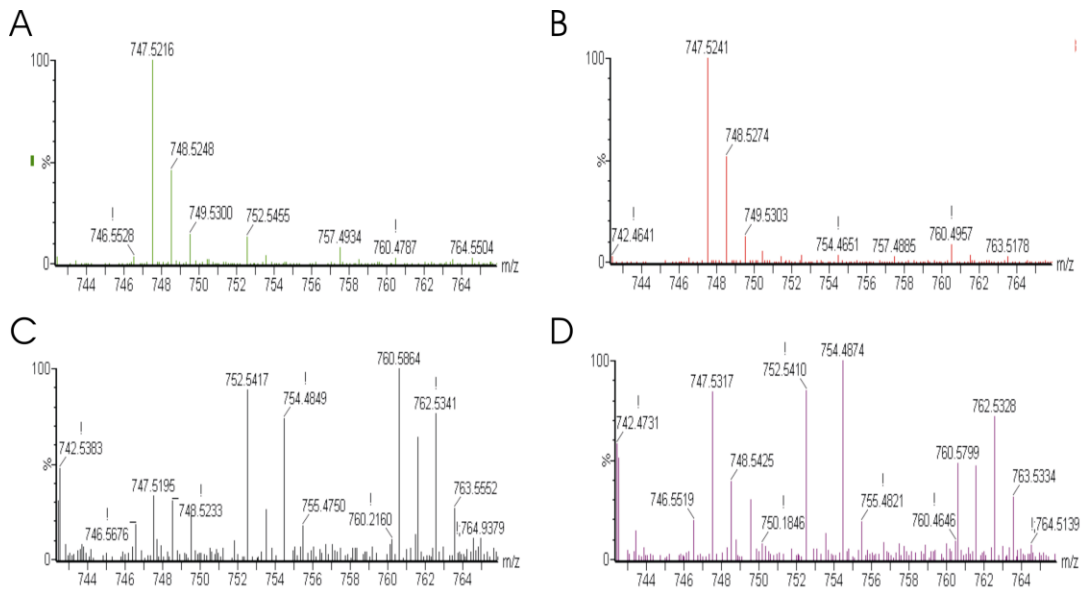


Abbildung 6.8: Massenspektrometrische Ergebnisse der Untersuchung der unpolaren Phase. Es sind detektierten Molekulargewichte (Da) dargestellt. (A) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm $\Delta ptsP$ aufgereinigt. (B) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt. (C) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} ΔGAF aus dem Stamm $\Delta ptsP$ aufgereinigt. (D) Ergebnisse für Strep-EI^{Ntr} ΔGAF aus dem Stamm $\Delta ptsP \Delta sspA$ aufgereinigt.

6.4.2. Identifikation von Interaktionspartner von YhbJ

Um Interaktionspartner von YhbJ zu identifizieren, wurde das Plasmid mit Strep-*yhbJ* sowie der isogene Leervektor in den $\Delta yhbJ$ Stamm eingebracht. Von beiden Transformanten wurden Kulturen in LB-Medium angezogen. Nach dem Erreichen von einer OD₆₀₀ von 0,8 wurden die Zellen mit IPTG zur Expression des Strep-Fusionsproteins induziert. Nach einer Stunde Wachstum wurden die Zellen geerntet. Eine weitere Kultur jeder Transformante wurde mit 0,4% Formaldehyd versetzt und unter Schütteln (90 rpm) für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Auch diese Zellen wurden anschließend geerntet. Die Zellpellets wurden mit der Digi-F-Press aufgeschlossen und die Proteine mittels Streptaktin Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Aufreinigungen wurden mittels denaturierender Gelelektrophorese überprüft (Abbildung 6.9).

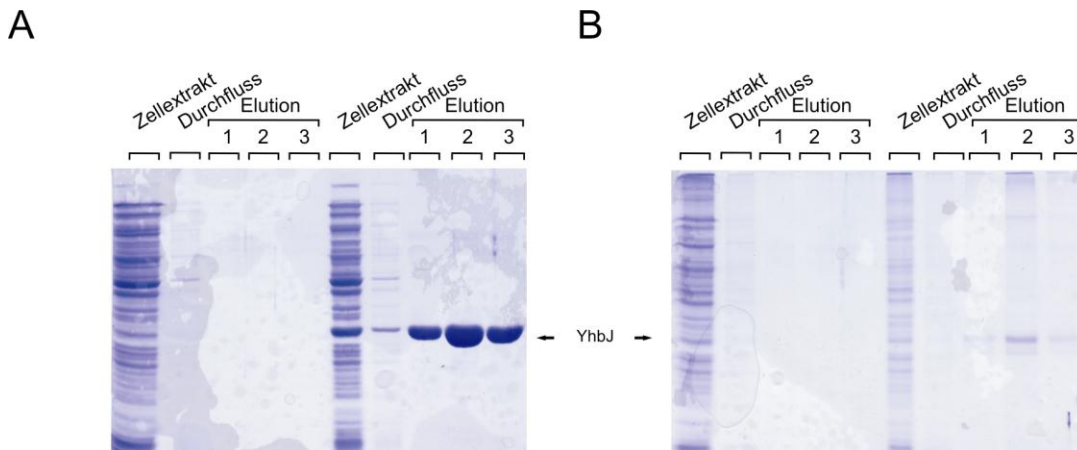


Abbildung 6.9: Aufreinigungen des Strep-Tags und des Strep-YhbJ Fusionsproteins. Die Transformanten des $\Delta ptsN$ Stammes (Z37) mit P_{tac} - Strep-*yhbJ* (pBGG164) und der Leervektor (pBGG237) wurden in LB-Medium angezogen. (A) Die Zellen wurden nach einer Stunde Induktion der Proteinexpression geerntet, aufgeschlossen und die Proteine über Streptaktin-Säulen aufgereinigt. Dabei wurden die Säulen mit Puffer W gewaschen und die Proteine schließlich mit Puffer E eluiert. (B) Die Zellen wurden nach einer Stunde Induktion der Proteinexpression mit Formaldehyd versetzt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Proteine über Streptaktin-Säulen aufgereinigt. Dabei wurden die Säulen mit Puffer W gewaschen und die Proteine schließlich mit Puffer E eluiert. 10 μ l des Zellextrakts, des Durchflusses, der Elutionsfraktionen und des Markers (M) wurde auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und die Gele mit Coomassie gefärbt.

Um nun die Eluate der Aufreinigung und der SPINE-Aufreinigung auf mögliche Interaktionspartner zu untersuchen, wurden je 20 μ l der Elutionsfraktionen zusammen mit einem Größenstandard auf ein SDS-Gel geladen. Nach der Auftrennung der Proteine, wurden diese durch die Anfärbung mit Silbernitrat sichtbar gemacht (Abbildung 6.10).

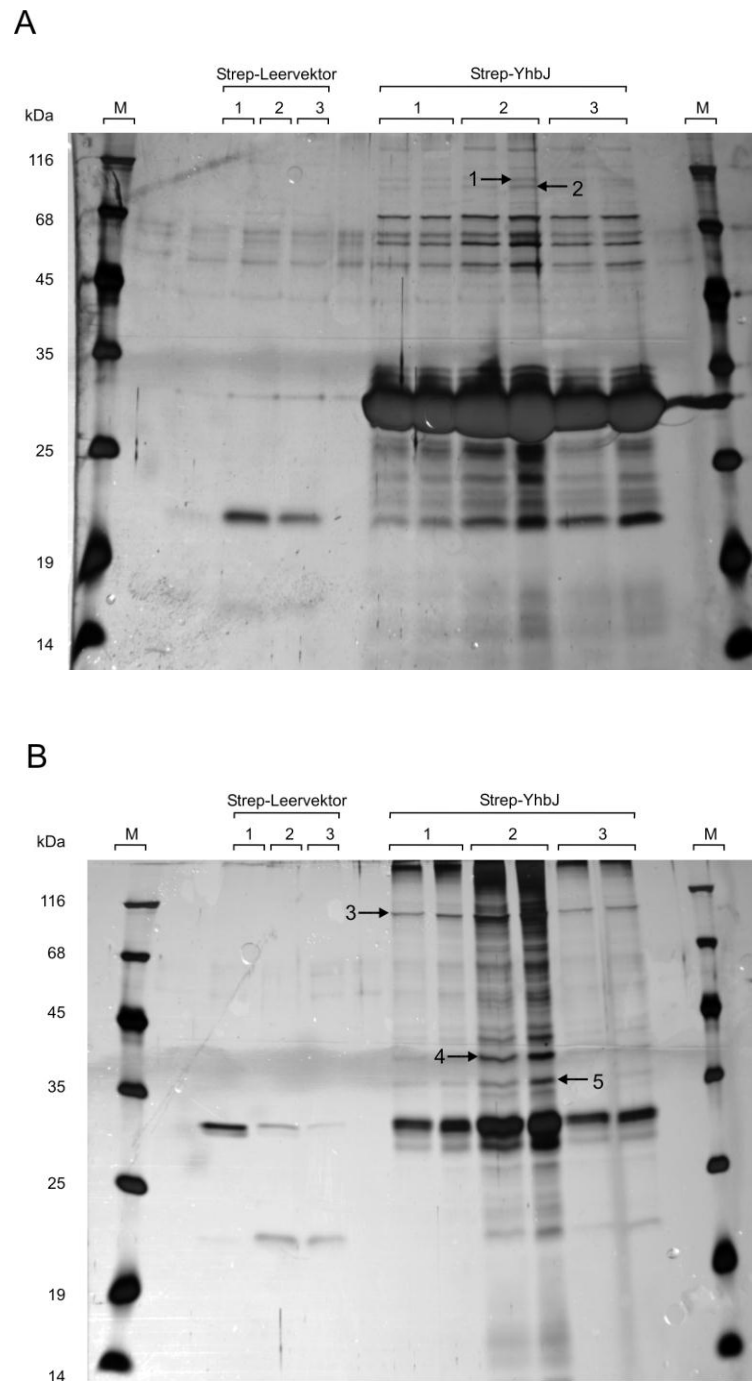


Abbildung 6.10: Analyse von möglichen Interaktionspartnern von YhbJ durch Koaufrreinigung und SPINE. Die drei Elutionsfraktionen der Aufrreibungen (Koaufrreinigung (A) und SPINE (B)) des Strep-Tags und von Strep-YhbJ wurden zusammen mit dem Unstained Protein Marker (M) auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen, die Proteine aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Es wurden jeweils fünf Proteinbanden pro Aufrreinigung für die massenspektrometrische Analyse ausgewählt. Diese Proteine, die spezifisch für die YhbJ Aufrreinigung sind, sind mit Pfeilen markiert.

Nun sollte analysiert werden, welche Proteine nur in den Strep-YhbJ Elutionen aber nicht in der Strep-Tag Aufrreinigung vorkommen. Hier konnten viele Banden eindeutig identifiziert werden. Es wurden fünf Proteinbanden aus den normalen und fünf aus der SPINE-Aufrreinigung ausgewählt und aus dem Gel ausgeschnitten. Um diese Proteine zu identifizieren, sollten sie massenspektrometrisch untersucht werden.

Dies wurde von Zentrum für molekulare Medizin in Köln durchgeführt. Die identifizierten Proteine in jeder Probe sind in Tabelle 3.3.-1 aufgeführt.

Tabelle 6.1: Identifikation von möglichen Interaktionspartnern von YhbJ durch Massenspektrometrie. Die aus den SDS-Gelen ausgeschnittenen Proteinbanden (jeweils 1-5) für die Koaufrreinigung und die SPINE-Aufrreinigung wurden massenspektrometrisch analysiert. Gezeigt sind die identifizierten Proteine, geordnet nach dem Score der Identifizierung und ihrem Molekulargewicht.

YhbJ Aufrreinigungen		
Probennummer	Identifiziertes Protein	Molekulargewicht des identifizierten Proteins (kDa)
1 (Koaufrreinigung)	kein Protein identifiziert	
2 (Koaufrreinigung)	kein Protein identifiziert	
3 (SPINE)	YhbJ	32,5
4 (SPINE)	Lac Repressor (Lac I)	38,6
5 (SPINE)	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	35,5
	YhbJ	32,5

In den Ligand-fishing-Experimenten konnten zwei Proteine als mögliche Interaktionspartner von EIIA^{Ntr} identifiziert werden. Es handelt sich um den Lac-Repressor und das Enzym Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase. Das Molekulargewicht des Lac-Repressors stimmt nicht mit der Größe der Bande, die im Gel gefunden wurde überein. Die Interaktion der Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase mit YhbJ wurde nicht weiter untersucht.

6.4.2.1. YhbJ interagiert scheinbar mit der Glukosamin-6-Phosphat Synthase (GlmS)

YhbJ reguliert die Synthese von GlmS. In einer $\Delta yhbJ$ Mutante wird die Prozessierung von GlmZ verhindert und GlmS akkumuliert (Kalamorz 2007). Nun sollte untersucht werden, ob YhbJ über einen weiteren Mechanismus GlmS reguliert. Es wurden der Zellextrakt einer $\Delta yhbJ$ Mutante zusammen mit den Elutionsfraktionen der Strep-Tag Aufrreinigung und der Strep-YhbJ Aufrreinigung auf einem denaturierenden Gel aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western Blot mit GlmS Antiserum durchgeführt um GlmS zu detektieren (Abbildung 6.11).

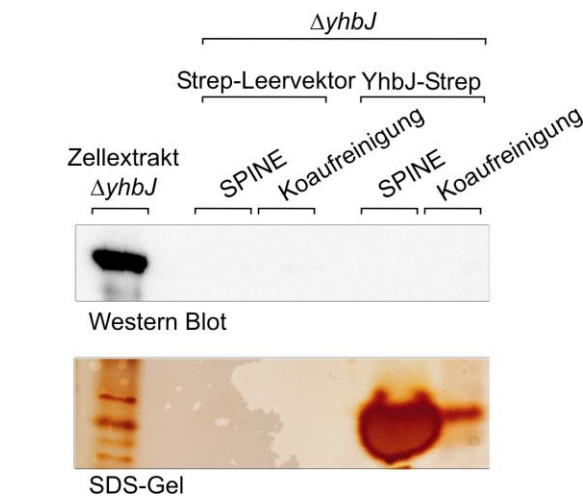


Abbildung 6.11: GlmS kann nicht mit YhbJ koaufgereinigt werden. Die Transformanten des $\Delta yhbJ$ Stammes (Z37) mit P_{tac} - Strep-*yhbJ* (pBGG164) und dem Leervektor (pBGG237) wurden in LB-Medium angezogen. Die Proteine wurden mit (SPINE) und ohne (Koaufreinigung) Quervernetzung mit Formaldehyd nach der Ernte und dem Aufschluss der Zellen aufgereinigt. Die Elutionsfraktionen 2 der Aufreinigungen und der Zellextrakt der $\Delta yhbJ$ Mutante (Z) wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde zur Detektion der Proteine mit Silbernitrat angefärbt. Außerdem wurde ein Western Blot zur Detektion von GlmS in den Eluaten mit GlmS Antiserum durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von unabhängigen Aufreinigungen und Western Blots.

Im Western Blot ist klar zu erkennen, dass GlmS im Zellextrakt der Mutante detektiert werden kann. In den Elutionen der Koaufreinigung und SPINE-Aufreinigung konnte GlmS nicht detektiert werden.

Die mögliche Interaktion zwischen YhbJ und GlmS wurde mit dem bakteriellen Two-Hybrid System untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden Plasmide mit den T18- und T25-Untereinheiten mit *yhbJ* und *glmS* in den BACTH Analysestamm transformiert. Von den Transformanten wurden geeignete Verdünnungen auf LB-Agarplatten getropft und die Interaktion analysiert (Abbildung 6.12).

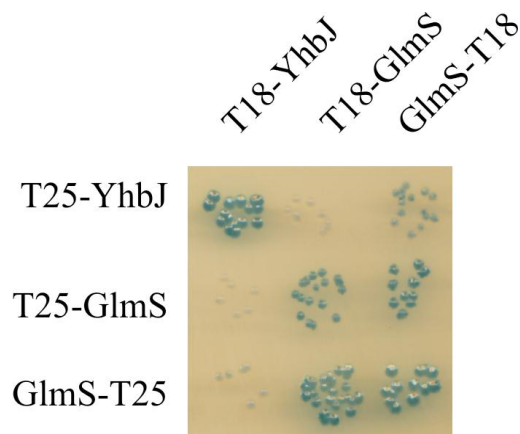


Abbildung 6.12: Interaktion von GlmS mit YhbJ. Die Plasmide, welche für die verschiedenen Fusionsproteine kodieren (*glmS* pBGG392, pBGG393, pBGG394 und pBGG395) wurden mit den

Plasmiden *yhbJ* (pBGG348 und pBGG349) in den Stamm BTH101 kotransformiert. Die erhaltenen Kotransformanten wurden phänotypisch auf LB-Agarplatten mit IPTG [1 mM] und X-Gal [40 mg/ml] analysiert.

In den phänotypischen Analysen ist zu erkennen, dass GlnS Multimere bildet. YhbJ interagiert auch mit sich selbst und bildet scheinbar Multimere. Es ist eine leichte Blaufärbung bei einer Kombination von YhbJ und GlnS zu erkennen ist. Dies weist auf eine Interaktion der beiden Proteine miteinander hin.

Da GlnS nicht in dem Ligand-fishing Experiment, aber im Two-Hybrid System als Interaktionspartner von YhbJ nachgewiesen werden konnte, wurde das Ligand-fishing Experiment umgekehrt wiederholt. Hierzu wurde ein Plasmid konstruiert, welches *glnS* unter P_{tac} -Kontrolle mit einem N-terminalen Strep-Tag trug. Dieses Plasmid wurde in den Wildtyp mit einer chromosomalen *yhbJ*-3xFLAG-Fusion eingebracht. Anschließend wurden die Zellen in LB-Medium angezogen und Strep-GlnS aufgereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden mit einem Western Blot mit FLAG Antiserum auf das Vorhandensein von YhbJ -3xFLAG überprüft (Abbildung 6.13).

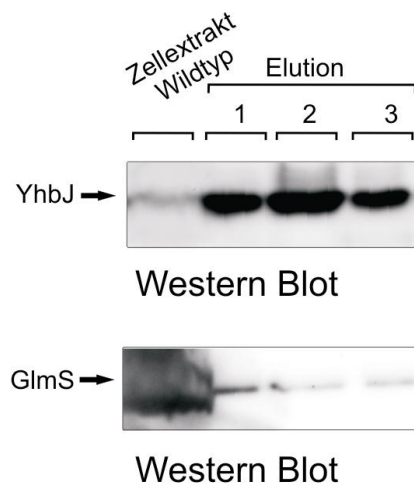


Abbildung 6.13: YhbJ kann mit Strep-GlnS koaufgereinigt werden. Die Transformante des Wildtyps mit chromosomalen *yhbJ*-3xFLAG-Fusion und P_{tac} -Strep-*glnS* wurde in LB-Medium angezogen. Strep-GlnS wurde nach der Ernte und dem Aufschluss der Zellen aufgereinigt. Die Elutionsfraktionen der Aufreinigung und der Zellextrakt der Transformante wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western Blot zur Detektion von YhbJ in den Eluat mit FLAG Antiserum durchgeführt.

In den Elutionsfraktionen der Strep-GlnS Aufreinigung konnte YhbJ in großen Mengen detektiert werden. Im Zellextrakt der Transformante ist nur wenig YhbJ detektierbar.

6.4.3. EIIA^{Ntr} reguliert die Expression der kleinen RNA GlnY

Es sollte untersucht werden, ob EIIA^{Ntr} einen Einfluss auf die Regulationskaskade zur Expression der Glukosamin-6-Phosphat Synthase hat. Das Protein ist für die Produktion von Aminosukern als

Vorläufermoleküle für die Zellwand verantwortlich. Nur bei Mangel an Aminosackern wird das Protein in der Zelle benötigt (Plumbridge and Vimr, 1999). Die Expression von *glmS* wird durch die zwei kleinen RNAs GlmY und GlmZ reguliert (Reichenbach *et al.*, 2008). Es wurde überprüft, ob EIIA^{Ntr} einen Einfluss auf die Expression oder Stabilität der kleinen RNAs oder auf das *glmS* Transkript hat. Hierzu wurde aus dem Wildtyp, dem $\Delta ptsN$ Stamm und der mit $P_{tac-ptsN}$ komplementierten Mutante Gesamt-RNA isoliert. Als Kontrolle wurde RNA aus dem $\Delta yhbJ$ Stamm isoliert. Die RNA wurde zur Untersuchung des *glmS* Transkripts auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Anschließend erfolgte ein Northern Blot und die Detektion des *glmS* Transkripts mit einer Sonde gegen diese spezifische RNA. Die Mengen an GlmY und GlmZ wurden bestimmt, indem die Gesamt-RNA auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt wurde und die RNAs durch Northern Blots und mit spezifischen Sonden detektiert wurden (Abbildung 6.14).

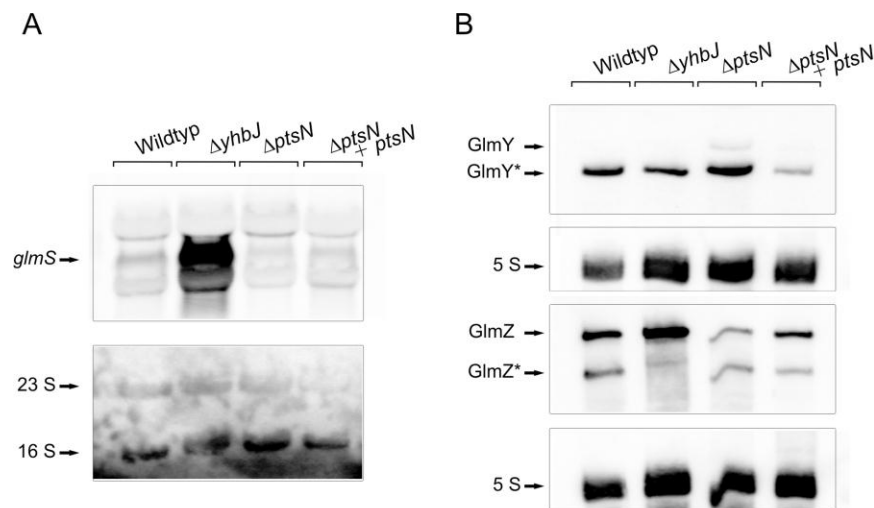


Abbildung 6.14: EIIA^{Ntr} reguliert die zellulären Mengen von GlmY und GlmZ. Das *glmS* Transkript und die kleinen RNAs GlmY und GlmZ wurden in der Gesamt-RNA aus dem Wildtypstamm (R1279), der $\Delta ptsN$ Mutante (Z79) und der mit $P_{tac-ptsN}$ (pBGG86) komplementierten Mutante im Northern Blot mit spezifischen Sonden detektiert. (A) Detektion von *glmS*. Als Kontrollen diente Gesamt-RNA aus der $\Delta yhbJ$ Mutante und die Detektion der 23S und 16S rRNA. (B) Detektion der kleinen RNAs GlmY und GlmZ in der Gesamt-RNA der Stämme und Transformante. Als Kontrollen diente Gesamt-RNA aus dem $\Delta yhbJ$ Stamm und die Detektion der 5S rRNA.

In der $\Delta yhbJ$ Mutante akkumuliert das *glmS* Transkript (Kalamorz *et al.*, 2007). Im Wildtyp, der $\Delta ptsN$ Mutante und in der komplementierten Mutante sind nur geringe Mengen *glmS* detektierbar. Die Mengen an detektiertem Transkript unterscheiden sich in den zwei Stämmen und der Transformante nicht. Die Menge an detektiertem Transkript unterscheidet sich in den zwei Stämmen und der Transformante nicht. Die Menge an GlmY ist im Wildtyp und der $\Delta yhbJ$ Mutante gleich. In der $\Delta ptsN$ Mutante ist mehr detektierbar als im Wildtyp, wohingegen die Menge bei *ptsN* Überexpression geringer ist. GlmZ akkumuliert in der $\Delta yhbJ$ Mutante in seiner unprozessierten Form. Im Wildtyp sind sowohl die prozessierte als auch die unprozessierte Form detektierbar. In der $\Delta ptsN$ Mutante ist die zelluläre Menge an unprozessiertem GlmZ etwas geringer als im Wildtyp. Die Überproduktion von EIIA^{Ntr} zeigt keinen

Effekt auf GlmZ. Nun wurde die EIIA^{Ntr}-abhängige Veränderung des *glmS* Transkripts und der kleinen RNA entlang der Wachstumskurve der Stämme und Transformante untersucht (Abbildung 6.15).

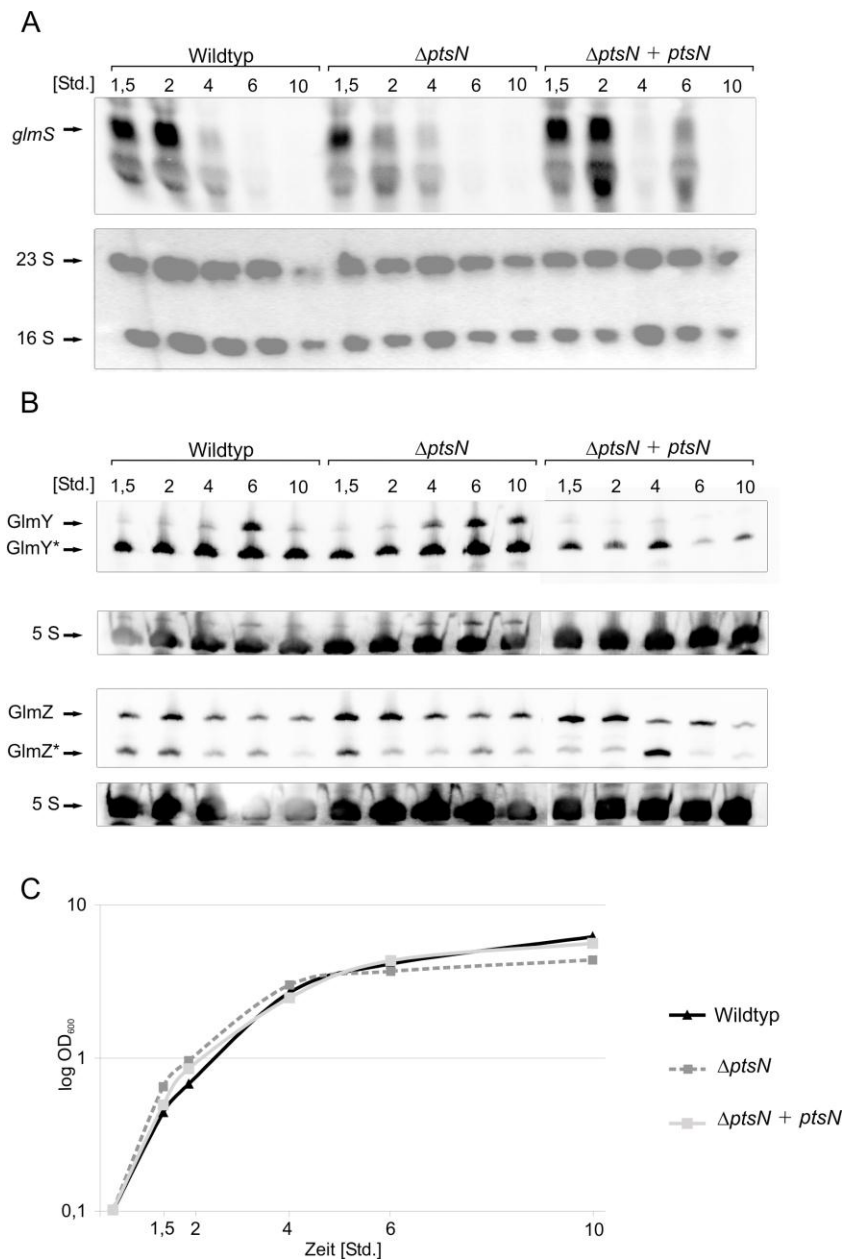


Abbildung 6.15: EIIA^{Ntr} reguliert die zelluläre Menge von GlmY. Der Wildtypstamm (R1279), die $\Delta ptsN$ Mutante (Z79) und die mit $P_{tac-ptsN}$ (pBGG86) komplementierte Mutante wurden in LB-Medium angezogen. Nach verschiedenen Zeitpunkten (1,5; 2; 4; 6 und 10 Stunden) wurde die OD₆₀₀ bestimmt und Proben zur Isolierung der Gesamt-RNA entnommen. Das *glmS* Transkript und die kleinen RNAs GlmY und GlmZ wurden in der Gesamt-RNA der Stämme und der Transformanten durch einen Northern Blot analysiert (A) Detektion von *glmS*. Als Kontrolle diente die Detektion der 23S und 16S rRNA. (B) Detektion der kleinen RNAs GlmY und GlmZ in der Gesamt-RNA der Stämme und der Transformante. Als Kontrolle diente die Detektion der 5S rRNA. (C) Wachstumskurve der angezogenen Stämme und der Transformante. Die Zeitpunkte der Probenentnahmen sind gekennzeichnet.

Im Wildtyp kann *glmS* in großen Mengen in der exponentiellen Wachstumsphase detektiert werden. Zu den späteren Messzeitpunkten nimmt die Menge an *glmS* ab. Die Deletion von *ptsN* hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von *glmS*. Die Überproduktion von EIIA^{Ntr} bewirkt nach 6 Stunden eine

Erhöhung der Transkriptmenge. Zu den anderen Messzeitpunkten können in der Transformante ähnliche Mengen an *glmS* wie im Wildtyp detektiert werden. Die sRNA GlmY ist im Wildtyp zu allen Messzeitpunkten in großen Mengen vorhanden. GlmY akkumuliert entlang der Wachstumskurve. In der $\Delta ptsN$ Mutante scheint die Akkumulation stärker als im Wildtyp. Die Überproduktion von EIIA^{Ntr} bewirkt eine Abnahme der Menge an GlmY entlang der Wachstumskurve. Zu allen Zeitpunkten ist bei der Überexpression von *ptsN* weniger GlmY detektierbar als im Wildtyp. GlmZ liegt im Wildtyp bei allen Messzeitpunkten in der prozessierten und unprozessierten Form vor. In der $\Delta ptsN$ Mutante scheint die unprozessierte Form zu akkumulieren. Die Überexpression von *ptsN* zeigt keinen starken Einfluss auf GlmZ. Nur nach 4 Stunden ist mehr von der prozessierten, als von der unprozessierten Form von GlmZ sichtbar.

Da die Mengen an GlmY sich im Wildtyp, der Mutante und der komplementierten Mutante unterscheiden, sollte nun untersucht werden, ob EIIA^{Ntr} die Transkription von GlmY reguliert. Hierzu wurden Stämme verwendet, die *glmY'-lacZ*-Fusionen im Chromosom tragen. Hier wurden Fusionen verwendet, in denen beide Promotoren vor *glmY* intakt sind oder die Mutationen im σ^{54} , σ^{70} Promotor oder beiden Promotoren vor *glmY* tragen. In diese Stämme wurde eine *ptsN* Deletion eingebracht. Die Wildtypstämme und die isogenen *ptsN* Mutanten wurden in LB-Medium angezogen. In der exponentiellen und in der späten exponentiellen Wachstumsphase wurden Proben entnommen und β -Galaktosidase-Messungen durchgeführt (Abbildung 6.16).

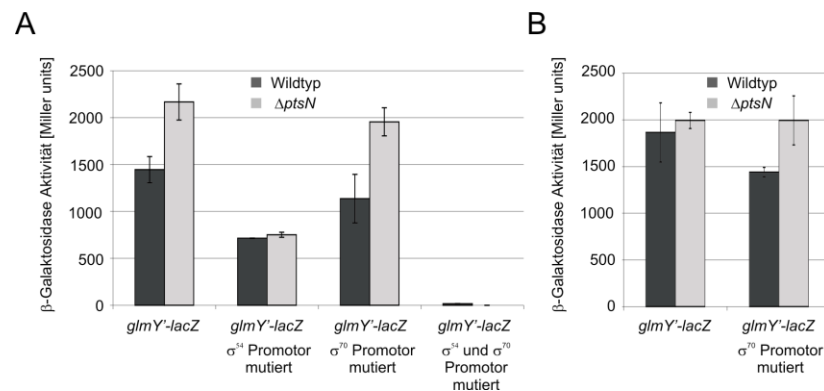


Abbildung 6.16: EIIA^{Ntr} reguliert die Aktivität des σ^{54} Promotors von *glmY*. Die Derivate des Wildtyps mit chromosomalen *glmY'-lacZ*-Fusionen (*glmY'-lacZ* (Z283); *glmY'-lacZ* σ^{54} Promotor mutiert (Z284); *glmY'-lacZ* σ^{70} Promotor mutiert (Z285) und *glmY'-lacZ* σ^{54} und σ^{70} Promotor mutiert (Z286)) und die isogenen $\Delta ptsN$ Mutanten (*glmY'-lacZ* (Z428); *glmY'-lacZ* σ^{54} Promotor mutiert (Z429); *glmY'-lacZ* σ^{70} Promotor mutiert (Z430) und *glmY'-lacZ* σ^{54} und σ^{70} Promotor mutiert (Z431)) wurden in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden in der exponentiellen (A) oder späten exponentiellen (B) Wachstumsphase geerntet. Anschließend wurden β -Galaktosidase Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller Units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von unabhängigen Messungen.

GlmY steht unter der Kontrolle von zwei perfekt überlappenden Promotoren. Ein Promotor ist ein σ^{70} -abhängiger Promotor. Der zweite Promotor besitzt eine -24 und -12 Erkennungssequenz und ist von σ^{54} und dem GrK/R Zwei-Komponenten System abhängig (Göpel *et al.*, 2011). Im Wildtyp wird *glmY* von beiden Promotoren aus exprimiert. Die σ^{54} -abhängige Expression ist sehr stark, hierfür wurden 1137 Miller units gemessen. Die Aktivität der σ^{70} -abhängigen Expression beträgt 714 Miller units. Sind beide Promotoren vorhanden erhält man eine LacZ-Aktivität von 1447 Miller units. Sind die

Erkennungssequenzen beider Promotoren mutiert, ist die Expression von *glmY* mit 16 Miller units sehr gering. Die *ptsN* Deletion hat auf die Aktivität des σ^{70} Promotors keinen Einfluss. Der gemessene Wert ist ähnlich zu dem des Wildtyps (751 gegenüber 714 Miller units). Die Expression des Stammes mit beiden mutierten Promotoren ist, wie auch im Wildtyp sehr gering. Für die *lacZ*-Fusion mit intakten Promotoren bzw. einem intakten σ^{54} Promotor werden Werte von 2167 und 1955 Miller units gemessen. Die Werte sind höher als für den Wildtypstamm (1445 und 1137 Miller units). Die Ergebnisse für die Zellen in der späten exponentiellen Phase zeigen kaum einen Unterschied zwischen Wildtyp und $\Delta ptsN$ Mutante (1866 versus 1994 Miller units für die unmutierten Promotoren und 1441 gegenüber 1995 Miller units für den σ^{54} -abhängigen Promotor). Da die Deletion von *ptsN* eine Stimulation der *glmY* Expression zur Folge hat, wurde überprüft, ob auch die Überexpression von *ptsN* Auswirkungen zeigt. Hierzu wurde die $\Delta ptsN$ Mutante mit einem *ptsN* Überexpressionsplasmid transformiert und die *glmY-lacZ* Expression in dieser Transformante untersucht (Abbildung 6.17).

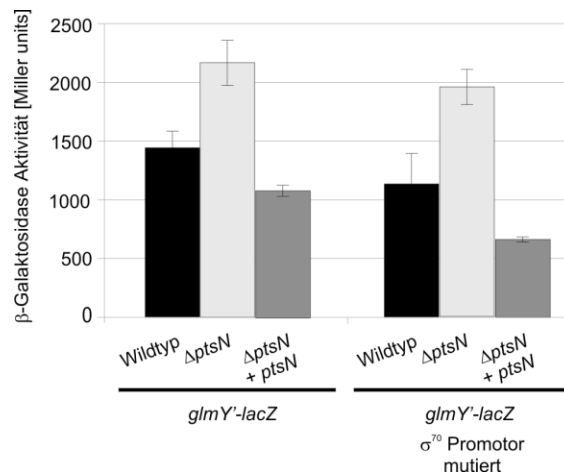


Abbildung 6.17: EIIA^{Ntr} reguliert die Expression von *glmY*. Die Derivate des Wildtyps mit chromosomalen *glmY-lacZ*-Fusionen (*glmY-lacZ* (Z283) und *glmY-lacZ* σ^{70} Promotor mutiert (Z285)) und die isogenen $\Delta ptsN$ Mutanten (*glmY-lacZ* (Z428) und *glmY-lacZ* σ^{70} Promotor mutiert (Z430)) sowie die mit $P_{tac-ptsN}$ (pBGG86) komplementierten Mutanten wurden in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden anschließend geerntet und es wurden β -Galaktosidase Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller Units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von unabhängigen Messungen.

Durch die Überproduktion ist die LacZ-Aktivität für beide *lacZ*-Fusionen im Vergleich zum Wildtyp reduziert (1084 versus 1445 und 663 gegenüber 1084 Miller units). Ist der σ^{70} -Promotor mutiert, so ist die Abhängigkeit von EIIA^{Ntr} stärker. Es wurde auch der Einfluss der mutanten *ptsN* Allele auf die *glmY* Expression untersucht. Der Wildtyp wurde mit den $P_{tac-ptsN}$, $P_{tac-ptsNH73A}$ und $P_{tac-ptsNH73E}$ Plasmiden transformiert und die *glmY-lacZ* Expression in diesen Transformanten gemessen (Abbildung 6.18).

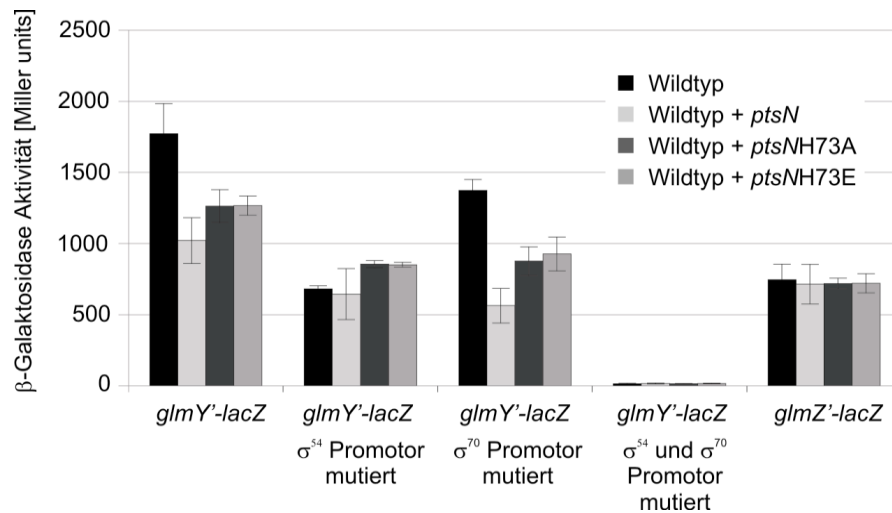


Abbildung 6.18: EIIA^{Ntr} reguliert die Aktivität des σ^{54} Promotors vor *glmY*. Die Derivate des Wildtyps mit chromosomalen *glmY'*-*lacZ*-Fusionen (*glmY'*-*lacZ* (Z283); *glmY'*-*lacZ* σ^{54} Promotor mutiert (Z284); *glmY'*-*lacZ* σ^{70} Promotor mutiert (Z285) und *glmY'*-*lacZ* σ^{54} und σ^{70} Promotor mutiert (Z286)) und chromosomaler *glmZ'*-*lacZ*-Fusion (Z360), sowie die Transformanten der Stämme mit *ptsN*-, *ptsN*-H73A und *ptsN*-H73E-Überexpressionsplasmiden (pBGG86; pBGG93 und pBGG334) wurden in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden in der exponentiellen oder späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Anschließend wurden β -Galaktosidase Messungen durchgeführt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller Units angegeben. Die Werte sind Durchschnittswerte von unabhängigen Messungen.

Die Überexpression aller *ptsN* Allele zeigt keinen Einfluss auf die *glmY'*-*lacZ*-Fusionen mit mutiertem σ^{54} Promotor und ohne intakte Promotoren. EIIA^{Ntr} wirkt sich nicht auf die Expression der *glmZ'*-*lacZ*-Fusion aus. Sind beide Promotoren, oder nur der σ^{54} Promotor aktiv, so ist die Expression der *glmY'*-*lacZ*-Fusionen durch die EIIA^{Ntr} Überproduktionen reduziert. Vergleicht man die Überexpression der verschiedenen Allele untereinander, so sind die Werte für alle drei *ptsN* Allele ähnlich.

6.4.3.1. GlmY und GlmZ wirken sich nicht auf die Proteinmenge an EIIA^{Ntr} aus

Um zu untersuchen, ob sich die kleinen RNAs GlmY und GlmZ auf die zellulären Mengen an EIIA^{Ntr} auswirken, wurden Stämme mit *ptsN*-3xFLAG-Fusionen im Chromosom und *glmY* bzw. *glmZ* Deletionen konstruiert. In diese Deletionsstämme wurden zusätzlich die Leervektoren oder *glmY* oder *glmZ* plasmidisch, unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors, eingebracht. Die Stämme und Transformanten wurden in LB-Medium angezogen, die Zellextrakte durch eine denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und EIIA^{Ntr}-3xFLAG in einem Western Blot detektiert (Abbildung 6.19).



Abbildung 6.19: EIIA^{Ntr} wird nicht durch die sRNAs GlmY und GlmZ reguliert. Der Wildtyp Stamm, die $\Delta glmZ::cat$ und $\Delta glmY::cat$ Mutanten mit chromosomalen *ptsN*-3xFLAG-Fusionen wurden zusammen mit den Transformanten der Deletionsstämme mit Leervektor, *glmZ* oder *glmY* in LB-Medium angezogen. Die Zellextrakte der Stämme und der Transformanten wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western Blot zur Detektion von EIIA^{Ntr} mit FLAG Antiserum durchgeführt.

In allen Zellextrakten konnte EIIA^{Ntr} detektiert werden. Es kann kein Unterschied zwischen dem Wildtyp, den Deletionsmutanten oder den komplementierten Deletionsmutanten festgestellt werden.

6.4.4. Proteinaufreinigungen

Um die direkte Interaktion zwischen EIIA^{Ntr} und PhoR zu beweisen und eine Beteiligung anderer Komponenten, die *in vivo* vorkommen, auszuschließen, wurden *in vitro* Interaktionsstudien (Far Western Blot) durchgeführt. Hierzu wurden PhoR, PhoB, EIIA^{Ntr}, EIIA^{Ntr}H73A und EIIA^{Glc} als aufgereinigte Proteine benötigt. Es wurden Plasmide konstruiert, die für die Überexpression und Aufreinigung von PhoR und PhoB geeignet sind. PhoR und PhoB wurden mit einem C-terminalen 10x His-Tag versehen. Die Plasmide mit den *phoR*-His- und *phoB*-His-Fusionen wurden in einen Stamm eingebracht, in dem das *phoBR*-Operon und das Gen für EIIA^{Ntr} deletiert war. LB-Kulturen der Transformanten wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Anschließend erfolgte die Induktion der Synthese der unterschiedlichen Fusionsproteine durch die Zugabe von IPTG. Nach einer weiteren Stunde Wachstum wurden die Zellen geerntet, mit der Digi-F-Press aufgeschlossen und die Proteine über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt. Die Ergebnisse der Aufreinigungen der His-getaggten Proteine sind in Abbildung 6.21 gezeigt.

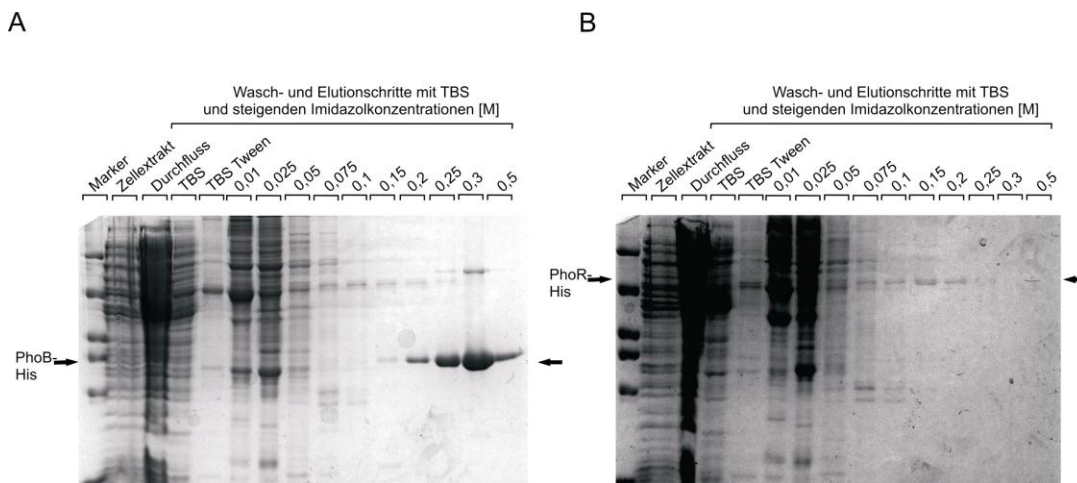


Abbildung 6.21: Aufreinigungen von PhoB-His und PhoR-His Fusionsproteinen. Die Transformanten des $\Delta phoBR/\Delta ptsN$ Stammes (Z666) mit *P_{tac}-phoB*-His (pDL39) und *P_{tac}-phoR*-His (pDL40) wurden in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden aufgeschlossen und die Proteine über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt. Dabei wurden die Säulen mit TBS, TBS mit 0,1% Tween und TBS mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen gewaschen und die Proteine schließlich eluiert. 10 μ l des Zellextrakts, des Durchflusses und der Wasch- und Elutionsfraktionen und der PAGE King Marker wurde auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und die Gele mit Coomassie blue gefärbt. (A) Aufreinigung von PhoB-His, (B) Aufreinigung von PhoR-His.

In den Elutionsfraktionen 0,15; 0,2 und 0,25 M Imidazol der PhoR-Aufreinigung befand sich das meiste Protein. Diese Elutionsfraktionen wurden vereinigt und im Dialysepuffer mit 25% Glycerin für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Genauso wurde mit den Elutionsfraktionen 0,25 und 0,3 M Imidazol der PhoB-Aufreinigung verfahren. Anschließend wurden die Proteinlösung mit Hilfe von Säulen aufkonzentriert und die Proteinkonzentrationen mit dem Bradford-Assay bestimmt. Aus dem gleichen Stamm wurden auch EIIA^{Ntr}, EIIA^{Ntr}H73A und EIIA^{Glc} aufgereinigt. Hierzu wurden Überexpressionsplasmide verwendet, die entweder für Strep-EIIA^{Glc}, Strep-EIIA^{Ntr} oder Strep-EIIA^{Ntr}H73A kodierten (pBGG230, pBGG217, pBGG217-H73A), wurden in den gleichen Stamm transformiert. Auch hier wurden LB-Kulturen angezogen und die Zellen nach einstündiger Induktion mit IPTG geerntet. Nach dem Aufschluss der Zellen erfolgte die Aufreinigung der Proteine über Streptaktin-Säulen. Die Elutionsfraktionen 1 und 2 jeder Aufreinigung wurden dialysiert und anschließend die erhaltene Proteinkonzentration gemessen. Die Aufreinigungen von Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr}H73A sind in Abbildung 6.22 gezeigt.

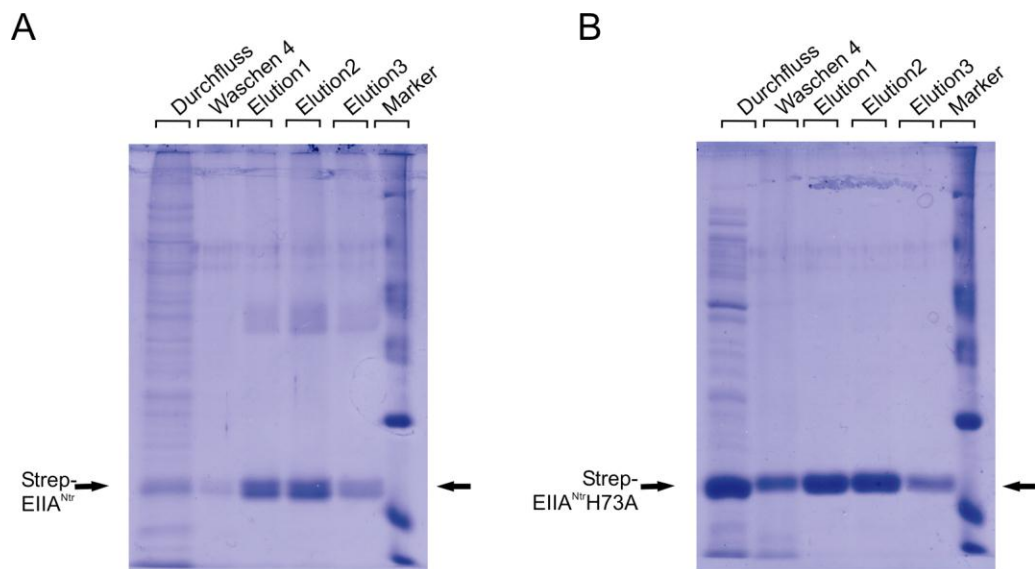


Abbildung 6.22: Aufreinigung von Strep-EIIA^{Ntr} und Strep-EIIA^{Ntr} H73A Fusionsproteinen. Die Transformanten des Δ phoBR/ Δ ptsN Stammes (Z666) mit P_{tac} -strep-ptsN (pBGG217) und P_{tac} -strep-ptsNH73A (pBGG217-H73A) wurden in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden aufgeschlossen und die Proteine über Streptaktin-Säulen aufgereinigt. Dabei wurden die Säulen mit Puffer W gewaschen und die Proteine schließlich mit Puffer E eluiert. 10 μ l des Durchflusses, des vierten Waschschruttes, der drei Elutionsfraktionen und der Unstained Protein Markers wurde auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und die Gele mit Coomassie blue gefärbt. (A) Aufreinigung von Strep-EIIA^{Ntr}, (B) Aufreinigung von Strep-EIIA^{Ntr}H73A.

Für die *in vitro* Interaktionsanalysen wurden EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A als His-Tag Proteine aus dem Δ phoBR/ Δ ptsN Stamm aufgereinigt. Dieser Stamm wurde benutzt, damit durch die Aufreinigung der Proteine die potentiellen Interaktionspartner nicht koaufgereinigt werden. Wie vorher gezeigt, bedarf es in einer EIIA^{Ntr} Aufreinigung keiner Quervernetzung um PhoR und auch PhoB koaufzureinigen. Um die Kontamination des aufgereinigten Proteins mit den jeweils anderen Proteinen zu vermeiden, wurde die Dreifachmutante verwendet. Die Aufreinigungen von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A sind in Abbildung 6.23 dargestellt. Die Fraktionen 0,15 und 0,2 M Imidazol beider Proteinaufreinigungen enthielten große

Mengen des aufgereinigten Proteins. Diese Fraktionen wurden dialysiert und die Proteinkonzentrationen bestimmt.

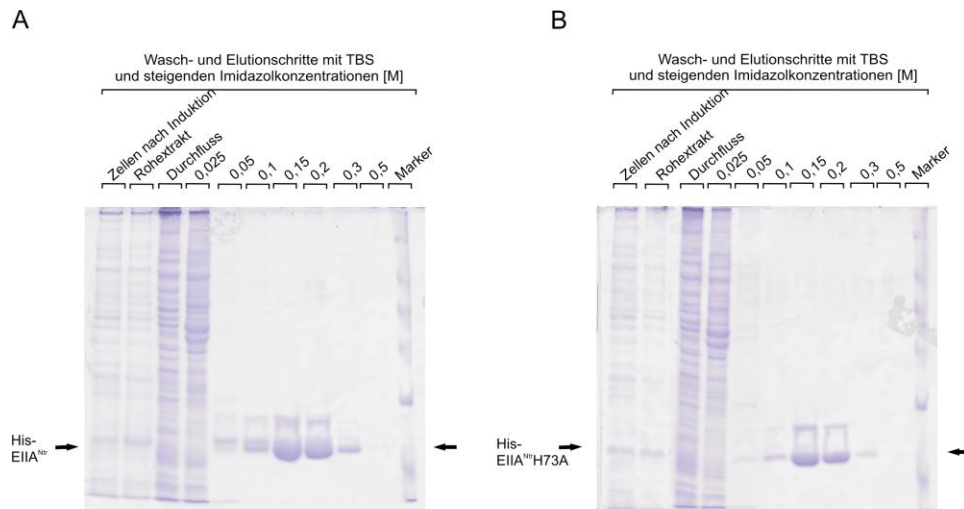


Abbildung 6.23: Aufreinigungen von EIIA^{Ntr} und EIIA^{Ntr}H73A Fusionsproteinen. Die Transformanten des $\Delta phoBR/\Delta ptsN$ Stammes (Z666) mit P_{tac} -His-*ptsN* (pBGG190) und P_{tac} -His-*ptsNH73A* (pBGG211) wurden in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden aufgeschlossen und die Proteine über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt. Dabei wurden die Säulen mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen gewaschen und die Proteine schließlich eluiert. 10 μ l der induzierten Kulturen, des Rohextrakts, des Durchflusses, der Wasch- und Elutionsfraktionen und der Unstained Protein Marker wurde durch eine 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit Coomassie blue gefärbt. (A) Aufreinigung von His-EIIA^{Ntr}, (B) Aufreinigung von His-EIIA^{Ntr}H73A.

Nach der Aufreinigung der Proteine wurden mit diesen Far Western-Analysen durchgeführt, um diese Interaktionen *in vitro* zu testen.

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern wurden Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr} Δ GAF aufgereinigt. Hierzu wurden Proben der Kultur vor der Induktion, nach der Induktion, der Durchfluss der Aufreinigung, die Waschschrirte und die Elutionen zusammen mit einem Größenstandard aufgetragen und die Proteine im SDS-Gel mit Coomassie angefärbt (Abbildung 6.24).

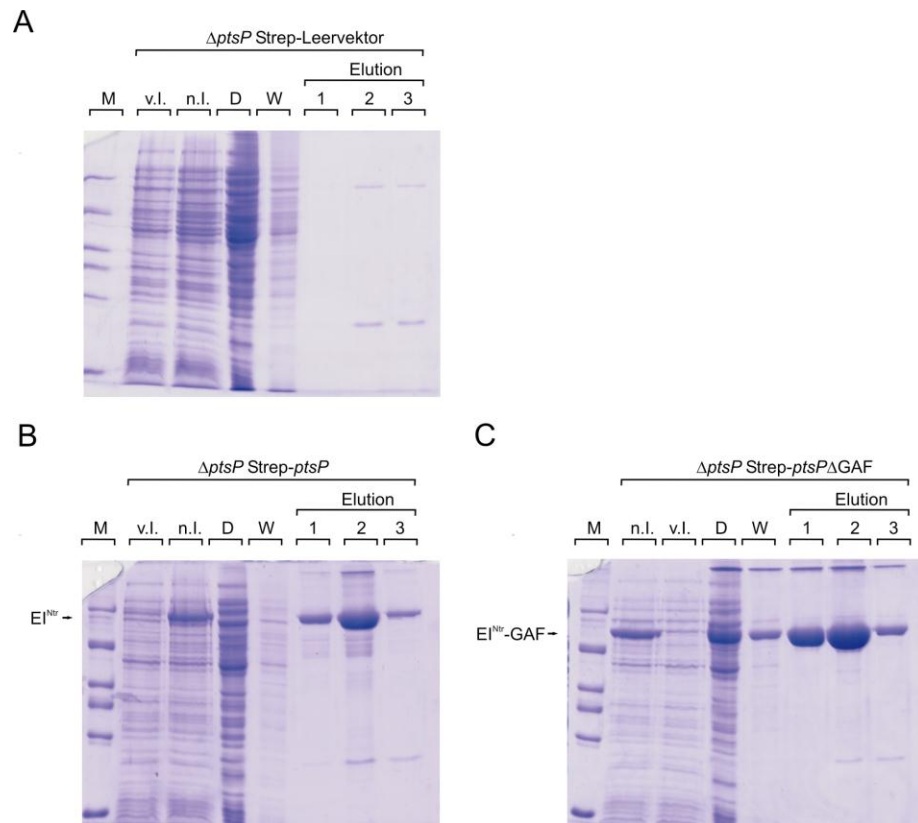


Abbildung 6.24: Aufreinigungen des Strep-Tags und der Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF Fusionsproteine. Die Transformanten des $\Delta ptsP$ Stammes (Z436) mit P_{tac} -Strep (pBGG237), P_{tac} -Strep- $ptsP$ (pBGG228) und P_{tac} -Strep- $ptsP\Delta GAF$ (pDL18) wurden in LB-Medium angezogen, die Zellen aufgeschlossen und die Proteine über Streptaktin-Säulen aufgereinigt. Dabei wurden die Säulen mit Puffer W gewaschen und die Proteine schließlich mit Puffer E eluiert. 13 μ l der uninduzierten und induzierten Kultur (v.l. und n.l.), 10 μ l des Durchflusses (D), der vereinigten Waschschrötte (W), der drei Elutionsfraktionen und des Page-King Markers (M) wurden auf einer 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit Coomassie gefärbt. (A) Aufreinigung des Strep-Tags (B) Aufreinigung von Strep-EI^{Ntr} (C) Aufreinigung von Strep-EI^{Ntr}ΔGAF.

Für den Strep-Tag allein konnten 2 Proteinbanden in dem SDS-Gel detektiert werden. Die untere Proteinbande taucht auch in den Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF Aufreinigungen auf. Die beiden Proteine (Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF) konnten in großen Mengen aufgereinigt werden.

Für die Identifikation von möglichen Liganden der GAF Domäne von EI^{Ntr} wurden Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF im BATCH Verfahren aufgereinigt. Hierzu wurden Proben der Kultur vor der Induktion, nach der Induktion, der Durchfluss der Aufreinigung, die Waschschrötte und die Elutionen zusammen mit einem Größenstandard aufgetragen und die Proteine im SDS-Gel mit Coomassie blue angefärbt. Die gefärbten SDS-Gele sind in Abbildung 6.25 dargestellt.

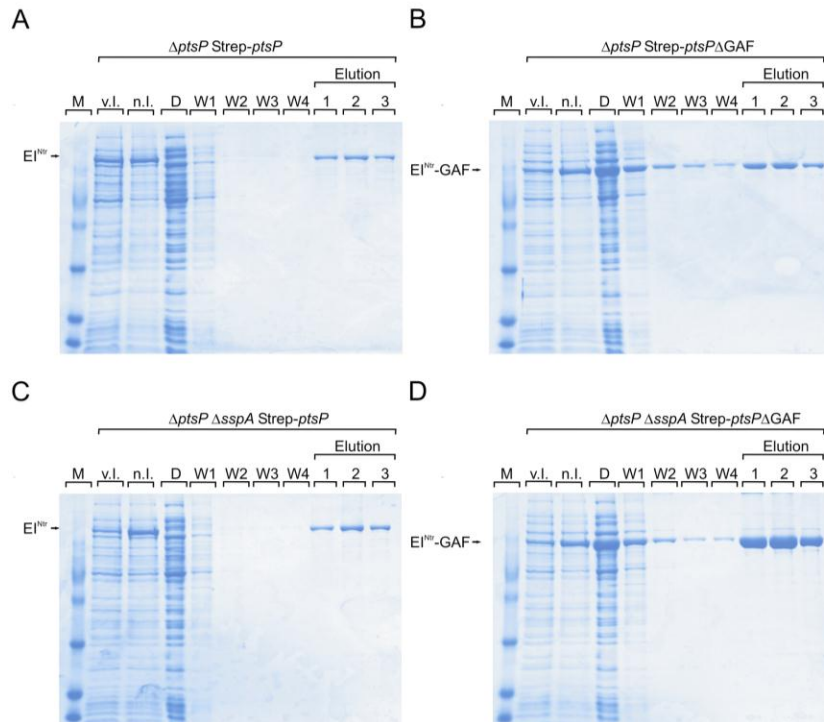


Abbildung 6.25: Aufreinigungen der Strep-EI^{Ntr} und Strep-EI^{Ntr}ΔGAF Fusionsproteine. Die Transformanten des *ΔptsP* (Z436) und des *ΔptsP ΔsspA* Stammes (Z565) mit *P_{tac}*-Strep-*ptsP* (pBG228) und *P_{tac}*-Strep-*ptsP*ΔGAF (pDL18) wurden in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden aufgeschlossen und die Proteine über Streptaktin-Beads aufgereinigt. Dabei wurden die Beads mit Puffer W gewaschen und die Proteine schließlich mit Puffer E eluiert. 13 μl der uninduzierten und induzierten Kultur (v.I. und n.I.), 10 μl des Durchflusses (D), der verschiedenen Waschschritte (W1-W4), der drei Elutionsfraktionen und des Markers (M) wurden auf einer 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit Coomassie gefärbt. (A) Aufreinigung von Strep-EI^{Ntr} aus *ΔptsP* (B) Aufreinigung von Strep-EI^{Ntr}ΔGAF aus *ΔptsP* (C) Aufreinigung von Strep-EI^{Ntr} aus *ΔptsP ΔsspA* (D) Aufreinigung von Strep-EI^{Ntr}ΔGAF aus *ΔptsP ΔsspA*.

Beide Proteine konnten in ausreichenden Mengen aus den verschiedenen Stämmen aufgereinigt werden und wurden für die folgenden massenspektrometrischen Untersuchungen eingesetzt.

6.4.5. Ligand-fishing Experimente mit EI^{Ntr} als Köderprotein zur Identifizierung unbekannter Interaktionspartner

Für die Ligand-fishing Experimente wurde das Protein von Interesse mit einem Affinitätstag (Strep-Tag) überproduziert. Anschließend wurde das Protein aufgereinigt (Durchführung Abschnitt 3.2.6.1.1.). Bei SPINE Experimenten wurde ähnlich verfahren. Allerdings wurde zu den Kulturen, in denen das Protein überproduziert wurde, Formaldehyd zugegeben. Durch Formaldehyd konnten benachbarte Proteine (Distanz bis etwa 2 Å) miteinander vernetzt werden. Anschließend wird das Protein mit Affinitätstag aufgereinigt (Durchführung Abschnitt 3.2.6.1.2.).

Für die Analysen wurde der *ΔptsN* Stamm mit einem Plasmid, welches Strep-*ptsN* unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors (*P_{tac}*) trägt, oder dem isogenen Leervektor transformiert. Von beiden Transformanten wurden Kulturen in LB-Medium angezogen. Nach dem Erreichen von einer OD₆₀₀ von

0,8 wurden die Zellen mit IPTG zur Expression des Strep-Fusionsproteins induziert. Nach einer Stunde Wachstum wurden die Zellen geerntet (Ligand-fishing Experiment). Eine weitere Kultur jeder Transformante wurde ebenfalls so behandelt. Vor dem Ernten der Zellen wurden die Kulturen allerdings mit 0,4% Formaldehyd versetzt. Unter Schütteln (90 rpm) wurden sie für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Auch diese Zellen wurden anschließend geerntet (SPINE Experiment). Die Zellen wurden mit der Digi-F-Press aufgeschlossen und die Proteine mittels Streptaktin Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Aufreinigungen wurden mittels denaturierender Gelelektrophorese überprüft (Abbildung 6.26).

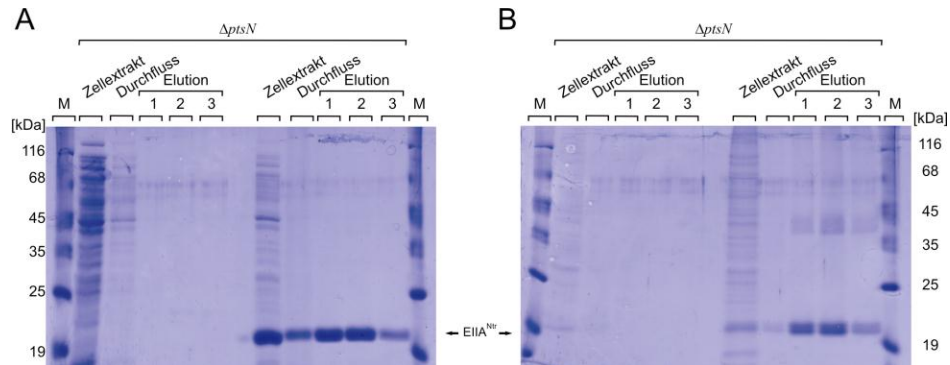


Abbildung 6.26: Aufreinigungen des Strep-Tags und des Strep-EIIA^{Ntr} Fusionsproteins. Die Transformanten des $\Delta ptsN$ Stammes (Z79) mit P_{tac} -Strep-*ptsN* (pBGG217) und der Leervektor (pBGG237) wurden in LB-Medium angezogen. (A) Die Zellen wurden nach einer Stunde Induktion der Proteinexpression geerntet, aufgeschlossen und die Proteine über Streptaktin-Säulen aufgereinigt. Dabei wurden die Säulen mit Puffer W gewaschen und die Proteine schließlich mit Puffer E eluiert. (B) Die Zellen wurden nach einer Stunde Induktion der Proteinexpression mit Formaldehyd versetzt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Proteine über Streptaktin-Säulen aufgereinigt. Dabei wurden die Säulen mit Puffer W gewaschen und die Proteine schließlich mit Puffer E eluiert. 10 μ l des Zellextrakts, des Durchflusses, der Elutionsfraktionen und des Markers (M) wurde auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und die Gele mit Coomassie gefärbt.

In den Elutionsfraktionen des Ligand-fishing und des SPINE-Experiments konnten großen Mengen von Strep-EIIA^{Ntr} aufgereinigt werden. Die Eluate beider Aufreinigungen konnten also auf mögliche Interaktionspartner untersucht werden. Hierzu wurden je 20 μ l der Elutionsfraktionen der Strep-EIIA^{Ntr} Aufreinigungen und der Kontrollaufreinigungen des Strep-Tags ohne fusioniertes Protein zusammen mit einem Größenstandard auf ein SDS-Gel geladen. Nach der Auftrennung der Proteine, wurden diese durch die Anfärbung mit Silbernitrat sichtbar gemacht (Abbildung 6.27).

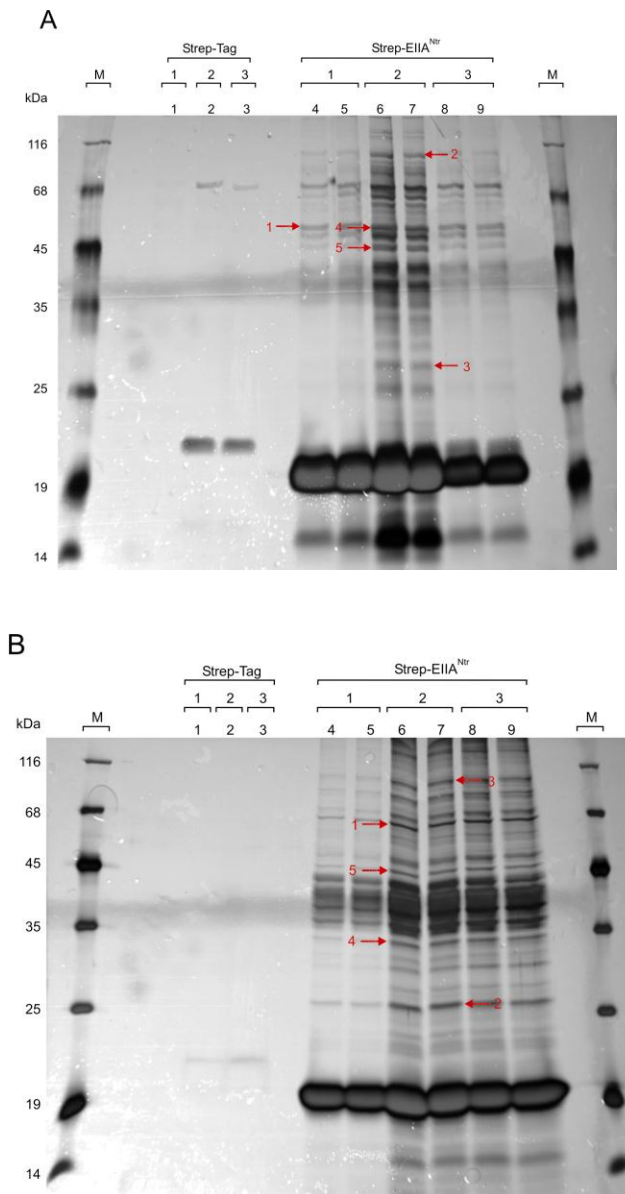


Abbildung 6.27: Analyse von möglichen Interaktionspartnern von EIIA^{Ntr} durch Koaufrreinigung und SPINE. Die drei Elutionsfraktionen der Aufreinigungen (Koaufrreinigung (A) und SPINE (B)) des Strep-Tags und von Strep-EIIA^{Ntr} wurden zusammen mit dem Unstained Protein Marker (M) auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen, die Proteine aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Es wurden jeweils fünf Proteinbanden pro Aufreinigung für die massenspektrometrische Analyse ausgewählt. Diese Proteine, die spezifisch für die EIIA^{Ntr} Aufreinigung sind, sind mit Pfeilen markiert.

In den Kontrollaufrreinigungen (Strep-Tag) konnten nur sehr wenige Proteine detektiert werden (jeweils Spuren 1-3 in Abbildung 6.27 A und B). In den Elutionsfraktionen von Strep-EIIA^{Ntr} konnten sowohl für das Ligand-fishing als auch für das SPINE-Experimente viele Proteine mit EIIA^{Ntr} koeluiert werden (Spuren 4-9 in Abbildung A und B). Es wurden fünf prominente Proteinbanden aus beiden EIIA^{Ntr}-Aufreinigungen ausgewählt und aus dem Gel ausgeschnitten (Banden sind mit Pfeilen markiert in Abbildung 6.27 A und B). Um diese Proteine zu identifizieren, wurden sie massenspektrometrisch untersucht. Dies wurde im Zentrum für Molekulare Medizin in Köln durchgeführt. Die identifizierten Proteine in jeder Probe sind in Tabelle 6.2 aufgeführt.

Tabelle 6.2: Identifikation von möglichen Interaktionspartnern von EIIA^{Ntr} durch Massenspektrometrie. Die aus den SDS-Gelen ausgeschnittenen Proteinbanden (jeweils 1-5) für die Ligand-fishing und die SPINE-Aufreinigung wurden massenspektrometrisch analysiert. Gezeigt sind die identifizierten Proteine und ihr Molekulargewicht. Sie sind nach dem Score der Identifizierung geordnet.

EIIA ^{Ntr} Ligand-fishing Experiment		
Probennummer	Identifiziertes Protein	Molekulargewicht (kDa)
1	Glukosamine-6-Phosphate Synthase (GlmS)	66,8
	Akonitase B (AcnB)	93,5
	Elongationsfaktor Tu (TufA/B)	43,3
	α -Ketoglutarat Dekarboxylase (SucA)	105,1
	Pyruvat Dehydrogenase UE E1 (AceE)	99,7
	Gyrase (GyrA)	97
	Glyzerin Kinase (GlpK)	56,2
2	Uridin Phosphorylase (Udp)	27,2
3	-	
4	Malat Dehydrogenase (Mdh)	32,3
5	Tryptophanase (TnaA)	52,8
	ATP Synthase UE β	50,3
EIIA ^{Ntr} SPINE Experiment		
Probennummer	Identifiziertes Protein	Molekulargewicht (kDa)
1	Glyzerin-3-Phosphat Dehydrogenase (GlpD)	56,8
2	Protein des Sec Sekretionssystems (SecA)	102
3	-	
4	ATP Synthase UE β	50,3
	Tryptophanase (TnaA)	52,8
	HslUV Protease UE U (HslU)	49,6
5	Elongationsfaktor Tu (TufA/B)	43,3
	HslUV Protease UE U (HslU)	49,6
	Acridin Efflux Komplex UE A (AcrA)	42,2
	Enzym II Trehalose	18,3
	Unbekanntes Protein (mögliche Pektinesterase) (YbfP)	
	Kdp Kaliumtransporter UE A (KdpA)	18,3
		59,2

In den Ligand-fishing Experimenten konnten verschiedenen Proteine als mögliche Interaktionspartner von EIIA^{Ntr} identifiziert werden. Hierzu gehören GlnS, die Glukosamine-6-Phosphate Synthase, verschiedene metabolische Enzyme, wie die Akonitase B, die α -Ketoglutarat Dekarboxylase, die Glycerin Kinase, die Malat Dehydrogenase, die Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase und eine Untereinheit der Pyruvat Dehydrogenase. Ebenfalls wurden die Uridin Phosphorylase, der Elongationsfaktor TU, ein Protein des Sec Sekretionssystems und eine Untereinheit des Kdp Kaliumtransporters identifiziert. Die Tryptophanase und die β -Untereinheit der ATP Synthase wurden in mehreren Proben identifiziert. Eine mögliche Interaktion mit diesen vielen Proteinen wurde in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

6.5. Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis

Tab. 6.3: Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	% (Volumenprozent)
% (w/v)	% (Gewicht/Volumen)
A	Alanin
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
[γ ³² P]-ATP	am γ -Phosphat markiertes Adenosintriphosphat
<i>attB</i>	Lambda Attachment site
c	zyklisch
D	Aspartat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>E. c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
EI	Enzym I

EII	Enzym II
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Glc	Glukose
H	Histidin
IPTG	Isopropyl-D-Thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani (LB-Medium)
MCS	Multiple cloning site
mRNA	messenger RNA
N	Stickstoff
Nr.	Mummer
Ntr	Stickstoff
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
<i>ori</i>	Origin of replication
<i>P</i>	Promotor
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
P	Phosphat
Pho	Phosphat
PRD	PTS regulatorische Domäne
PTS	Phosphotransferase System
PVMF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
<i>R.</i>	<i>Ralstonia</i>
RBS	Ribosomale Bindestelle
<i>R.e.</i>	<i>Ralstonia eutropha</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanz Unit
s.	siehe
SD	Shine Dalgano

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sRNA	small RNA
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	units
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
ZAP	Zellaufschlußpuffer
z. B.	Zum Beispiel

Tab. 6.4: Einheitenverzeichnis

A	Ampere
Å	Ånström
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	Molar (mol/l)
min	Minute
V	Volt

6.6. Verwendete Internetangebote und Computerprogramme

Tab. 6.5: Verwendete Internetangebote

URL	Anbieter	Anwendung
http://www.brenda-enzymes.org/	Department of Bioinformatik	Informationen über Enzyme

	Biochemie, Institut für Biochemie and Biotechnologie, Technische Universität Braunschweig	
http://www.ebi.ac.uk/ clustalw/	European Bioinformatics Institute	Erstellung von Alignments
http://www.microbes online.org/	Virtual Institute for Microbial Stress and Survival	Informationsdatenbank über unterschiedliche Prokaryonten
http://www.molecular cloning.com//	Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA	Verzeichnis über Molekularbiologische Anwendungen
http://www.ncbi. nlm.nih.gov/	National institutes of Health, Bethesda, USA	Literaturrecherche, Protein- und DNA- Sequenzen
http://www.ecocyc.org/		Genomdatenbank von <i>E. coli</i> , DNA Sequenzen und Geninformationen
http://www.uniprot.org/	UniProt Consortium	Blastanalysen, Informationen und Sequenzen von Proteinen

Tab. 6.6: Verwendete Computerprogramme

Programme	Hersteller	Anwendung
Corel Draw Graphics Suite	Corel Corporation	Erstellung von Grafiken
EndNote	Thomson Reuters	Literaturverwaltung
Microsoft Office 2007	Microsoft Inc.	Text- und Datenverarbeitung
ChromasLite	Chromas	Auswertung von DNA- Sequenzen
VectorNTI	Invitrogen	Konstruktion und Archivierung von Plasmiden und DNA-

		Sequenzen, sowie Klonierungsplanung
--	--	--

6.7. Materialien

6.7.1. Häufig verwendete Chemikalien

Tab 6.7: Häufig verwendete Chemikalien

Chemikalie	Firma
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ammoniumeisen(III)citrat	Sigma, München
Ammoniumpersulfat	Sigma, München
Antibiotika	Sigma, München
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue, R350	Amersham, Freiburg
D(+)-Glukose	Merck, Darmstadt
Dihydroxyacetonphosphat	Sigma, München
Dinitrophenylhydrazin	Sigma, München
DMSO	Sigma, München
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
DTT	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fruktose-1,6-Bisphosphat	Sigma, München
Glycerin	VWR, Pennsylvania (USA)
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$	Amersham, Freiburg
Hefeextrakt	Oxoid, Heidelberg
Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid	Peqlap, Erlangen AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Methylglyoxal	Sigma, München

Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Sigma, München Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumsuccinat	Fluka, Buchs, Schweiz
Ni ²⁺ -Agarose Superflow	Qiagen, Hilden
Nutrient Broth	Merck, Darmstadt
o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid	Sigma, München
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Ribose	Sigma, München
<i>Strep</i> -Tactin-Sepharose	Iba, Göttingen
TEMED	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypton	Oxoid, Heidelberg
Tween20	Sigma, München Merck, Darmstadt
X-Gal	Roth, Karlsruhe Fermentas, St. Leon-Rot

6.7.2. Im Labor verwendete Hilfsmittel

Tab. 6.8: Im Labor verwendete Hilfsmittel

Hilfsmittel	Firma
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson Drogheda, Irland
Eppendorfgefäße	Greiner, Nürtingen
Gene Amp Reaction Tubes (PCR)	Perkin Elmer, Weiterstadt
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Halbmikroküvetten aus Kunststoff	Greiner, Nürtingen
Kunststoffpetrischalen	Greiner, Nürtingen
Membranfilter NC 45 (0,2 µm Porengröße)	Schleicher und Schüll, Dassel
Mikroliterpipetten (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl)	Gilson, Düsseldorf Eppendorf, Darmstadt

Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen Eppendorf, Darmstadt Sarstedt, Nümbrecht Neptune, Sollentuna
Poly-Prep Chromatography Columns	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zentrifugenbecher	Beckmann, München

7. Literaturverzeichnis

- Diplomarbeit Björn Zimmer, (2007), Untersuchungen zur Funktion der im *rpoN*-Operon kodierten Proteine in *Escherichia coli*. Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen.
- Diplomarbeit Denise Lüttmann, (2008), Untersuchungen zur Funktion und Expression der kleinen RNA SraJ (GlmZ) in *Escherichia coli*. Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen.
- Diplomarbeit Katja Karstens, (2009), The regulatory phosphotransferase system (PTS) of *Ralstonia eutropha*. Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen.
- Altendorf, K.-H., Booth, I.R., Gralla, J., Greie, J.-C., Rosenthal, A.Z., Wood, J.M., (2009) Chapter 5.4.5., Osmotic Stress In A. Böck, R. Curtiss III, J. B. Kaper, P. D. Karp, F. C. Neidhardt, T. Nyström, J. M. Slauch, C. L. Squires, and D. Ussery (ed.), *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. www.ecosal.org ASM Press, Washington, DC.
- Wanner, B.L., Chapter 87., Phosphorus Assimilation and Control of the Phosphate Regulon. In A. Böck, R. Curtiss III, J. B. Kaper, P. D. Karp, F. C. Neidhardt, T. Nyström, J. M. Slauch, C. L. Squires, and D. Ussery (ed.), *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. www.ecosal.org ASM Press, Washington, DC.
- Abu-Qarn, M., Eichler, J., and Sharon, N. (2008) Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 544-550.
- Amaro, A.M., and Jerez, C.A. (1984) Methylation of ribosomal proteins in bacteria: evidence of conserved modification of the eubacterial 50S subunit. *J Bacteriol* **158**: 84-93.
- Amemura, M., Makino, K., Shinagawa, H., Kobayashi, A., and Nakata, A. (1985) Nucleotide sequence of the genes involved in phosphate transport and regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **184**: 241-250.
- Amemura, M., Makino, K., Shinagawa, H., and Nakata, A. (1990) Cross talk to the phosphate regulon of *Escherichia coli* by PhoM protein: PhoM is a histidine protein kinase and catalyzes phosphorylation of PhoB and PhoM-open reading frame 2. *J Bacteriol* **172**: 6300-6307.

- Anantharaman, V., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2001) Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *J Mol Biol* **307**: 1271-1292.
- Aravind, L., and Ponting, C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* **22**: 458-459.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**: 2006 0008.
- Bachmann, B.J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* **36**: 525-557.
- Baek, J.H., and Lee, S.Y. (2006) Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **264**: 104-109.
- Bahr, T., Lüttmann, D., März, W., Rak, B., and Görke, B. (2011) Insight into bacterial phosphotransferase system-mediated signaling by interspecies transplantation of a transcriptional regulator. *J Bacteriol* **193**: 2013-2026.
- Bardin, S.D., and Finan, T.M. (1998) Regulation of phosphate assimilation in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Genetics* **148**: 1689-1700.
- Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2007) The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol* **8**: R239.
- Begley, G.S., and Jacobson, G.R. (1994) Overexpression, phosphorylation, and growth effects of ORF162, a *Klebsiella pneumoniae* protein that is encoded by a gene linked to *rpoN*, the gene encoding sigma⁵⁴. *FEMS Microbiol Lett* **119**: 389-394.
- Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J.W., and Gilles, E.D. (2007) Correlation between growth rates, EIIA^{Crr} phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **189**: 6891-6900.
- Bi, W., and Stambrook, P.J. (1998) Site-directed mutagenesis by combined chain reaction. *Anal Biochem* **256**: 137-140.
- Bijlsma, J.J., and Groisman, E.A. (2005) The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **57**: 85-96.

- Boel, G., Mijakovic, I., Maze, A., Poncet, S., Taha, M.K., Larribe, M., Darbon, E., Khemiri, A., Galinier, A., and Deutscher, J. (2003) Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in Gram-negative bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**: 206-215.
- Bogdanov, M., Heacock, P., Guan, Z., and Dowhan, W. (2010) Plasticity of lipid-protein interactions in the function and topogenesis of the membrane protein lactose permease from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 15057-15062.
- Booth, I.R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev* **49**: 359-378.
- Bougdour, A., Cunning, C., Baptiste, P.J., Elliott, T., and Gottesman, S. (2008) Multiple pathways for regulation of sigma^S (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. *Mol Microbiol* **68**: 298-313.
- Bourret, R.B. (2010) Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Curr Opin Microbiol* **13**: 142-149.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brandon, L., Dorus, S., Epstein, W., Altendorf, K., and Jung, K. (2000) Modulation of KdpD phosphatase implicated in the physiological expression of the *kdp* ATPase of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **38**: 1086-1092.
- Brickman, E., and Beckwith, J. (1975) Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and *phi80* transducing phages. *J Mol Biol* **96**: 307-316.
- Buck, M., Gallegos, M.T., Studholme, D.J., Guo, Y., and Gralla, J.D. (2000) The bacterial enhancer-dependent sigma⁵⁴ (sigma^N) transcription factor. *J Bacteriol* **182**: 4129-4136.
- Buckles, E.L., Wang, X., Lockett, C.V., Johnson, D.E., and Donnenberg, M.S. (2006) PhoU enhances the ability of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract. *Microbiology* **152**: 153-160.
- Buelow, D.R., and Raivio, T.L. (2009) Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol* **75**: 547-566.

- Burgess, R.R., and Anthony, L. (2001) How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does. *Curr Opin Microbiol* **4**: 126-131.
- Cann, M.J. (2007) Sodium regulation of GAF domain function. *Biochem Soc Trans* **35**: 1032-1034.
- Caramel, A., and Schnetz, K. (1998) Lac and lambda repressors relieve silencing of the *Escherichia coli bgl* promoter. Activation by alteration of a repressing nucleoprotein complex. *J Mol Biol* **284**: 875-883.
- Carlyon, R.E., Ryther, J.L., VanYperen, R.D., and Griffiths, J.S. (2010) FeuN, a novel modulator of two-component signalling identified in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* **77**: 170-182.
- Carmany, D.O., Hollingsworth, K., and McCleary, W.R. (2003) Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *J Bacteriol* **185**: 1112-1115.
- Cases, I., Velazquez, F., and de Lorenzo, V. (2007) The ancestral role of the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system (PTS) as exposed by comparative genomics. *Res Microbiol* **158**: 666-670.
- Cayley, S., Lewis, B.A., Guttman, H.J., and Record, M.T., Jr. (1991) Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. Implications for protein-DNA interactions *in vivo*. *J Mol Biol* **222**: 281-300.
- Chao, J.D., Papavinasundaram, K.G., Zheng, X., Chavez-Steenbock, A., Wang, X., Lee, G.Q., and Av-Gay, Y. (2010) Convergence of Ser/Thr and two-component signaling to coordinate expression of the dormancy regulon in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **285**: 29239-29246.
- Choi, J., Shin, D., Yoon, H., Kim, J., Lee, C.R., Kim, M., Seok, Y.J., and Ryu, S. (2010) *Salmonella* pathogenicity island 2 expression negatively controlled by EIIA^{Ntr}-SsrB interaction is required for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20506-20511.
- Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L.W., Daniel, R.A., Errington, J., and Edwards, D.H. (2008) Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **68**: 1029-1046.
- Cozzone, A.J. (1998a) Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria. *Annu Rev Microbiol* **52**: 127-164.

- Cozzone, A.J. (1998b) Post-translational modification of proteins by reversible phosphorylation in prokaryotes. *Biochimie* **80**: 43-48.
- Danese, P.N., and Silhavy, T.J. (1998) CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol* **180**: 831-839.
- Dartois, V., Djavakhishvili, T., and Hoch, J.A. (1997) KapB is a lipoprotein required for KinB signal transduction and activation of the phosphorelay to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **26**: 1097-1108.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- De Wulf, P., Kwon, O., and Lin, E.C. (1999) The CpxRA signal transduction system of *Escherichia coli*: growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons. *J Bacteriol* **181**: 6772-6778.
- Deana, A., and Belasco, J.G. (2005) Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev* **19**: 2526-2533.
- Deutscher, J., Kessler, U., Alpert, C.A., and Hengstenberg, W. (1984) Bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: P-Ser-HPr and its possible regulatory function? *Biochemistry* **23**: 4455-4460.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939-1031.
- Deutscher, J. (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **11**: 87-93.
- Diederich, L., Rasmussen, L.J., and Messer, W. (1992) New cloning vectors for integration in the lambda attachment site *attB* of the *Escherichia coli* chromosome. *Plasmid* **28**: 14-24.
- Diniz, M.M., Goulart, C.L., Barbosa, L.C., Farache, J., Lery, L.M., Pacheco, A.B., Bisch, P.M., and von Kruger, W.M. (2011) Fine-tuning control of *phoBR* expression in *Vibrio cholerae* by binding of PhoB to multiple Pho boxes. *J Bacteriol*.
- Dong, T., and Schellhorn, H.E. (2009) Control of RpoS in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media. *Mol Genet Genomics* **281**: 19-33.

- Doucette, C.D., Schwab, D.J., Wingreen, N.S., and Rabinowitz, J.D. (2011) alpha-ketoglutarate coordinates carbon and nitrogen utilization via enzyme I inhibition. *Nat Chem Biol*.
- Doucleff, M., Pelton, J.G., Lee, P.S., Nixon, B.T., and Wemmer, D.E. (2007) Structural basis of DNA recognition by the alternative sigma-factor, sigma⁵⁴. *J Mol Biol* **369**: 1070-1078.
- Dowhan, W. (2009) Molecular genetic approaches to defining lipid function. *J Lipid Res* **50 Suppl**: S305-310.
- Eguchi, Y., Ishii, E., Hata, K., and Utsumi, R. (2011) Regulation of acid resistance by connectors of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **193**: 1222-1228.
- Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J., and Müller, G.A. (1993) Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal Biochem* **210**: 235-244.
- Epstein, W., and Kim, B.S. (1971) Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **108**: 639-644.
- Epstein, W. (2003) The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **75**: 293-320.
- Feng, X., Oropeza, R., and Kenney, L.J. (2003) Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **48**: 1131-1143.
- Fujita, Y. (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 245-259.
- Gabor, E., Gohler, A.K., Kosfeld, A., Staab, A., Kremling, A., and Jahreis, K. (2011) The phosphoenolpyruvate-dependent glucose-phosphotransferase system from *Escherichia coli* K-12 as the center of a network regulating carbohydrate flux in the cell. *Eur J Cell Biol* **90**: 711-720.
- Gardner, A.M., Gessner, C.R., and Gardner, P.R. (2003) Regulation of the nitric oxide reduction operon (*norRVW*) in *Escherichia coli*. Role of NorR and sigma⁵⁴ in the nitric oxide stress response. *J Biol Chem* **278**: 10081-10086.
- Geissmann, T., Marzi, S., and Romby, P. (2009) The role of mRNA structure in translational control in bacteria. *RNA Biol* **6**: 153-160.

- Gerken, H., Charlson, E.S., Cicirelli, E.M., Kenney, L.J., and Misra, R. (2009) MzrA: a novel modulator of the EnvZ/OmpR two-component regulon. *Mol Microbiol* **72**: 1408-1422.
- Göpel, Y., Lüttmann, D., Heroven, A.K., Reichenbach, B., Dersch, P., and Görke, B. (2011) Common and divergent features in transcriptional control of the homologous small RNAs GlmY and GlmZ in *Enterobacteriaceae*. *Nucleic Acids Res* **39**: 1294-1309.
- Görke, B., and Rak, B. (1999) Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *Embo J* **18**: 3370-3379.
- Görke, B. (2003) Regulation of the *Escherichia coli* antiterminator protein BglG by phosphorylation at multiple sites and evidence for transfer of phosphoryl groups between monomers. *J Biol Chem* **278**: 46219-46229.
- Görke, B., and Stülke, J. (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**: 613-624.
- Gottesman, S. (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol* **58**: 303-328.
- Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-466.
- Gutknecht, R., Beutler, R., Garcia-Alles, L.F., Baumann, U., and Erni, B. (2001) The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor. *Embo J* **20**: 2480-2486.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-4130.
- Hamann, K., Zimmann, P., and Altendorf, K. (2008) Reduction of turgor is not the stimulus for the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 2360-2367.
- Hames, C., Halbedel, S., Schilling, O., and Stülke, J. (2005) Multiple-mutation reaction: a method for simultaneous introduction of multiple mutations into the *glpK* gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4097-4100.

- Hansen, A.M., Lehnerr, H., Wang, X., Mobley, V., and Jin, D.J. (2003) *Escherichia coli* SspA is a transcription activator for bacteriophage P1 late genes. *Mol Microbiol* **48**: 1621-1631.
- Hansen, A.M., Qiu, Y., Yeh, N., Blattner, F.R., Durfee, T., and Jin, D.J. (2005) SspA is required for acid resistance in stationary phase by downregulation of H-NS in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **56**: 719-734.
- Harris, R.M., Webb, D.C., Howitt, S.M., and Cox, G.B. (2001) Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 5008-5014.
- Hayden, J.D., and Ades, S.E. (2008) The extracytoplasmic stress factor, sigma^E, is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS One* **3**: e1573.
- Heermann, R., Altendorf, K., and Jung, K. (2003) The N-terminal input domain of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* stabilizes the interaction between the cognate response regulator KdpE and the corresponding DNA-binding site. *J Biol Chem* **278**: 51277-51284.
- Heermann, R., Weber, A., Mayer, B., Ott, M., Hauser, E., Gabriel, G., Pirch, T., and Jung, K. (2009) The universal stress protein UspC scaffolds the KdpD/KdpE signaling cascade of *Escherichia coli* under salt stress. *J Mol Biol* **386**: 134-148.
- Heermann, R., and Jung, K. (2010) The complexity of the 'simple' two-component system KdpD/KdpE in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **304**: 97-106.
- Hengge, R. (2009) Proteolysis of sigma^S (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **160**: 667-676.
- Herzberg, C., Weidinger, L.A., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J., and Commichau, F.M. (2007) SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics* **7**: 4032-4035.
- Hoch, J.A., and Varughese, K.I. (2001) Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *J Bacteriol* **183**: 4941-4949.
- Hogema, B.M., Arents, J.C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H., and Postma, P.W. (1998) Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIA^{Glc}. *Mol Microbiol* **30**: 487-498.
- Hsieh, Y.J., and Wanner, B.L. (2010) Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Curr Opin Microbiol* **13**: 198-203.

- Hunke, S., Keller, R., and Muller, V.S. (2011) Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiol Lett* **326**: 12-22.
- Ishihama, A., and Saitoh, T. (1979) Subunits of RNA polymerase in function and structure. IX. Regulation of RNA polymerase activity by stringent starvation protein (SSP). *J Mol Biol* **129**: 517-530.
- Ishihama, A. (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* **54**: 499-518.
- Ishizuka, H., Hanamura, A., Kunimura, T., and Aiba, H. (1993) A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **10**: 341-350.
- Jackson, R.J., Binet, M.R., Lee, L.J., Ma, R., Graham, A.I., McLeod, C.W., and Poole, R.K. (2008) Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels. *FEMS Microbiol Lett* **289**: 219-224.
- Jenal, U., and Galperin, M.Y. (2009) Single domain response regulators: molecular switches with emerging roles in cell organization and dynamics. *Curr Opin Microbiol* **12**: 152-160.
- Jenkins, L.S., and Nunn, W.D. (1987) Regulation of the *ato* operon by the *atoC* gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 2096-2102.
- Jin, S., Ishimoto, K., and Lory, S. (1994) Nucleotide sequence of the *rpoN* gene and characterization of two downstream open reading frames in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**: 1316-1322.
- Joanny, G., Le Derout, J., Brechemier-Baey, D., Labas, V., Vinh, J., Regnier, P., and Hajnsdorf, E. (2007) Polyadenylation of a functional mRNA controls gene expression in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **35**: 2494-2502.
- Jung, K., and Altendorf, K. (1998a) Truncation of amino acids 12-128 causes deregulation of the phosphatase activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **273**: 17406-17410.
- Jung, K., and Altendorf, K. (1998b) Individual substitutions of clustered arginine residues of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* modulate the ratio of kinase to phosphatase activity. *J Biol Chem* **273**: 26415-26420.

- Jung, K., Heermann, R., Meyer, M., and Altendorf, K. (1998) Effect of cysteine replacements on the properties of the turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1372**: 311-322.
- Kalamorz, F., Reichenbach, B., März, W., Rak, B., and Görke, B. (2007) Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlnS expression depends on the small RNA GlnZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **65**: 1518-1533.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5752-5756.
- Kashyap, D.R., Wang, M., Liu, L.H., Boons, G.J., Gupta, D., and Dziarski, R. (2011) Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems. *Nat Med* **17**: 676-683.
- Kato, A., Tanabe, H., and Utsumi, R. (1999) Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg²⁺-responsive promoters. *J Bacteriol* **181**: 5516-5520.
- Kato, A., and Groisman, E.A. (2004) Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev* **18**: 2302-2313.
- Kim, H.J., Lee, C.R., Kim, M., Peterkofsky, A., and Seok, Y.J. (2011) Dephosphorylated NPR of the nitrogen PTS regulates lipid A biosynthesis by direct interaction with LpxD. *Biochem Biophys Res Commun* **409**: 556-561.
- King, N.D., and O'Brian, M.R. (2001) Evidence for direct interaction between enzyme I^{Ntr} and aspartokinase to regulate bacterial oligopeptide transport. *J Biol Chem* **276**: 21311-21316.
- Kleefeld, A., Ackermann, B., Bauer, J., Kramer, J., and Uden, G. (2009) The fumarate/succinate antiporter DcuB of *Escherichia coli* is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression. *J Biol Chem* **284**: 265-275.
- Kohara, Y., Akiyama, K., and Isono, K. (1987) The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell* **50**: 495-508.

- Koo, B.M., Yoon, M.J., Lee, C.R., Nam, T.W., Choe, Y.J., Jaffe, H., Peterkofsky, A., and Seok, Y.J. (2004) A novel fermentation/respiration switch protein regulated by enzyme IIA^{Glc} in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 31613-31621.
- Kundig, W., Ghosh, S., and Roseman, S. (1964) Phosphate Bound to Histidine in a Protein as an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System. *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**: 1067-1074.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamarche, M.G., Wanner, B.L., Crepin, S., and Harel, J. (2008) The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 461-473.
- Landmann, J.J., Busse, R.A., Latz, J.H., Singh, K.D., Stülke, J., and Görke, B. (2011a) Crh, the paralogue of the phosphocarrier protein HPr, controls the methylglyoxal bypass of glycolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **82**: 770-787.
- Landmann, J.J., Werner, S., Hillen, W., Stülke, J., and Görke, B. (2011b) Carbon source control of the phosphorylation state of the *Bacillus subtilis* carbon-flux regulator Crh *in vivo*. *FEMS Microbiol Lett.*
- LaPorte, D.C., and Chung, T. (1985) A single gene codes for the kinase and phosphatase which regulate isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* **260**: 15291-15297.
- Laub, M.T., and Goulian, M. (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* **41**: 121-145.
- Leblanc, S.K., Oates, C.W., and Raivio, T.L. (2011) Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **193**: 3367-3375.
- Lederberg, E.M., and Cohen, S.N. (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **119**: 1072-1074.
- Lee, C.R., Koo, B.M., Cho, S.H., Kim, Y.J., Yoon, M.J., Peterkofsky, A., and Seok, Y.J. (2005) Requirement of the dephospho-form of enzyme IIA^{Ntr} for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression. *Mol Microbiol* **58**: 334-344.

- Lee, C.R., Cho, S.H., Yoon, M.J., Peterkofsky, A., and Seok, Y.J. (2007) *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr} regulates the K⁺ transporter TrkA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 4124-4129.
- Lee, C.R., Cho, S.H., Kim, H.J., Kim, M., Peterkofsky, A., and Seok, Y.J. (2010) Potassium mediates *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr}-dependent regulation of sigma factor selectivity. *Mol Microbiol* **78**: 1468-1483.
- Lengeler, J.W., Jahreis, K., and Wehmeier, U.F. (1994) Enzymes II of the phospho enol pyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport. *Biochim Biophys Acta* **1188**: 1-28.
- Lengeler, J.W., and Jahreis, K. (2009) Bacterial PEP-dependent carbohydrate: phosphotransferase systems couple sensing and global control mechanisms. *Contrib Microbiol* **16**: 65-87.
- Levy, S., Zeng, G.Q., and Danchin, A. (1990) Cyclic AMP synthesis in *Escherichia coli* strains bearing known deletions in the *pts* phosphotransferase operon. *Gene* **86**: 27-33.
- Lindner, C., Hecker, M., Le Coq, D., and Deutscher, J. (2002) *Bacillus subtilis* mutant LicT antiterminators exhibiting enzyme I- and HPr-independent antitermination affect catabolite repression of the *bglPH* operon. *J Bacteriol* **184**: 4819-4828.
- Little, R., and Dixon, R. (2003) The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. *J Biol Chem* **278**: 28711-28718.
- Lüttmann, D., Heermann, R., Zimmer, B., Hillmann, A., Rampp, I.S., Jung, K., and Görke, B. (2009) Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA^{Ntr} in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **72**: 978-994.
- Lux, R., Jahreis, K., Bettenbrock, K., Parkinson, J.S., and Lengeler, J.W. (1995) Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11583-11587.
- Magasanik, B. (1993) The regulation of nitrogen utilization in enteric bacteria. *J Cell Biochem* **51**: 34-40.
- Martinez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P., and Dixon, R. (2005) Nitrogen fixation: key genetic regulatory mechanisms. *Biochem Soc Trans* **33**: 152-156.

- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T., and Epstein, W. (1994) Interdependence of K^+ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 1911-1917.
- Meadow, N.D., Fox, D.K., and Roseman, S. (1990) The bacterial phosphoenolpyruvate: glycolate phosphotransferase system. *Annu Rev Biochem* **59**: 497-542.
- Merrick, M.J., and Coppard, J.R. (1989) Mutations in genes downstream of the *rpoN* gene (encoding sigma 54) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from sigma 54-dependent promoters. *Mol Microbiol* **3**: 1765-1775.
- Merrick, M.J., and Edwards, R.A. (1995) Nitrogen control in bacteria. *Microbiol Rev* **59**: 604-622.
- Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. In *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Minagawa, S., Ogasawara, H., Kato, A., Yamamoto, K., Eguchi, Y., Oshima, T., Mori, H., Ishihama, A., and Utsumi, R. (2003) Identification and molecular characterization of the Mg^{2+} stimulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 3696-3702.
- Moon, K., and Gottesman, S. (2009) A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Mol Microbiol* **74**: 1314-1330.
- Nagarajavel, V., Madhusudan, S., Dole, S., Rahmouni, A.R., and Schnetz, K. (2007) Repression by binding of H-NS within the transcription unit. *J Biol Chem* **282**: 23622-23630.
- Nakashima, K., Sugiura, A., Kanamaru, K., and Mizuno, T. (1993) Signal transduction between the two regulatory components involved in the regulation of the *kdpABC* operon in *Escherichia coli*: phosphorylation-dependent functioning of the positive regulator, KdpE. *Mol Microbiol* **7**: 109-116.
- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., and Smith, D.F. (1974) Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* **119**: 736-747.
- Nelson, D.L., and Kennedy, E.P. (1971) Magnesium transport in *Escherichia coli*. Inhibition by cobaltous ion. *J Biol Chem* **246**: 3042-3049.
- Ninfa, A.J. (2007) Regulation of carbon and nitrogen metabolism: adding regulation of ion channels and another second messenger to the mix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 4243-4244.

- Otto, K., and Silhavy, T.J. (2002) Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2287-2292.
- Paget, M.S., and Helmann, J.D. (2003) The sigma⁷⁰ family of sigma factors. *Genome Biol* **4**: 203.
- Park, Y.H., Lee, B.R., Seok, Y.J., and Peterkofsky, A. (2006) *In vitro* reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**: 6448-6454.
- Parkinson, J.S., and Kofoed, E.C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* **26**: 71-112.
- Parkinson, J.S. (2010) Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases. *Annu Rev Microbiol* **64**: 101-122.
- Pereira, S.F., Goss, L., and Dworkin, J. (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 192-212.
- Pflüger-Grau, K., and Görke, B. (2010) Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends Microbiol* **18**: 205-214.
- Pflüger, K., and de Lorenzo, V. (2008) Evidence of *in vivo* cross talk between the nitrogen-related and fructose-related branches of the carbohydrate phosphotransferase system of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **190**: 3374-3380.
- Pflüger, K., and de Lorenzo, V. (2007) Growth-dependent phosphorylation of the PtsN (EII^{Ntr}) protein of *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem* **282**: 18206-18211.
- Pflüger, K., di Bartolo, I., Velazquez, F., and de Lorenzo, V. (2007) Non-disruptive release of *Pseudomonas putida* proteins by *in situ* electric breakdown of intact cells. *J Microbiol Methods* **71**: 179-185.
- Plumbridge, J., and Vimr, E. (1999) Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 47-54.
- Pohlmann, A., Fricke, W.F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Potter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voss, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., and Bowien, B. (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol* **24**: 1257-1262.

- Pompeo, F., Luciano, J., and Galinier, A. (2007) Interaction of GapA with HPr and its homologue, Crh: Novel levels of regulation of a key step of glycolysis in *Bacillus subtilis*? *J Bacteriol* **189**: 1154-1157.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543-594.
- Powell, B.S., Court, D.L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M.H., Jr., and Reizer, J. (1995) Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIA^{Ntr} affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an *era*^{ts} mutant. *J Biol Chem* **270**: 4822-4839.
- Puppe, W., Zimmann, P., Jung, K., Lucassen, M., and Altendorf, K. (1996) Characterization of truncated forms of the KdpD protein, the sensor kinase of the K⁺-translocating Kdp system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**: 25027-25034.
- Rabus, R., Reizer, J., Paulsen, I., and Saier, M.H., Jr. (1999) Enzyme I^{Ntr} from *Escherichia coli*. A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr. *J Biol Chem* **274**: 26185-26191.
- Raivio, T.L., and Silhavy, T.J. (1997) Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *J Bacteriol* **179**: 7724-7733.
- Raivio, T.L., Laird, M.W., Joly, J.C., and Silhavy, T.J. (2000) Tethering of CpxP to the inner membrane prevents spheroplast induction of the *cpx* envelope stress response. *Mol Microbiol* **37**: 1186-1197.
- Reaves, M.L., and Rabinowitz, J.D. (2011) Characteristic phenotypes associated with *ptsN*-null mutants in *Escherichia coli* K-12 are absent in strains with functional *ilvG*. *J Bacteriol* **193**: 4576-4581.
- Reichenbach, B., Maes, A., Kalamorz, F., Hajnsdorf, E., and Görke, B. (2008) The small RNA GlmY acts upstream of the sRNA GlmZ in the activation of *glmS* expression and is subject to regulation by polyadenylation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **36**: 2570-2580.

- Reizer, J., and Reizer, A. (1996) A voyage along the bases: novel phosphotransferase genes revealed by *in silico* analyses of the *Escherichia coli* genome. *Res Microbiol* **147**: 458-471.
- Reizer, J., Reizer, A., Merrick, M.J., Plunkett, G., 3rd, Rose, D.J., and Saier, M.H., Jr. (1996) Novel phosphotransferase-encoding genes revealed by analysis of the *Escherichia coli* genome: a chimeric gene encoding an Enzyme I homologue that possesses a putative sensory transduction domain. *Gene* **181**: 103-108.
- Roseman, S., and Meadow, N.D. (1990) Signal transduction by the bacterial phosphotransferase system. Diauxie and the *crr* gene (J. Monod revisited). *J Biol Chem* **265**: 2993-2996.
- Saier, M.H., Jr., Novotny, M.J., Comeau-Fuhrman, D., Osumi, T., and Desai, J.D. (1983) Cooperative binding of the sugar substrates and allosteric regulatory protein (enzyme III^{Glc} of the phosphotransferase system) to the lactose and melibiose permeases in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **155**: 1351-1357.
- Saiki, R.K., Walsh, P.S., Levenson, C.H., and Erlich, H.A. (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6230-6234.
- Salis, H., Tamsir, A., and Voigt, C. (2009) Engineering bacterial signals and sensors. *Contrib Microbiol* **16**: 194-225.
- Schnetz, K., Stülke, J., Gertz, S., Krüger, S., Krieg, M., Hecker, M., and Rak, B. (1996) LicT, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator protein of the BglG family. *J Bacteriol* **178**: 1971-1979.
- Segura, D., and Espin, G. (1998) Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly-beta-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **180**: 4790-4798.
- Seok, Y.J., Koo, B.M., Sondej, M., and Peterkofsky, A. (2001) Regulation of *E. coli* glycogen phosphorylase activity by HPr. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 385-393.
- Seshasayee, A.S., Bertone, P., Fraser, G.M., and Luscombe, N.M. (2006) Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. *Curr Opin Microbiol* **9**: 511-519.

- Sharp, J.S., and Bechhofer, D.H. (2005) Effect of 5'-proximal elements on decay of a model mRNA in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **57**: 484-495.
- Silva-Rocha, R., and de Lorenzo, V. (2010) Noise and robustness in prokaryotic regulatory networks. *Annu Rev Microbiol* **64**: 257-275.
- Smirnova, I., Kasho, V., Choe, J.Y., Altenbach, C., Hubbell, W.L., and Kaback, H.R. (2007) Sugar binding induces an outward facing conformation of LacY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 16504-16509.
- Steyn, A.J., Joseph, J., and Bloom, B.R. (2003) Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lpr family. *Mol Microbiol* **47**: 1075-1089.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Stülke, J., Arnaud, M., Rapoport, G., and Martin-Verstraete, I. (1998) PRD - a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol Microbiol* **28**: 865-874.
- Sugiura, A., Hirokawa, K., Nakashima, K., and Mizuno, T. (1994) Signal-sensing mechanisms of the putative osmosensor KdpD in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **14**: 929-938.
- Sutrina, S.L., Alleyne, L., Hoyte, K., and Blenman, M. (2002) Effect of replacing the general energy-coupling proteins of the PEP:sugar phosphotransferase system of *Salmonella typhimurium* with their fructose-inducible counterparts on utilization of the PTS sugar glucitol. *Microbiology* **148**: 3857-3864.
- Suziedeliene, E., Suziedelis, K., Garbenciute, V., and Normark, S. (1999) The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon. *J Bacteriol* **181**: 2084-2093.
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 479-506.
- Tetsch, L., Koller, C., Haneburger, I., and Jung, K. (2008) The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Mol Microbiol* **67**: 570-583.
- Tian, Z.X., Li, Q.S., Buck, M., Kolb, A., and Wang, Y.P. (2001) The CRP-cAMP complex and downregulation of the *glnAp2* promoter provides a novel

- regulatory linkage between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**: 911-924.
- Tomassen, J., and Lugtenberg, B. (1982) PHO-regulon of *Escherichia coli* K12: a minireview. *Ann Microbiol (Paris)* **133**: 243-249.
- Toro-Roman, A., Wu, T., and Stock, A.M. (2005) A common dimerization interface in bacterial response regulators KdpE and TorR. *Protein Sci* **14**: 3077-3088.
- Torriani, A. (1990) From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Bioessays* **12**: 371-376.
- Tucker, N.P., D'Autreaux, B., Spiro, S., and Dixon, R. (2006) Mechanism of transcriptional regulation by the *Escherichia coli* nitric oxide sensor NorR. *Biochem Soc Trans* **34**: 191-194.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., and Bossi, L. (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15264-15269.
- van Bogelen, R.A., Olson, E.R., Wanner, B.L., and Neidhardt, F.C. (1996) Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 4344-4366.
- van Heeswijk, W.C., Hoving, S., Molenaar, D., Stegeman, B., Kahn, D., and Westerhoff, H.V. (1996) An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**: 133-146.
- van Montfort, R.L., and Dijkstra, B.W. (1998) The functional importance of structural differences between the mannitol-specific IIA^{mannitol} and the regulatory IIA^{nitrogen}. *Protein Sci* **7**: 2210-2216.
- VanBogelen, R.A., Olson, E.R., Wanner, B.L., and Neidhardt, F.C. (1996) Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 4344-4366.
- Venkatesh, G.R., Kembou Koungni, F.C., Paukner, A., Stratmann, T., Blissenbach, B., and Schnetz, K. (2010) BglJ-RcsB heterodimers relieve repression of the *Escherichia coli* *bgl* operon by H-NS. *J Bacteriol* **192**: 6456-6464.
- Vogt, S.L., and Raivio, T.L. (2011) Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiol Lett* **326**: 2-11.
- Wang, G., Peterkofsky, A., Keifer, P.A., and Li, X. (2005) NMR characterization of the *Escherichia coli* nitrogen regulatory protein IIA^{Ntr} in solution and interaction with its partner protein, NPr. *Protein Sci* **14**: 1082-1090.

- Wang, Z., Choudhary, A., Ledvina, P.S., and Quioco, F.A. (1994) Fine tuning the specificity of the periplasmic phosphate transport receptor. Site-directed mutagenesis, ligand binding, and crystallographic studies. *J Biol Chem* **269**: 25091-25094.
- Wanner, B.L., and Chang, B.D. (1987) The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **169**: 5569-5574.
- Wanner, B.L. (1992) Genes for phosphonate biodegradation in *Escherichia coli*. *SAAS Bull Biochem Biotechnol* **5**: 1-6.
- Warner, J.B., and Lolkema, J.S. (2003) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 475-490.
- Williams, M.D., Ouyang, T.X., and 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.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478.
- Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R., and Ishihama, A. (2005) Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 1448-1456.
- Ye, J.J., Reizer, J., Cui, X., and Saier, M.H., Jr. (1994) ATP-dependent phosphorylation of serine-46 in the phosphocarrier protein HPr regulates lactose/H⁺ symport in *Lactobacillus brevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3102-3106.
- Zhang, W., Campbell, H.A., King, S.C., and Dowhan, W. (2005) Phospholipids as determinants of membrane protein topology. Phosphatidylethanolamine is required for the proper topological organization of the gamma-aminobutyric acid permease (GabP) of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 26032-26038.
- Zhang, Y.M., and Rock, C.O. (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**: 222-233.

- Zimmann, P., Steinbrügge, A., Schniederberend, M., Jung, K., and Altendorf, K. (2007) The extension of the fourth transmembrane helix of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* is involved in sensing. *J Bacteriol* **189**: 7326-7334.
- Zimmer, B., Hillmann, A., and Görke, B. (2008) Requirements for the phosphorylation of the *Escherichia coli* EIIA^{Ntr} protein *in vivo*. *FEMS Microbiol Lett* **286**: 96-102.

Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name Denise Lüttmann
Geburtsdatum, -ort 28.11.1982 in Neu Kaliß
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1989 – 1990 Grundschule Tripkau
1990 – 1993 Grundschule Neuhaus
1993 – 2002 Abitur am Gymnasium Boizenburg

Studium

10/2002 – 01/2007 Diplomstudium Biologie,
Georg-August-Universität Göttingen
und Anfertigung der Diplomarbeit
„Untersuchungen zur Funktion und Expression der kleinen RNA
SraJ (GlmZ) in *Escherichia coli*“
Arbeitsgruppe von PD Dr. Boris Görke,
Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-
August-Universität Göttingen

Promotion

06/2008 – 01/2012 Promotionsthema: „Die regulatorischen Funktionen
des paralogen Phosphotransferase Systems (PTS^{Ntr}) in
Escherichia coli“
Arbeitsgruppe von PD Dr. Boris Görke
Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-
August-Universität Göttingen