

Nebenwege des zentralen  
Kohlenstoffmetabolismus von *Bacillus subtilis*:  
Regulation der Methylglyoxalsynthase und der  
Zitratsynthase CitA

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
„Doctor rerum naturalium“  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm  
Microbiology and Biochemistry

vorgelegt von  
Christopher Patrick Zschiedrich  
Aus Teuschenthal/OS Holleben

Göttingen, September 2014



Nebenwege des zentralen  
Kohlenstoffmetabolismus von *Bacillus subtilis*:  
Regulation der Methylglyoxalsynthase und der  
Zitratsynthase CitA

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
„Doctor rerum naturalium“  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm  
Microbiology and Biochemistry

vorgelegt von  
Christopher Patrick Zschiedrich  
Aus Teuschenthal/OS Holleben

Göttingen, September 2014

## **Thesis Committee**

Prof. Dr. Jörg Stülke

(Institute für Mikrobiologie und Genetik; Abt. allgemeine Mikrobiologie)

PD Dr. Boris Görke

(Max F. Perutz Laboratories, Wien; Abt. für Microbiology, Immunobiology und Genetik)

Prof. Dr. Christiane Gatz

(Schwann-Schleiden-Forschungszentrum für Molekulare Zellbiologie; Abtl. Molekularbiologie und Physiologie der Pflanze)

## **Mitglieder der Prüfungskommission**

Referent: Prof. Dr. Jörg Stülke

(Institute für Mikrobiologie und Genetik; Abt. allgemeine Mikrobiologie)

Korreferent: Prof. Dr. Christiane Gatz

(Schwann-Schleiden-Forschungszentrum für Molekulare Zellbiologie; Abtl. Molekularbiologie und Physiologie der Pflanze)

## **Weitere Mitglieder der Prüfungskommission**

Prof. Dr. Henning Urlaub

(Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abt. bioanalytische Massenspektrometrie)

Prof. Dr. Stefanie Pöggeler

(Institute für Mikrobiologie und Genetik; Abt. Genetik eukaryotischer Mikroorganismen)

PD Dr. Boris Görke

(Max F. Perutz Laboratories; Abt. für Microbiology, Immunobiology und Genetik)

Prof. Dr. Kai Heimes

(Institute für Mikrobiologie und Genetik; Abt. mikrobielle Zellbiologie)

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 2014

Ich, Christopher Zschiedrich, versichere, dass ich die vorliegende Doktorarbeit mit dem Titel: „Nebenwege des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *Bacillus subtilis*: Regulation der Methylglyoxalsynthase und der Zitratsynthase CitA“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Christopher Patrick Zschiedrich

## Danksagung

Hiermit möchte ich einmal die Gelegenheit nutzen, allen Menschen zu danken, die mich im Laufe meines Studiums und während meiner Promotion begleitet haben. Auch an diejenigen, die ich hier nicht namentlich erwähne, es sei euch gesagt: „**Vielen Dank!**“.

Als erstes möchte ich hier meinen Doktorvater Prof. Jörg Stülke erwähnen, der mich in den letzten Jahren tatkräftig unterstützt und motiviert hat. Ich möchte mich dafür bedanken, dass er mir die Doktorarbeit, die Diplomarbeit und einen kurzen beruflichen Abstecher in die Schweiz ermöglicht hat. Auch für die zukünftige Unterstützung muss ich mich schon im Voraus bedanken. Es war mir stets ein Vergnügen, in deiner Arbeitsgruppe zu sein.

Ein großer Dank gebührt ebenfalls PD Dr. Boris Görke, bei dem ich die ersten 1 ½ Jahre meiner Doktorarbeit verbringen durfte. Vor allem die zahlreichen unterhaltsamen Gespräche waren sehr hilfreich für mich.

Vielen Dank an euch beide für die Überlassung des interessanten Themas und die exzellente fachliche Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Christiane Gatz für die Unterstützung während meiner Doktorarbeit und die Teilnahme an meinem Thesis Committee sowie für die Übernahme des Korreferates bedanken. Prof. Dr. Stefanie Pöggeler, Dr. Fabian M. Commichau und Prof. Dr. Henning Urlaub möchte ich herzlich für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission danken.

Für den experimentellen Beitrag und das Gelingen dieser Doktorarbeit möchte ich mich bei den Bachelorstudenten Bastian Behrens, Jan Gundlach, Nils Jäger und Anika Klewing bedanken. Ihr wart eine großartige Unterstützung für mich. Ein „Dankeschön!“ gebührt ebenfalls Romina Hofele (AG Urlaub) sowie Dr. Piotr Neumann und Dr. Achim Dickmanns (AG Ficner) die mich während meiner Experimente mit Rat und Tat unterstützt haben.

Hier möchte ich noch einmal die Gelegenheit aufgreifen, allen ehemaligen und aktuellen Kollegen zu danken. Mit eurer unverwechselbaren Art habt ihr eine tolle Arbeitsatmosphäre geschaffen. Ein ganz herzliches Dankeschön an Dr. Arne Schmeisky, Dr. Frederik Meyer, Dr. Fabian Rothe, Dr. Katrin Gunka, Dr. Jens Landmann, Dr. Yvonne Göpel, Dr. Christine Diethmaier und Dr. Martin Lehnik-Habrink für eure tatkräftige Unterstützung, die fachlichen

Gespräche und eure Hilfsbereitschaft. Ich wünsche Stephanie Großhennig, Lorena Stannek, Raphael Michna, Jan Gundlach, Dominik Tödter, Martin Thiele und Nora Cascante Estepa weiterhin gutes Gelingen und viel Erfolg bei ihrer Doktorarbeit. Es war mir ein großes Vergnügen euch zunächst beruflich und später auch privat kennengelernt zu haben. Auch in Zukunft werde ich sicherlich einen regen Kontakt mit euch pflegen.

Mein aufrichtiger Dank geht auch an meine Freunde, mit denen ich in den letzten Jahren eine unvergessliche Zeit verbracht habe. Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern bedanken, die mich in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert haben. Ohne euch wären die letzten Jahre umso schwerer gewesen.

*Vielen Dank ... !!!*

*Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft.  
Wer nichts anzweifelt, prüft nichts.  
Wer nichts prüft, entdeckt nichts.  
Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.*

(Pierre Teilhard de Chardin)



# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	
Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	1
<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
2.1. Der Modellorganismus <i>Bacillus subtilis</i> .....	5
2.2. Der zentrale Kohlenstoffmetabolismus von <i>B. subtilis</i> .....	6
2.2.1. Die Glykolyse .....	7
2.2.2. Der Zitratzyklus.....	9
2.2.3. Die anaplerotischen Reaktionen .....	11
2.2.4. Der Methylglyoxalmetabolismus .....	13
2.3. Das bakterielle Phosphoenolpyruvat: Kohlenstoff Phosphotransferase-system ....	14
2.4. Die Katabolitenrepression.....	17
2.5. Crh, das Paralog zu HPr .....	20
2.6. Ziel der Arbeit.....	22
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.1. Bakterienstämme und Plasmide .....	23
3.1.1. Bakterienstämme .....	23
3.1.2. Plasmide .....	23
3.1.3. Oligonukleotide .....	23
3.2. Medien und fakultative Zusätze.....	23
3.3. Methoden.....	26
3.3.1. Allgemeine Methoden.....	26
3.3.2. Anzucht von Bakterien .....	26

---

3.3.3.	Dauerkulturen .....	27
3.3.4.	Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation (nach Lederberg und Cohen, 1974) .....	27
3.3.5.	Transformation von <i>B. subtilis</i> .....	28
3.3.6.	Arbeiten mit DNA .....	29
3.3.7.	Arbeiten mit Proteinen .....	42
3.3.8.	Analyse von Protein-Protein Interaktionen .....	47
3.3.9.	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	54
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
4.1.	Charakterisierung der Interaktionsfläche von MgsA und Crh anhand genetischer Daten .....	61
4.1.1.	Ungerichtete Mutagenese von <i>mgsA</i> .....	61
4.1.2.	Charakterisierung der MgsA-Mutanten .....	64
4.1.3.	Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und Crh .....	66
4.1.4.	Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und MgsA WT .....	68
4.1.5.	Isolation kompensatorischer Mutationen in Crh, die die Interaktion mit MgsA wiederherstellen .....	70
4.1.6.	Charakterisierung der kompensatorischen Crh-Mutanten.....	71
4.1.7.	Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und Crh-Mutanten.....	75
4.1.8.	<i>In vitro</i> Charakterisierung der MgsA-Mutanten.....	80
4.1.9.	<i>In vitro</i> Vernetzung von MgsA und Crh mittels BS3 .....	83
4.1.10.	<i>In vitro</i> Untersuchung der MgsA-Oligomerisierung .....	89
4.1.11.	<i>In vitro</i> Untersuchung der Crh/MgsA Heteromerisierung.....	91
4.1.12.	Struktur des MgsA Hexamers: ein Trimer aus Dimeren .....	93
4.2.	Die Bedeutung des Zitratzyklus für das Wachstum von <i>B. subtilis</i> .....	98
4.2.1.	Der Zitratzyklus ist nicht essentiell für <i>B. subtilis</i> .....	98

---

4.2.2.	Deletion der Zuflüsse in den Zitratzyklus von <i>B. subtilis</i> .....	100
4.2.3.	Phänotypische Analyse der Deletionsstämme.....	101
4.2.4.	CitA kompensiert den Verlust von CitZ .....	104
4.2.5.	Untersuchung der Expression des Gens <i>citA</i> .....	107
4.2.6.	Charakterisierung der Zitratsynthasen CitA und CitZ aus <i>B. subtilis in vitro</i> ...	109
4.3.	Studien hinsichtlich des Minimalgenoms von <i>B. subtilis</i> .....	111
4.3.1.	Markerlose Deletion mit Hilfe des Cre/Lox-Systems .....	112
4.3.2.	Die Deletion des <i>citRA</i> -Lokus mit Hilfe des Cre/Lox-Systems .....	113
4.3.3.	Reorganisation der Gene <i>pgi</i> , <i>fbaA</i> und <i>ptsGHI</i> im Genom von <i>B. subtilis</i> .....	115
4.3.4.	Funktionalität des <i>pgi-fbaA-ptsGHI</i> Konstrukts .....	119
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>122</b>
5.1.	Die Bedeutung des Methylglyoxalmetabolismus.....	122
5.2.	Die Familie der Methylglyoxalsynthasen .....	124
5.2.1.	Die Struktur der Methylglyoxalsynthasen.....	124
5.2.2.	Die Regulation der Methylglyoxalsynthasen .....	125
5.2.3.	Modell der Crh vermittelten Inaktivierung von MgsA.....	129
5.3.	Das Verständnis über essentielle Prozesse in <i>B. subtilis</i> .....	131
5.4.	Die Bedeutung des Zitratzyklus und von dessen Zuflüssen für <i>B. subtilis</i> .....	132
5.4.1.	Auswirkungen des Verlustes des Zitratzyklus und von dessen Zuflüsse.....	132
5.4.2.	<i>odhB</i> ist nicht essentiell.....	134
5.4.3.	Die Bedeutung von CitA .....	134
5.5.	Ausblick .....	138
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>140</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>155</b>
7.1.	Stämme .....	155
7.2.	Oligonukleotide .....	158

---

7.3.	Plasmide .....	179
7.4.	Messwerte des $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstests .....	191
7.5.	Massenspektrometrische Analyse der MgsA und Crh Vernetzung .....	195
7.6.	Materialien .....	197
7.6.1.	Chemikalien .....	197
7.6.2.	Hilfsmittel .....	199
7.6.3.	Geräte und Apparaturen .....	200
7.6.4.	Kommerziell erhältliche Systeme .....	202
7.6.5.	Proteine und Enzyme .....	203
7.6.6.	Verwendete Internetangebote und Computerprogramm .....	204

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	% (volume/volume) (Volumenprozent)
% (w/v)	% (weight/volume) (Massenprozent)
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Bzw.	Beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	Circa
CAA	Casamino acid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CcpA	<i>catabolite control protein A</i>
CCR	Carbon catabolite repression bzw. <i>combined chain reaction</i>
CDP*	2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor)Tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat, Dinatriumsalz
chrom. DNA	chromosomale DNA
Cm	Chloramphenicol
CSE	C-Minimalmedium mit Succinat und Glutamat
deion. Wasser	deionisiertes Wasser
Da	Dalton
DHAP	Dihydroxiacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Erythromycin
E I	Enzym I
E II	Enzym II
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FastAP	Thermosensitive Alkaline Phosphatase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
Glc	Glukose
IPTG	Isoprpyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
Kan	Kanamycin
L	Lincomycin

---

LB	Luria Bertani (Medium)
LD	Lysozym/DNase(Mix)
LFH	Long-Flanking-Homology
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MMR	<i>multiple mutation reaction</i>
mRNA	messenger RNA
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD <sub>x</sub>	optische Dichte, gemessen bei Wellenlänge $\lambda=x$ nm
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
<i>Ori</i>	Replikationsursprung
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
Phleo	Phleomycin
PRD	PTS-regulatorische-Domäne
PTS	Phosphotransferase System
RAT	Ribonucleic Antiterminator
RBD	RNA-bindende-Domäne
Ri	Ribose
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SP	Sporulationsmedium
Spec	Spectinomycin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheiten)
UV	ultraviolettes Licht
ÜN	über Nacht
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
ZAP	Zellaufschlusspuffer
Zeo	Zeomycin

<b>Einheiten</b>		<b>Vorsätze</b>		
A	Ampere	k	kilo	10 <sup>3</sup>
Bp	Basenpaare	m	milli	10 <sup>-3</sup>
°C	Grad Celsius	μ	mikro	10 <sup>-6</sup>
Da	Dalton	n	nano	10 <sup>-9</sup>
G	Gramm			
H	Stunde	<b>Nukleotide</b>		
L	Liter	A	Adenin	
M	Meter	C	Cytosin	
M	Molar (mol/l)	G	Guanin	
Min	Minute	T	Thymin	
Sek	Sekunde	U	Uracil	
Rpm	Umdrehungen pro Minute			
V	Volt			
W	Watt			

#### **Aminosäuren-Nomenklatur** (nach IUPAC-IUB-Vereinbarung 1969)

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	T	Tyr	Tyrosin
K	Lys	Lysin	V	Val	Valin
L	Leu	Leucin	W	Trp	Tryptophan

## 1. Zusammenfassung

Als Bodenbakterium ist *B. subtilis* in seinem natürlichen Habitat permanenten Umweltveränderungen ausgesetzt. Ständig wechselnde Nährstoffbedingungen erfordern die strenge Regulation eines komplexen Stoffwechselnetzwerkes. So kann selbst die Verfügbarkeit einer guten Nährstoffquelle die Lebensqualität von *B. subtilis* beeinträchtigen. In Anwesenheit von Kohlenhydraten, die sehr schnell und effektiv über das Phosphotransferasesystem aufgenommen werden können, akkumulieren schädliche Zuckerphosphate in der Zelle. Unter diesen Bedingungen wird der Methylglyoxalnebenweg der Glykolyse aktiviert, um den durch die Zuckerphosphate vermittelten Stress zu umgehen. Die Aktivität der Methylglyoxalsynthase (MgsA) wird durch direkte Protein-Protein Interaktion mit dem Kohlenstoffflussregulator Crh reguliert.

Diese Arbeit liefert erste Einblicke in die Regulation der MgsA-Aktivität auf molekularer Ebene. Anhand eines genetischen Screens wurden die an der Interaktion von MgsA und Crh beteiligten Aminosäuren identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Helices 1 und 2 von Crh möglicherweise an der Interaktion mit dem N-Terminus von MgsA beteiligt sind. Weiterhin konnte die Struktur von MgsA gelöst werden. In seiner aktiven Form liegt MgsA als Hexamer vor. Unter schlechten Wachstumsbedingungen bindet dephosphoryliertes Crh an das MgsA-Hexamer. Dies führt zur Destabilisierung des Hexamers, welches darauf in drei Dimere zerfällt. Folglich liegen drei Heterotetramere bestehend aus je zwei Molekülen Crh und zwei Molekülen MgsA vor.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit hat sich mit der Essentialität des Zitratzyklus und dessen Zuflüssen beschäftigt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl der Zitratzyklus als auch die Zuflüsse in den Zitratzyklus unter optimalen Wachstumsbedingungen nicht essentiell für das Leben von *B. subtilis* sind. In diesem Zusammenhang wurde auch die Bedeutung der Zitratsynthase CitA für *B. subtilis* näher untersucht. Als aktive Zitratsynthase kann CitA den Verlust der Zitratsynthase CitZ teilweise kompensieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Nebenwege des zentralen Kohlenstoffmetabolismus streng reguliert sind und zum Gleichgewicht des Kohlenstoffhaushalts erheblich beitragen



## 2. Einleitung

### 2.1. Der Modellorganismus *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* ist ein stäbchenförmiges gram-positives Bakterium, das zur Gruppe der Firmicutes gehört (Claus und Berkeley, 1986). In der Natur ist *B. subtilis* vor allem im Boden und auf Pflanzenoberflächen anzutreffen. Unter aeroben Bedingungen ernährt es sich dort chemoorganoheterotroph. Diese Habitats sind durch große Umweltveränderungen wie Nährstoffversorgung, Verfügbarkeit von Wasser, schwankende Temperaturen und Osmolarität gekennzeichnet. Daher verfügt *B. subtilis* über verschiedene Strategien diesen widrigen Bedingungen zu entgehen (Hecker *et al.*, 2007). Die Expression der für das Überleben essentiellen/notwendigen Gene wird durch unterschiedliche Umweltbedingungen beeinflusst. Das heißt, dass unter spezifischen Bedingungen nur ein Teil der Proteine, die im Genom kodiert sind, benötigt werden (Boylan *et al.*, 1993; Helman *et al.*, 2001; Hecker *et al.*, 2007). *B. subtilis* kann unter limitierenden Bedingungen stoffwechsellinaktive Endosporen ausbilden, die gegen Bestrahlung, Austrocknung und Hitze resistent sind (Losick *et al.*, 1986). Dieser Mikroorganismus besitzt weitere Fähigkeiten sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Durch Flagellen kann sich *B. subtilis* widrigen Bedingungen durch aktive Fortbewegung entziehen. Die natürliche Kompetenz vermittelt *B. subtilis* die Fähigkeit DNA, die als Nahrungsquelle dient oder in das Genom integriert werden kann, aus der Umgebung aufzunehmen (Hamoen *et al.*, 2003).

*B. subtilis* ist einer der am besten erforschten Bakterien. Daher wird dieser Mikroorganismus als Modellorganismus in der Forschung angesehen. Erkenntnisse über *B. subtilis* dienen als Grundlage für Studien über nahe verwandte pathogene Organismen wie Clostridien, Staphylokokken oder Mycoplasmen.

Das komplette Genom (4.2Mbp) von *B. subtilis* wurde im Jahre 1997 sequenziert (Kunst *et al.*, 1997). Studien haben gezeigt, dass etwa 87% des Genoms für Proteine kodieren (Barbe *et al.*, 2009).

*B. subtilis* hat auch eine große wirtschaftliche Bedeutung. Aufgrund der leichten Kultivierung und Manipulation des Genoms von *B. subtilis* wird dieser zur Überproduktion von Enzymen, die biotechnologisch relevant sind, genutzt (Hamoen *et al.*, 2003, Schallmeyer *et al.*, 2004).

## 2.2. Der zentrale Kohlenstoffmetabolismus von *B. subtilis*

Als chemoorganotropher Organismus kann *B. subtilis* eine Vielzahl unterschiedlicher organischer Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Glukose dient als bevorzugte Energie- und Kohlenstoffquelle (Stülke und Hillen, 2000). Die Aufnahme der C-Quellen erfolgt immer energieabhängig. Die einzige Ausnahme ist Glycerol, das durch Diffusion aufgenommen wird. Zu den energieabhängigen Aufnahmesystemen gehören unter anderem ABC-Transporter, die einen ATP-bindenden Bereich haben und das Phosphotransferasesystem (Higgins *et al.*, 1992; Postma *et al.*, 1993).

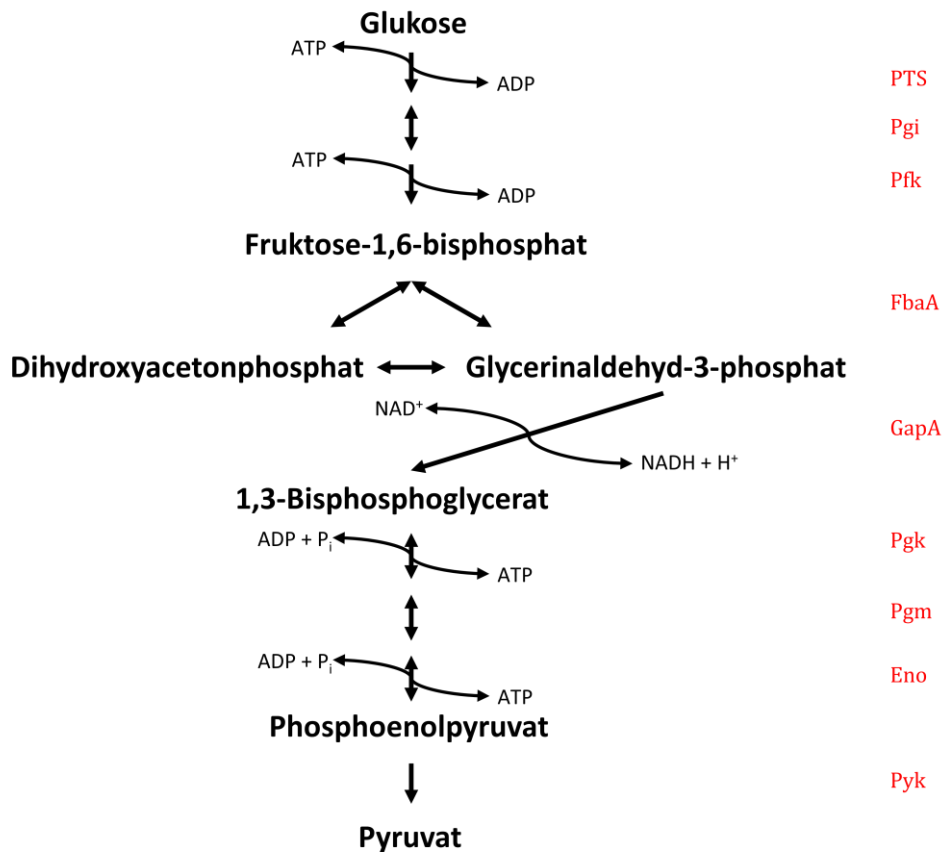
Der zentrale Kohlenstoffmetabolismus von *B. subtilis* besteht aus den Stoffwechselwegen Glykolyse, Glukoneogenese, Pentosephosphatweg und Zitratzyklus (Sonenshein, 2002). Sämtliche verfügbaren C-Quellen werden mit Hilfe dieser Stoffwechselwege abgebaut und erzeugen dabei alle organischen Verbindungen, die für die Synthese der Makromoleküle der Zelle erforderlich sind. Diese Reaktionen liefern Energie in Form von ATP sowie Metabolite und Reduktionsäquivalente, die für weitere Biosynthesewege benötigt werden. *B. subtilis* besitzt außerdem sehr spezielle Stoffwechselwege. So kann unter anaeroben Bedingungen Energie durch Nitrat-Atmung bzw. fermentative Stoffwechselwege erzeugt werden (Cruz Ramos *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 1997). Auf der anderen Seite gibt es Organismen, die einen reduzierten Kohlenstoffmetabolismus besitzen und sich so an nährstoffreiche Habitats angepasst haben. So weisen beispielsweise die phylogenetisch nah verwandten Listerien keinen vollständigen Zitratzyklus auf (Eisenreich *et al.*, 2006; Schaer *et al.*, 2010; Glaser *et al.*, 2001).

Die Expression der Gene, die für Enzyme des zentralen Kohlenstoffmetabolismus kodieren, ist stark reguliert. Nur in Anwesenheit einer bestimmten Kohlenstoffquelle bzw. unter bestimmten Wachstumsbedingungen werden die dafür benötigten Gene exprimiert (Fisher, 1999; Lorca *et al.*, 2005; Stülke und Hillen, 2000).

### 2.2.1. Die Glykolyse

Nahezu jeder Organismus ist in der Lage, ein Molekül Glukose über die Glykolyse zu jeweils zwei Molekülen Pyruvat zu oxidieren. Die Verwertung von Glukose erfolgt sowohl bei strikt und fakultativ aeroben als auch bei fermentierenden Bakterien. Glukose ist die bevorzugte C- und Energiequelle von *B. subtilis*. In der Glykolyse wird ATP durch Substratkettenphosphorylierung und das Reduktionsäquivalent NADH erzeugt. Zusätzlich liefert die Glykolyse wichtige Vorstufen für die Synthese von Aminosäuren und der Zellwand (Ludwig *et al.*, 2001). *B. subtilis* besitzt alle Enzyme, die für eine vollständige Glykolyse benötigt werden. In neun aufeinanderfolgenden Reaktionen wird ein Mol Glukose zu zwei Mol Pyruvat, zwei Mol NADH und zwei Mol ATP umgewandelt.

Die Glykolyse kann in zwei Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Teil wird Glukose aufgenommen und zu Glycerinaldehyd-3-phosphat umgewandelt. Dieser Prozess ist energieabhängig, es werden zwei Mol ATP benötigt. Der zweite Abschnitt der Glykolyse dient der Energiegewinnung. Hier wird Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Pyruvat umgewandelt. In der Abbildung 2.1. ist die Glykolyse mit den daran beteiligten Enzymen und Intermediaten dargestellt.



**Abbildung 2.1: Die Reaktionen der Glykolyse inklusive aller beteiligten Enzyme.**

PTS = Phosphotransferasesystem; Pgi = Glukose-6-phosphat-Isomerase; Pfk = Phosphofruktokinase; FbaA = Aldolase; GapA = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Pgk = Phosphoglyceratkinase; Pgm = Phosphoglyceratmutase; Eno = Enolase und Pyk = Pyruvatkinase

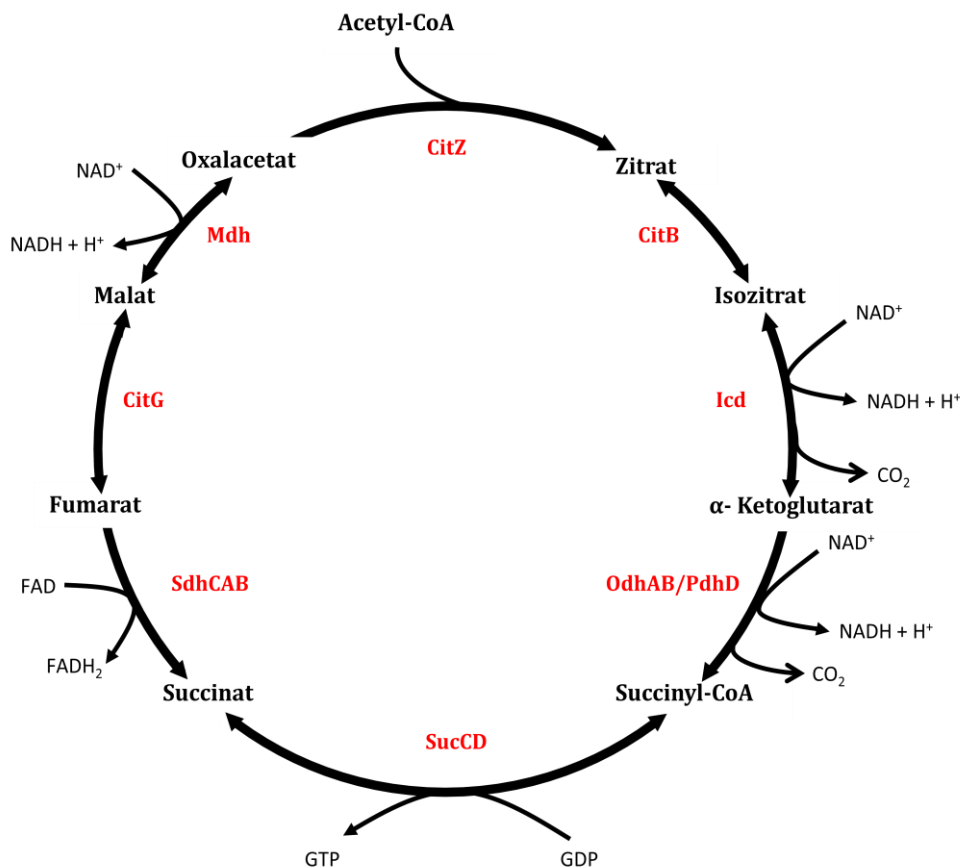
Die glykolytischen Enzyme Pgi und FbaA katalysieren irreversible Reaktionen. Die Aktivität dieser Enzyme wird sowohl in der Glykolyse als auch in der Glukoneogenese benötigt. Die dazugehörigen Gene unterliegen keiner regulatorischen Kontrolle und sind daher konstitutiv exprimiert. Im Gegensatz dazu wird die Expression der Enzyme Pfk und Pyk, welche ebenfalls irreversible Reaktionen katalysieren, durch Glukose induziert (Ludwig *et al.*, 2001). Die Enzyme, die die Reaktionen des zweiten Abschnittes der Glykolyse katalysieren, sind im *gap*-Operon kodiert. Zusätzlich kodiert dieses Operon für den spezifischen Regulator CggR, der die Expression des Operons in Abwesenheit von Glukose unterdrückt. Ein weiterer Promoter strangabwärts von *gapA* erlaubt die Expression der Gene, die sowohl unter glykolytischen als auch unter glukoneogenetischen Bedingungen benötigt werden (Atmanene *et al.*, 2010; Doan und Aymerich, 2003; Fillinger *et al.*, 2000).

Neben der Regulation der Genexpression wird auch die Aktivität einiger glykolytischen Enzyme reguliert. Hier ist die Phosphofruktokinase zu erwähnen. Die PFK wird durch AMP aktiviert und durch hohe Konzentrationen an FBP und ATP gehemmt. Des Weiteren unterliegt die Pyruvatkinase der Kontrolle von FBP und ATP. Dabei hat ATP einen hemmenden und FBP einen stimulierenden Effekt auf die Aktivität von Pyk (Diesterhaft und Freese, 1972; Marschke und Bernlohr, 1973).

### **2.2.2. Der Zitratzyklus**

Als zentraler Stoffwechselweg ist der Zitratzyklus in vielen Organismen anzutreffen. Er vereint anabolische und katabolische Prozesse in der Zelle. In acht aufeinanderfolgenden Reaktionen wird Acetyl-CoA im Zitratzyklus vollständig zu CO<sub>2</sub> und Wasser oxidiert. Dabei werden Energie in Form von ATP und Reduktionsäquivalenten bereitgestellt. Die Intermediate des Zitratzyklus liefern die Grundbausteine für die Synthese von Aminosäuren. Die Expression der am Zitratzyklus beteiligten Enzyme unterliegt einer strengen Kontrolle. So werden die Gene, die für Enzyme des Zitratzyklus kodieren, in Anwesenheit von Glukose reprimiert (Stülke und Hillen, 2000; Blencke *et al.*, 2003).

*B. subtilis* besitzt einen vollständigen Zitratzyklus (Sauer *et al.*, 1997). In der Abbildung 2.2. ist der Zitratzyklus mit den daran beteiligten Enzymen und Intermediaten dargestellt.



**Abbildung 2.2: Die Reaktionen des Zitratzyklus inklusive aller beteiligten Enzyme und Intermediate.**

CitZ = Zitratsynthase; CitB = Aconitase; Icd = Isozitatdehydrogenase; OdhAB/PdhD =  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenasekomplex; SucCD = Succinyl-CoA-Synthetase; SdhCAB = Succinat-Dehydrogenase-Komplex; CitG = Fumarase; Mdh = Malat-Dehydrogenase

Wie bereits beschrieben, ist *B. subtilis* sich ständig ändernde Bedingungen innerhalb seines natürlichen Habitats ausgesetzt. Insbesondere die Nährstoffversorgung ist hier zu erwähnen, welche eine Anpassung des Stoffwechsels an die jeweilige Nahrungsquelle erfordert. In Anwesenheit gut verwertbarer C-Quellen wird die Expression der Gene zur Verwertung sekundärer Zucker unterdrückt. Dieser Mechanismus wird als Katabolitenrepression (CCR bezeichnet) (Stülke und Hillen, 2000). Auch der Zitratzyklus unterliegt der CCR. Hier sind die Transkriptionsfaktoren CcpA und CcpC an der Expression der Gene, die für Enzyme des Zitratzyklus kodieren, beteiligt.

Das *citZ*-Operon, das für die Zitratsynthase, die Isocitrat-Dehydrogenase und die Malat-Dehydrogenase kodiert, wird in Anwesenheit von Glukose durch CcpA und CcpC reprimiert. Zusätzlich verstärkt Glutamat den reprimierenden Effekt (Kim *et al.*, 2002; Jourlin-Castelli *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu erfährt die Aconitase (*citB*) ausschließlich

eine Regulation durch den Repressor CcpC (Blencke *et al.*, 2006). Neben CcpC hat auch die Verfügbarkeit von Eisen einen Einfluss auf die Expression von *citB*. Unter Mangelbedingungen wird CitB durch die kleine RNA FsrA reprimiert (Gaballa *et al.*, 2008). Alle weiteren Enzyme des Zitratzyklus unterliegen entweder keiner Regulation oder erfahren lediglich einen schwach reprimierenden Effekt durch Glukose (Blencke *et al.*, 2003).

Neben CitZ kodiert das Genom von *B. subtilis* für eine weitere Zitratsynthase, CitA. Beide Enzyme katalysieren die Reaktion von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Zitrat. Jedoch ist die Bedeutung von CitA weitgehend unbekannt. Die Expression der Zitratsynthase CitA wird durch den Transkriptionsfaktor CitR reguliert. Dieser gehört zur Familie der LysR Regulatoren (Jin und Sonenshein, 1994a; Jin und Sonenshein, 1994b).

### 2.2.3. Die anaplerotischen Reaktionen

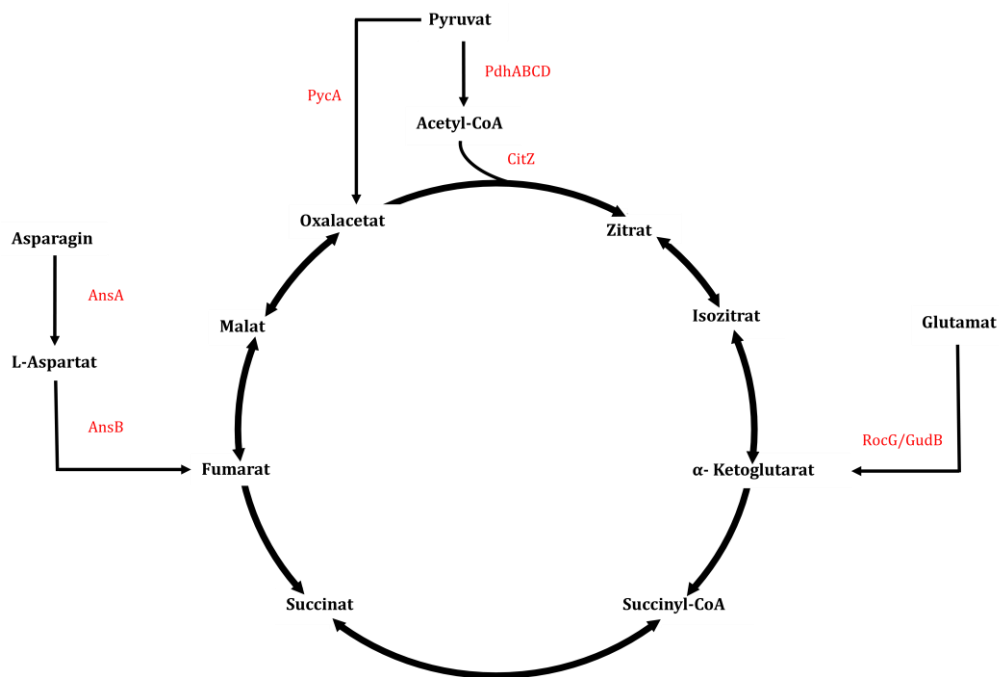
Der Zitratzyklus ist der zentrale Knotenpunkt des Kohlenstoffmetabolismus von *B. subtilis*. Er liefert die Vorstufen für die Synthese der Aminosäuren, Fettsäuren und Nukleinsäuren. So wird zum Beispiel L-Aspartat aus Oxalacetat bzw. Glutamat aus  $\alpha$ -Ketoglutarat hergestellt. Theoretisch würde dies dazu führen, dass die relative Konzentration an Intermediaten des Zitratzyklus konstant abnimmt. Damit die Abfolge des Zitratzyklus bestehen bleibt, gibt es die sogenannten anaplerotischen Reaktionen. Diese Auffüllreaktionen verbinden den Zitratzyklus mit anderen Stoffwechselwegen und liefern die benötigten Intermediate für die Abfolge des Zitratzyklus. In der Abbildung 2.3. sind die in dieser Arbeit untersuchten anaplerotischen Reaktionen dargestellt.

Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, wird im Zitratzyklus weiter zu CO<sub>2</sub> abgebaut. Wobei Pyruvat über zwei Reaktionen in den Zitratzyklus eingeführt werden kann. Der Pyruvatdehydrogenase-Komplex katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA, das über eine Kondensationsreaktion mit Oxalacetat zu Zitrat umgewandelt wird. Weiterhin kann Pyruvat über die Pyruvat-carboxylase (*pycA*) zu Oxalacetat umgewandelt werden und so in den Zitratzyklus eingeschleust werden. Somit liefert Pyruvat beide Vorstufen für die erste Reaktion des Zitratzyklus (Utter und Keech, 1963; Diesterhaft und Freese, 1972; Jitrapakdee *et al.*, 2008).

Ein weiterer Einstiegspunkt für die anaplerotischen Reaktionen ist  $\alpha$ -Ketoglutarat. In Anwesenheit von Glutamat kann dies über die im Genom kodierten Glutamatdehydrogenasen RocG und GudB zu  $\alpha$ -Ketoglutarat umgewandelt werden. Der Laborstamm 168 verfügt lediglich über eine aktive Glutamat-Dehydrogenase, RocG. In diesem Stamm ist GudB inaktiv. Deletiert man RocG, so wird die inaktive Glutamat-Dehydrogenase GudB dekryptifiziert. Die aktive GudB kann den Verlust von RocG kompensieren

(Commichau *et al.*, 2008).

Neben Glutamat liefert auch Asparagin ein Intermediat des Zitratzyklus. Über das Zwischenprodukt L-Aspartat wird Asparagin zu Fumarat umgewandelt. Die L-Asparaginase (*ansA*) sowie die L-Aspartase (*ansB*) katalysieren diese Reaktion.



**Abbildung 2.3: Der Zitratzyklus und die anaplerotischen Reaktionen von *B. subtilis***

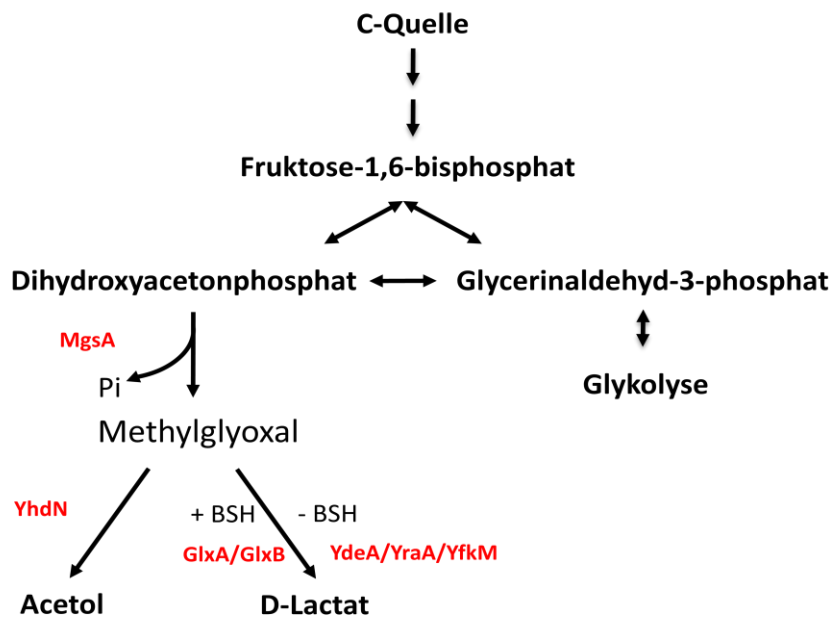
CitZ = Zitratsynthase; RocG/GudB = Glutamat Dehydrogenasen; AnsA = L-Asparaginase; AnsB = L-Aspartase; PycA = Pyruvat-Carboxylase; PdhABCD = Pyruvat-Dehydrogenase-komplex



#### 2.2.4. Der Methylglyoxalmetabolismus

Nahezu jeder Organismus ist in der Lage Glukose über die Glykolyse zu verwerten. Viele Organismen besitzen neben der Glykolyse einen alternativen Stoffwechselweg, der die Glykolyse umgeht. Dabei wird Dihydroxyacetonphosphat zu Methylglyoxal, welches ein Aldehyd von Pyruvat darstellt, umgewandelt. Dieser Nebenweg liefert keine Energie (Cooper, 1984; Kalapos *et al.*, 2008). Überraschenderweise ist Methylglyoxal sehr toxisch. Aufgrund von DNA- und Proteinschäden wird das Wachstum von *B. subtilis* beeinträchtigt (Thornally, 2008; Töttemeyer *et al.*, 1998).

Der erste Schritt dieses Nebenweges wird durch die Methylglyoxal-Synthase (kodiert durch *mgsA*) katalysiert. Unter Abspaltung einer Phosphatgruppe wird hier Dihydroxyacetonphosphat zu Methylglyoxal umgewandelt. Im Anschluss kann Methylglyoxal in *B. subtilis* über mehrere Wege abgebaut werden. Dabei entsteht entweder Acetol oder D-Laktat. Die Aldo-Keto-Reduktase YhdN katalysiert die Reaktion von Methylglyoxal zu Acetol. Die Synthese von D-Lactat kann bacillithiolabhängig und -unabhängig erfolgen. Bacillithiol dient zur Aufrechterhaltung des zellulären Redoxpotentials. Weiterhin vermittelt es eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Fosfomyzin. Der bacillithiolabhängige Abbauweg von Methylglyoxal wird durch die beiden Glyoxalasen I und II (*glxA* und *glxB*) katalysiert. Die Glyoxalase III vermittelt den bacillithiolunabhängigen Abbau von Methylglyoxal in *B. subtilis*. Im Genom von *B. subtilis* sind drei mögliche Glyoxalasen III (*ydeA*, *yraA*, *yfkM*) kodiert (Chandrangsu *et al.*, 2014). Zusätzlich gibt es nicht weiter charakterisierte Abbauwege von Methylglyoxal. Zum einen kann Pyruvat direkt aus Methylglyoxal über die Methylglyoxaldehydogenase hergestellt werden. Zum anderen kann über die Methylglyoxalreduktase Laktat in Laktaldehyd und anschließend von der Laktaldehyddehydrogenase in Laktat umgewandelt werden. In *B. subtilis* wird diese Reaktion von bisher unbekanntem Enzymen katalysiert (Monder, 1967; Murata *et al.*, 1985). In der Abbildung 2.4. ist die Synthese und die Hauptabbauwege von Methylglyoxal in *B. subtilis* dargestellt.



**Abbildung 2.4: Der Methylglyoxalweg in *B. subtilis***

MgsA = Methylglyoxal-Synthase; YhdN = Aldo-Keto-Reduktase; GlxA = Glyoxalase I; GlxB = Glyoxalase II; YdeA = Glyoxalase III; YraA = Glyoxalase III; YfkM = Glyoxalase III; BSH = Bacillithiol

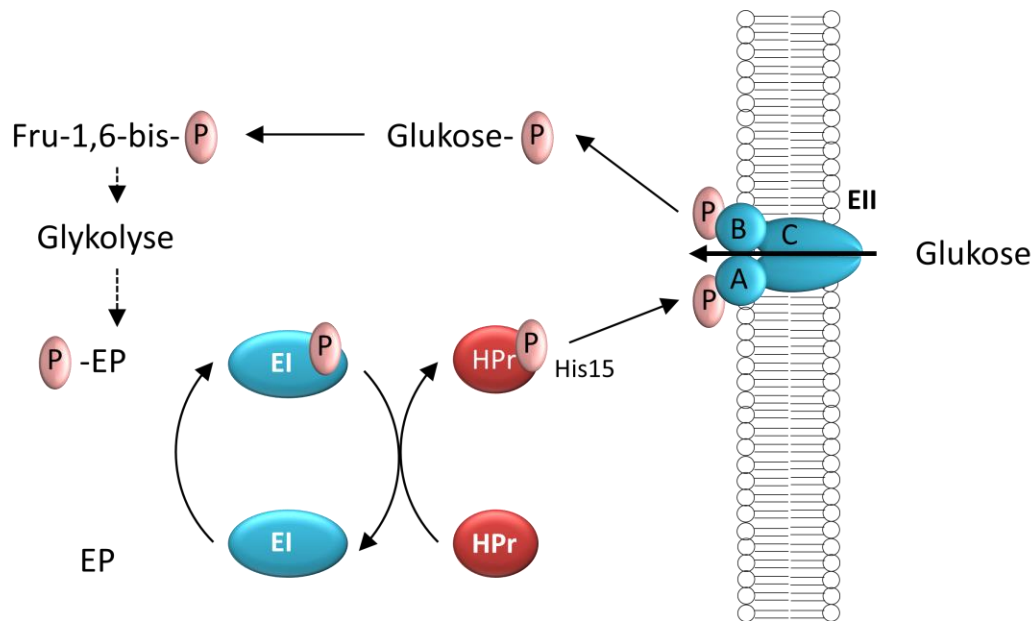
Der Methylglyoxal-Nebenweg der Glykolyse wird als Überfluss-Mechanismus angesehen. Die Aufnahme großer Mengen Glukose stört das Gleichgewicht innerhalb der Glykolyse. Dies führt zur Akkumulation glykolytischer Intermediate, die toxisch für die Zelle sind. Um diesem Zuckerphosphat-vermittelten Zellstress zu entgehen, produzieren Bakterien Methylglyoxal. Dabei wird inorganisches Phosphat frei, welches für die Synthese von ATP benötigt wird (Böck und Neidhardt, 1966; Irani und Maitra, 1977; Kadner *et al.*, 1992).

### 2.3. Das bakterielle Phosphoenolpyruvat: Kohlenstoff Phosphotransferasesystem

Das bakterielle Phosphoenolpyruvat (PEP): Kohlenstoff Phosphotransferasesystem (PTS) übernimmt sowohl katalytische als auch regulatorische Funktionen. Das PTS vermittelt den Transport und die Phosphorylierung zahlreicher C-Quellen (Postma *et al.*, 1993). Es fungiert außerdem als wichtige Kontrollinstanz für den Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatmetabolismus in vielen Bakterien. Der Phosphorylierungszustand der einzelnen Komponenten des PTS ist ausschlaggebend für regulatorischen Prozesse. So wird ein direkter Zusammenhang zwischen verfügbarer C-Quelle und den regulatorischen

Mechanismen geschaffen. Insbesondere ist hier die Katabolitenrepression (CCR) zu erwähnen. (Görke und Stülke 2008; Deutscher *et al.*, 2014).

*B. subtilis* werden Kohlenhydrate bevorzugt über das PTS aufgenommen. Auf diese Art werden in *B. subtilis* mehr als 20 verschiedene Zucker aufgenommen. Der Transport von Glukose ist in Abbildung 2.5. dargestellt. Das PTS besteht aus einem membranständigen substratspezifischen Transporter und den zwei cytosolischen Proteinen, Enzym I und HPr. In *B. subtilis* kodieren die Gene *ptsH* für HPr und *ptsI* für EI. Demgegenüber stehen die Zuckertransporter, auch Enzym II genannt. Der Transport durch EII ist sehr spezifisch. Jede C-Quelle hat ihre eigenes EII (Deutscher *et al.*, 2014). In *B. subtilis* kodiert das Gen *ptsG* für das Glukose-spezifische EII. Das PTS nutzt PEP als Energiequelle und Phosphatdonor für die Aufnahme der verschiedenen C-Quellen. Die löslichen PTS-Bestandteile EI und HPr bilden eine Phosphorylierungskaskade und übertragen die Phosphatgruppe von PEP über EII auf Glukose. EI nutzt PEP um sich selbst zu phosphorylieren. Diese Phosphatgruppe wird im Anschluss auf das Histidin-15 von HPr übertragen. HPr ist wiederum in der Lage eine Vielzahl von spezifischen EII zu phosphorylieren. Die EII-Komplexe bestehen aus drei Domänen. Die Domänen A und B sind Bestandteil der Phosphorylierungskaskade. Die Domäne C ist der eigentliche Transporter von Glukose. HPr phosphoryliert die Domäne A des EII Komplexes. Über die Domäne-B wird das Phosphat auf Glukose während des Transports durch die Zellmembran übertragen. Glukose-6-Phosphat wird dann über die Glykolyse weiter zu Pyruvat abgebaut. In *B. subtilis* erfolgt die Aufnahme aller PTS-Zucker nach dem zuvor beschriebenen Prinzip (Postma *et al.*, 1993; Deutscher *et al.*, 2014).



**Abbildung 2.5: Das bakterielle Phosphoenolpyruvat: Kohlenstoff PTS**

Das PTS verknüpft die Aufnahme verschiedener Kohlenhydrate mit deren Phosphorylierung. Das PTS besteht aus den drei Proteinen EI, HPr und EII. EI startet die Phosphorylierungskaskade, durch Autophosphorylierung wird ein energiereiches Phosphat von PEP auf EI übertragen. Die Phosphatgruppe wird über das His15 von HPr auf den EII-Komplex übertragen. Die Domäne A transferieren die Phosphorylgruppe auf die Domäne B des EII-Komplexes. Die EII-B Domäne phosphoryliert daraufhin Glukose, das von der Domäne C durch die Zytosolmembran geschleust wird (nach Görke und Stülke, 2008).

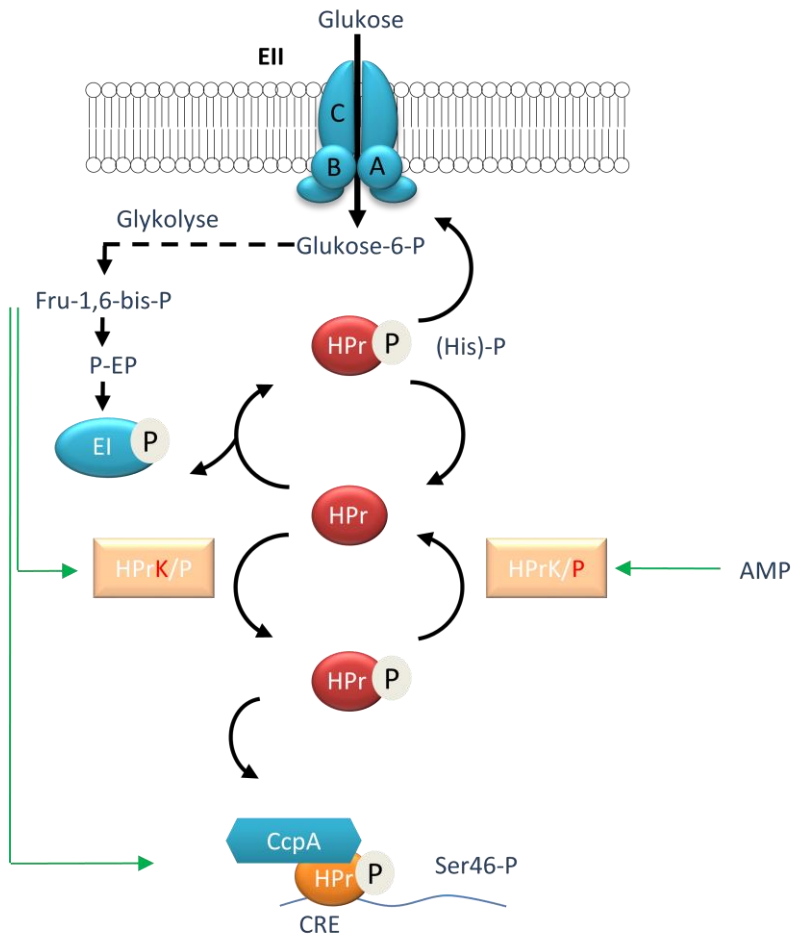
In *B. subtilis* sind 16 unterschiedliche EIIs bekannt. Sämtliche EII-Komplexe sind immer gleich aufgebaut. Sie bestehen aus 3 Domänen, die entweder aus verschiedenen Proteinen oder durch ein einziges Multidomänprotein gebildet werden können. Die Phosphorylierungskaskade ist für alle EII gleich. Eine Ausnahme ist hier das Lev-PTS welches für die Aufnahme von Fruktose verantwortlich ist. Im Lev-PTS besteht das EII aus 4 Domänen. Die Phosphatgruppe wird über die Domänen A, B, C und D auf Fruktose übertragen (Meadow *et al.*, 1990; Martin-Verstraete *et al.*, 1990; Postma *et al.*, 1993; Deutscher *et al.*, 2002).

## 2.4. Die Katabolitenrepression

Die meisten Bakterien können mehrere Kohlenstoffquellen verwerten. Dies geschieht entweder simultan oder nacheinander, wobei die C-Quelle mit dem höchsten energetischen Potential zuerst verwertet wird. In den meisten Bakterien ist Glukose die bevorzugte Kohlenstoffquelle. Die Anwesenheit von Glukose verhindert die Verwertung weniger energiereicher C-Quellen. Der Mechanismus wird als Katabolitenrepression bezeichnet (CCR) (Deutscher, 2008; Görke und Stülke 2008). Dieses Phänomen hat eine zentrale Rolle im Leben der Mikroorganismen, da 5-10% aller Gene durch die CCR reguliert werden. Außerdem nimmt die CCR indirekt Einfluss auf das Konkurrenzverhalten der Bakterien untereinander. Die Verwertung bevorzugter C-Quellen gewährleistet das schnellst mögliche Wachstum. In pathogenen Organismen hat die CCR außerdem einen bedeutenden Rolle für die Expression von Virulenzfaktoren (Meinken *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001; Blencke *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Lorca *et al.*, 2005).

In *B. subtilis* sind der Transkriptionsfaktor CcpA, HPr und die HPrK/P sowie die glykolytischen Intermediate Glukose-6-phosphat und Fruktose-1,6-bisphosphat die Hauptakteure der CCR. In *B. subtilis* besitzt HPr zwei Phosphorylierungsstellen. Zum einen dient Histidin-15 als Überträger einer Phosphorylgruppe beim zuckerspezifischen Transport durch die Zellmembran. Zum anderen erfüllt das Serin-46 eine regulatorische Funktion. Folglich existieren vier unterschiedliche Formen an HPr: unphosphoryliertes HPr, am Ser46 oder His15 phosphoryliertes HPr sowie doppelt phosphoryliertes HPr. HPr-Ser46-P ist in der Lage, einen Komplex mit CcpA zu bilden. Dieser Komplex bindet an die sogenannten regulatorischen Elemente der DNA (*cre*) und moduliert dadurch die Genexpression. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von HPr am Serin-46 wird durch HPrK/P katalysiert. Dabei entscheidet die Qualität der Kohlenstoffquelle, ob die HPrK/P Kinase- bzw. Phosphorylase-Aktivität ausübt. Unter guten Wachstumsbedingungen wird die Kinase-Aktivität der HPrK/P durch Fruktose-1,6-bisphosphat stimuliert. Folglich wird unter diesen Bedingungen HPr am Serin-46 phosphoryliert. Steigt die Konzentration an anorganischem Phosphat und sinkt die Konzentration an Fruktose-1,6-bisphosphat und ATP, so dephosphoryliert die HPrK/P HPr (Deutscher und Engelmann, 1984; Galinier *et al.*, 1998; Jault *et al.*, 2000). Die Bindung von HPr-Ser46-P an CcpA führt zu einer leichten Rotationsbewegung der N-terminalen und C-terminalen Subdomänen des CcpA-Kerns. Diese

Konformationsänderung ermöglicht der N-terminalen DNA-Bindedomäne von CcpA DNA zu binden (Schumacher *et al.*, 2004). Die Komplexbildung aus CcpA und HPr-Ser46-P wird zusätzlich durch die Interaktion mit Glukose-6-phosphat und Fruktose-1,6-bisphosphat verstärkt. In Anwesenheit von Glukose, werden die Gene durch CcpA reprimiert, deren Produkte zur Verwertung alternativer C-Quellen benötigt werden. Zusätzlich erfolgt eine Aktivierung der Gene, deren Produkte an der Sekretion von Kohlenstoffverbindungen, die im Überschuss vorliegen, beteiligt sind (Henkin *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001). Damit der Komplex aus HPr und CcpA Einfluss auf die Genexpression nehmen kann, muss er an die DNA binden. Hierfür existieren verschiedene Mechanismen. In der Regel überlappt die Bindungsstelle des Komplexes entweder mit dem Transkriptionsstartpunkt oder dem Promoter der zu regulierenden Gene. Dadurch wird die Transkription verhindert. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass der Komplex strangauf- bzw. -abwärts des Promoters bindet. Dies führt entweder zur Aktivierung der Genexpression oder resultiert in einem Roadblock für die RNA-Polymerase (Miwa *et al.*, 2000; Nicholson *et al.*, 1987). In der Abbildung 2.6. ist die CcpA-abhängige CCR von *B. subtilis* dargestellt.



**Abbildung 2.6: Die CCR in *B. subtilis*.**

In Anwesenheit einer guten C-Quelle steigt die intrazelluläre Konzentration an Fruktose-1,6-bisphosphat (FBP) und ATP. Hohe Konzentrationen an FBP und ATP stimulieren die Kinase-Aktivität der HPrK/P. Folglich wird HPr am Serin-46 phosphoryliert. HPr-Ser46-P bindet CcpA. Dieser Komplex moduliert die Expression kataboler Gene durch Bindung an die regulatorischen Elemente der DNA. In Abwesenheit von Glukose sinkt der intrazelluläre Spiegel an FBP und ATP. Dies führt zur Akkumulation inorganischem Phosphats. Unter diesen Bedingungen wird die Phosphorylase-Aktivität der HPrK/P stimuliert. Somit wird HPr-Ser46-P dephosphoryliert. (nach Görke und Stülke, 2008).

## 2.5. Crh, das Paralog zu HPr

In Firmicutes erfüllt HPr aus dem PTS zwei Funktionen. Während der Aufnahme von verschiedenen Zuckern überträgt HPr eine Phosphorylgruppe von EI auf EII. Weiterhin hat HPr eine entscheidende Schlüsselfunktion bei der CCR. Die CCR erlaubt Bakterien, die Expression der Gene für die Verwertung sekundärer C-Quellen in Anwesenheit bevorzugter Kohlenhydrate zu unterdrücken (Deutscher *et al.*, 2006; Deutscher, 2008; Görke und Stülke, 2008).

Neben HPr besitzen *B. subtilis* und weitere *Bacilli* das „Carbon-Flux-Regulating HPr“, Crh genannt. Die paralogen Proteine HPr und Crh zeigen eine Sequenzidentität von 40% auf (Galinier *et al.*, 1997). Ähnlich wie HPr kann auch Crh phosphoryliert werden. Jedoch besitzt Crh nur eine Phosphorylierungsstelle. Die Phosphorylierung am Ser-46 erfolgt ebenfalls durch die HPrK/P. Wie auch HPr-Ser46-P kann Crh-Ser-46-P einen Komplex mit CcpA bilden. Im Komplex können beide Proteine die CCR vermitteln. Aufgrund der geringeren Expression von Crh und der geringeren Bindungsfähigkeit von Crh zu CcpA, kann man Crh lediglich eine untergeordnete Funktion bei der CCR zuordnen (Galinier *et al.*, 1997; Görke *et al.*, 2004; Seidel *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2008).

Die eigentliche Funktion von Crh konnte vor kurze, entschlüsselt werden. Dephosphoryliertes Crh bindet und inaktiviert die Methylglyoxalsynthase, MgsA in *B. subtilis*. HPr ist jedoch nicht befähigt, MgsA zu binden. Steigt die Konzentration an Fruktose-1,6-bisphosphat und ATP in der Zelle führt dies zur Aktivierung der HPrK/P. Die HPrK/P wiederum phosphoryliert Crh am Serin-46. Crh-P ist nicht mehr in der Lage, MgsA zu binden. Folglich ist MgsA aktiv und Dihydroxyacetonphosphat wird zu Methylglyoxal umgesetzt (Landmann *et al.*, 2011). Dieser Nebenweg der Glykolyse dient als „Überdruckventil“. Die Aufnahme großer Mengen Glukose stört das Gleichgewicht innerhalb der Glykolyse. Dies führt zur Akkumulation glykolytischer Intermediate, die toxisch für die Zelle sind. Um diesem Zuckerphosphat-vermittelten Zellstress zu entgehen produzieren Bakterien Methylglyoxal. Dabei wird inorganisches Phosphat frei, welches für die Synthese von ATP benötigt wird (Weber *et al.*, 2005).

Trotz der hohen Sequenzidentität zwischen HPr und Crh erfüllen beide Proteine unterschiedliche Funktionen in der Zelle. Strukturanalysen von Crh- und HPr-Komplexen



---

haben gezeigt, dass in beiden Proteinen die Helices 1 und 2 die Interaktionsfläche mit dem jeweiligen Bindungspartner bilden (Brokx *et al.*, 1999; Schumacher *et al.*, 2004; Schumacher *et al.*, 2006; Schumacher *et al.*, 2007). Interaktionsstudien von Crh und HPr belegen außerdem, dass die Aminosäurereste Leu14; Glu15; Ala20 und Phe22 in Crh maßgeblich an den unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von Crh und HPr zu MgsA beteiligt sind (Landmann *et al.*, 2011). Gleiches gilt für die Interaktion mit CcpA. Alanin-20 in Crh ist für die verminderte Bindungsaffinität zu CcpA verantwortlich (Schumacher *et al.*, 2007). Diese Erkenntnisse bestätigen die Hypothese, dass der Aminosäurerest an der Position 20 von Crh bzw. HPr hauptverantwortlich für die Bestimmung des Interaktionspartners und der damit verbundenen spezifischen Funktion ist (Landmann *et al.*, 2011).

## 2.6. Ziel der Arbeit

Bisherige Studien haben gezeigt, dass Crh die enzymatische Aktivität der Methylglyoxalsynthase MgsA in *B. subtilis* reguliert. Für die Regulation ist der Phosphorylierungszustand von Crh entscheidend. Dephosphoryliertes Crh bindet und inaktiviert MgsA. Im Gegensatz dazu ist Crh-P nicht mehr fähig, MgsA zu binden. Dies ermöglicht MgsA Dihydroxyacetonphosphat in Methylglyoxal umzuwandeln. Dadurch kann der untere Teil der Glykolyse umgangen werden.

Bisher gab es keine Hinweise darauf, welche Aminosäurereste in MgsA an der Interaktion mit Crh beteiligt sind und wie Crh die Enzymaktivität von MgsA mechanistisch inhibiert. Die Hypothese, dass Crh die Multimerisierung von MgsA verhindert, sollte in dieser Arbeit weiter verfolgt werden. Ein genetischer Screen diente zur Identifizierung der Aminosäurereste in MgsA, die an der Interaktion mit Crh beteiligt sind. Zusätzlich sollten durch biochemische Analysen die genetischen Daten überprüft werden. Anhand der Struktur von MgsA und massenspektrometrischen Analysen konnte die gemeinsame Interaktionsfläche von MgsA und Crh bestimmt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Zitratsynthase CitA näher zu charakterisieren. CitA katalysiert wie auch CitZ die erste Reaktion des Zitratzyklus von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Zitrat. Für den Zitratzyklus als zentralen Stoffwechselweg, ist es unabdingbar, sämtliche Aspekte über dessen Regulation aufzuklären. In diesem Zusammenhang sollte ein markerloses Deletionssystem, basierend auf der Cre-Rekombinase, etabliert werden. Die Daten zeigen, dass CitA eine weitaus größere Rolle bei der Synthese von Zitrat spielt, als bisher angenommen.

### 3. Material und Methoden

Die für diese Arbeit verwendeten Materialien (Chemikalien, Hilfsmittel, Geräte, Apparaturen, kommerziell erhältliche Systeme sowie Proteine, Antikörper, und Enzyme sind im Anhang dieser Arbeit unter Punkt 7.6. aufgeführt.

#### 3.1. Bakterienstämme und Plasmide

##### 3.1.1. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind im Anhang unter Punkt 7.1. aufgeführt.

##### 3.1.2. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind im Anhang unter Punkt 7.3. aufgeführt.

##### 3.1.3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang unter Punkt 7.2. aufgeführt.

#### 3.2. Medien und fakultative Zusätze

Medien, Puffer und Lösungen wurden mit deion. Wasser angesetzt und für 20 min im Tischautoklav bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Thermolabile Substanzen wurden gelöst und steril filtriert. Alle Angaben beziehen sich auf Wasser. Andere Lösungsmittel sind jeweils angegeben. Bei der Herstellung von Plattenmedien wurde den Grundmedien 15 g/l Agar zur Verfestigung zugesetzt (Hübner, 2008).

##### Bakterienmedien

In der Tabelle 3.1 sind die verschiedenen Medien für die Anzucht von *B. subtilis* und *E. coli* angegeben. *B. subtilis* wurde in CSE-Minimalmedium mit verschiedenen Zusätzen

angezogen. Neben Glukose wurden die Zusätze Ribose und Malat verwendet (0,5% w/v). In den jeweiligen Experimenten sind die verwendeten Zusätze angegeben. Für die Anzucht von *E. coli* wurde LB-Medium verwendet. Als Zusätze wurden X-Gal (40 µg/ml), IPTG (0,5 mM) und Glukose verwendet. In den jeweiligen Experimenten sind die verwendeten Zusätze angegeben. Allen Festmedien wurde 1,5% Agar zugesetzt (Landmann, 2011).

**Tabelle 3.1: Bakterienmedien und fakultative Zusätze.**

Medium oder Komponenten	Medienbestandteil	Menge, Volumen oder Konzentration
LB-Medium (1 l) (Sambrock und Russel, 2001)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
5 x C-Salze (1 l)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	80 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16,5 g
100 x '-Salze (1 l)	MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,232 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	12,3 g
1 x CSE-Medium (1l)	5 x C-Salze	200 ml
	Tryptophan (5 mg ml <sup>-1</sup> )	10 ml
	Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml <sup>-1</sup> )	10 ml
	'-Salze	10 ml
	Kaliumglutamat (40%)	20 ml
	Natriumsuccinat (30%)	20 ml
		8 g
SP-Medium (1 l)	Nutrient Broth	
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g
	KCl	1 g
	ad. 1000 ml deion. Wasser	ad 1000 ml
	CaCl <sub>2</sub> (0,5 M)	1 ml
	MnCl <sub>2</sub> (10 mM)	1 ml
	Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml <sup>-1</sup> )	2 ml
MNGE (10 ml) +/-	1x MN-Medium	9,2 ml
	Glukose (20%)	1 ml
	Kaliumglutamat (40%)	50 µl
	Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml <sup>-1</sup> )	50 µl
	Tryptophan (5 mg ml <sup>-1</sup> )	100 µl
	MgSO <sub>4</sub> (1 M)	30 µl
	(10%)	100 µl
10 x MN-Medium (1 l)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	136 g

	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 g
	Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O	10 g
Stärkeplatten	Nutrient-Broth	7,5 g
	Stärke	5 g
X-Gal	X-Gal in DMF	40 mg/ml

### Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen (außer Zeocin: 2000-fach [Invivo Gen]) angesetzt. Ampicillin, Spectinomycin, Lincomycin und Kanamycin wurden dazu in deion. Wasser gelöst, Chloramphenicol, Tetracyclin und Erythromycin in 70% Ethanol. Alle Lösungen wurden steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt. Nach dem Abkühlen der Medien auf ca. 50°C wurden die Antibiotika zu den entsprechenden Endkonzentrationen zugegeben (Hübner, 2009).

#### Selektionskonzentration für *E. coli*:

Ampicillin (Amp)	100 µg ml <sup>-1</sup>
Kanamycin (Kan)	50 µg ml <sup>-1</sup>
[für 2-Hybrid-Analysen]	

#### Selektionskonzentration für *B. subtilis*:

Chloramphenicol (Cm)	5 µg ml <sup>-1</sup>
Erythromycin <sup>1</sup> (E)	2 µg ml <sup>-1</sup>
Kanamycin (Kan)	10 µg ml <sup>-1</sup>
Lincomycin <sup>1</sup> (L)	25 µg ml <sup>-1</sup>
Phleomycin (Phleo)	5 µg ml <sup>-1</sup>
Spectinomycin (Spec)	150 µg ml <sup>-1</sup>
Tetracyclin (Tet)	10 µg ml <sup>-1</sup>
Zeocin (Zeo)	50 µg ml <sup>-1</sup>

<sup>1</sup>Die Selektion auf Erythromycin-Resistenz erfolgt auf eine Mischung aus Erythromycin und Lincomycin in den oben angegebenen Konzentrationen verwendet.

### 3.3. Methoden

#### 3.3.1. Allgemeine Methoden

Eine Zusammenfassung der allgemeinen Methoden, die in der Literatur beschrieben sind und in dieser Arbeit angewendet wurden, ist in Tabelle 3. 2. aufgeführt.

**Tabelle 3.2: Allgemeine Methoden.**

Methoden	Referenz
Absorptionsmessung	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Ethidiumbromidfärbung von DNA	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Fällung von Nukleinsäuren	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Gelelektrophorese von DNA	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Gelelektrophorese von Proteinen (denaturierend)	Laemmli, 1970
Ligation von -Fragmenten	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Proteinmengenbestimmung	Bradford, 1976
Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	Sanger <i>et al.</i> , 1977

#### 3.3.2. Anzucht von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte soweit nicht anders angegeben, in LB-Medium bei 37°C und 200 rpm in Reagenzgläsern, Kolben oder Schikanekolben. Für die Anzucht von *B. subtilis* wurde LB-Medium, CSE-Medium oder MNGE-Medium verwendet. Die Zellen wuchsen bei 37°C oder 28°C und 200 rpm in Reagenzgläsern, Erlenmeyerkolben oder Schikanekolben. Beimpft wurde aus Kryokulturen, von frischen Vereinzlungsplatten bzw. aus Übernachtskulturen. In regelmäßigen Abständen wurde das Wachstum durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Die Messung wurde mit einem Photometer und geeigneter Verdünnung der Zellkulturen gegen eine Leerkontrolle mit dem jeweils verwendeten Medium durchgeführt.

Zur Berechnung der Generationszeit wurde die optische Dichte der Kulturen im Bereich des logarithmischen Wachstums herangezogen. Die Generationszeit (g) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$g = \frac{\lg_2 \times (t_2 - t_1)}{\log K_2 - \log K_1}$$

g	Generationszeit(min)	
t <sub>1</sub>	Zeitpunkt 1 (min)	t <sub>2</sub> Zeitpunkt 2 (min)
K <sub>1</sub>	OD <sub>600</sub> zum Zeitpunkt 1	K <sub>2</sub> OD <sub>600</sub> zum Zeitpunkt 2

### 3.3.3. Dauerkulturen

#### Stammkonservierung von *B. subtilis* und *E. coli*

Zur Konservierung von Bakterienstämmen wurden Kryokulturen angelegt. Es wurden 900 µl einer frischen Übernachtskultur mit 100 µl DMSO gemischt, 5 Minuten ruhen gelassen und bei -70°C eingefroren.

*B. subtilis* wurde zusätzlich in SP-Schrägagarrröhrchen aufbewahrt. Die entsprechenden Stämme wurden in Röhrchen mit Antibiotika ausgestrichen, für 2 Tage bei 37°C bebrütet und im Anschluss bei RT gelagert.

### 3.3.4. Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation (nach Lederberg und Cohen, 1974)

#### Präparation kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen wurde eine Vorkultur des zu transformierenden Stamm in 4 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 U min<sup>-1</sup> inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde eine 1 zu 100 Verdünnung der Vorkultur in 25 ml LB angelegt. Die Hauptkultur wurde bei 37°C und 200 U min<sup>-1</sup> bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,4 wachsen gelassen. Im Anschluss wurde die gesamte Kultur in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und für 20 min auf Eis gestellt. Von diesem Zeitpunkt an müssen die Zellen bis zum Hitzeschock permanent kalt bleiben. Danach wurde die Suspension in einer vorgekühlten Zentrifuge für 15 min bei 4°C und 4000 U min<sup>-1</sup> abzentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurden die Bakterien vorsichtig in 10 ml vorgekühltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Ein weiterer Zentrifugationsschritt der Suspension erfolgte nach einer 20 minütiger Inkubation auf Eis. Nach dem erneuten

dekantieren wurde das Pellet vorsichtig in 0,5 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die *E. coli*-Zellen sind nun kompetent und können mehrere Stunden bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt (Landmann, 2011).

### **Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen**

Zu 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen wurde in etwa 10-100 ng des zu transformierenden Plasmides oder der gesamte Ligationsansatz gegeben. Für die phänotypische Analyse im Two-Hybrid-System wurden jeweils 10 ng Plasmid verwendet. Der Ansatz wurde gemischt und für 20 min auf Eis gestellt. Danach wurde das Reaktionsgefäß für 1,5 min auf 42°C erwärmt und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen für 45 min bei 37°C 200 U min<sup>-1</sup> geschüttelt. Von den Transformationsansätzen wurden jeweils 200 µl und der abzentrifugierte Rest auf entsprechenden LB-Selektionsplatten (mit Ampicillin) ausplattiert (Landmann, 2011).

### **3.3.5. Transformation von *B. subtilis***

#### **Herstellung von kompetenten Zellen**

Zur Herstellung kompetenter *B. subtilis*-Zellen wurde eine Vorkultur des zu transformierenden Stamm in 4 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden jeweils 10 ml MNGE-Medium (mit CAA) mit der Vorkultur zu einer OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und unter Schütteln bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde durch regelmäßige Messung der OD<sub>600</sub> verfolgt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1,3 wurden die Zellen mit gleicher Menge an MNGE-Medium ohne CAA verdünnt. Danach wurden die Zellen für eine weitere Stunde bei 37°C und 200 U min<sup>-1</sup> geschüttelt. Die *B. subtilis*-Zellen sind nun kompetent und können unmittelbar für die Transformation genutzt werden. Optional können die Zellen für mehrere Wochen bei -80°C gelagert werden. Dafür ist eine Glycerinkonzentration von 10% erforderlich. Das Einfrieren der Zellen erfolgt flüssigem Stickstoff (Landmann, 2011).



### **Transformation der kompetenten Zellen**

Für die Transformation von *B. subtilis* wurden 400 µl der kompetenten Zellen verwendet. Zu dieser Bakteriensuspension wurden 0,1-1 µg chromosomale DNA, ca. 500 ng Plasmid-DNA oder der gesamte PCR-Ansatz (LFH-PCR-Produkt) gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C und 200 rpm. Anschließend wurden 100 µl Expressionslösung (500 µl Hefeextrakt [5% w/v], 250 µl CAA [10 w/v], 250 µl deion. Wasser, 50 µl Tryptophan [5 mg/ml]), zupipettiert und für weitere 60 min bei 37°C und 200 U min<sup>-1</sup> geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen auf Selektionsmedium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert (Landmann, 2011).

### **3.3.6. Arbeiten mit DNA**

#### **Aufreinigung von Plasmid-DNA über modifizierte Alkali/SDS-Lyse**

Die Plasmidisolierung wurde mittels alkalischer Lyse und anschließender chromatographischer Aufreinigung durchgeführt. Die Isolation wurde unter Verwendung des Nucleospin-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für „high-copy“ Plasmide wurden 4 ml und für „low-copy“ Plasmide wurden 10 ml einer über Nacht Kultur für die Isolation von Plasmiden verwendet. Die Elution sämtlicher Plasmide erfolgte in 50 µl H<sub>2</sub>O (Landmann, 2011).

#### **Isolierung von chromosomaler DNA aus *B. subtilis***

Die Isolation der chromosomalen DNA aus *B. subtilis* erfolgte mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden). Hierzu wurden 1,5 ml einer in LB-Medium gewachsenen ÜN-Kultur 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 180 µl Lyse-Puffer resuspendiert und 60 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 µl RNase A (20 mg/ml) und einer Inkubation von 10 min bei RT. Alle weiteren Schritte zur Isolation der chromosomalen DNA erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgte in 180 µl H<sub>2</sub>O (Hübner, 2011).

### **DNA-Gelelektrophorese**

Die Größenbestimmung, Kontrolle und Quantifizierung von PCR-Produkten, DNA-Restriktionsfragmenten, chromosomaler DNA und Plasmiden erfolgte mit Hilfe einer Gelelektrophorese. In Abhängigkeit von der DNA-Fragmentgröße wurden 1%-ige bzw. 2%-ige Agarosegele verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in horizontalen Elektrophoresekammern des Typs „Gelkammer Speedy“ der Firma Omnilab durchgeführt. Die Agarosegele hatten eine Dimension von 8,5 cm Länge, 10 cm Breite und waren 3-5 mm dick. Die Agarosegele wurden nach dem Gießen (60°C) durch Abkühlen auf RT verfestigt, die Proben mit DNA-Farbmarker versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gel-Lauf erfolgte bei 100-140 V, bis der DNA-Farbmarker das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Danach wurden die Gele in Ethidiumbromid (EtBr) für 10 min gefärbt, kurz in Wasser entfärbt und anschließend in der Geldokumentationsanlage (BioRad) unter UV Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) analysiert und fotografiert. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wurde der  $\lambda$ -DNA-Marker oder der 1kb-Marker (BioLabs) verwendet.

Die Analyse von präparativen Gelen erfolgte bei 365 nm. DNA-Banden der entsprechenden Größe wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Die Isolation der DNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden). Die Elution sämtlicher DNA erfolgte in 30  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (Hübner, 2008; Landmann, 2011).

### **Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierungen wurden im Göttinger Genomics Laboratory, von der Firma SeqLab in Göttingen sowie LGC in Berlin durchgeführt. Hierfür wurden pro Probe ca. 500-1000 ng Plasmid-DNA sowie 20-30 pMol Primerlösung verwendet. Die erhaltene Sequenz wurde mit Hilfe von Vector NTI analysiert und auf Fehler überprüft.

### **Restriktion und Ligation von DNA**

Die Restriktionen mit Endonukleasen wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Die Enzymmenge und Inkubationsdauer richteten sich nach der eingesetzten DNA-Menge, dem Restriktionsenzym und dem Reaktionsvolumen. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase unter Verwendung des vom Hersteller

mitgelieferten Puffers durchgeführt. Für die Ligation wurden zwischen 100 und 150 ng Vektor-DNA und ein 3-facher Überschuss an Insert eingesetzt. Die Ligrationsreaktion erfolgte für mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Für die Berechnung der bei der Ligation eingesetzten Menge an Insert wurde folgende Formel verwendet (Landmann, 2011).

$$\text{Menge des Inserts (ng)} = \frac{\text{Menge des Vektors (ng)}}{\text{Größe des Vektors (bp)}} \times (3 \times \text{Größe des Inserts (bp)})$$

### **Dephosphorylierung von DNA**

Die Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas) unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Einem Ansatz mit einer DNA-Endkonzentration von ca. 10-40 ng/μl wurden 1 μl FastAP (1000 Units/μl) zugesetzt. Diese Probe wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe des QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Danach konnte der Ansatz direkt für eine Ligation verwendet werden (Landmann, 2011).

### **DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels NanoDrop Spektrometer (PeqLab, Erlangen) bestimmt.

### **Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Generation von PCR-Fragmenten für Klonierung wurde stets mit chromosomaler DNA oder zirkulärer Plasmid-DNA als Matrizen-DNA durchgeführt. PCR-Fragmente für Klonierungsarbeiten wurde stets mit der Phusion-Polymerase (Finnzymes) oder der selbst aufgereinigten PfuS-Polymerase generiert (Landmann, 2011).

Die Annealingtemperatur der Primer wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Annealingtemperatur (}^\circ\text{C)} = (\text{Anzahl A-/T-Nukleotide} \times 2^\circ\text{C}) + (\text{Anzahl C-/G-Nukleotide} \times 4^\circ\text{C}) - 5^\circ\text{C}$$

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

1 µl Primer 1 (20 pmol)


1 µl Primer 2 (20 pmol)

1 µl Matrizen-DNA (ca. 50 ng DNA [Plasmid/chromosomal DNA])

10 µl 5 x *Phusion* HF Puffer0,5 µl *Phusion*-Polymerase (2 U µl<sup>-1</sup>)2 µl dNTPs (12,5 µmol ml<sup>-1</sup>)

34,5 µl deion. Wasser

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	98°C	1 min
31		Denaturierung	98°C
		Annealing	50-60°C
		Primer Extension	72°C
1	Endlauf	72°C	10 min

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt.

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

1 µl Primer 1 (20 pmol)

1 µl Primer 2 (20 pmol)

1 µl Matrizen-DNA (ca. 50 ng DNA [Plasmid/chromosomal DNA])

10 µl 5 x *Phusion* HF Puffer1 µl *Phusion*-Polymerase (2 U µl<sup>-1</sup>)2 µl dNTPs (12,5 µmol ml<sup>-1</sup>)

34 µl deion. Wasser

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	98,5°C	3 min
31	}	Denaturierung	98,5°C
		Annealing	50-60°C
		Primer Extension	72°C
1	Endlauf	72°C	5 min

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt.

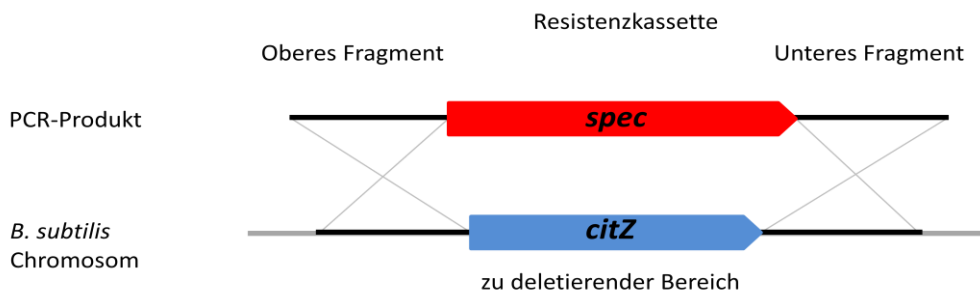
### Aufreinigung von PCR Produkten

Die PCR Ansätze wurden mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

### Long Flanking Homology PCR (LFH-PCR)

Für die Konstruktion einer *citZ* Deletionsmutante von *B. subtilis* wurde die LFH-PCR angewendet. Diese Methode dient der Herstellung linearer DNA-Fragmente zur Konstruktion von Deletionsmutanten mittels so genannter *Allelic-Replacement*-Mutagenese. Die Abbildung 3.1. zeigt schematische die Herstellung einer *citZ* Deletionsmutante. Für die Konstruktion der Deletionsmutante von *B. subtilis* wurde zunächst eine Spectinomycin-Resistenzkassette mit einer Größe von ca. 1,15 kb amplifiziert, welche von der Arbeitsgruppe bereitgestellt wurde. Des Weiteren wurden zwei Primerpaare verwendet, mit denen die flankierenden Bereiche der zu deletierenden Gene amplifiziert werden konnten. Diese Fragmente mit einer Größe von ca. 1000 bp mussten so gewählt werden, dass die Expression der angrenzenden Gene nicht beeinflusst wurde. An das strangaufwärts und an das strangabwärts liegende DNA-Fragment wurde mit dem *reverse* Primer bzw. *forward* Primer jeweils eine 25 Nukleotide lange Sequenz angehängt. Diese Sequenz ist komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende der Resistenzkassette. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. In einer zweiten PCR wurden die strangaufwärts und strangabwärts liegenden DNA-Fragmente und die Resistenzkassette über die 25 Nukleotide lange Sequenz miteinander verbunden und amplifiziert. Hierfür wurde der *forward* Primer des strangaufwärts und der *reverse* Primer des strangabwärts liegenden Fragments benötigt. Die eingesetzte DNA-Menge des oberen und unteren Fragmentes betrug jeweils 150 ng, die der Resistenzkassette etwa 300 ng. Die

Amplifikation der einzelnen Fragmente erfolgte mit Hilfe der *PfuS*-DNA-Polymerase. Der Wildtypstamm von *B. subtilis* wurde direkt mit den erhaltenen PCR-Produkten transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR überprüft. Dazu wurden Primer gewählt, die oberhalb der strangaufwärts und unterhalb der strangabwärts liegenden DNA-Fragmente hybridisieren. Die äußeren Primer wurden mit Primern kombiniert, die innerhalb der Resistenzkassette hybridisieren. Um sicherzustellen, dass bei den beiden PCR-Schritten keine Mutationen eingebaut wurden, erfolgte eine Sequenzierung der bei den Kontroll-PCRs erhaltenen DNA-Fragmente (Diethmaier, 2008).



**Abbildung 3.1: Konstruktion einer *citZ* Deletionsmutante mit Hilfe der LFH-PCR.**

Durch doppelt homologe Rekombination wird das Gen *citZ* durch eine ca. 1,15 kb Spectinomycin-Resistenzkassette ersetzt. Die Mutante GP797 wurde nach diesem Prinzip konstruiert.

#### Programm der LFH-PCR

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	98°C	1 min
10	{	Denaturierung	98°C 10 sek
		Annealing	50-60°C 30 sek
		Primer Extension	72°C 1:15 min
1	Pause	15°C	∞ (Zugabe der Primer)
21	{	Denaturierung	98°C 10 sek
		Annealing	50-60°C 30 sek
		Primer Extension	72°C 1:15 min + 5 sek je Zyklus
		Endlauf	72°C 10 min

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 15°C abgekühlt.

### Markerlose Deletion mit dem Cre/Lox-System

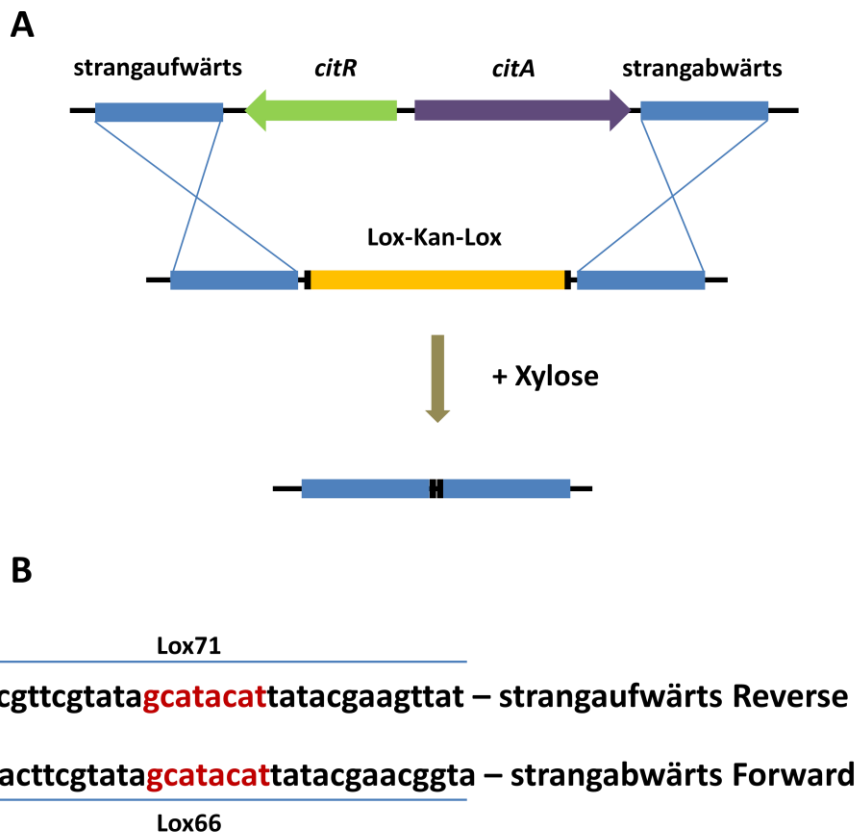
Herkömmliche Deletionen werden in *B. subtilis* mit Hilfe der LFH-PCR hergestellt. Dabei wird das zu deletierende Gen mit einer Antibiotikaresistenzkassette ausgetauscht. Der Nachteil dieser Methode ist die Anzahl der aufeinanderfolgenden Deletionen. Bisher war es nicht möglich, mehr als 6 Bereiche in einem Stamm zu deletieren, da nicht ausreichend Resistenzmarker zur Verfügung stehen.

Das Cre/Lox-System nutzt die Fähigkeit der Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1, eine spezifische 34 bp Sequenz zu erkennen, zu schneiden und zu rekombinieren. Bei der markerlosen Deletion wird eine Xylose induzierbare Cre-Rekombinase und eine Kanamycin Resistenzkassette, die von der Erkennungssequenz der Rekombinase flankiert ist, genutzt (Kumpfmüller *et al.*, 2013). Die Abbildung 3.2. zeigt schematisch die markerlose Deletion mit dem Cre/Lox-System.

Für die Konstruktion einer *citRA* Deletionsmutante von *B. subtilis* wurde das Cre/Lox-System angewendet. Für die Konstruktion der Deletionsmutante von *B. subtilis* wurde zunächst eine Kanamycin-Resistenzkassette, flankiert von den Lox71 und Lox66 Sequenzen mit einer Größe von ca. 1,56 kb amplifiziert. Das Plasmid pGP2514 dient als Matrize. Des Weiteren wurden zwei Primerpaare verwendet, mit denen die flankierenden Bereiche der zu deletierenden Gene amplifiziert werden konnten. Diese Fragmente mit einer Größe von ca. 1000 bp mussten so gewählt werden, dass die Expression der angrenzenden Gene nicht beeinflusst wurde. An das strangaufwärts und an das strangabwärts liegende DNA-Fragment wurde mit dem *reverse* Primer bzw. *forward* Primer jeweils eine 35 Nukleotide lange Sequenz angehängt. Diese Sequenz ist komplementär zu der Lox61 und Lox77 Sequenz des 5'- bzw. 3'-Endes der Resistenzkassette. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. In einer zweiten PCR wurden die strangaufwärts und strangabwärts liegenden DNA-Fragmente und die Resistenzkassette über die 35 Nukleotide lange Sequenz miteinander verbunden und amplifiziert. Hierfür wurde der *forward* Primer des strangaufwärts und der *reverse* Primer des strangabwärts liegenden Fragments benötigt. Die eingesetzte DNA-Menge des oberen und unteren Fragmentes betrug jeweils 150 ng, die der Resistenzkassette etwa 300 ng. Die Amplifikation der einzelnen Fragmente erfolgte mit Hilfe der *PfuS*-DNA-Polymerase. Der Empfänger-Stamm von *B. subtilis* wurde direkt mit den erhaltenen PCR-Produkten transformiert.

Im Anschluss wurde die Resistenzkassette mit Hilfe der Cre-Rekombinase herausgeschnitten. Dazu wurden zunächst die erhaltenen Transformanten vereinzelt. Von dieser Vereinzlungsplatte wurde fünf Kolonien über Nacht in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angezogen. Am darauf folgenden Tag wurde eine 1 zu 100 Verdünnung der Vorkultur in 10 ml LB mit 0,5% Xylose angelegt. Die Zellen wurden bei 37°C und 200 rpm angezogen. Xylose induziert die Expression der Cre-Rekombinase, welche die Kanamycinresistenzkassette aus dem Chromosom entfernt. Bei einer  $OD_{600}$  von ca. 0,4 wurden die Zellen auf  $10^{-6}$  verdünnt und auf SP-Medium ausplattiert. Am nächsten Tag wurden Kolonien gepickt und auf SP-Platten mit und ohne Kanamycin ausgestrichen. Dabei wird auf Verlust des Wachstums auf Kanamycin untersucht. Kolonien, die nur auf SP-Medium wachsen können, haben die Kanamycinresistenzkassette verloren. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels PCR überprüft. Dazu wurden Primer gewählt, die oberhalb der strangaufwärts und unterhalb der strangabwärts liegenden DNA-Fragmente hybridisieren. Als Kontrolle dient der Wildtyp. Ein Größenunterschied der erhaltenen PCR-Fragmente zeigt die erfolgreiche Deletion der *citRA*-Region. Im nächsten Schritt erfolgte eine Sequenzierung der bei den Kontroll-PCRs erhaltenen DNA-Fragmente.





**Abbildung 3.2: Konstruktion einer *citRA* Deletionsmutante mit Hilfe des Cre/Lox-System.**

A) Durch doppelt homologe Rekombination wird der *citRA*-Lokus durch eine ca. 1,5 kb Kanamycin-Resistenzkassette, die von der Lox61 und Lox77 Sequenz flankiert ist, ersetzt. Nach Induktion der Expression der Cre-Rekombinase durch Xylose wird die Resistenzkassette herausgeschnitten. Die Mutante GP1755 wurde nach diesem Prinzip konstruiert. B) Zeigt die Lox71 und Lox66 Sequenz, die an die Primer für die flankierenden Bereiche angehängt werden. Die beiden Lox-Sequenzen bilden einen „Loop“; an dem die Cre-Rekombinase bindet. In rot sind die Rekombinase Bereiche markiert.

### **Einfügen von Genmutationen mittels kombinierter Kettenreaktion (CCR)**

Zur Einführung von einer oder mehreren Punktmutationen in das Gen *crh* bzw. *mgsA* wurde die kombinierte Kettenreaktion (Bi und Stambrook, 1998) verwendet. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Einführung der Punktmutationen und die Amplifikation des mutagenisierten Fragments in nur einem Schritt erfolgen. Es erfolgt sowohl eine Polymerasekettenreaktion als auch eine Ligation. Zur Ligrationsreaktion werden am 5´-Ende phosphorylierte Oligonukleotide und eine thermostabile Ligase (Ampligase, Biozym) benötigt. Die Abbildung 3.3. zeigt schematisch das Einfügen einer Genmutation in ein DNA-Fragment (Landmann, 2011).

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

2 µl Primer 1 (20 pmol)

2 µl Primer 2 (20 pmol)

4 µl Mutageneseprimer (20 pmol)

1 µl Matrizen-DNA (ca. 100 ng)

5 µl 10 x CCR Puffer

2 µl *Accuzyme*-Polymerase (2,5 U µl<sup>-1</sup>)1 µl dNTPs (12,5 µmol ml<sup>-1</sup>)

2 µl BSA (10 mg/ml)

3 µl *Ampligase*® (15 U)

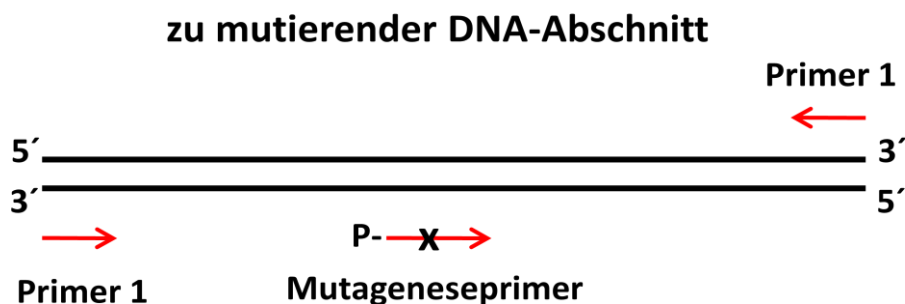
29 µl deion. Wasser

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Programm der CCR für *Accuzyme*-Polymerase

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	95°C	5 min
31	{ Denaturierung Annealing Primer Extension	95°C	30 sek
		50-60°C	30 sek
		65°C	1 kb/3 min
1	Endlauf	65°C	10 min

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 15°C abgekühlt.



**Abbildung 3.3: Schema der kombinierten Kettenreaktion zur ortsspezifischen Mutagenese.**

Der Mutageneseprimer trägt in der Mitte ein nicht zur Matrize komplementäres Nukleotid (dargestellt durch ein schwarzes X)

## Kolonie PCR

Die Kolonie PCR wurde zur Überprüfung auf Vorhandensein bestimmter DNA-Abschnitte in *E. coli*-Zellen verwendet. Vorzugweise wurde die Kolonie-PCR mit einem Primer, der im Vektor hybridisiert und einem Primer, der mit dem gewünschten DNA-Abschnitt hybridisiert, verwendet. Auf dieser Weise kann zusätzlich auf die korrekt eingebaute DNA überprüft werden. Dazu wurden Einzelkolonien von LB-Agar Platte gepickt und in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. 1 µl dieser Verdünnung wurde für die PCR-Reaktion eingesetzt.

### Reaktionsansatz für die *Taq*-Polymerase (40 µl):

1 µl Primer 1 (100 µM)

1 µl Primer 2 (100 µM)

1 µl Matrizen-DNA (Verdünnung einer Einzelkolonie)

4 µl 10 x *Taq*-Polymerase Puffer


1 µl *Taq*-Polymerase (5 U µl<sup>-1</sup>)

1 µl dNTPs (12,5 µmol ml<sup>-1</sup>)

30 µl deionisiertes Wasser

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

### Programm für *Taq*-Polymerase

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	96°C	5 Min
31		Denaturierung	96°C
		Annealing	50-60°C
		Primer Extension	72°C
1	Endlauf	72°C	10 Min

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 15°C abgekühlt.

**Error-Prone-PCR (nach Zhou *et al.*, 1991)**

Die Error-Prone-PCR folgt dem gleichen Prinzip wie eine Standard-PCR mit dem Unterschied, dass hier eine ungerichtete Mutagenese stattfindet.

Durch eine vierfach geringere Konzentration an dNTPs kommt es schnell zu einer Verarmung an Nuklotiden und es werden somit falsche Basen in die DNA-Kopien eingebaut. Durch den Einsatz einer *Taq*-Polymerase, welche kein Proof-Reading besitzt, wird die Korrektur der falsch eingebauten Basen verhindert (Behrens, 2012).

Reaktionsansatz für eine Error-Prone-PCR (50 µl)

1 µl Primer 1 (100 µM)

1 µl Primer 2 (100 µM)

3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

0,5 µl Matrizen-DNA

5 µl 10 x *Taq*-Polymerase Puffer


1 µl *Taq*-Polymerase (5 U µl<sup>-1</sup>)

0,2 µl dNTPs (2 mM)

39,3 µl deionisiertes Wasser

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Programm für *Taq*-Polymerase

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	96°C	5 Min
31		Denaturierung	96°C
		Annealing	50-60°C
		Primer Extension	72°C
1	Endlauf	72°C	10 Min

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 15°C abgekühlt.

### Lösungen für das Arbeiten mit DNA

Sämtliche Lösungen die für das Arbeiten mit DNA benötigt werden sind in Tabelle 3.3. aufgeführt.

Tabelle 3.3: Lösungen für das Arbeiten mit DNA.

Medium oder Komponenten	Medienbestandteil	Menge, Volumen oder Konzentration
Agarosegel 1% für DNA-Gelelektrophorese	Agarose	1% (w/v) Agarose in 1x TAE
5 x -Farbmarker für DNA-Gelelektrophorese	Glycerin (100%)	5 ml
	deion. Wasser	4,5 ml
	TAE (50x)	200 µl
	Bromphenolblau	0,01 g
	Xylencyanol	0,01 g
50 x TAE-Puffer für DNA-Gelelektrophorese	Tris	2 M
	Essigsäure (100%)	57,1 ml
	EDTA	100 ml Na <sub>2</sub> -EDTA pH 8,0 (0,5M)
dNTP-Lösung für PCR	dNTP's	12,5 mM (jedes Nukleotid)
CCR-Puffer für PCR	Tris	
	MgCl <sub>2</sub>	200 mM Tris-HCl pH 8,5
	KCl	30 mM
	NAD <sup>+</sup>	500 mM 5 mM
Lyse-Puffer (5ml) für Isolation chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i>	Lysozym	
	Tris	100 mg
	EDTA	100 µl Tris-HCl pH 8,0 (1M)
	ad. 5 ml deion. Wasser	20 µl EDTA pH 8,0 (0,5M) ad 5 ml
RNase A für Isolation chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i>	RNase A	20 mg/ml

### 3.3.7. Arbeiten mit Proteinen

#### Zellaufschluss mit der French Press

Für den Zellaufschluss mit der French Pressure Cell wurden die Pellets aus 1 l Kulturvolumen in maximal 10 ml (große Bombe) kaltem ZAP resuspendiert. Pellets aus einem Kulturvolumen von 50 ml wurden in 1 ml kaltem ZAP resuspendiert. Die gekühlte Bombe wurde mit der Bakteriensuspension gefüllt, anschließend verschlossen und nach dem Herausdrücken der Luft und der Schließung des Ablassventils in die French Pressure Cell eingespannt. Bei *E. coli*-Stämmen wurden zwei und bei Bacillus-Stämmen mindestens drei Aufschlussvorgänge durchgeführt. Wurde die kleine Bombe verwendet, so erfolgte der Zellaufschluss in der SLM Aminco 2-FA-078-E1 French Press Cell (SLM Aminco). Wurde die große Bombe verwendet, so erfolgte der Aufschluss entweder in der SLM Aminco 2-FA-078-E1 French Press Cell (SLM Aminco) oder der HTU-Digi-French Pressure Cell F-10 (Fa. G. Heinemann). Der Druck wurde auf 1000 psi eingestellt. Wurde der Aufschlussvorgang mit der kleinen Aufschlussbombe durchgeführt, so wurde bei der SLM Aminco 2-FA-078-E1 French Press Cell der Hebel auf Medium gestellt. Bei der großen Aufschlussbombe wurde der Hebel auf High gestellt. Wurden Proteinaufreinigungen durchgeführt, so erfolgte nach dem Aufschluss ein Zentrifugationsschritt mit der Heraeus-Tischzentrifuge (20 min, 4°C, 8000 rpm) und eine Ultrazentrifugation (FiberLite Rotor F50L-8x39, 1 h, 4°C, 35000 rpm) (Landmann, 2011).

#### Überproduktion von Proteinen

Zur Überexpression von Proteinen wurde 1 l LB-Medium mit 10 ml einer Übernachtskultur von einem Stamm, der das entsprechende Überexpressionsplasmid trug, angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 erfolgte, falls erforderlich, die Induktion der Genexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG. Zur Überprüfung der Überproduktion wurde vor der Induktion und vor der Zellernte je eine Probe entnommen. Die Proben wurden per SDS-PAA-Gel analysiert. Die Kultur wurde 2 bzw. 3 h nach der Induktion geerntet und 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren des Pellets in 15 ml kaltem ZAP-Puffer wurde erneut für 20 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden bis zur Weiterverwendung bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden mit Hilfe der French Press. Zum Abtrennen der Zelltrümmer

wurde das Gemisch in der Ultrazentrifuge 1 h bei 4°C bei 32000 U/min zentrifugiert (Braun, 2009).

### **Aufreinigung von Proteinen über Ni<sup>2+</sup>-NTA Säule**

Zur Aufreinigung der Proteine mit einer C- oder N-terminalen Hexahistidin-Sequenz wurden Poly-Prep-Chromatographie-Säulchen (BIO-RAD, München) verwendet. Dabei wurde die Säule zunächst mit 4 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA Superflow (QIAGEN, Hilden) beladen und dann mit 20 ml ZAP äquiliert. Das Proteinrohlysat wurde über die Matrix gegeben. Mit steigender Imidazolkonzentration im Puffer (10 mM, 20 mM, (je 20 ml); 50 mM, 80 mM 100 mM 120 mM und 250 mM (je 8 ml) Imidazol) wurden zunächst unspezifisch bindende Proteine abgewaschen und danach das *His*-tag-tragende Protein eluiert. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden auf einem SDS-PAA-Gel mit anschließender Färbung mit Coomassie-Brilliantblau auf Zusammensetzung und Reinheit überprüft. Die Fraktionen, die aufgereinigtes Protein enthielten, wurden ÜN dialysiert und anschließend mittels Bradford-Reagenz auf ihre Proteinkonzentrationen getestet (Hübner, 2009; Bradford *et al.*, 1976).

### **Aufreinigung über Strep-Tactin-Sepharose® Säule**

Die Überexpression und der Zellaufschluss mittels French Press wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Für die Aufreinigung der Proteine mit einem Strep-Tag wurde die Poly-Prep-Chromatographie-Säule (Bio-Rad, München) mit 1 ml Streptactin-Sepharose (IBA) verwendet. Diese Matrix bindet spezifisch eine Sequenz von acht Aminosäuren, den Strep-Tag (WSHPQFEK). Die Bindung kann durch eine Verdrängungsreaktion mit D-Desthiobiotin wieder aufgehoben werden. Dadurch können Proteine, die diesen Tag C- oder N-terminalen tragen, aus einem Proteingemisch isoliert werden. Zuerst wurde die Säule mit 15 ml Puffer W äquiliert. Dann konnte die Säule mit 10 ml Proteinrohextrakt beladen werden. Zum Waschen der Säule wurden 4 mal 2,5 ml Puffer W verwendet. Das gebundene Protein konnte dann mit 3 ml Puffer E in Fraktionen von je 1 ml eluiert werden. Die bei der Elution erhaltenen Fraktionen wurden, wie oben beschrieben, überprüft. Die Untersuchung der Aufreinigung von Proteinen mittels Massenspektrometrie erfolgte wie beschrieben (Hübner, 2009).

### **Dialyse von Proteinen**

Die über einen Hexahistidin- oder Strep-Tag an die Chromatographie-Säule gebundenen Proteine werden durch Imidazol bzw. Desthiobiotin von der Säule abgelöst. Diese Substanzen können weitere Versuche mit dem aufgereinigten Protein negativ beeinflussen. Um das Imidazol bzw. Desthiobiotin aus der Proteinpräparation zu entfernen, wurden die Elutionsfraktionen in einem Dialyseschlauch (Ausschlussgröße: 5 kDa) gegen ZAP-Puffer zweimal je 24 h bei 4°C dialysiert. Das Volumen des Dialysepuffers betrug mindestens das 1000-fache der zu dialysierenden Proteinlösung (Landmann, 2011).

### **Denaturierende Polyacrylamid-Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Denaturierende Proteingele wurden nach der Methode von Laemmli *et al.*, (1970) hergestellt. Verwendet wurden das System von Bio-Rad (Bio-Rad Mini-Protean®) und die Apparatur für große Gele von Hoefer (SE-400). Die denaturierenden Gele bestanden aus Trenn- und Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.7.). Wurde die Bio-Rad-Apparatur verwendet, so wurden Gele mit einer Dicke von 1 mm gegossen. Diese Gele hatten eine Größe von 10,1 x 7,3 cm. Die Länge des Trenngels betrug hierbei 6 cm und die des Sammelgels ca. 1 cm. Bei der Hoefer-Apparatur (große Gele) betrug die Länge des Trenngels ca. 11,5 cm und die des Sammelgels ca. 2 cm. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (5 x Lämmli) versetzt und vor der Auftragung 20 min auf 99°C erhitzt. Wurde die Bio-Rad-Apparatur verwendet, so erfolgte der Lauf der Proteingele bei maximal 140 V für etwa 1,5 h. Bei der Hoefer-Apparatur (große Gele) erfolgte der Einlauf bei 90 V und der Hauptlauf bei 180 V. Lief das Gel über Nacht so wurden 35 V an die Apparatur angelegt. Sofern nicht anders angegeben wurden 12 oder 15%-ige Gele genutzt (Landmann, 2011).

### **Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Proteingelelektrophorese (blue-native-Page)**

Bei der nicht-denaturierenden Blau Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine in nativem Zustand nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dadurch ist die Analyse des Molekulargewichtes und des Oligomerisierungsstatus möglich. Durch die Zugabe von Commassie Brilliant Blue G250 wird den zu untersuchenden Proteinen eine einheitliche negative Ladung verliehen, der native Zustand wird jedoch beibehalten. Anders als bei der SDS-Page fungiert Histidin anstatt Glycin als dipolare ionische Pufferkomponente. Es wurden



zwischen 1 und 5 µg gereinigtes Protein über ein 5 – 24 %-iges nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt (Niepmann & Zheng, 2006). Der Gellauf erfolgte in der Bio-Rad-Apparatur bei 4°C und 20 V/cm für 10 h. Für die Gele wurde das System von Bio-Rad (Bio-Rad Mini Protean®) verwendet. Die nativen Gele hatten eine Größe von 10,1 x 7,3 cm. Zur Visualisierung der Proteine erfolgte anschließend eine Silberfärbung (Mehne, 2013).

### **Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen**

Die zu färbenden Polyacrylamid-Gele wurden zunächst für 10 min in Fixierlösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Inkubation in der Färbelösung. Das Gel wurde im Entfärber geschwenkt bis ein optimaler Kontrast zwischen Proteinbanden und Gelhintergrund erreicht war. Die Verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3.7. aufgeführt (Landmann, 2011).

### **Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen**

Bei der Silberfärbung handelt es sich um eine der sensitivsten Färbemethoden für Polyacrylamid-Gele, die sich besonders zur Überprüfung der Reinheit und zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen eignet. Ihr Vorteil liegt in der hohen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze ca. 5 ng Protein pro Bande). Die Nachteile der Silberfärbung bestehen jedoch darin, dass sie nicht genau reproduzierbar und nicht quantifizierbar ist, was mit der Physik der Anhäufung von Silberpartikeln zusammenhängt (Butcher und Tomkins, 1985). Die Proteinbanden wurden in Anlehnung an die Methode nach Nesterenko (1994) Silber gefärbt. Dazu wurden die Polyacrylamid-Gele mit folgenden Lösungen in angegebener Reihenfolge auf dem Schüttler inkubiert (Tabelle 3.4.) (Commichau *et al.*, 2006).

**Tabelle 3.4: Schritte und Lösungen für die Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen.**

<b>Methode</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Dauer</b>
Fixieren	Fixierer	1 bis 24 h
Waschen	Ethanol 50%	3 x 20 min
Reduzieren	Thiosulfatlösung	1 min 30 sek
Waschen	ddH <sub>2</sub> O	3 x 20 sek
Färben	Imprägnierer	30 min
Waschen	ddH <sub>2</sub> O	2 x 20 sek
Entwickeln	Entwickler	bis zur ausreichenden Färbung
Waschen	ddH <sub>2</sub> O	20 sek
Abstoppen	Stopplösung	5 min

### **Western Blot-Analyse**

Der Blot von Proteinen auf die PVDF-Membran erfolgte in einer Semi Dry Blot Apparatur. Die Gele wurden nach der Elektrophorese zunächst 30 sek in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol (100%) und anschließend 5 min in Transferpuffer inkubiert. Für die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wurde das Polyacrylamidgel und die Membran zwischen je drei zuvor in Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere gelegt. Nach dem einstündigen Transfer bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> wurde die PVDF-Membran zwischen 30 min und 3 h in Milchblockinglösung (Blotto) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit polyklonalen Antikörper gegen die entsprechenden Proteine. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3.5. aufgeführt. In der Antikörperlösung wurde die PVDF-Membran entweder 3 h oder über Nacht inkubiert. Nach 3 Waschschritten von je 30 min in Blotto erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG, alkalische Phosphatase gekoppelt), der 1:100000 in Blotto verdünnt zum Einsatz kam. Nach 3 weiteren 30 minütigen Waschschritten mit Blotto wurde die Membran in deion. Wasser gespült und anschließend zur Erhöhung des pH-Wertes 5 min in Puffer III inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der Proteine unter Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates CDP\*. Der Chemocom Lumineszenzdetektor (Intas) wurde zur Dokumentation der Signale verwendet (Mehne, 2013).

Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper.

Protein	Verdünnung	Referenz	Charge
Crh	1:10000	Wolfgang Hillen und Susanne Werner; Erlangen	Anti-Rabbit Conjugate
HPr	1:10000	W. Hengstenberg, Bochum	Anti-Rabbit Conjugate
Flag-Tag	1:10000	Sigma, München	Anti-Rabbit Conjugate
Strep-Tag	1:1000	PromoKine, Heidelberg	Anti-Rabbit Conjugate #PK-AB718-4217
His-Tag	1:1000	<a href="http://www.antibodies-online.de">www.antibodies-online.de</a>	Anti-Rabbit Conjugate #ABIN398410
Secondary antibody ( $\alpha$ IgG gekoppelt mit AP)	1:100000	Promega, Madison (USA)	Anti-Rabbit Conjugate

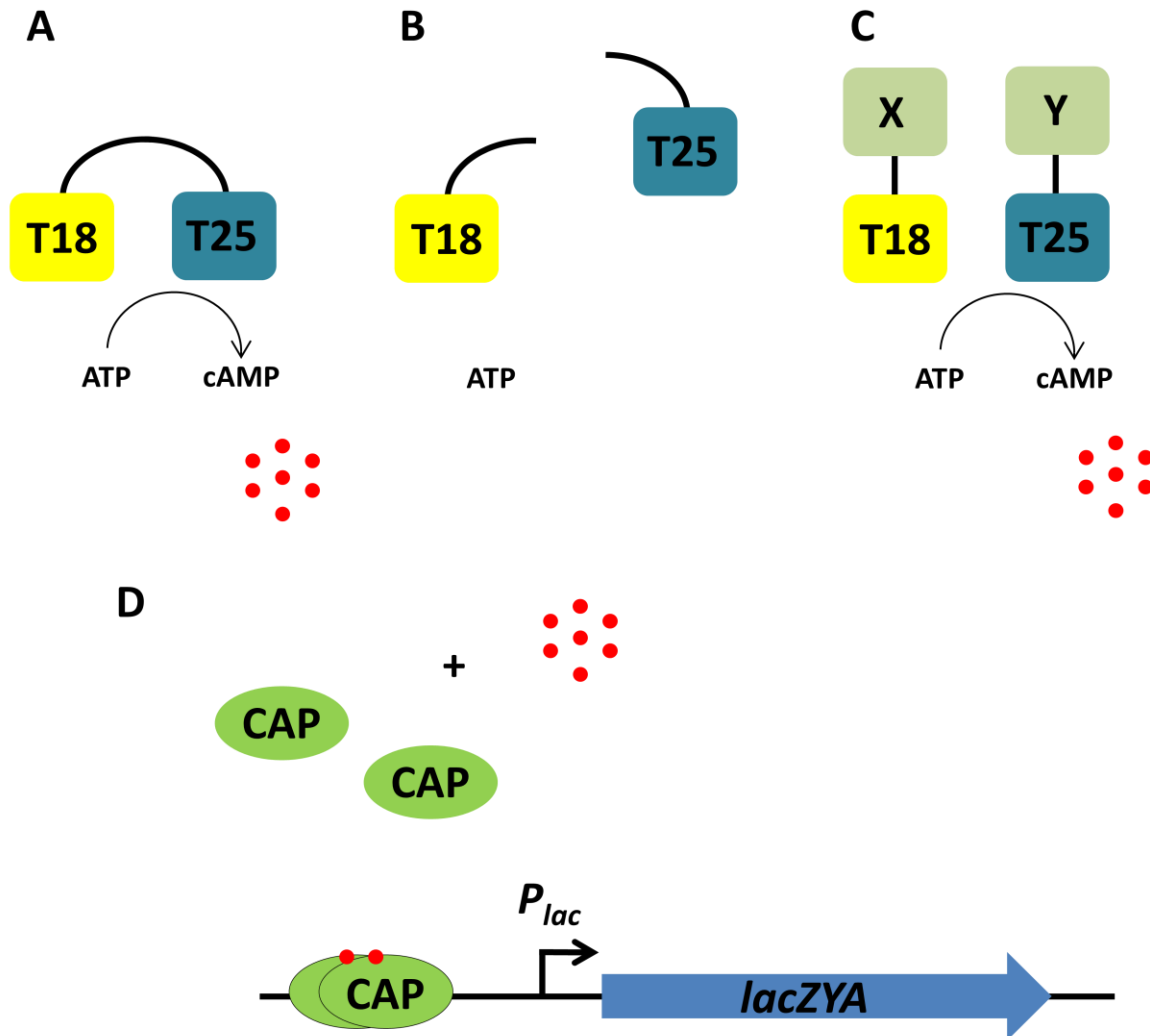
### 3.3.8. Analyse von Protein-Protein Interaktionen

Der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen erfolgte mittels Two-Hybrid- und BS3-cross-Linker-Analysen.

#### Bakterielles Adenylatzyklase Two-Hybrid-System

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde das bakterielle Adenylatzyklase Two-Hybrid-System verwendet (Karimova *et al.*, 1998). Dieses System basiert auf der Rekonstruktion der Adenylatzyklase-Aktivität in *E. coli* (siehe Abbildung 3.4.). In diesem Two-Hybrid-System wird die Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis* verwendet, die aus den zwei Domänen T18 und T25 besteht. Werden die zwei Domänen mit Proteinen verknüpft, die interagieren, so kommt es zur funktionellen Komplementation der Adenylatzyklase. Das dann von der Adenylatzyklase synthetisierte cAMP bindet sich an das Kataboliten-Aktivatorprotein CAP und der cAMP/CAP-Komplex aktiviert daraufhin das Reportergen *lacZ*. Die Stärke der Interaktion spiegelt sich somit in der Expression des *lacZ*-Gens wieder.

Zur Detektion der Interaktion wurden die zu untersuchenden Proteine sowohl C- als auch N-terminal mit den Domänen der Adenylatzyklase fusioniert. Für die Klonierung wurden vier verschiedene Vektoren verwendet. Die Plasmide pUT18 und p25N ermöglichen die Expression von Proteinen, die N-terminal an die T18- bzw. T25-Domäne fusioniert sind, die Plasmide pUT18C und pKT25 ermöglichen die Expression von Proteinen, die C-terminal an die T18- bzw. T25-Domäne fusioniert sind. Bei den Plasmiden pUT18 und pUT18C handelt es sich um high-copy Vektoren (ori ColEI), bei den Plasmiden p25N und pKT25 um low-copy Vektoren (ori p15A) (Claessen *et al.*, 2008). Die Primer für die Amplifikate, die in die Vektoren pKT25 und pUT18C kloniert wurden, wurden so entworfen, dass das entsprechende Fusionsgen mit einem Stoppkodon endet. Die amplifizierten Genprodukte und die Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XbaI* verdaut und anschließend ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde der Stamm XL1-blue transformiert. In diesem Stamm wird das Gen *lacI* stark exprimiert, so dass die Expression der Fusionsproteine verhindert wird. Anschließend wurden die beiden entsprechenden Plasmide in den Stamm BTH101 kotransformiert. Dieser Stamm besitzt keine eigene Adenylatzyklase. Bei Phänotyp-Analysen wurde die Kotransformation mit jeweils 10 ng Plasmid in Mikrotiterplatten durchgeführt. Zu den Plasmiden wurden jeweils 30 µl kompetente Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation über einen Zeitraum von 30 min auf Eis. Der anschließende zweiminütige Hitzeschock erfolgte bei 42°C. Anschließend wurden 120 µl LB-Medium zu den Zellen gegeben und es folgte eine zweistündige Inkubation bei 30°C. Jeweils 4 µl der Zellen wurden auf Selektionsmedium (40 µg/ml X-Gal, 0,5 mM IPTG, 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Ampicillin) gespottet. Die Platten wurden für 36 h bei 30°C inkubiert. Interagierende Proteine konnten anhand der Spaltung von X-Gal und der dabei auftretenden Blaufärbung erkannt werden. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich die Plasmide pKT-zip und pUT18C-zip kotransformiert. Diese Plasmide kodieren für ein Leucin-Zipper-Motiv und weisen eine starke Interaktion auf. Als Negativkontrolle wurden die Leervektoren verwendet (Meyer, 2009).



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

A) Die katalytische Domänen der Adenylatzyklase sind für die Synthese des cAMP verantwortlich. B) Die Domänen der Adenylatzyklase sind im getrennten Zustand inaktive. C) Fusioniert mit zwei interagierenden Protein (X, Y) wird die Aktivität wiederhergestellt. D) Durch die Bildung von cAMP wird das Reportergen transkribiert.

### ***In vitro* Vernetzung von Proteinen mit BS3 zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen**

Die Vernetzung von Proteinen mit Hilfe von Bissulfosuccinimidyl suberate (BS3) wurde zur Analyse der Interaktion von Crh und MgsA eingesetzt. Bei dieser Methode werden *in vitro* eng benachbarte Lysine (ein Abstand von etwa 10 Å) irreversibel miteinander verknüpft. Die Analyse der vernetzten Proteine erfolgt per Polyacrylamid-Proteingelelektrophorese. Im Anschluss können mögliche Protein-Komplexe mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert werden.

Für das Experiment wurden zunächst Strep-MgsA und Crh-His wie in Abschnitt 3.3.7. beschrieben aufgereinigt, im Verhältnis 1:1 gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde eine Proteinkonzentration von 25 pmol eingestellt. Danach wurden die Proben mit aufsteigender Konzentration an BS3 vermengt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle dient eine Probe, die nicht mit BS3 behandelt wird. Ein mögliches Pipettierschema ist der Tabelle 3.6. zu entnehmen. Während der Inkubationszeit bilden sich stabile Amid-Verbindungen aus, die nicht aufgehoben werden können. Es ist darauf zu achten, dass BS3 in Wasser gelöst sehr instabil ist. Daher sollte die BS3-Lösung vor jedem Versuch neu angesetzt werden. Im Anschluss werden die Proben mit Loading Dye und 1.25 µl einer 1 M DTT Lösung versetzt. Es folgt ein Inkubationsschritt für 10 min bei 70°C. Danach werden die Proben mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Die Gele können mit Coomassie Brilliant Blau oder Silbernitrat angefärbt werden. Banden, die auf einen Proteinkomplex hindeuten wurden sorgfältig ausgeschnitten. Die Interaktionsflächen möglicher Komplexe können so per Massenspektrometrie identifiziert werden.

**Tabelle 3.6:** Pipettierschema für das Vernetzen von Protein mit BS3 *in vitro*.

Verhältnis BS3/Protein	BS3			Protein		Puffer (Hepes- Puffer)
	Menge (pmol)	Konzentration (µg/µl)	Volumen (µl)	Menge (pmol)	Volumen (µl)	
0	0	0	0	25	10	7350
5	125	0,05	1,428	25	10	6,071
10	250	0,1	1,428	25	10	6,071
25	625	0,1	3,571	25	10	3,929
50	1250	0,5	1,428	25	10	6,071
100	2500	0,5	2,857	25	10	4,643
200	5000	1,0	2,857	25	10	4,643

### **Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse von Protein-Protein Komplexen**

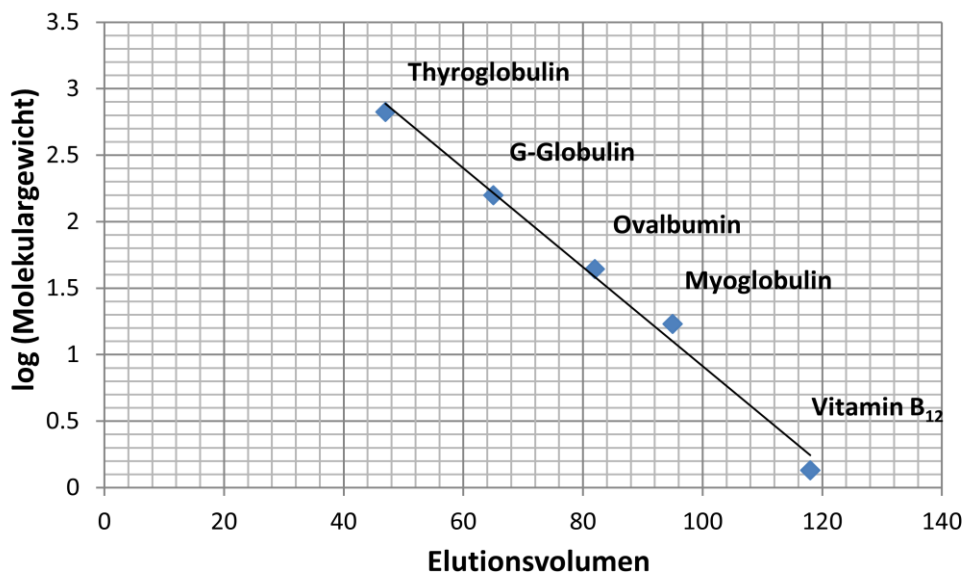
Die massenspektrometrische Analyse von Protein-Protein-Komplexen wurde am MPI für Biophysikalische Chemie durchgeführt.

Das Herausschneiden von Banden aus dem Polyacrylamidgel erfolgte wie oben beschrieben. Im Anschluss erfolgt die Extraktion von Proteinen aus den erhaltenen Proben. Zunächst werden die Gelstücke mit H<sub>2</sub>O für 5 min bei 26°C und 1050 rpm gewaschen. Der Überstand wurde nach einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt vorsichtig mit einer gelben Spitze abgenommen und verworfen. Im nächsten Schritt werden die Proben mit Acetonitril behandelt. Dadurch wird den Gelen das Wasser entzogen. Die Inkubation erfolgt mit 150 µl Acetonitril für 15 min bei 26°C und 1050 rpm. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird auch dieser Überstand verworfen. Im Anschluss werden die Proben in der SpeedVac getrocknet. Durch Zugabe von 100 µl 10 mM DTT werden sämtliche Disulfidbrücken in den Proben reduziert. Dies ist nötig, da Disulfidbrücken das Flugverhalten der Peptide im elektrischen Feld bei der massenspektrometrischen Analyse beeinflussen. Die Proben werden erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgt eine weitere Behandlung mit Acetonitril (siehe oben). Im nächsten Schritt wurden die Proben mit NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> für 15 min bei 26°C und 1050 rpm behandelt. Dies dient dazu, den pH-Wert der Proben zu erhöhen. Der optimale pH-Wert für Peptidasen liegt im leicht basischen Bereich. Nach dem Trocknen der Gelstücke mit Acetonitril und der SpeedVac, sind die Proben bereit für den Verdau mit Trypsin.

Zunächst werden die Proben für 45 min bei 4°C mit 15 µl Trypsin-Puffer I rehydratisiert. Der Verdau der Proben erfolgt über Nacht bei 37°C nach Zugabe von 15 µl Trypsin-Puffer II. Am folgenden Tag werden die Proben mit 15 µl H<sub>2</sub>O und 50 µl Acetonitril versetzt und für 15 min bei 37°C und 1050 rpm inkubiert. Der Überstand, in dem sich die Peptide befinden, wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Die Behandlung der Gelstücke mit 50 µl Acetonitril wird wiederholt, um die Ausbeute an Peptiden zu erhöhen. Im Anschluss wird der Überstand vereinigt und die Peptide in der SpeedVac eingedampft.

## Molekulargewichtsbestimmung von Protein und Protein-Komplexen mittels analytischer Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration ist eine Methode, um das Molekulargewicht von Proteinen und Protein-Komplexen zu bestimmen. Daraus können Rückschlüsse auf den Oligomerisierungsstatus bzw. Heteromerisierungsstatus gezogen werden. Im Fall von globulären Proteinen besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem relativen Elutionsvolumen ( $V_E/V_0$ ). Mit Hilfe von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht (Gel Filtration Standard, Bio-Rad) wurde eine Standardkurve erstellt, die zur Berechnung des Molekulargewichtes des zu untersuchenden Proteins oder Protein-Komplex verwendet wurde. Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex™ 200 16/600 Säule (GE Healthcare) und dem Äkta Purifier System durchgeführt. Die Säule wurde vorher mit Hepes-Puffer äquilibriert. Ni<sup>2+</sup>-NTA- oder Strep- gereinigte Proteine wurde anschließend auf die Säule gegeben. Abbildung 3.5. zeigt die berechnete Standardgerade der Eichproteine (Mehne, 2013).



**Abbildung 3.5: Standardkurve der analytischen Gelfiltration an einer Superdex™ 200 16/600.** Berechnete Standardgerade durch die Auftragung des Elutionsvolumen gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes der eingesetzten Proteine. Folgende Proteine wurden verwendet: Thyroglobulin (670 kDa), g-Globulin (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und der Cofaktor Vitamin B12 (1,3 kDa).



## Kristallisation

Zur näheren Analyse der Interaktionsfläche zwischen zwei Proteinen wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt. Grundvoraussetzung für die Kristallisation sind große Mengen an hochreinem Protein. Sowohl MgsA als auch Crh wurden wie bereits beschrieben aufgereinigt. Dafür wurden Zellen aus einem Kulturvolumen von 10 l geerntet und aufgeschlossen. Nach der Aufreinigung erfolgte die Aufkonzentration der Proteine bis eine Konzentration von etwa 10 mg/ml eingestellt wurde. Für die anschließenden Versuche wurden ca. 50 mg MgsA und Crh eingesetzt.

Die aufgereinigten Proteine wurden einzeln oder im Verhältnis von 1:1 für die Kristallisation eingesetzt. Die Proteinlösung wurde mit verschiedenen Pufferlösungen inkubiert, um die optimalen Kristallisationsbedingungen zu finden. Hierfür wurde ein breites Spektrum an Puffern verwendet (1-3 M Natrium – Kaliumphosphat, 10 – 20% Polyethylenglycol [PEG] verschiedener Kettenlängen, z.B. PEG 6000, 1 – 4 M Ammoniumsulfat und 0,5 – 1,5 M Natriumzitat [pH 4 – 10]). Die Ansätze wurden gemischt und für einige Wochen bei 4°C oder RT inkubiert. Die Kristallisationsbedingungen der einzelnen Proben sind im Ergebnisteil dargestellt.

Die so erhaltenen Kristalle wurden im Anschluss für die Berechnung der Struktur von MgsA bzw. des MgsA/Crh-Komplexes verwendet. Das Röntgenstrahlungsmuster der Kristalle wurde aufgezeichnet. Die Struktur von MgsA aus *E. coli* und Crh aus *Bacillus subtilis* dienen als Grundlage für die Berechnung der Struktur (Saadat und Harrison, 1999; Favier *et al.*, 2002). Die Programme CCP4, Phaser und Coot wurden für das „molecular replacement“ eingesetzt. Sämtliche Arbeiten für die Strukturbestimmung wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

### 3.3.9. Bestimmung von Enzymaktivitäten

#### Amylasetest auf Stärkeplatten

*B. subtilis* besitzt ein Amylasegen, *amyE*. Dieses Gen findet häufig Anwendung, wenn Reporter-genkonstrukte über doppelt homologe Rekombination in das Genom von *B. subtilis* eingeführt werden sollen. Das funktionale *amyE* kann sehr einfach nachgewiesen werden und hat zusätzlich den Vorteil, dass es für *B. subtilis* nicht essentiell ist. Der Nachweis erfolgt auf Stärkeplatten. Ist das Gen intakt, wird Amylase gebildet und die Stärke wird von den Bakterienzellen abgebaut. Wurde das Gen durch Rekombinationsereignisse zerstört, wird keine Amylase gebildet und die Stärke wird nicht angegriffen. Der Nachweis erfolgte, indem jeweils ein *amyE*-Wildtypstamm und die Klonen mit der erwarteten Rekombination auf einer Stärkeplatte ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert wurden. Am nächsten Morgen wurde Iod-Kaliumiodid-Lösung (Roth, Karlsruhe) aufgetropft und auf der Platte verteilt. Um die Ausstriche mit einem intakten *amyE*-Gen bildet sich ein deutlich sichtbarer Hof. Wurde das *amyE*-Gen jedoch zerstört, ist kein Hof erkennbar (Diethmaier, 2008).

#### Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität

Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in *E. coli* erfolgte nach der von Miller (1972) beschriebenen Methode mit leichten Modifikationen (Protokoll der Arbeitsgruppe Görke). Die  $\beta$ -Galaktosidase spaltet das künstliche Substrat ONPG in Galaktose und o-Nitrophenol, dessen Absorption bei 420 nm quantitativ bestimmt werden kann. Die Menge an pro Zeiteinheit umgesetztem o-Nitrophenol ist bei Substratsättigung ein direktes Maß für die vorhandene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden zunächst 10 ml Hauptkulturen (LB-Medium mit Antibiotika und ggfs. Zusätzen) mit Zellen der Vorkultur zu einer  $OD_{600}=0,1$  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. Die geernteten Kulturen wurden sofort im Aktivitätstest eingesetzt oder abzentrifugiert (10 min, 4°C, 8000 rpm). Wurden Pellets hergestellt, so wurden diese in Z-Puffer (Tabelle 3.7. resuspendiert und anschließend geeignete Verdünnungen angelegt. Zusätzlich wurden Referenzproben angelegt. Das Gesamtvolumen der Reaktionslösung betrug 1 ml. Um die Zellen durchlässig zu machen,

wurde jede Verdünnung mit jeweils zwei Tropfen Chloroform und einem Tropfen einer 0,1%-igen SDS-Lösung versetzt. Durch 15-sekündiges Vortexen wurde die Zellmembran durchlässig gemacht. Die Ansätze wurden zunächst für 10 min bei 28°C vorinkubiert und dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung (Tabelle 3.7.) gestartet. Sobald eine Gelbfärbung erkennbar wurde, wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt. Die Standardreaktionszeit betrug 30 min. Die Proben wurden abzentrifugiert (7 min, RT, 13000 rpm), der Grad der Gelbfärbung wurde bei 420 nm im Photometer gegen den mitgeführten Referenzwert gemessen. Die β-Galaktosidase-Aktivität in Miller Units wurde mit folgender Formel berechnet (Landmann, 2011):

$$1 \text{ Miller Unit} = \frac{(\text{OD}_{420} \times V \times 1000)}{(t \times \text{OD}_{600})}$$

OD <sub>420</sub>	Absorption von o-Nitrophenol
t	Zeitdifferenz zwischen Start und Stopp der Reaktion in min
V	Verdünnungsfaktor

### **Bestimmung der MgsA-Aktivität *in vitro***

Die Aktivität der Methylglyoxalsynthase MgsA wurde *in vitro* bestimmt, wie zuvor beschrieben (Hopper und Cooper, 1972; Braun Diplomarbeit 2009). Die MgsA-Aktivität wurde in einem Reaktionsansatz von 0,5 ml gemessen, der Imidazolpuffer (40 mM, pH7,5), Dihydroxyacetonphosphat (3 mM) und aufgereinigtes Strep-MgsA (0,1 µg) enthielt. Nach einer 15-minütigen Inkubation des Reaktionsansatzes auf dem Heizblock bei 30°C wurden 100 µl des Ansatzes entnommen und in eine zuvor zusammenpipettierte Lösung überführt, die sich aus 900 µl H<sub>2</sub>O und 330 µl einer Dinitrophenylhydrazinlösung (0,1% 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 M HCl) zusammensetzt. Es folgte ein Inkubationsschritt für weitere 15 min bei 30°C. Danach wurden jeweils 1,78 ml einer 10%-igen NaOH-Lösung zu den Ansätzen hinzugegeben. Das Gesamtvolumen betrug nun 3 ml. Es folgte ein weiterer 15-minütiger Inkubationsschritt bei 30°C. Anschließend wurde die optische Dichte (OD<sub>555</sub>) photometrisch bestimmt. Für die Berechnung der spezifischen Aktivität wurde der molare Extinktionskoeffizient ε=4,48 x 10<sup>4</sup> (Wells, 1966) verwendet. Die spezifische MgsA-Aktivität wurde folgendermaßen berechnet (Landmann, 2011).

Berechnung der spezifischen MgsA-Aktivität

Extinktion	OD <sub>555</sub> = 0,36
Extinktionskoeffizient (Wells, 1966)	$\epsilon = 4,48 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$
Schichtdicke der Küvette	d = 1 cm
Reaktionszeit	10 min
Reaktionsvolumen (RV):	0,5 ml
Gesamtvolumen (GV):	3 ml
Verdünnungsfaktor:	30 (0,1 ml aus der Reaktionslösung wurden in 3 ml Gesamtvolumen gegeben).

1.) Berechnung der MG-Konzentration im Gesamtvolumen (GV) mit dem Lambert Beer'schen Gesetz:

$$c_{\text{gv}} [\text{M}] = \frac{E}{\epsilon [\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}] \times d [\text{cm}]} = \frac{0,36}{4,48 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \times 1 \text{ cm}} = 8,04 \times 10^{-6} \text{ M}$$

2.) Berechnung der MG-Konzentration (c) im Reaktionsvolumen RRV)

$$c_{\text{RV}} = c_{\text{GV}} \times 30 = 2,41 \times 10^{-4} \text{ M}$$

3.) Berechnung der Anzahl der umgesetzten MG-Teilchen ( $n_{\text{RV}}$ ) in der Reaktionslösung

$$n_{\text{RV}} = c_{\text{RV}} \times \text{RV} = 2,41 \times 10^{-4} \text{ M} \times 5 \times 10^{-4} \text{ l} = 1,21 \times 10^{-7} \text{ mol}$$

4.) Berechnung der spezifischen MgsA-Aktivität

$$\begin{aligned} \text{spezifische Aktivität} &= \frac{n_{\text{RV}} [\text{mol}]}{\text{Proteinmenge} [\text{g}] \times \text{Reaktionszeit} [\text{min}]} \\ &= \frac{1,21 \times 10^{-7}}{0,1 \times 10^{-6} \text{ g} \times 10 \text{ min}} = 0,121 \frac{\text{mol}}{\text{g} \times \text{min}} \end{aligned}$$

## Lösungen zum Arbeiten mit Proteinen

Tabelle 3.7: Lösungen für das Arbeiten mit Proteinen.

Verwendungszweck	Lösung	Bestandteil	Konzentration
Zellaufschluss	Zellaufschlusspuffer (ZAP)	Tris-HCl pH 7,5 NaCl	50 mM 200mM
Aufreinigung von Proteinen über Streptactin-Sephrose Säulen	Puffer W	Tris-HCl pH 8,0 NaCl EDTA	100 mM 150 mM 1 mM
	Puffer E	Tris-HCl pH 8,0 NaCl EDTA D-Desthiobiotin	100 mM 150 mM 1 mM 2,5 mM
	Hepespuffer	NaCl Hepes	150 mM 50 mM
	Hepespuffer-Elution	NaCl Hepes D-Desthiobiotin	150 mM 50 mM 2,5 mM
Aufreinigung von Proteinen über Ni <sup>2+</sup> -NTA Säule	Imidazol-Puffer	Imidazol-Stocklösung ZAP-Puffer (je nach erforderlicher Imidazolkonzentration)	0,5 M
	Imidazol-Hepes-Puffer	Imidazol-Stocklösung Hepes-Puffer (je nach erforderlicher Imidazolkonzentration)	0,5 M
Dialyse	Hepespuffer	NaCl Hepes	150 mM 50 mM
denaturierende Protein-gelelektrophorese	Trenngel (15%; 25 ml)	1,5 M Tris-HCl pH 8,7 AA/Bis 29:1 (40%) SDS (10%w/v) H <sub>2</sub> O TEMED APS (10%)	6,25 ml 9,372 ml 250 µl 9,128 ml 25 µl 250 µl

native Protein- gelelektrophorese (blue native Page)	Sammelgel (5%; 15 ml)	1 M Tris-HCl pH 6,8 AA/Bis 29:1 (40%) SDS (10% w/v) H <sub>2</sub> O TEMED APS (10%)	1,8 ml 1,875 ml 150 µl 11,18 ml 15 µl 150 µl
	1 x Lämmli	Tris-HCl pH 6,8 β-Mercaptoethanol SDS Glycerin Bromphenolblau	62,5 mM 5% (w/v) 2% (w/v) 10% (w/v) 0,05% (w/v)
	10 x Proteinlaufpuffer (1 l)	Glycin Tris-HCl pH 8,9 SDS	144,13 g 60,55 g 10 g
	Trenngel (5%; 10 ml)	1 M Tris-HCl pH 8,8 AA/Bis 37,5:1 (30%) H <sub>2</sub> O TEMED APS (10%)	2 ml 1,6 ml 6,4 ml 4 µl 20 µl
	Trenngel (24%; 10 ml)	1 M Tris-HCl pH 8,8 AA/Bis 37,5:1 (30%) TEMED APS (10%)	2 ml 8 ml 4 µl 20 µl
	Sammelgel (5%; 15 ml)	1 M Tris-HCl pH 6,8 AA/Bis 29:1 (40%) H <sub>2</sub> O TEMED APS (10%)	1,8 ml 1,875 ml 11,18 ml 15 µl 150 µl
	Kathodenpuffer	Histidin pH 8,0 (optional Commassie Brilliant Blue G250)	100 mM
	Anodenpuffer	Tris-HCl pH 8,8	100 mM
	Ladepuffer	Tris-HCl pH 8,0 Glycerin Commassie Brilliant Blue G250	100 mM 40% (w/v) 0,5% (w/v)

Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen	Fixierer	Essigsäure Methanol deion. H <sub>2</sub> O	100 ml 500 ml ad 1 l
	Färber	Essigsäure Methanol CBB R250 deion. H <sub>2</sub> O	100 ml 500 ml 2,5 g ad 1 l
	Entfärber	Essigsäure Methanol deion. H <sub>2</sub> O	75 ml 500 ml ad 1 l
Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	Fixierer (100 ml)	Methanol (100%) Essigsäure (100%) Formaldehyd (37%) deion. H <sub>2</sub> O	50 ml 12 ml 100 µl ad 100 ml
	Thiosulfatlösung (100 ml)	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O deion. H <sub>2</sub> O	20 mg ad 100 ml
	Imprägnierer (100 ml)	AgNO <sub>3</sub> Formaldehyd (37%) deion. H <sub>2</sub> O	0,2 g 100 µl ad 100 ml
	Entwickler (100 ml)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Thiosulfatlösung Formaldehyd (37%) deion. H <sub>2</sub> O	6 g 2 ml 50 µl ad 100 ml
	Stopplösung (100 ml)	Na <sub>2</sub> -EDTA deion. H <sub>2</sub> O	1,86 g ad 100 ml
	Western-Blot	1 l TBS (10x)	Tris-HCl pH 7,6 NaCl deion. H <sub>2</sub> O
1 l Blotto		10 x TBS Magermilchpulver Tween 20 deion. H <sub>2</sub> O	100 ml 25 g 1 ml ad 1 l
5 l Transferpuffer		Tris Glycin Methanol (100%) deion. H <sub>2</sub> O	15,1 g 72,1 g 750 ml ad 5 l

	1 l Puffer III	Tris-HCl pH 9,5 NaCl deion. H <sub>2</sub> O	0,1 M 0,1 M ad 1 l
Induktion der Genexpression		IPTG	1 M
β-Galaktosidase	ONPG-Lösung	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ONPG	60 mM 40 mM 4 mg/ml
	Z-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> KCl MgSO <sub>4</sub> am Tag der Benutzung frisch dazugegeben Chloramphenicol β-Mercaptoethanol	60 mM 40 mM 10 mM 1 mM  100 µg/ml 20 mM
	Stopplösung	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 M
Extraktion von Proteinen aus Polyacrylamidgelen	Trypsin-Puffer I (120 µl)	Trypsin (0,1 µg/µl) NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (100 mM) CaCl <sub>2</sub> (100 mM) H <sub>2</sub> O	15 µl 50 µl 5 µl 50 µl
	Trypsin-Puffer II (105 µl)	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (100 mM) CaCl <sub>2</sub> (100 mM) H <sub>2</sub> O	50 µl 5 µl 50 µl
weitere Lösungen	Iod-Kaliumiodidlösung	Kaliumiodid Iod deion. H <sub>2</sub> O	100 g 50 g ad 1 l
	10 x PBS (1 l, pH 6,5)	NaCl KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	80 g 2 g 2,4 g 17,79 g

Sämtliche hier aufgeführten Methoden entstammen aus der Methodensammlung der Arbeitsgruppe Stülke und Commichau.



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung der Interaktionsfläche von MgsA und Crh anhand genetischer Daten

Als zentraler Abbauweg für die meisten Kohlenhydrate ist die Glykolyse in nahezu allen Lebewesen konserviert. Zunächst wird ein Molekül Glukose in zwei C3-Körper gespalten, die im Anschluss weiter zu Pyruvat umgewandelt werden können. Die Glykolyse liefert die Energie und Bausteine, die für das Leben benötigt werden. Sämtliche Reaktionen, die bei der Verwertung von Glukose ablaufen, unterliegen einer strengen Regulation. Unter nährstoffreichen Bedingungen ist *B. subtilis* in der Lage mehr Glukose aufzunehmen als über die Glykolyse verstoffwechselt werden kann. Dies führt zur Akkumulation von Zuckerphosphaten, die für die Zelle toxisch sind.

HPr hat eine zentrale Rolle bei der Regulation der Kohlenstoffverwertung. Neben HPr besitzt *B. subtilis* das paraloge Crh. Wie auch HPr, wird Crh bei hohen Fruktose-1,6-bisphosphatkonzentrationen durch die HPrK/P phosphoryliert. In einer vorherigen Studie wurde die Methylglyoxalsynthase A (MgsA) als Interaktionspartner von Crh identifiziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion abhängig vom Crh-Phosphorylierungszustand ist. De-phosphoryliertes Crh ist in der Lage, MgsA zu binden und dadurch zu inaktivieren. Wird Crh phosphoryliert, wie zum Beispiel bei einer sehr hohen Glukosekonzentration im Medium, erfolgt keine Interaktion mehr mit MgsA. In der nun aktiven Form von MgsA wird aus Dihydroxyacetonphosphat Methylglyoxal gebildet (Landmann *et al.*, 2011).

Ziel dieser Arbeit war es weitere Erkenntnisse über die Regulation des Methylglyoxal Nebenweges der Glykolyse zu erhalten. Im speziellen sollte der Mechanismus der Hemmung von MgsA durch Crh charakterisiert werden.

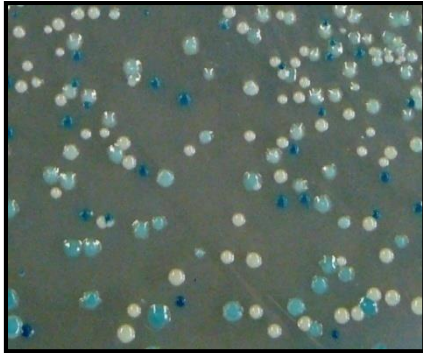
#### 4.1.1. Ungerichtete Mutagenese von *mgsA*

Zunächst sollten die Aminosäuren in MgsA zu identifizieren, welche an der Interaktion mit Crh beteiligt sind. Da es bisher noch keine Hinweise gab, welche Aminosäuren die

gemeinsame Interaktionsfläche zwischen MgsA und Crh ausbilden, wurden zufällige MgsA-Mutanten erzeugt. Anhand eines bakteriellen Two-Hybrid-Systems wurden Mutanten identifiziert, die eine abgeschwächte Interaktion mit Crh zeigen. Dieses System basiert auf der Wiederherstellung der Aktivität der Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis*. Bei einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine werden die Domänen der Adenylatzyklase in räumliche Nähe gebracht, wodurch die Bildung von cAMP ermöglicht wird. Dieses Signalmolekül reguliert wiederum die Expression des Reportergens *lacZ*, indem es im Komplex mit dem cAMP-Akzeptorprotein an den *lac*-Promoter bindet. Daher steht die Interaktion der zu untersuchenden Proteine im direkten Zusammenhang mit der LacZ-Aktivität. In diesem Versuchsansatz wurden MgsA-Mutanten identifiziert, die eine abgeschwächte LacZ-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp zeigen. Die Interaktion zwischen MgsA und Crh kann mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems untersucht werden. Hierfür wurden Crh und MgsA N-terminal an die T25- bzw. T18-Domäne der Adenylatzyklase fusioniert. Die phänotypische und quantitative Analyse der Interaktion erfolgte im Anschluss mit den Plasmiden pGP1164 (Crh-T18) und pGP1175 (MgsA-T25) (Landmann *et al.*, 2011).

Zunächst sollte eine *mgsA*-Mutantenbank geschaffen werden, die sowohl phänotypisch als auch quantitativ analysiert wurde. Das zuvor beschriebene Two-Hybrid-System ermöglicht dann die Analyse der Interaktion zwischen den MgsA-Mutanten und Crh. Mit Hilfe der Error-Prone-PCR erfolgte die ungerichtete Mutagenese von *mgsA*. Da bei dieser Methode eine Polymerase verwendet wird, die keine „Proof-Reading“ Aktivität besitzt und eine geringere Konzentration an dNTPs verwendet wurde, werden falsche Basen in den synthetisierten Strang eingebaut. Mit dieser Mutantenbank wurde ein Pool an Derivaten von pGP1175 generiert.

Zur Analyse der Interaktion zwischen Crh und den MgsA-Mutanten wurden die Plasmide pGP1175 (MgsA-T25) sowie dessen Derivate und pGP1146 (Crh-T18) in den *E.coli* Stamm BTH101 kotransformiert und auf Selektionsplatten mit 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 0,5 mM IPTG und 40 µg/ml X-Gal ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert und die Blaufärbung wurde in regelmäßigen Abständen analysiert. In der Abbildung 4.1. ist die charakteristische Färbung einer Selektionsplatte abgebildet.



**Abbildung 4.1: Interaktion zwischen Crh und MgsA-Mutanten im bakteriellen Two-Hybrid-System.**

Für diesen Versuch wurde das bakterielle Adenylatzyklase Two-Hybrid-System verwendet, das auf der Wiederherstellung der Adenylatzyklase-Aktivität in dem heterologen Wirt *E. coli* beruht. Die Interaktion von Crh-T18 mit der Mutantenbank von MgsA-T25 wurde auf Selektionsplatten mit 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 0,5 mM IPTG und 40 µg/ml X-Gal analysiert. Die unterschiedliche Färbung der Kolonien ist ein direktes Zeichen für die Stärke der Interaktion des jeweiligen MgsA-Proteins mit Crh. Dabei zeigen dunkelblaue Kolonien eine starke Interaktion, hellblaue Kolonien eine abgeschwächte Interaktion und weiße Kolonien keine Interaktion mit Crh an.

Abbildung 4.1. zeigt Kolonien mit unterschiedlicher Blaufärbung. Zum einen waren deutlich dunkelblau gefärbte Kolonien zu erkennen. Wie in der Arbeit von Landmann *et al.*, 2011 bereits beschrieben, entspricht diese Färbung der Interaktion von MgsA mit Crh. Demzufolge trugen diese pGP1175-Derivate das Wildtypallel von *mgsA* bzw. Mutationen im *mgsA* Allel, die keinen Einfluss auf die Interaktion mit Crh hatten. Die fehlende Proteininteraktion spiegelt sich in der Weißfärbung wieder. Ein Grund dafür könnte eine Mutation sein, die zu einer Verschiebung des Leserasters von *mgsA* führt. Diese Derivate von pGP1175 wurden für weitere Analysen nicht berücksichtigt. Zum Anderen traten bei dieser Analyse hellblaue Kolonien auf, die eine verminderte Interaktion von MgsA und Crh verdeutlichen. Dies wiederum führt zu einer geringeren Expression des Reportergens *lacZ*, das sich in einer hellblauen Färbung zeigt. Die pGP1175-Derivate, die eine hellblaue Färbung in Kombination mit pGP1164 zeigten, trugen ein *mgsA* Allel mit einer Mutation, die die Interaktion mit Crh beeinflusst. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass die entsprechende Aminosäure möglicherweise an der Interaktion mit Crh beteiligt ist. Eine Auflistung sämtlicher isolierter Derivate des Plasmids pGP1175 ist dem Anhang zu entnehmen.

#### 4.1.2. Charakterisierung der MgsA-Mutanten

Weiterhin sollte der Ursprung der abgeschwächten Interaktion der pGP1175-Derivate identifiziert werden. Zunächst wurden die Kolonien vereinzelt und die Plasmide isoliert. Hierbei ergab sich das Problem, dass nach der Plasmidisolation ein Gemisch aus zwei verschiedenen Plasmiden (pGP1164 und ein pGP1175-Derivat), die getrennt werden mussten, vorlag. Dieses Gemisch wurde erneut in den *E. coli* Stamm XL1-blue transformiert und anschließend erfolgte eine Selektion auf Klone, die ausschließlich in der Lage waren auf LB-Platten mit Kanamycin zu wachsen, aber nicht auf Ampicillin. Dies war möglich, da alle pGP1175-Derivate eine Kanamycinresistenz vermitteln. Im Gegensatz dazu trägt pGP1164 eine Ampicillinresistenz. Die Sequenz der so erhaltenen pGP1175-Derivate wurde analysiert.

In der Arbeit von Landmann *et al.*, 2011 wurde die Regulation der Enzymaktivität von MgsA durch Crh beschrieben. Auf molekularer Ebene ist MgsA aus *B. subtilis* weitgehend uncharakterisiert. MgsA hat ein Molekulargewicht von 14 kDa und besteht aus insgesamt 137 Aminosäuren. Die Struktur von MgsA aus *E. coli* konnte bereits gelöst werden. Es wird vermutet, dass die aktive Form von MgsA ein Hexamer bildet. Zwischen den Proteinen aus beiden Organismen gibt es eine Sequenzidentität von 44%. Eine ähnliche Struktur bzw. Mechanismus ist für MgsA aus *B. subtilis* zu erwarten (Saadat *et al.*, 1999).

Die Tabelle 4.1. zeigt eine Zusammenfassung von wiederholt identifizierten Mutationen in MgsA. Es ist deutlich zu erkennen, dass vermehrt Mutationen im N-terminalen Bereich von MgsA sowie dem möglichen aktiven Zentrum (Saadat *et al.*, 1999) aufgetreten sind. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Crh möglicherweise an den N-Terminus von MgsA bindet und dadurch inaktiviert. Weiterhin könnte diese Interaktionsfläche mit dem möglichen aktiven Zentrum von MgsA überlappen. Im Sequenzalignment (Abbildung 4.2.) wird deutlich, dass beide Regionen konserviert sind. Dies gilt sowohl innerhalb der Gattung *Bacillus* als auch für Vertreter anderer Gattungen.

Die Tatsache, dass es vermehrt zu einem Austausch verschiedener Aminosäurereste an ein und derselben Stelle gekommen ist, bestätigt unsere Annahme, dass Crh an den N-Terminus von MgsA bindet. Hier sind die Aminosäuren Isoleucin-3, Alanin-4 und Phenylalanin-77 zu erwähnen. Ein Austausch von Isoleucin-3 zu Leucin oder Threonin konnte anhand der Sequenzierung identifiziert werden. Beide Mutationen haben den gleichen Phänotyp, der sich durch hellblaue Kolonien zeigte. Als weiteres Beispiel ist hier Alanin-4 zu nennen. Durch

Sequenzierung konnten Mutationen zu Valin und Threonin bestätigt werden. Beide Mutanten zeigten außerdem den gleichen Phänotyp.

Tabelle 4.1: Übersicht der wesentlichen pGP1175-Derivate.

Plasmid	AS Austausch
pGP2440	Lys-2 → Asn
pGP2441	Lys-2 → Asn
pGP2442	Ile-3 → Leu
pGP2443	Ile-3 → Thr
pGP2444	Ala-4 → Thr
pGP2445	Ala-4 → Val
pGP2447	His-8 → Arg
pGP2462	Phe-77 → Leu
pGP2463	Phe-77 → Tyr
pGP2464	Asp-80 → Ala

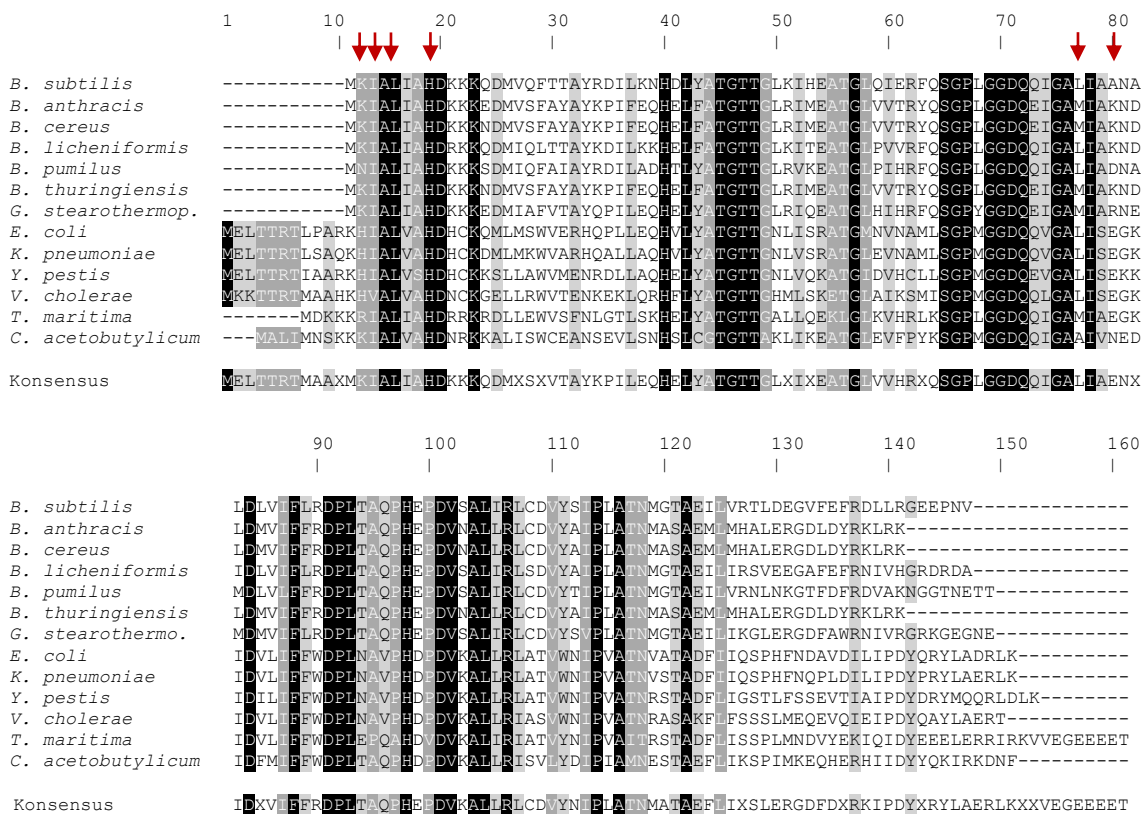


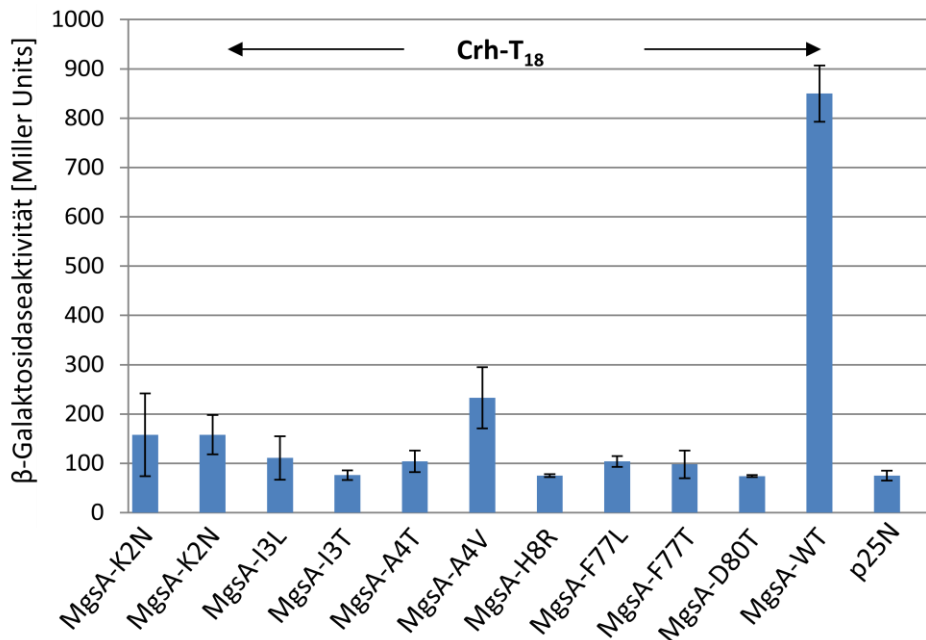
Abbildung 4.2: Alignment der Aminosäuresequenz von MgsA aus unterschiedlichen Organismen.

Das Alignment zeigt, dass MgsA innerhalb der Gattung Bacillus sehr konserviert ist. Die Sequenzidentität mit MgsA aus *E. coli* beträgt 44%. Im Vergleich zu *B. subtilis* besitzt MgsA aus *E. coli* zusätzlich elf Aminosäuren am N-Terminus. Rot markiert sind Aminosäurereste, die an der Interaktion mit Crh beteiligt sind. Im Vergleich von Bacillus und anderen Organismen wird deutlich, dass der N-Terminus von MgsA stark konserviert ist. Das Alignment wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Geneious erstellt. Die Proteinsequenzen stammen aus der Geneious Datenbank (A 100% identisch; A 80-100% identisch und A 60-80% identisch).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 31 pGP1175-Derivate isoliert. Eine Liste sämtlicher Mutanten und der daraus resultierenden Plasmide ist dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 7.7.). Für die weitere Analyse wurden stille Mutationen, Zwei- und Dreifachmutanten sowie Insertionen und Deletionen nicht berücksichtigt. Bei den Zwei- und Dreifachmutanten ist unklar, wodurch der Phänotyp hervorgerufen wird. Die Mutationen könnten simultan, aber auch einzeln den Phänotyp auslösen. Für eine weitere Analyse müssten die jeweiligen Einzelmutanten generiert werden. Bei den Insertionen bzw. Deletionen tritt eine Verschiebung des Leserasters oder ein vorzeitiger Abbruch der Translation auf.

#### **4.1.3. Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und Crh**

In weiteren Analysen wurde die Interaktion der Fusionsproteine MgsA-T25/MgsA-T25-Mutanten mit Crh-T18 quantifiziert (siehe Abbildung 4.3.). Zunächst wurde der Stamm BTH101 mit den entsprechenden Plasmiden kotransformiert. Die Transformanten wurden auf Selektionsplatten ausplattiert und für 36 h bei 30°C inkubiert. Anhand von Platten mit den Zusätzen 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 0,5 mM IPTG und 40 µg/ml X-Gal wurde der Phänotyp noch einmal bestätigt. Die quantitative Messung erfolgte wie in Abschnitt 3.3.9. beschrieben.



**Abbildung 4.3: Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und Crh in der stationären Wachstumsphase mit dem bakteriellen Two-Hybrid-System.**

Zur Quantifizierung der Interaktion zwischen den MgsA-Mutanten mit Crh wurde das bakterielle Adenylatzyklase Two-Hybrid-System verwendet, das auf der Wiederherstellung der Adenylatzyklase-Aktivität beruht. MgsA bzw. Crh tragen eine C-terminale Fusion mit der T-25 bzw. T-18 Domäne der Adenylatzyklase. Die Transformanten wurden in LB-Medium mit Zusätzen üN bei 30°C angezogen. Die Hauptkultur wurde auf OD<sub>600</sub> 0,1 angeimpft und bei 30°C für inkubiert bis sie eine OD<sub>600</sub> von 2,0 erreicht hatten. Es folgte die Ernte der Zellen und die β-Galaktosidase-Aktivitätsmessung. Die β-Galaktosidase-Aktivität dient hier als direktes Maß für die Interaktion zwischen MgsA und Crh. Für die Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und Crh wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Bei diesem Versuch wurde die Interaktion der in Tabelle 4.1. dargestellten MgsA-Mutanten mit Crh untersucht. Als Referenz diente die Interaktion der Wildtypproteine. Für die Kotransformanten wurde eine β-Galaktosidase-Aktivität von ca. 850 MU gemessen. Dies entsprach den Werten der Arbeit Landmann *et al.*, 2011. Aus der Abbildung 4.3. wird ersichtlich, dass sämtliche MgsA-Mutanten eine sehr stark verminderte β-Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Für die Mutanten wurde eine Aktivität von 80 - 200 MU gemessen. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Aktivität um das 5 bis 10-fache vermindert. Als negative Kontrolle wurde die Interaktion des Leervektors p25N und pGP1164 gemessen. Der Wert von ca. 50 MU gab die Basalaktivität der β-Galaktosidase an. Demzufolge war die gemessene Aktivität sämtlicher MgsA-Mutanten im Vergleich zur Negativkontrolle nur leicht erhöht.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Interaktion der MgsA-Mutanten mit Crh nahezu vollständig inhibiert ist. Dies zeigt, dass die Aminosäuren im N-Terminus von MgsA für die Interaktion mit Crh von großer Bedeutung sind.

Im Anhang befindet sich eine Zusammenfassung der für die Interaktion von MgsA-Mutanten mit Crh gemessenen Werte (siehe Abschnitt 7.4.).

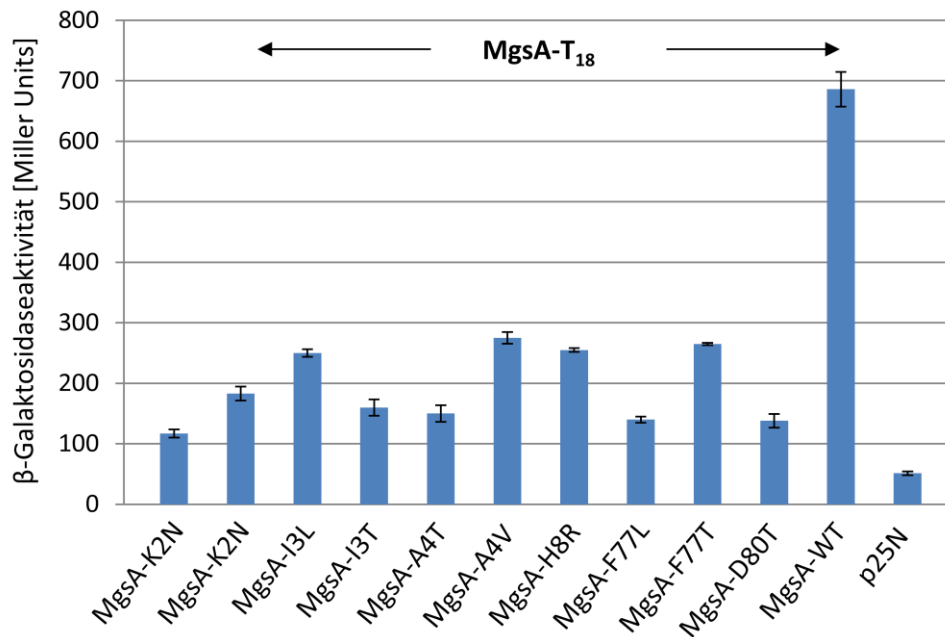
#### **4.1.4. Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und MgsA Wildtyp**

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass MgsA sowohl in *B. subtilis* als auch *E. coli* ein Homomultimer bildet (Landmann *et al.*, 2011; Saadat und Harrison 1999). Um zu klären, welchen Einfluss die zuvor identifizierten Mutationen in MgsA auf dessen Multimerisierung haben, wurde die Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und MgsA Wildtyp durch  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessungen quantifiziert.

Die Quantifizierung der Interaktion erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie in Kapitel 4.1.3. beschrieben. Jedoch wurde in diesem Versuch pGP1173 anstelle von pGP1164 verwendet. In dem Plasmid pGP1173 ist die T18 Domäne der Adenylatzyklase mit dem C-Terminus des Wildtyp *mgsA*-Gen fusioniert (MgsA-T18). Zunächst wurde der *E. coli* Stamm BTH101 mit den entsprechenden Plasmiden kotransformiert. Die Transformanten wurden auf Selektionsplatten (100  $\mu$ g/ml Ampicillin, 50  $\mu$ g/ml Kanamycin, 0,5 mM IPTG und 40  $\mu$ g/ml X-Gal) ausplattiert und für 36 h bei 30°C inkubiert.

Für die quantitative Messung wurde je Transformationsansatz eine Kolonie in 10 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin, 50  $\mu$ g/ml Kanamycin, 0,5 mM IPTG üN bei 30°C angezogen. Am folgenden Morgen wurde die Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft, bei 30°C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Es folgte die Ernte der Zellen und die LacZ-Messung. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der exponentiellen Wachstumsphase zeigte die Interaktion der MgsA-Mutanten mit den MgsA Wildtyp (siehe Abbildung 4.4.).





**Abbildung 4.4: Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und MgsA Wildtyp in der exponentiellen Wachstumsphase mit dem bakteriellen Adenylatzyklase Two-Hybrid-System.**

Mit Hilfe des bakteriellen Adenylatzyklase Two-Hybrid-Systems erfolgte die Quantifizierung der Interaktion zwischen den MgsA-Mutanten (MgsA-Mutanten-T-25) und MgsA (T18-MgsA) Wildtyp. Die Transformanten wurden in LB-Medium angezogen. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Hierbei dient der Wert der gemessenen Aktivität als direktes Maß für die Interaktion zwischen den MgsA-Mutanten und MgsA Wildtyp. Für die Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und MgsA wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Die Eigeninteraktion des Wildtyp-MgsA diente als Positivkontrolle. Dabei exprimierten die Plasmide pGP1175 und pGP1173 die Fusionsproteine MgsA-T25 und T18-MgsA. Die gemessene Aktivität von 700 MU korreliert mit den Werten von Landmann *et al.*, 2011. Weiterhin wurde die Interaktion der in Tabelle 4.1. aufgelisteten Mutanten mit dem Fusionsprotein T18-MgsA quantifiziert. Sämtliche Mutanten zeigen eine stark reduzierte Fähigkeit zur Eigeninteraktion mit dem MgsA Wildtyp. Der gemessene Wert zwischen 100-300 MU entsprach in etwa 25% der Aktivität der Positivkontrolle. Als negative Kontrolle wurde die Interaktion des Leervektors p25N und pGP1173 gemessen. Der Wert von ca. 50 MU zeigte die Basalaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase an.

Im Vergleich zum MgsA Wildtyp wiesen die MgsA-Mutanten eine deutlich schwächere Eigeninteraktion auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Aminosäuren im N-Terminus von MgsA für die Eigeninteraktion als auch für die Interaktion mit Crh wichtig sind. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die Interaktionsflächen der Komplexe Crh/MgsA und MgsA möglicherweise überlappen. So lässt sich ein Titrationsmechanismus, bei dem entweder nur

der Crh/MgsA Komplex oder das MgsA Homomultimer vorliegen, für die Regulation von MgsA vermuten. Weitere Analysen sind nötig, um diesen Mechanismus näher zu charakterisieren.

Im Anhang befindet sich eine Zusammenfassung der für die Interaktion von MgsA-Mutanten mit Crh gemessenen Werte (siehe Abschnitt 7.4.).

#### **4.1.5. Isolation kompensatorischer Mutationen in Crh, die die Interaktion mit MgsA wiederherstellen**

Die zuvor beschriebenen MgsA-Mutanten zeigten alle eine verminderte Interaktionsfähigkeit mit Crh. Dies deutet darauf hin, dass der N-Terminus von MgsA an der Interaktion mit Crh beteiligt ist. Jedoch gibt es noch keinen Hinweis auf die physiologische Relevanz dieser Aminosäuren. Möglich wäre, dass die Mutationen einen Einfluss auf die Faltung und Stabilität der Fusionsproteine haben. Dies würde sich ebenfalls in einer verminderten Interaktion zeigen. Die physiologische Bedeutung der Mutationen in *mgsA* soll mit Hilfe eines genetischen Ansatzes analysiert werden. Hier soll die Interaktion mit den MgsA-Mutanten durch zufällige Mutagenese von *crh* wieder hergestellt werden. Damit würde bestätigt, dass die zuvor identifizierten Aminosäurereste tatsächlich maßgeblich an der Interaktion mit Crh beteiligt sind.

Anhand eines bakteriellen Adenylatzyklase Two-Hybrid-Systems wurden Crh-Mutanten identifiziert, die die Interaktion mit den zuvor isolierten MgsA-Mutanten wiederherstellen. Bei diesem Screen zeigte sich die abgeschwächte Interaktion der zuvor isolierten MgsA-Mutanten durch eine hellblaue Färbung der Kolonien. Hier sollte durch Mutagenese von Crh die Interaktion mit den MgsA-Mutanten Ile3Leu, Ala4Thr, His8Arg und Asp80Ala wiederhergestellt werden. Im initialen Screen zeigten diese Mutanten eine abgeschwächte Interaktion mit Crh. Crh-Mutanten, die zur Interaktion mit den MgsA-Mutanten befähigt sind, sollten eine dunkelblaue Koloniefärbung zeigen. Es wurde eine *crh*-Mutantenbank generiert, die zunächst phänotypisch und im Anschluss quantitativ analysiert wurde. Mit Hilfe der Error-Prone-PCR erfolgte die ungerichtete Mutagenese von *crh*. Da bei dieser Methode eine Polymerase verwendet wird die keine „Proof-Reading“ Aktivität besitzt und eine geringere Konzentration an dNTPs verwendet wird, werden falsche Basen in den

synthetisierten Strang eingebaut. Mit dieser Mutantenbank wurde ein Pool an Derivaten von pGP1164 generiert.

Zu diesem Zweck wurden die Derivate von pGP1164 in den *E. coli* Stamm BTH101, der entweder das Plasmid pGP2442 (trägt das *mgsA*-Allel Ile3Leu), pGP2444 (Ala4Thr), pGP2447 (His8Arg) oder pGP2464 (Asp80Ala) trug, transformiert. Die Transformanten wurden auf Selektionsplatten ausplattiert und für 36 h bei 30°C inkubiert.

Bei allen vier Ansätzen ergab sich ein ähnlicher Phänotyp. Wie erwartet zeigten sich Kolonien mit unterschiedlicher Blaufärbung. Hellblaue Kolonien zeigten eine abgeschwächte Interaktion, wie sie bereits für die Interaktion der MgsA-Mutanten mit Crh beschrieben wurde. Demzufolge trugen diese pGP1164-Derivate das WT Allel von *crh* bzw. Mutationen, die keinen Einfluss auf die Interaktion mit den entsprechenden MgsA-Mutanten (Ile3Leu, Ala4Thr, His8Arg und Asp80Ala) haben. Diese wurden für die weitere Analyse nicht berücksichtigt.

Zusätzlich gab es pGP1164-Derivate, die ein *crh*-Allel exprimierten, das nicht mit den MgsA-Mutanten interagiert. Dies zeigte sich durch eine weiße Koloniefärbung. Hier wird kein cAMP gebildet und LacZ nicht exprimiert. Bei den pGP1164-Derivaten, die eine weiße Koloniefärbung zeigten, handelt es sich möglicherweise um Mutationen, bei denen das Leseraster von *crh* verschoben ist. In diesem Fall erfolgt keine Expression von Crh. Diese Derivate wurden für weitere Analysen ebenfalls nicht berücksichtigt.

Weiterhin traten bei diesem Screen dunkelblaue Kolonien auf. Dabei handelt es sich um Crh-Mutanten, die eine stärkere Interaktion mit den jeweiligen MgsA-Mutanten aufwiesen.

Hiermit konnte bestätigt werden, dass die identifizierten Aminosäuren im N-Terminus von MgsA an der Interaktion mit Crh beteiligt sind. In den folgenden Versuchen wurde die Interaktion der Crh-Mutanten mit den jeweiligen MgsA-Mutanten quantifizieren.

#### **4.1.6. Charakterisierung der kompensatorischen Crh-Mutanten**

Als nächstes sollte der Ursprung für die verstärkte Interaktion der pGP1164-Derivate mit den jeweiligen MgsA Mutanten identifiziert werden. Dafür wurden die Plasmide isoliert und sequenziert. Wie bereits beschrieben, ergab sich das Problem, dass nach der Plasmidisolation ein Gemisch aus pGP1164-Derivaten und pGP2442, pGP2444, pGP2447

oder pGP2464 vorlag. Eine anschließende Transformation in den *E. coli* Stamm XL1-blue und Selektion auf LB-Platten mit Ampicillin ermöglichte die Isolation der korrekten Plasmide.

Die Strukturen der paralogen Proteine HPr und Crh, welche eine Sequenzidentität von 45% haben, konnte bereits gelöst werden. Anhand dieser, und der Struktur anderer bekannter Interaktionspartner, wurden bereits wichtige Bereiche in HPr und Crh identifiziert, die an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind. In HPr befinden sich wichtige Aminosäurereste in den Helices 1 und 2, die für die Interaktion mit der HPrK/P und CcpA benötigt werden. Weiterhin ist der Loop vor der Helix 1, sowie nach der Helix 2 maßgeblich an der Interaktion beteiligt (Schumacher *et al.*, 2006, Schumacher *et al.*, 2007). Für die Interaktion von Crh mit CcpA zeigt sich ein ähnliches Bild. Es konnte gezeigt werden, dass die gleichen Bereiche wie in HPr an der Interaktion mit CcpA beteiligt sind (Schumacher *et al.*, 2007). In vorangegangenen Analysen wurde weiterhin gezeigt, dass Unterschiede in der Helix 1 von Crh bzw. HPr ausschlaggebend für das Vermögen sind MgsA zu binden (Landmann *et al.*, 2011).

Mit diesem genetischen Screen sollen Crh-Mutanten identifiziert werden, die eine höhere Bindungsaffinität zu den MgsA-Mutanten Ile3Leu, Ala4Thr, His8Arg und Asp80Ala zeigen. So kann man bereits spekulieren, dass mögliche kompensatorische Mutanten in Crh isoliert werden, die eine Mutation in der Helix 1 oder 2 tragen.

In Tabelle 4.2. sind die isolierten Crh-Mutanten aufgelistet. Wie in dem Alignment der Abbildung 4.5. zu sehen, befinden sich sämtliche Mutationen in den Bereichen der Helix 1, 2 und 3 von Crh. Dies bestätigt die Annahme, dass ähnlich wie bei der Interaktion von Crh mit CcpA die Helices 1 und 2 an der Interaktionsfläche mit MgsA beteiligt sind. Daraus lässt sich schließen, dass es eine Interaktion von Aminosäureresten im N-Terminus von MgsA mit Aminosäureresten in den Helices 1 und 2 von Crh gibt. Die direkte Protein-Protein Interaktion von MgsA und Crh führt wiederum zur Inaktivierung von MgsA.

Tabelle 4.2: Übersicht der wesentlichen pGP1164-Derivate.

MgsA-Mutante	pGP1164 Derivat	AS Austausch
pGP2442	pGP2478	Glu7 → Val
[Ile3Leu]	pGP2481	Pro18 → Ser
	pGP2484	Pro18 → Ala
	pGP2485	Ile47 → Leu
	pGP2480	Glu71 → Gly
pGP2444	pGP2483	Ile47 → Leu
[Ala4Thr]	pGP2481	Pro18 → Ser
	pGP2484	Pro18 → Ala
	pGP2485	Ile47 → Leu
pGP2447	pGP2486	Ile47 → Leu
[His8Arg]		
pGP2464	pGP2486	Ile47 → Leu
[Asp80Ala]		

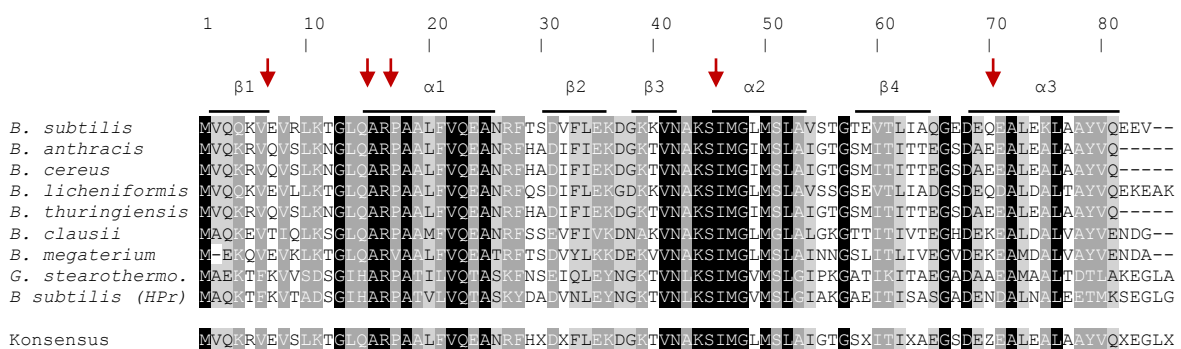


Abbildung 4.5: Alignment der Aminosäuresequenz von Crh aus verschiedenen Organismen der Gattung *Bacillus*.

Das Alignment zeigt, dass Crh innerhalb der Gattung *Bacillus* sehr konserviert ist. Angegeben sind die Strukturmerkmale von Crh (die Position der β-Faltblätter und der α-Helices). Rot markiert sind Aminosäurereste, die an der Interaktion mit MgsA beteiligt sind. Das Alignment wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Geneious erstellt. Die Proteinsequenzen stammen aus der Geneious Datenbank (A 100% identisch; A 80-100% identisch und A 60-80% identisch).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 14 pGP1164-Derivate isoliert, die die Interaktion mit den jeweiligen MgsA-Mutanten Ile3Leu, Ala4Thr, His8Arg und Asp80Ala wiederherstellen. In der Tabelle 7.8. im Anhang befindet sich eine ausführliche Auflistung der isolierten Plasmide, die ein mutiertes *crh* Allel tragen. Der Basenpaaraustausch und die entsprechend betroffenen Aminosäuren sind ebenfalls angegeben. Wie bereits für die MgsA-Mutanten beschrieben,

wurden für weitere Analysen stille Mutationen, Zwei- und Dreifachmutanten sowie Insertionen und Deletionen nicht berücksichtigt. Bei diesen Mutanten kann der Phänotyp nicht explizit auf eine Mutation zurückgeführt werden. Hierbei wäre die Konstruktion von Einzelmutanten erforderlich.

Bei näherer Betrachtung sämtlicher Crh-Mutanten fällt auf, dass die Mutation Ile47Leu bei 30% aller pGP1164-Derivate aufgetreten ist. Sowohl Einzel- als auch mehrere Doppelmutanten konnten isoliert werden. Dies belegt, dass die Helix 2 von Crh an der gemeinsamen Interaktionsfläche von Crh und MgsA beteiligt ist. Daher wird für die Quantifizierung der Interaktion die Crh-Mutante Ile47Leu für sämtliche MgsA-Mutanten (Ile3Leu, Ala4Thr, His8Arg und Asp80Ala) berücksichtigt. Weiterhin sind Mutationen im Bereich der Helix 1 zu erwähnen. Es wurden mehrfach Einzel- und auch Doppelmutanten der Reste Alanin-16 und Prolin-18 identifiziert. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Helix 1 an der Interaktion mit MgsA beteiligt ist.

Da die kompensatorischen Mutanten in Crh die Interaktion mit den zuvor identifizierten MgsA-Mutanten wiederherstellen, wird hier die physiologische Relevanz des N-Terminus von MgsA für die Interaktion mit Crh bekräftigt.

#### **4.1.7. Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und Crh-Mutanten**

Die Ergebnisse der Two-Hybrid-Experimente deuteten darauf hin, dass der N-Terminus von MgsA mit den Helices 1 und 2 von Crh interagiert. Im nächsten Schritt wurde die Interaktion der Fusionsproteine MgsA-T25-Mutanten (Ile3Leu, Ala4Thr, His8Arg und Asp80Ala) mit den jeweiligen Crh-T18-Mutanten (Glu7Val, Ala16Gly, Pro18Ser, Pro18Ala, Ile47Leu bzw. Glu71Gly) quantifiziert.

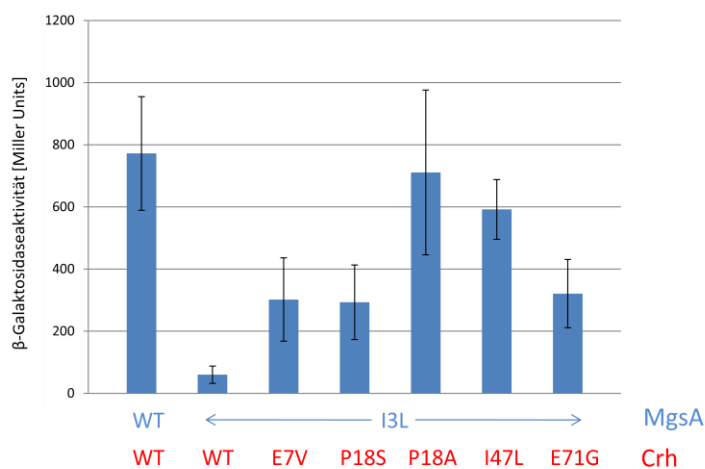
Die quantitative Analyse der Interaktion zwischen den MgsA- und Crh-Mutanten erfolgte wie zuvor beschrieben in dem heterologen Wirt *E. coli*. Der Stamm BTH 101 wurde mit den entsprechenden Plasmiden kotransformiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. Der Phänotyp wurde nach einer Inkubationszeit von 36 h bei 30°C noch einmal bestätigt. Der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest erfolgte wie in Kapitel 3.3.9. beschrieben.

Die gemessene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der exponentiellen Wachstumsphase zeigt die Interaktion der MgsA-Mutanten mit den kompensatorischen Crh-Mutanten an. Im Anhang unter Punkt 7.4. befindet sich eine Auflistung der Originalzahlenwerte der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung. In den nachfolgenden Graphen sind die Messwerte dargestellt.

### Quantitative Analyse der Interaktion zwischen MgsA (Ile3Leu) und den kompensatorischen Crh-Mutanten

Die Abbildung 4.6. zeigt die Interaktion der Fusionsproteine MgsA(Ile3Leu)-T25 mit den Crh-Mutanten (Glu7Val, Ala16Gly, Pro18Ser, Pro18Ala, Ile47Leu bzw. Glu71Gly) gezeigt.

Für diesen Versuch wurden die Wildtypproteine MgsA und Crh als Positivkontrolle verwendet. Die Negativkontrolle zeigt die Interaktion zwischen der MgsA-Mutante (Ile3Leu) und dem Wildtyp Crh an. Transformanten, die die Positivkontrolle koexprimierten, produzierten eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von ca. 800 MU, die in etwa 15-fach höher lag als die der Negativkontrolle von ca. 50 MU. Die Crh-Mutanten Glu7Val, Pro18Ser und Glu71Gly waren in der Lage, partiell die Interaktion mit der MgsA-Mutante Ile3Leu wiederherzustellen. Alle drei Mutanten zeigten eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von ca. 300 MU. Dies entspricht etwa einem Drittel der gemessenen Aktivität des Wildtyps. Bei den Crh-Mutanten Pro18Ala und Ile47Leu wurde ein Aktivitätsniveau, das der Positivkontrolle entsprach, gemessen. Diese Mutationen befähigen Crh zur vollen Interaktion mit der MgsA-Mutante Ile3Leu.



**Abbildung 4.6: Quantitative Analyse der Interaktion zwischen der MgsA-Mutante Ile3Leu und den kompensatorischen Crh-Mutanten (Glu7Val, Pro18Ser, Pro18Ala, Ile47Leu und Glu71Gly).**

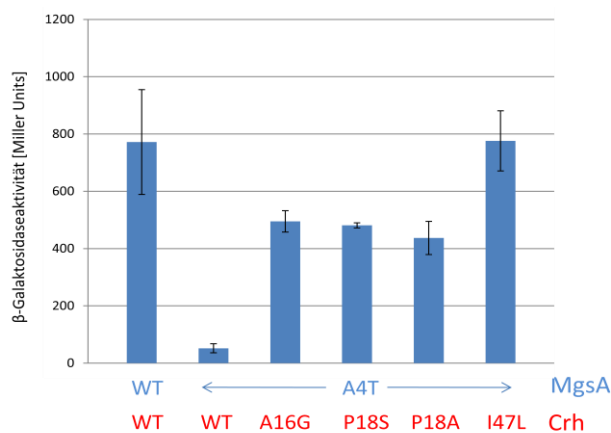
Zur Quantifizierung der Interaktion zwischen der MgsA-Mutante (Ile3Leu) und den kompensatorischen Crh-Mutanten (Glu7Val, Pro18Ser, Pro18Ala, Ile47Leu und Glu71Gly) wurde ein bakterielles Two-Hybrid-System verwendet, das auf der Wiederherstellung der Adenylatzyklase-Aktivität beruht. MgsA bzw. Crh tragen eine C-terminale Fusion mit der T-25 bzw. T-18 Domäne der Adenylatzyklase. Die Transformanten wurden in LB-Medium mit Zusätzen  $\mu$ N bei 30°C angezogen. Die Hauptkultur wurde auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft und bei 30°C inkubiert bis eine  $OD_{600}$  von ca. 0.6 erreicht wurde. Es folgte die Ernte der Zellen und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität dient hier als direktes Maß für die Interaktion zwischen der MgsA-Mutante mit den jeweiligen Crh-Mutanten. Für die Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und Crh wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.



### Quantitative Analyse der Interaktion zwischen MgsA (Ala4Thr) und den kompensatorischen Crh-Mutanten

In der Abbildung 4.7. ist die Interaktion der Fusionsproteine MgsA(Ala4Thr)-T25 mit den Crh-Mutanten (Ala16Gly, Pro18Ser, Pro18Ala und Ile47Leu) gezeigt.

Wie bereits zuvor beschrieben, wurden die Wildtypproteine MgsA und Crh als Positivkontrolle (ca. 800 MU) verwendet. Die Negativkontrolle (ca. 50 MU) zeigt die Interaktion zwischen der MgsA-Mutante (Ala4Thr) und dem Wildtypprotein von Crh an. Für die Crh-Mutante Ile47Leu wurde eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von ca. 800 MU gemessen. Dies entspricht der gemessenen Aktivität des Wildtyps. Daher lässt sich vermuten, dass es eine Wechselwirkung zwischen der Aminosäure Ile47 aus Crh mit Ile3 und Ala4 aus MgsA gibt. Die Crh-Mutanten Ala16Gly, Pro18Ser und Pro18Ala waren in der Lage, die Interaktion mit der MgsA-Mutante Ala4Thr partiell wiederherzustellen. Alle drei Mutanten zeigten eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von ca. 400 MU. Dies entspricht etwa der Hälfte der gemessenen Aktivität des Wildtyps.

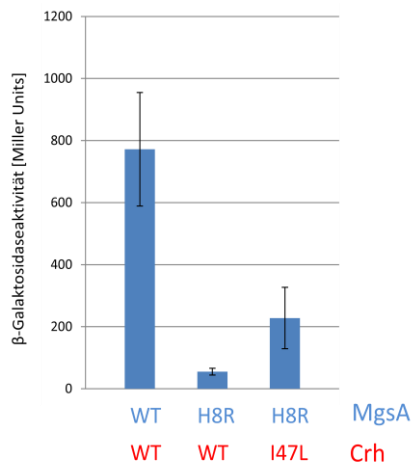


**Abbildung 4.7: Quantitative Analyse der Interaktion zwischen der MgsA-Mutante Ala4Thr und den kompensatorischen Crh-Mutanten (Ala16Gly, Pro18Ser, Pro18Ala und Ile47Leu).**

Mit Hilfe des bakteriellen Adenylatzyklase Two-Hybrid-Systems erfolgte die Quantifizierung der Interaktion zwischen der MgsA-Mutante Ala4Thr und den kompensatorischen Crh-Mutanten (Ala16Gly, Pro18Ser, Pro18Ala und Ile47Leu). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung erfolgte wie bereits mehrfach beschrieben. Die Daten beziehen sich auf mindestens drei unabhängige Experimente.

### Quantitative Analyse der Interaktion zwischen MgsA (His8Arg) und der kompensatorische Crh-Mutante Ile47Leu

Bei der Isolation kompensatorischer Crh-Mutanten für die MgsA-Mutante His8Arg konnte lediglich die Crh-Mutante Ile47Leu identifiziert werden. Die quantitative Analyse der Fusionsproteine MgsA(His8Arg)-T25 mit der Crh-Mutante Crh(Ile47Leu)-T18 ist in Abbildung 4.8. dargestellt. Für die Interaktion zwischen MgsA(His8Arg) und Crh(Ile47Leu) wurde eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von ca. 200 MU gemessen. Der Wert entsprach in etwa einem viertel der Aktivität (ca. 800 MU) der Interaktion zwischen den Wildtypproteinen von MgsA und Crh. Die Negativkontrolle (ca. 50 MU) zeigt die Interaktion zwischen der MgsA-Mutante (His8Arg) und dem Wildtypprotein von Crh an.

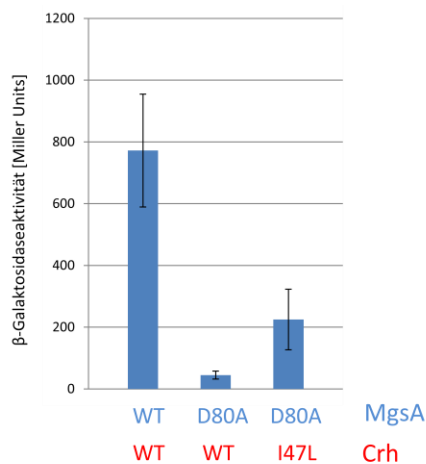


**Abbildung 4.8: Quantitative Analyse der Interaktion zwischen der MgsA-Mutante His8Arg und der kompensatorischen Crh-Mutante Ile47Leu.**

Zur Quantifizierung der Interaktion zwischen der MgsA-Mutante His8Arg und der kompensatorischen Crh-Mutanten Ile47Leu wurde ein bakterielles Two-Hybrid-System verwendet. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung erfolgte wie bereits mehrfach beschrieben. Die Daten beziehen sich auf mindestens drei unabhängige Experimente.

### Quantitative Analyse der Interaktion zwischen MgsA (Asp80Ala) und der kompensatorischen Crh-Mutante Ile47Leu

Die quantitative Analyse der Interaktion der Fusionsproteine MgsA(Asp80Ala)-T25 mit der Crh-Mutante Crh(Ile47Leu)-T18 zeigte das gleiche Ergebnis wie für die Analyse der Interaktion zwischen der MgsA-Mutante His8Arg und der Crh-Mutante Ile47Leu. Die gemessene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität entsprach einem Viertel der Aktivität der Positivkontrolle.



**Abbildung 4.9: Quantitative Analyse der Interaktion zwischen der MgsA-Mutante Asp80Ala und der kompensatorischen Crh-Mutante Ile47Leu.**

Mit Hilfe des bakteriellen Adenylatzyklase Two-Hybrid-Systems erfolgte die Quantifizierung der Interaktion zwischen der MgsA-Mutante Asp80Ala und den kompensatorischen Crh-Mutanten Ile47Leu. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung erfolgte wie bereits mehrfach beschrieben. Die Daten beziehen sich auf mindestens drei unabhängige Experimente.

Für sämtliche untersuchten MgsA-Mutanten konnten kompensatorische Crh-Mutanten isoliert werden, die die Interaktion mit den jeweiligen MgsA-Mutanten wiederherstellten. Die dabei gemessene Aktivität entsprach mindestens einem viertel und maximal der vollen Aktivität der Interaktion zwischen MgsA WT und Crh WT. Diese Daten untermauern die physiologische Relevanz der zuvor identifizierten Aminosäurereste in MgsA, die für die Interaktion mit Crh essentiell sind. Hiermit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass es eine direkte Interaktion zwischen dem N-Terminus von MgsA und den Helices 1 und 2 von Crh gibt. Anhand dieser Daten ergibt sich als Schlussfolgerung, dass die Aminosäuren Ala2 und Ile3 aus MgsA sowie Pro18 und Ile47 aus Crh maßgeblich an der direkten Protein-Protein Interaktion von MgsA und Crh beteiligt sind. Daraus lässt sich eine gemeinsame

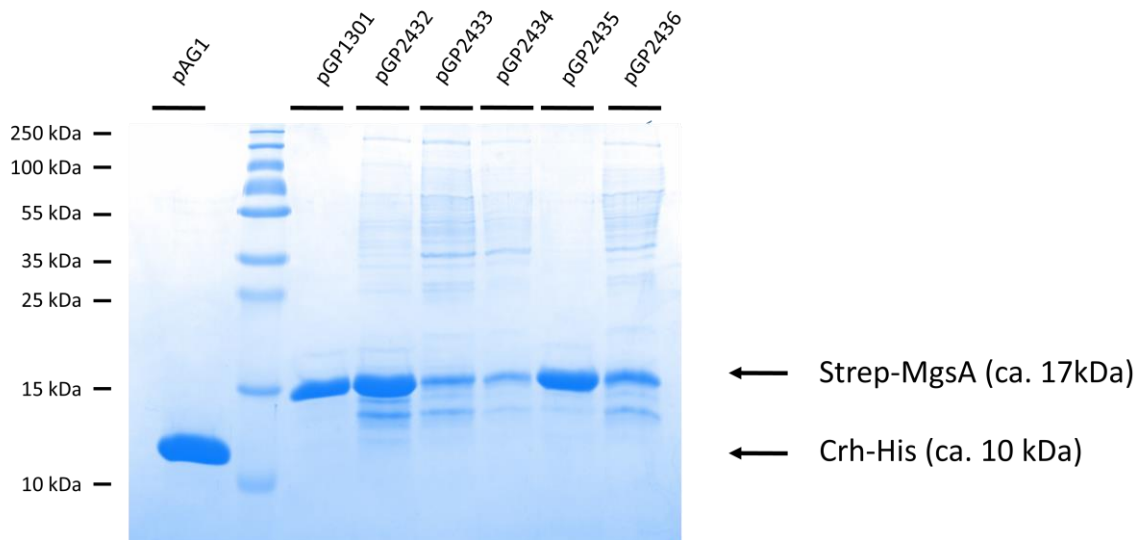
Interaktionsfläche zwischen dem N-Terminus aus MgsA und den Helices 1 und 2 aus Crh erschließen.

#### 4.1.8. *In vitro* Charakterisierung der MgsA-Mutanten

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mutationen im N-terminalen Bereich von MgsA die Interaktion mit Crh beeinflussen. Vorherige Studien zeigten außerdem, dass MgsA aus *B. subtilis* und *E. coli* ein Homomultimer bilden. Die aktive Form von MgsA in *E. coli* ist ein Hexamer (Landmann *et al.*, 2011; Saadat und Harrison, 1999). In Kapitel 4.1.4. wurde die Eigeninteraktion der MgsA-Mutanten Ile3Leu, Ala4Thr, His8Arg und Asp80Ala mit MgsA WT bereits beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass alle isolierten MgsA-Mutanten eine verminderte Fähigkeit zur Eigeninteraktion aufwiesen. Als nächstes stellte sich die Frage, ob das verminderte Vermögen auf Eigeninteraktion der Mutanten einen Einfluss auf die Aktivität von MgsA hat.

In diesem Kapitel wird die Enzymaktivität ausgewählter MgsA-Mutanten *in vitro* beschrieben. Zunächst wurden die Plasmide pGP2432 (trägt das *mgsA*-Allel Ile3Leu), pGP2433 (Ala4Thr), pGP2434 (His8Arg), pGP2435 (Gln62Arg) und pGP2436 Asp80Ala), die eine Strep-Tag-Fusion der jeweiligen *mgsA*-Allele unter  $P_{tac}$ -Kontrolle tragen, erzeugt. Die Testexpression ergab, dass alle MgsA-Mutanten im heterologen Wirt *E. coli* überexprimiert werden konnten. Im Anschluss erfolgten die Überproduktion und die Aufreinigung wie in Kapitel 3.3.7. beschrieben. Sämtliche MgsA-Derivate wurden mittels Streptactin-Sepharose-Affinitätschromatographie aufgereinigt, Crh hingegen über  $Ni^{2+}$ -NTA Superflow-Affinitätschromatographie. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.10. dargestellt. Die analysierten Proteinmassen stimmten mit den theoretischen Massen von 17 kDa für MgsA (WT und Derivate) und 10 kDa für Crh (WT) überein. Im Anschluss wurden alle aufgereinigten Proteine für den MgsA-Aktivitätstest verwendet. Die erhaltene Proteinkonzentration von Crh betrug 4 mg/ml. Alle MgsA-Derivate konnten mit einer Konzentration von ca. 1 mg/ml aufgereinigt werden. Dies erfolgte nach dem gleichen Prinzip, um mögliche Unterschiede in der Proteinstabilität zu erkennen. Bei der Ausbeute an Proteinen gab es lediglich kleine Unterschiede. Hier ergab sich das Problem, dass die MgsA-Mutanten mit unterschiedlicher Effizienz aufgereinigt wurden. Möglicherweise bilden

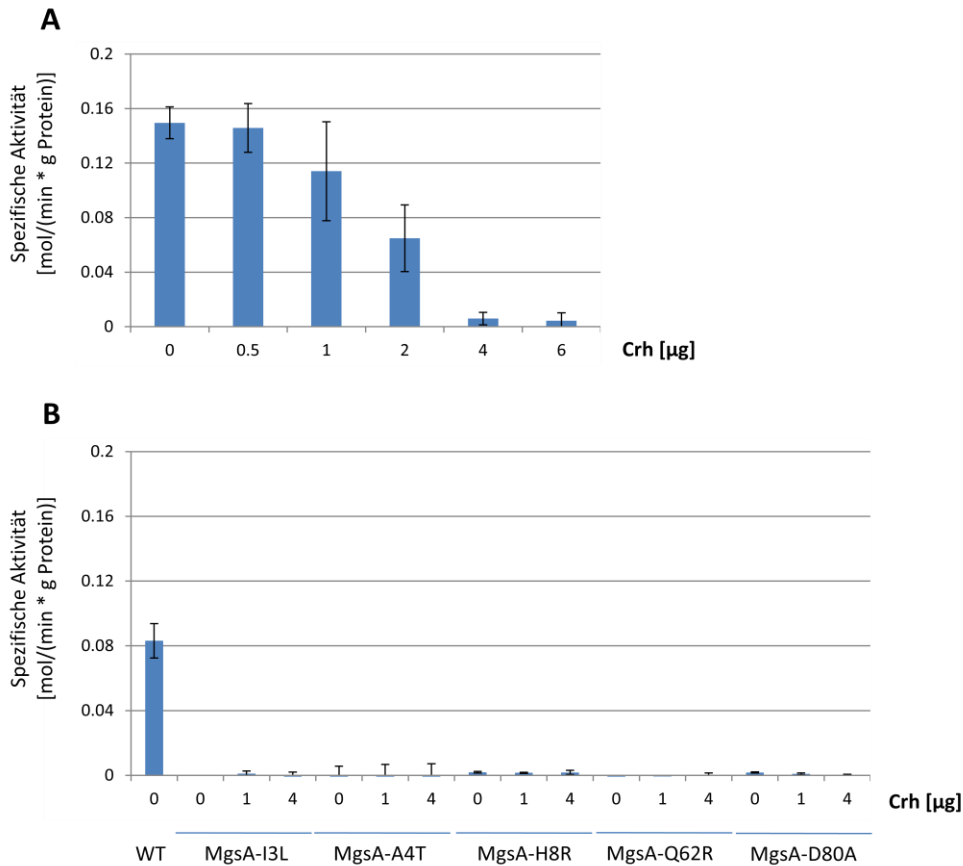
einige dieser Mutanten Aggregate, wodurch die Aufreinigung erschwert wird. Das könnte ein möglicher Hinweis darauf sein, dass die Mutationen die Struktur von MgsA beeinflussen.



**Abbildung 4.10: Aufreinigung der rekombinanten Proteine.**

Für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine Strep-MgsA, Strep-MgsA(Ile3Leu), Strep-MgsA(Ala4Thr), Strep-MgsA(His8Arg), Strep-MgsA(Gln62Arg), Strep-MgsA(Asp80Ala) und Crh-His wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet. Dazu wurden die Plasmide pGP1301, pGP2432, pGP2433; pGP2434, pGP2435, pGP2436 und pAG1 in den entsprechenden Stamm transformiert und auf Selektionsplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Die Transformanten wurden in LB-Medium angezogen und die Expression der rekombinanten Proteine durch Zugabe von IPTG induziert. Als die Kulturen eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 erreicht hatten, erfolgte die Induktion der Proteinsynthese. Der Aufschluss und die Proteinaufreinigung erfolgten wie im Abschnitt 3.3.7. beschrieben. Nach der Aufreinigung wurden 15 µl der Elutionsfraktionen mittels 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Elutionsfraktion 1 für Strep getaggte Proteine bzw. 100 mM Imidazolpuffer für His getaggte Proteine). Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Coomassie Brilliantblau für 10 min.

Die aufgereinigten Proteine wurden direkt für den Enzymassay eingesetzt. Dabei wird bei geeigneten Pufferbedingungen die Umsatzrate an Dihydroxyacetonphosphat bestimmt. Jeder Reaktionsansatz bestand bei diesem Assay aus aufgereinigtem MgsA (oder einer MgsA-Mutante), Imidazolpuffer und Dihydroxyacetonphosphat als Substrat. Nach einem 15 minütigen Inkubationsschritt wurde jede Probe mit Dinitrophenylhydrazin versetzt. Dieses reagiert mit Methylglyoxal zu Dinitrophenylhydrazon. Nach weiteren 15 min erfolgte die Zugabe von NaOH. In Anwesenheit von NaOH färbt Dinitrophenylhydrazon die Reaktionslösung rot. Dieser Farbumschlag konnte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 555$  nm bestimmt werden (Hopper und Cooper, 1972). Durch Zugabe von Crh in den Reaktionsansatz konnte der Einfluss auf die MgsA-Aktivität untersucht werden.



**Abbildung 4.11: Spezifische Aktivität von MgsA und den MgsA-Mutanten in An- und Abwesenheit von Crh.**

Für jeden Reaktionsansatz wurden 0,1  $\mu\text{g}$  MgsA bzw. eine der MgsA-Mutanten verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates Dihydroxyacetonphosphat gestartet. Der Einfluss einer aufsteigenden Konzentration an Crh auf die Methylglyoxalproduktion von MgsA und den MgsA-Mutanten wurde analysiert. Die Syntheserate von Methylglyoxal wurde photometrisch bestimmt. Die Werte der spezifischen Aktivität von MgsA bzw. den MgsA-Mutanten wurde mit drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Zunächst sollte die spezifische Aktivität von MgsA in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Crh untersucht werden. Dafür wurde jeweils 0,1  $\mu\text{g}$  MgsA mit aufsteigenden Konzentrationen an Crh inkubiert. Die Methylglyoxalproduktion wurde im Anschluss spektrophotometrisch bestimmt. In der Abbildung 4.11.A. ist der Einfluss von Crh auf die Methylglyoxalproduktion von MgsA dargestellt. In Abwesenheit von Crh wurde eine spezifische Aktivität von ca. 0,15 mol/(min\*g) für MgsA gemessen. Mit aufsteigender Konzentration an Crh nahm die spezifische Aktivität von MgsA ab. Die volle Inhibition von MgsA wurde bei einer Konzentration von 4  $\mu\text{g}$  Crh erreicht. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen der Arbeit von Landmann *et al.*, 2011.

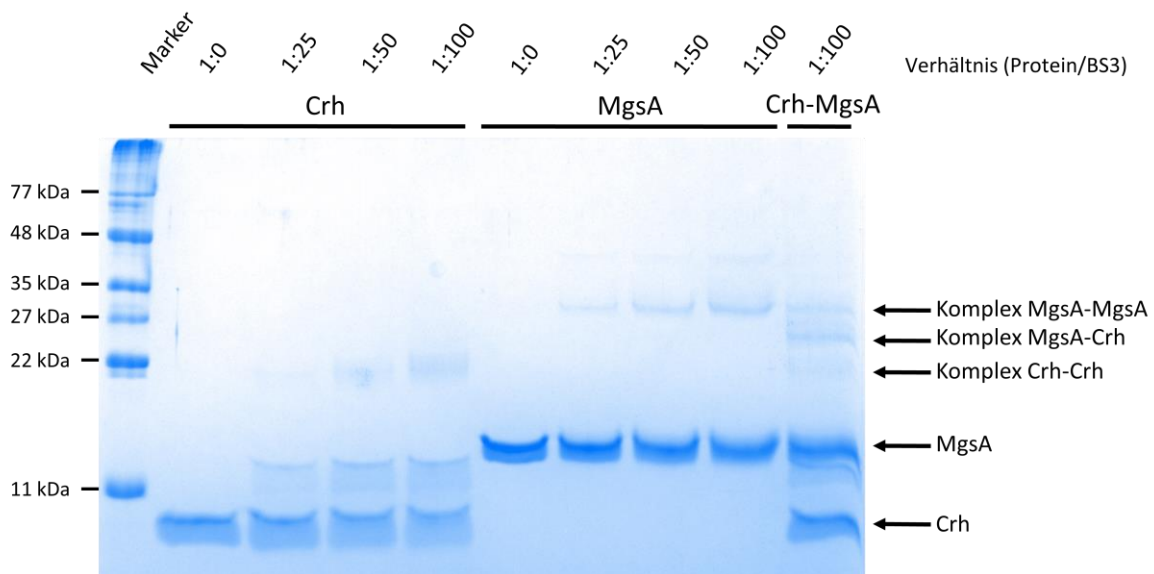
Im nächsten Schritt wurde die spezifische Aktivität der MgsA Mutanten bestimmt. Wie bereits beschrieben, wurde die Methylglyoxalproduktion spektrophotometrisch bestimmt.

Hierfür wurde die gleiche Menge der jeweiligen MgsA-Mutante (0,1 µg) mit steigender Konzentration an Crh inkubiert. Aus der Abbildung 4.11.B. wird ersichtlich, dass keine der MgsA-Mutanten enzymatisch aktiv war. Alle isolierten und charakterisierten MgsA-Mutanten waren weder in der Lage, mit Crh zu interagieren noch Methylglyoxal zu produzieren. Hier zeigte sich, dass lediglich ein stabiles Heteromer aus MgsA enzymatisch aktiv ist. Die geringere Eigeninteraktion der MgsA-Mutanten führte zur Inaktivierung von MgsA.

#### **4.1.9. *In vitro* Vernetzung von MgsA und Crh mittels BS3**

Anhand eines genetischen Screens konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der N-Terminus von MgsA mit den Helices 1 und 2 aus Crh interagiert. Dies sollte *in vitro* näher untersucht werden. Hierfür wurden zunächst die beiden Wildtypproteine MgsA und Crh aufgereinigt (siehe Kapitel 4.1.8.). Für die Analyse des Proteinkomplexes wurden MgsA und Crh im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 gemischt und eine Proteinkonzentration von 25 pmol eingestellt. Im Anschluss wurden die Proben mit aufsteigender Konzentration des Vernetzers Bissulfosuccinimidyl suberate (BS3) vermengt und für 30 min bei RT inkubiert. Hierbei diente eine Probe als Kontrolle, die nicht mit dem „cross-linker“ BS3 behandelt wurde. Bei der direkten Protein-Protein Interaktion von MgsA und Crh vernetzt BS3 eng benachbarte Lysinreste in einem Abstand von bis zu 10 Å. Durch die Vernetzung mit BS3 entstehen Amid-Verbindungen, die nicht durch Erhitzen aufgelöst werden können. Daher war es möglich, auftretende Proteinkomplexe mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese zu untersuchen. Im Anschluss erfolgte die Analyse der quervernetzten Peptide mit Hilfe der Massenspektrometrie. Die Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse wurde im Kapitel 3.3.8. beschrieben. Die Abbildung 4.12. zeigt die Vernetzung der einzelnen Proteine Crh, MgsA und dem Gemisch aus Crh/MgsA in Anwesenheit aufsteigender BS3 Konzentrationen. Unvernetzte Proteine dienten als Negativkontrolle. Sowohl Crh als auch MgsA zeigten im unvernetzten Zustand keine Homomultimere. Mit aufsteigender Konzentration an BS3 veränderte sich das Bandenmuster. Die unvernetzte Probe von Crh zeigte eine Bande bei 10 kDa. Dies entsprach der bekannten Masse von Crh. Im vernetzten Zustand wurden zusätzliche Banden mit einer Masse von ca. 11 kDa und 20 kDa detektiert. Die 20 kDa Bande war ein möglicher Hinweis

auf Crh-Dimere. Ein ähnliches Bild zeigte sich für MgsA. Bei der unvernetzten Probe wurde eine Bande bei ca. 17 kDa registriert. Dies entsprach der bekannten Masse von MgsA. Die Probe, bei der MgsA mit BS3 vernetzt wurde, zeigte eine zusätzliche Bande bei ca. 35 kDa. Dabei handelte es sich um MgsA-Dimere. Dies war ein eindeutiger Hinweis darauf, dass sowohl MgsA als auch Crh Homomultimere bilden. In Anwesenheit von BS3 wurde für die Probe, in der MgsA und Crh im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vorlagen, mehrere Banden beobachtet. Zum einen waren die unvernetzten Proteine Crh und MgsA erkennbar, zum anderen traten Banden mit einer Masse von ca. 25 kDa und 35 kDa auf. Anhand der bekannten Größen von Crh und MgsA entsprach dies dem Homomultimer von MgsA und dem Heteromultimer aus Crh und MgsA. Dieses Ergebnis sollte mittels Western Blot und Massenspektrometrie weiter analysiert werden.

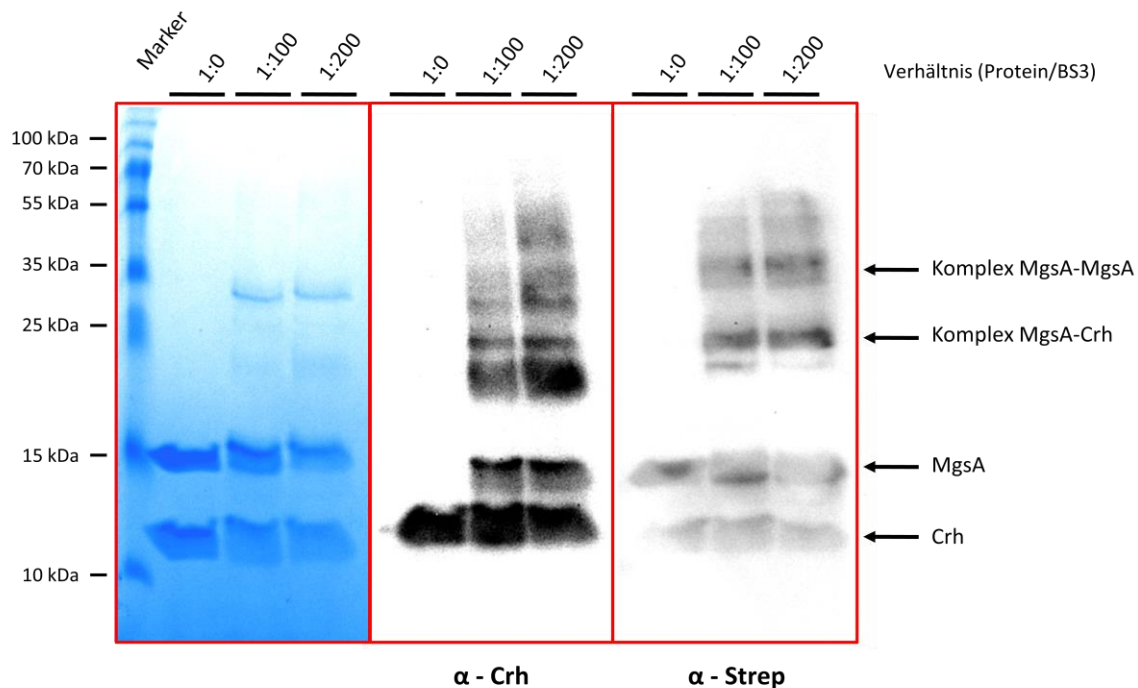


**Abbildung 4.12: *In vitro* Vernetzung von MgsA und Crh mit BS3.**

Die Vernetzung von MgsA und Crh erfolgte mit BS3, das eng benachbarte Lysinreste miteinander verbindet. Da die entstandenen Amid-Verbindungen irreversibel sind, kann das Multimerisierungsverhalten von Crh und MgsA mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht werden. Für jeden Reaktionsansatz wurden 25 pmol Protein (Crh bzw. MgsA oder ein Gemisch aus MgsA und Crh im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1) eingesetzt. Im Anschluss wurden die Proben mit aufsteigender Konzentration an BS3 für 30 min bei RT inkubiert. Die Analyse des Multimerisierungsverhalten von MgsA und Crh erfolgte mit einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau für 10 min gefärbt. Die Pfeile rechts neben der Grafik zeigen die unvernetzten Proteine Crh und MgsA sowie die Komplexe aus MgsA und Crh/MgsA an.



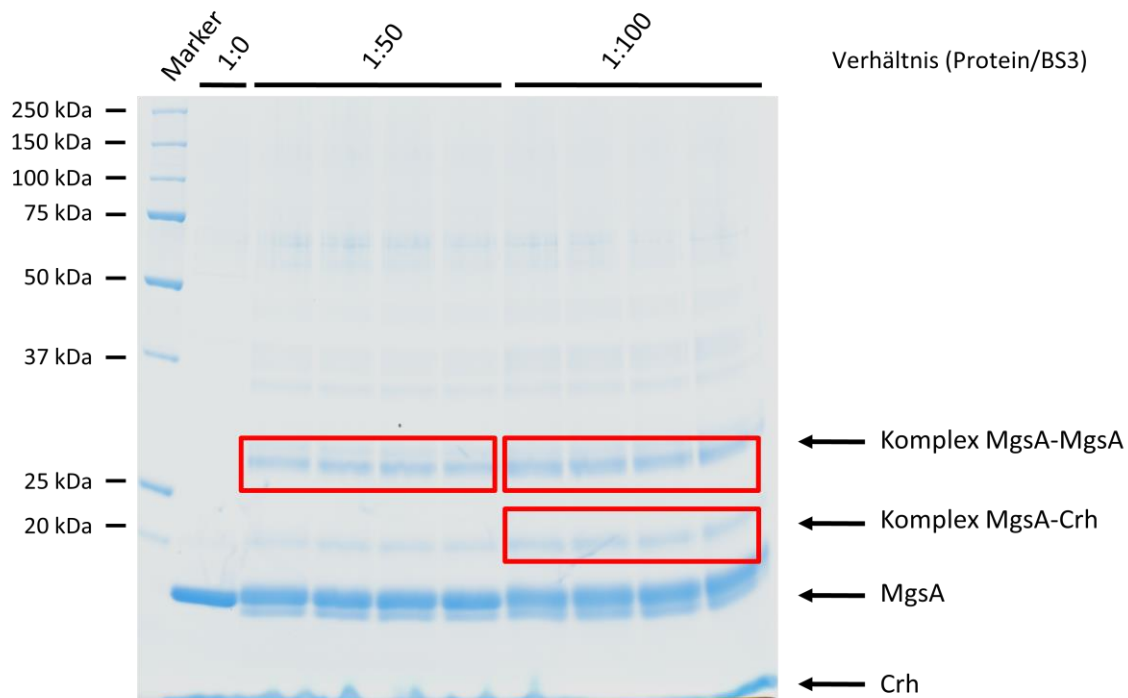
Um die Interaktion zwischen MgsA und Crh zu bestätigen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Wie bereits gezeigt, konnten MgsA und Crh mit Hilfe von BS3 vernetzt werden. Durch spezifische Antikörper, die gegen Crh bzw. Strep-MgsA gerichtet waren, konnten Proteinkomplexe identifiziert werden. Die einzelnen Proben wurden wie bereits beschrieben mit BS3 versetzt. Für diesen Versuch wurde ein Protein/BS3 Verhältnis von 1:100 und 1:200 verwendet. Ein Überschuss an BS3 war nötig, damit die Proteine ausreichend miteinander vernetzt werden. Nach dem Vernetzen der Proteine wurden die Proben mittel 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Gel geteilt und zum einen für die Färbung mit Coomassie und zum anderen für den Western Blot genutzt. Die Abbildung 4.13. zeigt den Western Blot der vernetzten Proteine MgsA und Crh. In der Kontrollprobe wurden lediglich die unvernetzten Proteine MgsA und Crh nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten weitere Banden bei den mit BS3 behandelten Proben detektiert werden. Sowohl mit dem Antikörper, der gegen Strep-MgsA gerichtet war, als auch der Antikörper, der gegen Crh gerichtet war. Es wurden zwei prägnante Banden identifiziert, die sich auf einer Höhe von ca. 25 und 35 kDa befanden. Die Masse von ca. 25 kDa entsprach annähernd der Summe der Molekulargewichte von Crh-His (10 kDa) und Strep-MgsA (17 kDa), wohingegen die Masse von ca. 35 kDa in etwa der Summe der Molekulargewichte zweier Strep-MgsA (17 kDa) Moleküle entsprach. Weitere Banden zeigten möglicherweise ein Heterotetramer aus zwei Molekülen MgsA und Crh oder ein Dimer von Crh, die für die weitere Charakterisierung der Interaktion zwischen Crh und MgsA nicht berücksichtigt wurden. Das durchgeführte BS3-Experiment bestätigte daher die direkte Interaktion zwischen Crh und MgsA. Zusammenfassend zeigen diese Daten das Auftreten eines MgsA-Komplexes sowie das Vorhandensein eines Heteromultimer bestehend aus Crh und MgsA.



**Abbildung 4.13: Nachweis der vernetzten MgsA und Crh/MgsA Komplexe.**

Die Vernetzung von MgsA und Crh erfolgte mit BS3, das eng benachbarte Lysinreste miteinander verbindet. Für jeden Reaktionsansatz wurden 25 pmol Protein (Crh bzw. MgsA oder ein Gemisch aus MgsA und Crh im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1) eingesetzt. Im Anschluss wurden die Proben mit BS3 versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Für diesen Versuch wurde ein Protein/BS3 Verhältnis von 1:100 und 1:200 verwendet. Die Analyse des Multimerisierungsverhalten von MgsA und Crh erfolgte mit einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel. Nach dem Gellauf wurde das Gel geteilt. Ein Teil wurde mit Coomassie Brilliantblau für 10 min gefärbt. Mit den anderen beiden Teilen erfolgte ein Western Blot mit gegen den Strep-Tag (rechts) zur Detektion von Strep-MgsA und gegen Crh (Mitte) gerichtete Antikörper. Die Pfeile rechts neben der Grafik zeigen die unvernetzten Proteine Crh und MgsA sowie die Komplexe aus MgsA und Crh/MgsA an.

Der Komplex aus MgsA und Crh konnte durch Vernetzung beider Proteine mit BS3 bestätigt werden. Die gemeinsame Interaktionsfläche sollte im weiteren Verlauf mittels Massenspektrometrie bestimmt werden. Die Abbildung 4.14. zeigt das analytische SDS-Polyacrylamidgel, das für die Untersuchung des Multimerisierungsverhalten von MgsA und Crh verwendet wurde. Anhand der vorher durchgeführten Titration mit BS3 und den einzelnen Proteinen wurde das optimale Protein/BS3 Verhältnis identifiziert, welches am besten für die weiteren Untersuchungen geeignet war. Für die massenspektrometrische Analyse von MgsA bzw. des MgsA-Crh Komplexes wurde ein 50- bzw. 100-facher Überschuss an BS3 verwendet. Die entsprechenden Banden, die auf diese Komplexe hinwiesen (in der Abbildung rot markiert), wurden aus dem Gel ausgeschnitten, um die darin vorhandenen Proteine zu identifizieren. Die Prozedur für die Isolation von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel ist in dem Abschnitt 3.3.8. detailliert beschrieben.



**Abbildung 4.14: Analytisches SDS-Polyacrylamidgel für die Bestimmung der an der Interaktion zwischen MgsA und Crh beteiligten Aminosäuren mittels Massenspektrometrie.**

Die Vernetzung von MgsA und Crh erfolgte mit BS3. Für jeden Reaktionsansatz wurden 25 pmol Protein (ein Gemisch aus MgsA und Crh im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1) eingesetzt. Im Anschluss wurden die Proben mit der angegebenen Menge an BS3 (ein 50 bzw. 100 facher Überschuss an BS3) vermengt. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. Die rot markierten Bereiche wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Die Pfeile rechts neben der Grafik zeigen die unvernetzten Proteine Crh und MgsA sowie die Komplexe aus MgsA und Crh/MgsA an. Die Rot markierten Proben wurden ausgeschnitten und die darin vernetzten Peptide mittels Massenspektrometrie analysiert.

Anhand der massenspektrometrischen Analyse der Proben aus Abbildung 4.14. konnten die vorher erhaltenen genetischen Daten bestätigt werden. Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse ist in den Tabellen 4.3. und 4.4. zusammengefasst. Dabei kann zwischen zwei Klassen von vernetzten Peptiden unterschieden werden. Es konnten Lysinreste identifiziert werden, die auf eine intermolekulare Protein-Vernetzung hingedeutet haben. Bei diesen vernetzten Peptiden konnte jeweils eines der beiden Peptide MgsA und Crh zugeordnet werden. Es sind wiederholt Verbindungen zwischen den Lysinresten zehn, elf und zwölf aus MgsA und den Lysinresten 40 und 41 aus Crh aufgetreten. Die Interaktion dieser Bereiche bestätigt den zuvor durchgeführten genetischen Screen. Dies zeigt, dass sich bei der direkten Protein-Protein Interaktion zwischen MgsA und Crh der N-Terminus von MgsA und die Helix 2 von Crh in räumlicher Nähe befinden und möglicherweise eine gemeinsame Interaktionsfläche bilden.

**Tabelle 4.3: Übersicht der identifizierten intermolekularen Protein-Vernetzungen zwischen MgsA und Crh.**

Protein [AS]		Protein [AS]		Peptid 1	Peptid 2
MgsA	K10	Crh	K40	IALIAHDK*KK	DGK*K
MgsA	K10	Crh	K41	IALIAHDK*K	K*VNAK
MgsA	K11	Crh	K40	K*QDMVQFTTAYR	DGK*K
MgsA	K12	Crh	K40	K*QDMVQFTTAYR	DGK*K
MgsA	K12	Crh	K41	K*QDMVQFTTAYR	K*VNAK

\* markiert sind die vernetzten Lysinreste der identifizierten Peptide

Auf der anderen Seite wurden verlinkte Lysinreste identifiziert, die auf eine intramolekulare Vernetzung hingedeutet haben. Bei diesen vernetzten Peptiden konnten beide Peptide entweder MgsA oder Crh zugeordnet werden. Für Crh wurden intramolekulare Vernetzungen zwischen den  $\beta$ -Faltblättern 1 und 2 sowie 1 und 3 identifiziert. Anhand der Struktur von Crh konnte bereits gezeigt werden, dass sich diese Bereiche in räumlicher Nähe befinden (Favier *et al.*, 2002). Somit war BS3 in der Lage, Lysinreste dieser Faltblätter untereinander zu verbinden. Außerdem konnten intramolekulare Vernetzungen von MgsA identifiziert werden. Dabei wurden entweder Lysinreste (K2, K10, K12 und K40) von einem oder zwei MgsA Molekülen miteinander vernetzt. Anhand der identifizierten intramolekularen und intermolekularen Peptid-Verbindungen ist zu erkennen, dass die Lysinreste K10, K11 und K12 aus MgsA aufgrund räumlicher Nähe mit Crh und MgsA vernetzt werden konnten. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung der entsprechenden Aminosäuren an der Interaktion zwischen MgsA und Crh hin.

**Tabelle 4.4: Übersicht der identifizierten intramolekularen Protein-Vernetzungen in MgsA und Crh.**

Protein	AS 1	AS 2	Peptid 1	Peptid 2
Crh	K5	K41	MVQQK*VEVR	K*VNAK
Crh	K5	K37	FTSDVFLEK*DGK	MVQQK*VEVR
Crh	K11	K40	LK*TGLQARPAAL	DGK*K
MgsA	K2	K12	SSSMK*IALIAHD	K*QDMV
MgsA	K10	K12	IALIAHDK*K	K*QDMVQ
MgsA	K40	K10	TGTTGLK*IHEATGL	LIAHDK*K

\* markiert sind die vernetzten Lysinreste der identifizierten Peptide

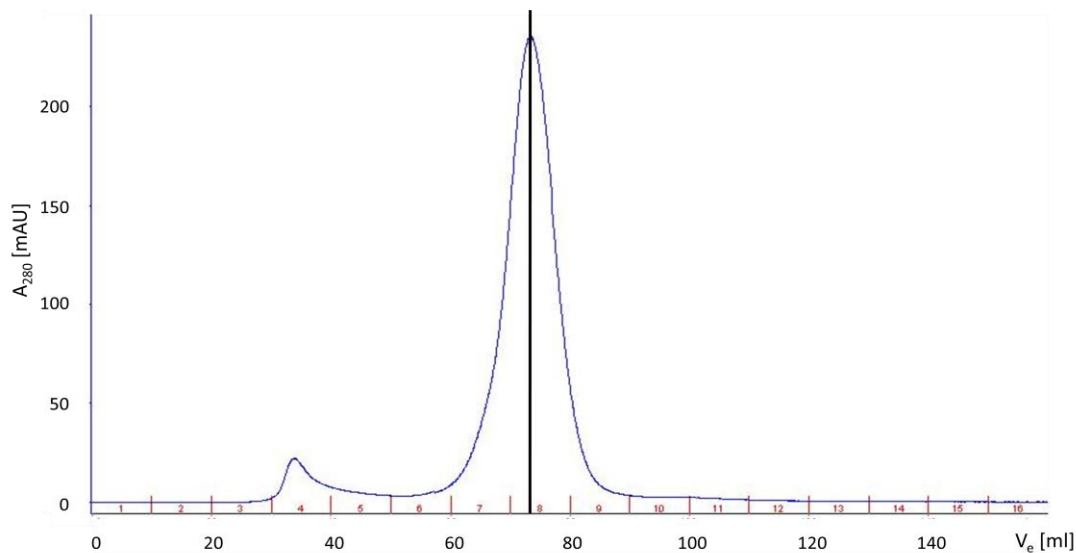
Die erhaltenen Ergebnisse der Versuche mit BS3 bestätigen die zuvor erhaltenen genetischen Daten. Zusammenfassend zeigen alle Daten, dass der N-Terminus von MgsA und die Helix 2 aus Crh eine gemeinsame Interaktionsfläche bilden. Zusätzlich ergibt sich

daraus die Hypothese, dass sich die Interaktionsflächen zwischen dem MgsA- und dem MgsA/Crh-Komplex zumindest teilweise überlappen. Somit kann ein MgsA Molekül zu einem bestimmten Zeitpunkt nur Bestandteil eines der beiden Komplexe sein. Im Anhang befindet sich eine Zusammenfassung sämtlicher Daten, die mittels Massenspektrometrie erhalten wurden.

#### **4.1.10. *In vitro* Untersuchung der MgsA-Oligomerisierung**

Die bisher zur Verfügung stehenden Daten zeigen, dass MgsA ein Homomultimer bildet. Um die Frage zu beantworten, ob MgsA aus *B. subtilis* ein Hexamer wie MgsA aus *E. coli* bildet, sollte der Oligomerisierungsstatus mittels analytischer Gelfiltration und Blau native-PAGE genauer untersucht werden. Wie in Kapitel 3.3.7. beschrieben wurde Strep-MgsA mit Hilfe des Expressionsplasmides pGP1301 (pGP172-*mgsA*) aufgereinigt. Im Anschluss wurden die Elutionsfraktionen mittels SDS-Page auf Proteingehalt und Reinheit untersucht. Abbildung 4.10. zeigt die erfolgreiche Aufreinigung von MgsA mit einer theoretischen Masse von 17 kDa. Die Reinheit der Probe ist ein wichtiges Kriterium für die folgende Analyse per Gelfiltration und Blau native-PAGE. Nach der Aufreinigung erfolgte die Aufkonzentrierung der Probe. Die Proteinlösung wurde sorgfältig auf die Matrix einer Vivaspin® Turbo 15 gegeben und bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Proteingehalt der Lösung wurde in regelmäßigen Abständen gemessen, bis eine Konzentration von 10 mg/ml erreicht wurde.

In der Abbildung 4.15. ist das Ergebnis der analytischen Gelfiltration gezeigt. Dabei wurde ein signifikanter Ausschlag für MgsA detektiert. In Relation zum Standard korreliert dieser Peak mit dem Molekulargewicht eines MgsA Hexamers. Mit Hilfe der Standardgeraden konnte für dieses Signal ein Molekulargewicht von ca. 84 kDa berechnet werden. Dies entspricht in etwa dem theoretischen Molekulargewicht eines MgsA Hexamers. Somit konnte gezeigt werden, dass MgsA aus *B. subtilis* als Hexamer in seiner aktiven Form vorliegt.



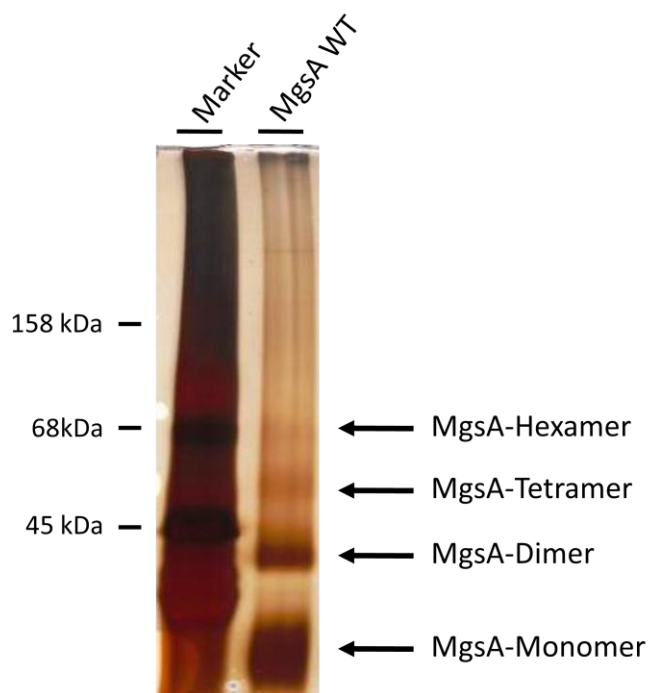
**Abbildung 4.15: Analytische Gelfiltration zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von MgsA.**

Die Proteinlösung mit dem aufgereinigten MgsA wurde an einer Superdex™ S200 16/600 getrennt. Im Abschnitt 3.3.7. wurde die Berechnung der Standardgleichung beschrieben. Die Standardgerade ergibt sich durch die Auftragung des Elutionsvolumens [ $V_e$ ] gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes der eingesetzten Proteine. Folgende Proteine wurden für die Berechnung der Standardgeraden verwendet: Thyroglobulin (670 kDa), g-Globulin (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und der Cofaktor Vitamin B12 (1,3 kDa). Im Anschluss erfolgte mit Hilfe der Standardgleichung die Berechnung des Molekulargewichtes der Probe. Die Absorption der Probe wurde bei 280 nm gemessen [ $A_{280}$ ].

Die Proteinlösung wurde ebenfalls mit Hilfe der Blau native-PAGE untersucht. Das Ergebnis ist in der Abbildung 4.16. dargestellt. Anhand der Standardproteine können weitere Rückschlüsse auf das Molekulargewicht und damit auf den Oligomerisierungsstatus von MgsA geschlossen werden. Es konnten vier Banden mit unterschiedlicher Intensität detektiert werden. Die oberste Bande entsprach einem Molekulargewicht von  $>68$  kDa. Das theoretische Molekulargewicht eines MgsA Molekül beträgt ca. 17 kDa. Demzufolge repräsentiert die oberste Bande sehr wahrscheinlich ein Hexamer. Das zweithöchste Signal war zwischen 45 kDa und 68 kDa zu sehen. Anhand des Molekulargewichtes von MgsA entsprach diese Bande einem Tetramer von MgsA. Weiterhin wurden zwei Signale  $<45$  kDa gefunden. Das obere der beiden Signale repräsentierte ein MgsA-Dimer und das untere zeigte das MgsA-Monomer. Des Weiteren ist der Abbildung eine unterschiedliche Verteilung zwischen Monomer, Dimer, Tetramer und Hexamer zu entnehmen. Etwa 70% der Moleküle lagen als Monomer, weitere 20% als Dimer und jeweils 5% als Tetramer und Hexamer vor. Im Vergleich zur analytischen Gelfiltration, bei der lediglich das Hexamer beobachtet wurde ist hier anzunehmen, dass das Hexamer während des Gellaufes zerfällt bzw. die Pufferbedingungen für die Blau native-PAGE das Oligomerisierungsverhalten von MgsA

beeinflussten. Schließlich unterstützen die Daten der Gelfiltration und der Blau native-PAGE die Hypothese, dass MgsA in der aktiven Form als Hexamer vorliegt. Das Hexamer ist kein starrer Komplex, da es in die einzelnen Komponenten zerfallen kann.

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Eichproteine und MgsA ist es schwierig, mit Hilfe der Blau native-PAGE das genaue Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine zu bestimmen. Das Laufverhalten der Proteine wird sehr stark von den jeweiligen Eigenschaften der Proteine beeinflusst. Daher dient das ermittelte Molekulargewicht lediglich als grober Richtwert.



**Abbildung 4.16: Blau native-PAGE zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von MgsA.**

Für die Blau native-PAGE wurde 1,5 µg gereinigtes MgsA auf ein 5-25%iges nicht denaturierendes PAA Gel aufgetragen. Die Visualisierung der Proteine und Proteinkomplexe erfolgte mittels Silberfärbung. Die identifizierten Banden mit einer Größe von >68 kDa, >45 kDa und <45kDa repräsentieren das MgsA-Hexamer, MgsA-Tetramer sowie das MgsA-Dimer und das MgsA-Monomer.

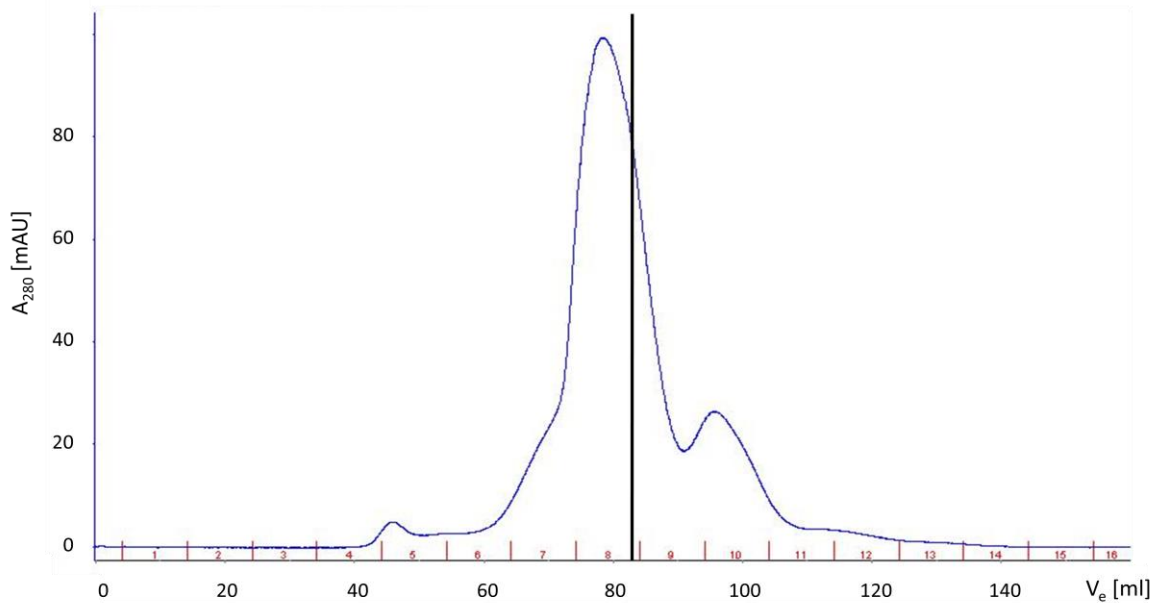
#### 4.1.11. *In vitro* Untersuchung der Crh/MgsA Heteromerisierung

Um den Einfluss von Crh auf den Oligomerisierungsstatus von MgsA zu untersuchen wurden weitere analytische Gelfiltrationen durchgeführt. Hierfür wurden Strep-MgsA und Crh-His wie in Kapitel 3.3.7. beschrieben mit Hilfe der Expressionsplasmide pGP1301 (pGP172-*mgsA*) und pAG1 (*crh*) aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurden die Elutionsfraktionen mittels

SDS-Page auf Proteingehalt und Reinheit untersucht. Die Abbildung 4.10. zeigt die erfolgreiche Aufreinigung von MgsA und Crh mit einer theoretischen Masse von 17 und 10 kDa. Im Anschluss erfolgte ebenfalls eine Aufkonzentration der Lösungen, bis zu einem Proteingehalt von ca. 10 mg/ml. Danach wurde ein Gemisch aus Crh und MgsA im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 angelegt und für 30 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit bildet sich der Crh/MgsA Komplex aus. In der Abbildung 4.17. ist das Ergebnis der analytischen Gelfiltration gezeigt. Es wurden zwei signifikante Signale detektiert. Der erste Ausschlag ähnelt dem der Gelfiltration von MgsA (siehe dazu Abbildung 4.15.). Jedoch war zu erkennen, dass das Signal breiter war. In Relation zum Standard korreliert dieser Ausschlag mit dem Molekulargewicht eines Hexamers bzw. einem Heterotetramer aus jeweils zwei Molekülen MgsA und Crh. Wird lediglich der hintere Teil des Signals berücksichtigt, so konnte mit Hilfe der Standardgerade für diesen Peak ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa berechnet werden. Dies entsprach in etwa dem theoretischen Molekulargewicht eines Heterotetramers aus jeweils zwei Molekülen MgsA und Crh ( $[2 \times 17 \text{ kDa}] + [2 \times 10 \text{ kDa}]$ ). Die Analyse dieser Elutionsfraktion mittels SDS-Page bestätigte, dass der Komplex aus Crh und MgsA im Verhältnis 1:1 gebildet wird. Der zweite Ausschlag korrelierte mit dem Molekulargewicht eines Crh Monomers. Anhand der Standardgerade konnte für dieses Signal ein Molekulargewicht von ca. 12 kDa berechnet werden. Dies entsprach in etwa dem theoretischen Molekulargewicht von Crh.

Anhand der erhaltenen Daten ergab sich die Annahme, dass nicht phosphoryliertes Crh an das MgsA-Hexamer bindet. Als Folge dessen zerfällt der Komplex in ein Heterotetramer, bestehend aus jeweils zwei MgsA- und Crh-Molekülen.





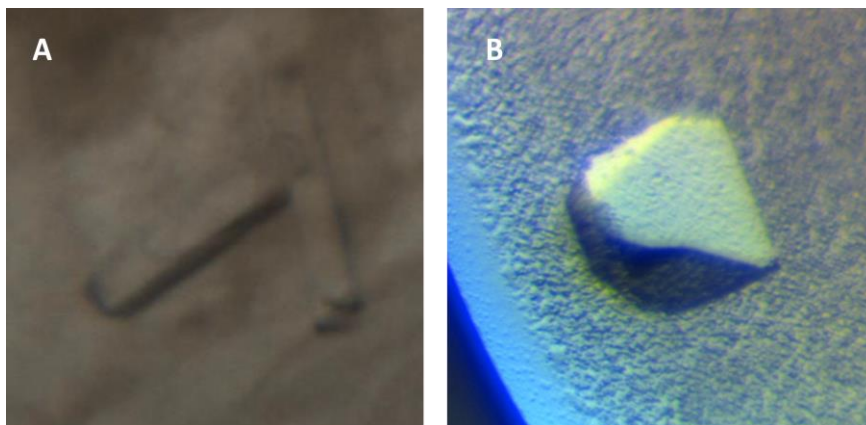
**Abbildung 4.17: Analytische Gelfiltration zur Bestimmung der Heteromerisierung von MgsA und Crh.**

Die Proteinlösung mit dem Gemisch aus Crh und MgsA wurde an einer Superdex™ S200 16/600 getrennt. Im Abschnitt 3.3.7. wurde die Berechnung der Standardgleichung beschrieben. Die Standardgerade ergibt sich durch die Auftragung des Elutionsvolumen [ $V_e$ ] gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes der eingesetzten Proteine. Folgende Proteine wurde für die Berechnung der Standardgeraden verwendet: Thyroglobulin (670 kDa), g-Globulin (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und der Cofaktor Vitamin B12 (1,3 kDa). Im Anschluss erfolgte mit Hilfe der Standardgleichung die Berechnung des Molekulargewichtes der Probe. Die Absorption der Probe wurde bei 280 nm gemessen [ $A_{280}$ ].

#### 4.1.12. Struktur des MgsA Hexamers: ein Trimer aus Dimeren

Die Daten der analytischen Gelfiltration und der Blau native-PAGE deuten darauf hin, dass die aktive Form von MgsA ein Hexamer bildet. Mit Hilfe der Struktur sollte dies bestätigt werden. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ralf Ficner (Abteilung für Molekulare Strukturbiologie der Universität Göttingen) konnte die Struktur von MgsA gelöst werden. Zunächst wurde Strep-MgsA und Crh-His wie bereits mehrfach beschrieben mit Hilfe der Expressionsplasmide pGP1301 (pGP172-*mgsA*) und pAG1 (*crh*) aufgereinigt (siehe dazu Abbildung 4.10.). Grundvoraussetzung für die Kristallisation sind große Mengen an hochreinem Protein. Damit sich Kristalle ausbilden können, ist es erforderlich, dass das auszukristallisierende Protein in Übersättigung gebracht wird. Daher erfolgte nach der erfolgreichen Aufreinigung beider Proteine die Aufkonzentration der Lösungen, bis zu einem Proteingehalt von ca. 15 mg/ml.

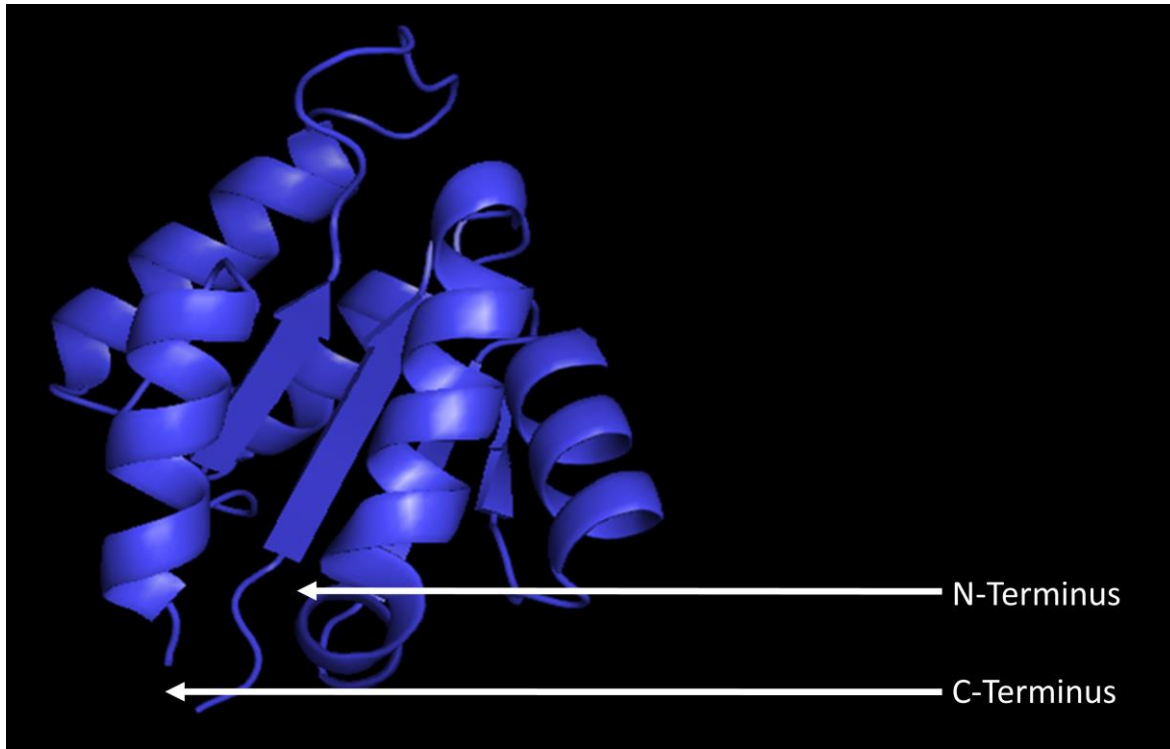
Es wurden zwei Kristallisationsansätze angelegt. Im ersten Ansatz sollten die experimentellen Hinweise, dass MgsA ein Hexamer bildet, bestätigt werden. Der zweite Ansatz diente dazu die Struktur des Crh/MgsA Komplexes zu lösen, um weitere Einblicke in die Regulation der MgsA-Aktivität durch Crh zu erhalten. Für diesen Ansatz wurden Crh und MgsA im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 gemischt. Beide Kristallisationsansätze wurden mit verschiedenen Pufferlösungen inkubiert, um die optimalen Kristallisationsbedingungen zu finden. Hierfür wurde ein breites Spektrum an Puffern verwendet (1-3 M Natrium – Kaliumphosphat, 10 – 20% Polyethylenglycol [PEG] verschiedener Kettenlängen, z.B. PEG 6000, 1 – 4 M Ammoniumsulfat und 0,5 – 1,5 M Natriumzitat [pH 4 – 10]). Die Ansätze wurden gemischt und für einige Wochen bei 4°C inkubiert. Die Abbildung 4.18. zeigt das Ergebnis der Kristallisationsansätze. Die mikroskopische Analyse beider Proben bestätigte die Ausbildung von Kristallen.



**Abbildung 4.18: Kristallisationsansätze zur Bestimmung der Struktur von MgsA und dem Crh/MgsA Komplex.** Hochreines MgsA (15 mg/ml) bzw. ein Gemisch aus Crh und MgsA (je 7,5 mg/ml) im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 wurden für die Kristallisation eingesetzt. Die Kristallisationsansätze wurden mit verschiedenen Pufferlösungen inkubiert um die optimalen Kristallisationsbedingungen zu bestimmen. Abbildung A zeigt den Kristallisationsansatz für MgsA und B den Kristallisationsansatz für den Crh/MgsA Komplex. Die Kristalle haben sich für beide Ansätze unter folgenden Bedingungen ausgebildet: PEG4000; Hepes-Puffer pH 8,5; 20% (w/v) Glycerol und 0.03M eines Gemisches aus divalenten Kationen.

Die erhaltenen Kristalle wurden im Anschluss für die Berechnung der Struktur von MgsA bzw. des MgsA/Crh-Komplexes verwendet. Das Röntgenstrahlungsmuster der Kristalle wurde aufgezeichnet. Die Strukturen von MgsA aus *E. coli* und Crh aus *Bacillus subtilis* dienten als Grundlage für die Berechnung der Struktur (Saadat und Harrison, 1999; Favier *et al.*, 2002). Die Programme CCP4, Phaser und Coot wurden für das „molecular replacement“ eingesetzt. Anhand der „Vorlage“ konnte die Struktur von MgsA bestimmt

werden. Die berechnete Struktur des MgsA Monomers ist in Abbildung 4.19. dargestellt. Die vier Kern bildenden  $\beta$ -Faltblätter sind von sechs  $\alpha$ -Helices umgeben.



**Abbildung 4.19: 3-dimensionale Struktur des MgsA Monomers aus *B. subtilis*.**

Anhand des Kristallisationsansatzes konnte die Struktur von MgsA gelöst werden. Die Struktur eines MgsA-Monomers zeigt, dass der Kern eines Monomers bestehend aus vier  $\beta$ -Faltblättern umgeben von sechs  $\alpha$ -Helices ist. Weiß markiert sind der N- und C-Terminus des MgsA-Monomers.

Die erhaltenen Kristalle zeigten, dass MgsA ein Hexamer bildet, wodurch die experimentellen Daten bestätigt wurden. Die Struktur des MgsA-Hexamers ist in Abbildung 4.20.A. abgebildet. Anhand der Struktur wird ersichtlich, dass das eigentliche „Hexamer“ ein Trimer aus Dimeren ist. Dabei bilden drei MgsA-Dimere die hexagonale Form. Hiermit lässt sich möglicherweise das Auftreten von MgsA-Dimeren in der Abbildung 4.16. erklären. Während der Blau native-PAGE zerfällt das „Hexamer“ in Dimere.

Die Struktur zeigt, dass es zwei Dimerisierungsgrenzflächen gibt. Eine der beiden Grenzflächen wird durch die N-terminalen Helices von MgsA gebildet. In Abbildung 4.20.A. befindet sich diese Grenzfläche zwischen den Molekülen in pink und in grau, in hellblau und in rot sowie in dunkelblau und in gelb. Diese Region ist durch Salzbrücken gekennzeichnet. Eine genauere Analyse zeigt, dass die Aminosäuren Alanin-93 und Leucin-97 maßgeblich an dieser Interaktion beteiligt sind. Eine weitere Dimerisierungsgrenzfläche bilden die

C-terminalen Helices von MgsA. Diese Grenzfläche wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Molekülen in rot und in dunkelblau, in gelb und in pink sowie in grau und in hellblau ausgebildet. Die Aminosäuren Threonin-107 und 111 sind möglicherweise an der Ausbildung dieser Grenzfläche beteiligt. Hier ergibt sich die Vermutung, dass durch die Bindung von Crh an das MgsA-Hexamer strukturelle Veränderungen ausgelöst werden, die bewirken, dass das Hexamer in drei Dimere zerfällt. Welche der beiden Dimerisierungsgrenzfläche dabei aufgebrochen wird ist jedoch unklar. Zum aktuellen Zeitpunkt konnte leider die Struktur des Crh/MgsA Komplexes durch eine Überlagerung beider Proteine nicht bestimmt werden. Jedoch konnte Anhand der genetischen Daten und der Strukturen beider Proteine ein Computermodell des Crh/MgsA-Komplexes erstellt werden. Die Abbildung 4.20.B. zeigt den Komplex zwischen MgsA und Crh. Hierbei sind mehrere überlagerte Crh-Moleküle abgebildet, die an ein MgsA-Monomer (grün) binden. Die Berechnung ergab, dass Crh möglicherweise an dem N-Terminus bzw. der C-terminalen Helix von MgsA bindet. Hier ist vor allem die Helix 2 mit den Methioninen 48 und 51 maßgeblich an der Interaktion beteiligt. Das Modell steht im Einklang mit vorangegangenen Studien, die sich mit der Interaktion von Crh beschäftigt haben (Schumacher *et al.*, 2006, Schumacher *et al.*, 2007).





**Abbildung 4.20: Modell des MgsA-Hexamers.**

Anhand des Kristallisationsansatzes konnte die Struktur von MgsA aufgelöst werden. MgsA bildet in seiner aktiven Form ein Hexamer, das aus einem Trimer von Dimeren besteht. Die einzelnen MgsA-Moleküle sind in den Farben Dunkelblau, Gelb, Pink, Grau, Hellblau und Rot dargestellt. A) Die Struktur eines MgsA-Hexamers. Zu erkennen sind die verschiedenen Dimerisierungsgrenzflächen zwischen den einzelnen MgsA-Monomeren. (Grenzfläche 1, charakterisiert durch Salzbrücken: dunkelblau und gelb, pink und grau sowie hellblau und rot); (Grenzfläche 2, charakterisiert durch Wasserstoffbrückenbindungen: rot und dunkelblau, gelb und pink sowie grau und hellblau) B) Modell des Crh/MgsA Komplexes. Crh (farblich; rotierend entlang der Interaktionsfläche zwischen Crh und MgsA) bindet an den N-Terminus und die C-terminale Helix von MgsA (grün).

## 4.2. Die Bedeutung des Zitratzyklus für das Wachstum von *B. subtilis*

Der Zitratzyklus gilt als zentrale Drehscheibe des Stoffwechsels von *B. subtilis*, in dem sowohl Metabolite abgebaut werden, als auch Intermediate für andere Reaktionen synthetisiert werden. Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, kann in Acetyl-CoA umgewandelt werden, welches in den Zitratzyklus eingeschleust wird. *B. subtilis* besitzt einen vollständigen Zitratzyklus und kann daher Pyruvat vollständig in CO<sub>2</sub> umwandeln (Sonenshein, 2002). Der Zitratzyklus gilt als essentiell für *B. subtilis*. Er hat jedoch für einige verwandte Organismen keine große Bedeutung. *Listeria monocytogenes* besitzt keinen vollständigen Zitratzyklus. Es fehlt der  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase. Demzufolge kann Oxalacetat nur über Carboxylierung von von Pyruvat hergestellt werden (Eisenreich *et al.*, 2006; Schaer *et al.*, 2010; Glaser *et al.*, 2001). Dies ist ein Hinweis darauf, dass auch in *B. subtilis* der Zitratzyklus möglicherweise nicht essentiell ist.

Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die einzelnen Enzyme des Zitratzyklus und der anaplerotischen Reaktionen notwendig für das Leben von *B. subtilis* sind.

### 4.2.1. Der Zitratzyklus ist nicht essentiell für *B. subtilis*

Als erstes sollten sämtliche Gene, die für Enzyme des Zitratzyklus kodieren, deletiert werden. Ein Überblick der Enzyme, die an der Umsetzung von Pyruvat zu CO<sub>2</sub> beteiligt sind, ist der Einleitung zu entnehmen. Hierfür wurden mittels LFH-PCR die Einzelmutanten GP790 ( $\Delta$ *citZ-mdh*), GP791 ( $\Delta$ *sucCD*), GP792 ( $\Delta$ *sdhCAB*), GP1275 ( $\Delta$ *citB*) und GP1276 ( $\Delta$ *odhAB*) hergestellt. Für die Konstruktion der Deletionsmutanten von *B. subtilis* wurden zunächst die Marker, die eine Resistenz gegenüber Kanamycin, Erythromycin, Chloramphenicol, Tetrazyklin, Phleomycin und Spectinomycin vermitteln, amplifiziert. Für die Generation der Einzelmutanten mussten weiterhin die Regionen strangauf- und strangabwärts der zu deletierenden Gene amplifiziert werden. Als Matrize diente hierfür die chromosomale DNA des Wildtyps 168. An das strangaufwärts und an das strangabwärts liegende DNA-Fragment wurde mit dem *reverse* Primer bzw. *forward* Primer jeweils eine 25 Nukleotide lange Sequenz angehängt. Diese Sequenz ist komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende der Resistenzkassette. In einer zweiten PCR wurden die strangauf- und -abwärts liegenden DNA-Fragmente und die Resistenzkassette über die 25 Nukleotide lange Sequenz

miteinander verbunden und amplifiziert. Hierfür wurde der *forward* Primer des strangaufwärts und der *reverse* Primer des strangabwärts liegenden Fragments benötigt. Der Wildtypstamm von *B. subtilis* wurde direkt mit den erhaltenen PCR-Produkten transformiert. Das zu deletierende Gen wurde durch doppelt homologe Rekombination gegen die entsprechende Resistenzkassette ausgetauscht. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf SP-Medium mit den entsprechenden Antibiotika. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR überprüft. Dazu wurden Primer gewählt, die oberhalb der strangaufwärts und unterhalb der strangabwärts liegenden DNA-Fragmente hybridisieren. Sämtliche Primer für die Konstruktion der Deletionsmutanten sind im Anhang aufgelistet.

Das Gen *odhB*, welches für die E2 Untereinheit des Oxoglutarat Dehydrogenase Komplexes kodiert, galt bisher als essentiell (Kobayashi *et al.*, 2003). Anhand der konstruierten Mutante GP1276 ( $\Delta odhAB$ ) konnte gezeigt werden, dass *odhB* für *B. subtilis* nicht essentiell ist (Michna *et al.*, 2014).

Im nächsten Schritt wurden die konstruierten Einzelmutanten kombiniert, sodass der resultierende *B. subtilis* Stamm GP1278 keinen funktionalen Zitratzyklus besaß. Dafür wurde der Stamm GP790 ( $\Delta citZ-mdh$ ) in angegebener Reihenfolge mit chromosomaler DNA der Stämme GP791 ( $\Delta sucCD$ ), GP792 ( $\Delta sdhCAB$ ), GP718 ( $\Delta citG$ ), GP1276 ( $\Delta odhAB$ ) und GP1275 ( $\Delta citB$ ) transformiert. Die Selektion der Transformanten der schrittweisen Deletion des Zitratzyklus erfolgte jeweils auf SP-Medium mit den entsprechenden Antibiotika. Der Deletionsstamm GP1278 wurde im Anschluss mittels PCR überprüft. Die Tabelle 4.5. zeigt die in dieser Arbeit konstruierten Einzelmutanten der Gene *citZ-mdh*, *citB*, *odhAB*, *sucCD* und *sdhCAB*. Weiterhin ist der Genotyp des Stammes GP1278 aufgelistet.

Tabelle 4.5: Überblick über wesentliche Mutanten des Zitratzyklus.

Mutante	relevanter Genotyp
GP790	$\Delta citZ-mdh::aphA3$
GP791	$\Delta sucCD::tet$
GP792	$\Delta sdhCAB::phleo$
GP1275	$\Delta citB::erm$
GP1276	$\Delta odhAB::cat$
GP1278	$\Delta citZ-mdh::aphA3, \Delta sucCD::tet, \Delta sdhCAB::phleo, \Delta citG::spec, \Delta odhAB::cat, \Delta citB::erm$

#### 4.2.2. Deletion der Zuflüsse in den Zitratzyklus von *B. subtilis*

Zusätzlich sollte ein Stamm konstruiert werden, indem sämtliche Zuflüsse des Zitratzyklus fehlen. Ein Überblick der Gene, die für Enzyme der Auffüllreaktionen des Zitratzyklus kodieren, ist der Einleitung zu entnehmen. Hierfür erfolgte wie bereits unter Punkt 4.2.1. beschrieben die Konstruktion der Stämme GP793 ( $\Delta pycA$ ) und GP797 ( $\Delta citZ$ ) mittels LFH-PCR. Nach der Amplifikation der jeweiligen strangauf- und -abwärts liegenden Fragmente, erfolgte die Fusion dieser Bereiche mit den Resistenzmarkern. Der Wildtypstamm von *B. subtilis* wurde direkt mit den erhaltenen PCR-Produkten transformiert. Das zu deletierende Gen wurde durch doppelt homologe Rekombination gegen die entsprechende Resistenzkassette ausgetauscht. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf SP-Medium mit den entsprechenden Antibiotika. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR überprüft.

Eine Kombination der Einzelmutanten ergab den *B. subtilis* Stamm GP1279, indem keine Zuflüsse in den Zitratzyklus vorliegen. Die Konstruktion erfolgte durch die Transformation des Stammes GP1160 ( $\Delta gudB$ ) in angegebener Reihenfolge mit chromosomaler DNA der Stämme GP810 ( $\Delta rocG$ ), GP1153 ( $\Delta ansAB$ ), GP797 ( $\Delta citZ$ ) und GP793 ( $\Delta pycA$ ). Die Selektion der Transformanten der schrittweisen Deletion der Zuflüsse in den Zitratzyklus erfolgte jeweils auf SP-Medium mit den entsprechenden Antibiotika. Der Deletionsstamm GP1279 wurde im Anschluss mittels PCR überprüft. Die Tabelle 4.6. zeigt die in dieser Arbeit konstruierten Einzelmutanten der Gene *citZ* und *pycA*. Weiterhin ist der Genotyp des Stammes GP1279 aufgelistet.



Tabelle 4.6: Übersicht über wesentliche Mutanten der Zuflüsse in den Zitratzyklus.

Mutante	relevanter Genotyp
GP793	$\Delta pycA::cat$
GP797	$\Delta citZ::spec$
GP1279	$trpC2, \Delta rocG::tet, \Delta gudB::aphA3, \Delta ansAB::erm, \Delta citZ::spec, \Delta pycA::cat$

### 4.2.3. Phänotypische Analyse der Deletionsstämme

Anhand der konstruierten Stämme GP1278 und GP1279 konnte gezeigt werden, dass sowohl der Zitratzyklus als auch die Reaktionen, die den Zitratzyklus speisen, für das Leben von *B. subtilis* nicht essentiell sind. Beide Stämme konnten auf SP-Medium wachsen. Jedoch zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp 168 eine Veränderung der Koloniemorphologie. Die Tabelle 4.7. zeigt die Koloniemorphologie des Stammes GP1278, ohne funktionalen Zitratzyklus und die dafür konstruierten Einzelmutanten im Vergleich zum Wildtyp 168. Die Stämme GP790 ( $\Delta citZ-mdh$ ), GP791 ( $\Delta sucCD$ ) und GP718 ( $\Delta citG$ ) hatten auf SP-Medium eine ähnliche Koloniegröße und Morphologie wie der Wildtyp 168. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese Deletionen keinen Einfluss auf das Wachstum von *B. subtilis* haben. Im Gegensatz dazu waren die Kolonien der Stämme GP792 ( $\Delta sdhCAB$ ), GP1275 ( $\Delta citB$ ), GP1276 ( $\Delta odhAB$ ) kleiner als die des Wildtyps 168. Möglicherweise bewirkt die Anhäufung von Zitrat ein vermindertes Wachstum dieser Stämme. Der fertige Deletionsstamm GP1278, der keinen funktionalen Zitratzyklus besitzt, zeigte ebenfalls eine verringerte Koloniegröße im Vergleich zum Wildtyp 168.

Tabelle 4.7: Überblick über die Koloniemorphologie der Mutanten des Zitratzyklus.

Mutante	relevanter Genotyp	Koloniegröße im Vergleich zum 168
GP718	<i>ΔcitG::spec</i>	gleich
GP790	<i>ΔcitZ-mdh::aphA3</i>	gleich
GP791	<i>ΔsucCD::tet</i>	gleich
GP792	<i>ΔsdhCAB::phleo</i>	kleiner
GP1275	<i>ΔcitB::erm</i>	kleiner
GP1276	<i>ΔodhAB::cat</i>	kleiner
GP1278	<i>ΔcitZ-mdh::aphA3, ΔsucCD::tet, ΔsdhCAB::phleo, ΔcitG::spec, ΔodhAB::cat, ΔcitB::erm</i>	kleiner

In der Tabelle 4.8. ist die Koloniemorphologie des Stammes GP1279 ohne funktionale Zuflüsse in den Zitratzyklus und die dafür konstruierten Einzelmutanten im Vergleich zum Wildtyp 168 dargestellt. Die Stämme GP793 (*ΔpycA*), GP797 (*ΔcitZ*), GP1153 (*ΔansAB*) und GP1160 (*ΔgudB*) hatten auf SP-Medium eine ähnliche Koloniegröße und Morphologie wie der Wildtyp 168. Dies deutet darauf hin, dass diese Deletionen keinen Einfluss auf das Wachstum von *B. subtilis* haben. Im Vergleich zum Wildtyp waren die Kolonien des Stammes GP810 (*ΔrocG*) kleiner. Das Fehlen der aktiven Glutamatdehydrogenase RocG führt zur Akkumulation toxischer Intermediate, die einen negativen Effekt auf das Zellwachstum haben (Gunka *et al.*, 2012). Der fertige Deletionsstamm GP1279 ohne Zuflüsse in den Zitratzyklus zeigte ebenfalls eine verringerte Koloniegröße im Vergleich zum Wildtyp 168. Auch hier bewirkt möglicherweise die Anhäufung toxischer Intermediate ein verringertes Wachstum.

Zusammenfassend sind alle Mutanten lebensfähig. Jedoch ist die verringerte Koloniegröße einiger Mutanten ein direkter Hinweis auf mögliche Wachstumsdefizite der entsprechenden Stämme. Die Deletion der Gene *sdhCAB*, *citB*, *odhAB* und *rocG* hatte einen negativen Effekt auf das Wachstum von *B. subtilis*, der sich im Vergleich zum Wildtyp durch kleinere Kolonien auf SP-Medium zeigte. Im Gegensatz dazu zeigte die Deletion der Gene *citG*, *citZ-mdh*, *sucCD*, *pycA*, *citZ*, *ansAB* und *gudB* keinen sichtbaren Effekt auf das Wachstum von *B. subtilis*.

Tabelle 4.8: Übersicht über die Koloniemorphologie der Mutanten der Zuflüsse in den Zitratzyklus.

Mutante	relevanter Genotyp	Koloniegröße im Vergleich zum 168
GP793	$\Delta pycA::cat$	gleich
GP797	$\Delta citZ::spec$	gleich
GP810	$\Delta rocG::tet$	kleiner
GP1153	$\Delta ansAB::erm$	gleich
GP1160	$\Delta gudB::kan$	gleich
GP1279	$\Delta rocG::tet \Delta gudB::aphA3 \Delta ansAB::erm$ $\Delta citZ::spec \Delta pycA::cat$	kleiner

Des Weiteren wurde das Wachstum der beiden Stämme GP1278 und GP1279 unter optimalen Wachstumsbedingungen untersucht. Die Abbildung 4.21. zeigt das Wachstum des Wildtyps 168 und der beiden Stämme GP1278 und GP1279 in LB-Glukose-Medium bei 37°C. Für diesen Versuch wurde eine Glukosekonzentration von 0,5% verwendet. Zunächst wurden 4 ml einer ÜN-Kultur mit den entsprechenden Stämmen angeimpft. Am darauffolgenden Morgen wurden 20 ml LB-Glukose auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,05 angeimpft. Das Wachstum der Stämme wurde im Anschluss in regelmäßigen Abständen durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm im „Platereader“ untersucht.

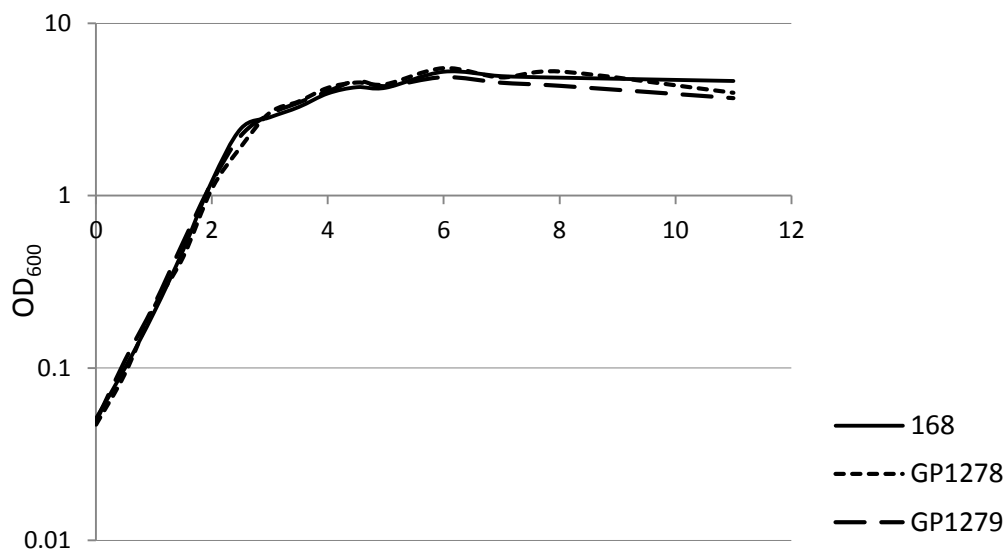


Abbildung 4.21: Das Wachstum der Stämme GP1278 und GP1279 im Vergleich zum Wildtyp 168.

Die Stämme 168, GP1278 und GP1279 wurden ÜT in LB-Glukose-Medium bei 37°C angezogen. Die Glukosekonzentration im Medium betrug 0,5%. Mit der ÜT-Kultur wurde eine 4 ml ÜN angeimpft. Am nächsten Morgen wurden die Zellen der ÜN-Kultur dazu genutzt die Hauptkultur zu einer OD<sub>600</sub> von 0,05 anzupfen. Die Hauptkultur wurde bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Dabei zeigten alle *B. subtilis* Stämme ein ähnliches Wachstumsverhalten.

Sowohl der Stamm GP1278 ohne funktionalen Zitratzyklus, als auch der Stamm GP1279 ohne funktionale Zuflüsse in den Zitratzyklus, wiesen kein Wachstumsdefizit im Vergleich zum Wildtyp 168 auf. Somit konnte gezeigt werden, dass der Zitratzyklus und sein Zuflüsse nicht essentiell für das Wachstum von *B. subtilis* sind.

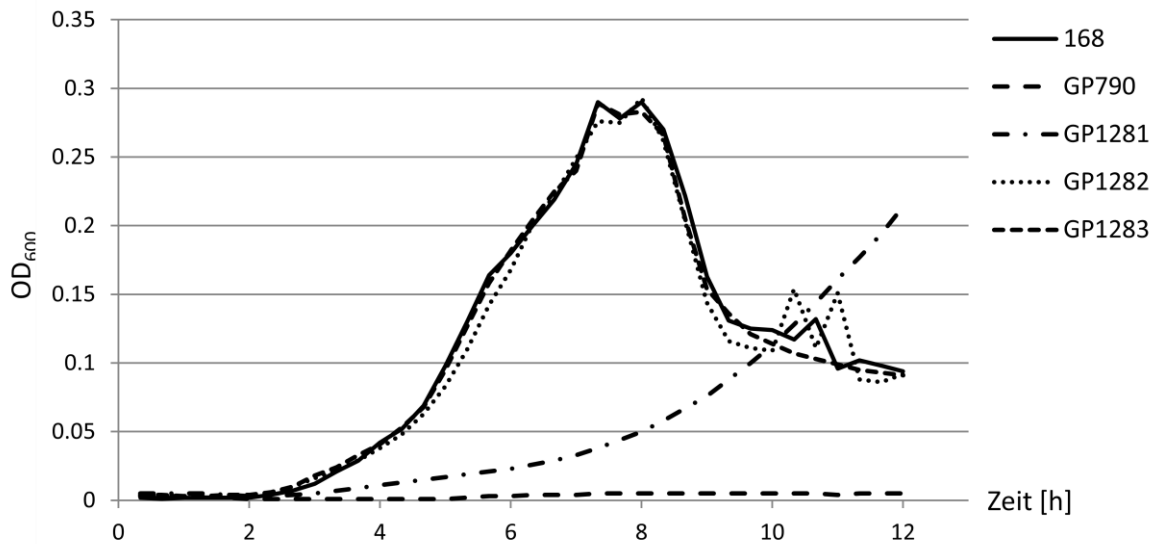
Wachstumsdefizite der einzelnen Stämme zeigen sich möglicherweise erst unter definierten Wachstumsbedingungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies nicht weiter untersucht. Auch das Auftreten möglicher Suppressormutanten wäre dabei zu berücksichtigen.

#### 4.2.4. CitA kompensiert den Verlust von CitZ

Die Zitratsynthase CitZ gilt als Einstiegspunkt in den Zitratzyklus. CitZ verbindet Acetyl-CoA und Oxalacetat, über eine Kondensationsreaktion irreversibel miteinander zu Zitrat. Neben *citZ* besitzt *B. subtilis* ein weiteres Gen, *citA*, das für eine potentielle Zitratsynthase kodiert. Die Bedeutung von CitA ist bis heute weitgehend unbekannt (Jin und Sonenshein, 1994).

Im initialen Screen konnte gezeigt werden, dass der Stamm GP797 ( $\Delta citZ$ ) in der Lage war, auf C-Minimalmedium mit 0,5% Malat zu wachsen. Ohne funktionale Zitratsynthase fehlen diesem Stamm bedeutende Intermediate des Zitratzyklus, die für die Synthese von Aminosäuren benötigt werden. Daher wäre zu erwarten, dass GP797 nicht auf C-Minimalmedium mit Malat und Ammoniumsulfat als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquellen wachsen kann.

Hier ergab sich die Frage, wie der Stamm GP797 trotz fehlender Zitratsynthase Glutamat aus Malat synthetisiert. Möglicherweise wurde in diesem Stamm die Zitratsynthase CitA aktiviert. Durch weitere Wachstumsversuche, die in den Abbildungen 4.22. und 4.23. dargestellt sind, konnte diese Hypothese bestätigt werden. Für die Wachstumsversuche wurde der Stamm GP1281 verwendet. Dieser wurde wie GP797 konstruiert, jedoch unter Verwendung einer Erythromycinresistenzkassette anstelle der Spectinomycinresistenzkassette.



**Abbildung 4.22: Wachstumsversuch der Zitratsynthasemutanten in C-Malat-Medium**

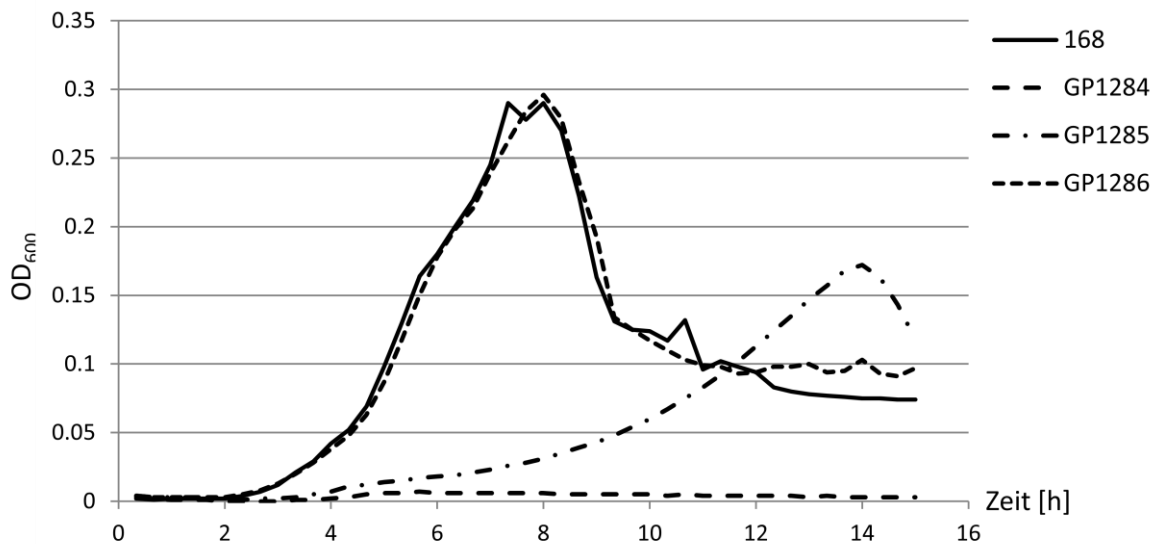
Die Stämme 168, GP790 ( $\Delta citZ-mdh$ ), GP1281 ( $\Delta citZ$ ), GP1282 ( $\Delta citA$ ) und GP1283 ( $\Delta citR$ ) wurden  $\ddot{U}N$  in LB-Medium bei 37°C angezogen. Das Wachstum der Stämme  $\ddot{U}T$  erfolgte durch Inokulation in CSE-Glukose-Medium. Am Nachmittag wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal mit C-Malat-Medium gewaschen. Im Anschluss wurde die Hauptkultur (C-Malat-Medium) zu einer  $OD_{600}$  von 0,05 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm. Die Glukose- bzw. Malatkonzentration im Medium betrug 0,5%. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Wachstumskurve für mindestens drei unabhängige Experimente.

Zunächst wurden die Stämme GP1282 ( $\Delta citA$ ) und GP1283 ( $\Delta citR$ ) konstruiert, um den Einfluss von CitA auf die Synthese von Zitrat zu untersuchen. Die Konstruktion erfolgte mit Hilfe der LFH-PCR.

Für diesen Versuch wurden die Stämme 168, GP790 ( $\Delta citZ-mdh$ ), GP1281 ( $\Delta citZ$ ), GP1282 und GP1283 zunächst als  $\ddot{U}N$ -Kulturen in LB-Medium angezogen. Die entsprechenden  $\ddot{U}N$ -Kulturen wurden für die Inokulation der  $\ddot{U}T$ -Kulturen in CSE-Glukose-Medium genutzt. Nach ca. 6h wurden die  $\ddot{U}T$ -Kulturen abzentrifugiert und die Zellen in C-Malat-Medium resuspendiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift, um sämtliche Spuren von Glukose zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inokulation der Hauptkultur, C-Malat-Medium, auf eine  $OD_{600}$  von ca. 0,05. Das Wachstum der Stämme wurde danach in regelmäßigen Abständen im „Platereader“ durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm überwacht.

Die Positiv- und Negativkontrolle zeigten das erwartete Wachstum. Der Laborstamm 168 war in der Lage, auf C-Minimalmedium mit Malat als einziger Kohlenstoffquelle gut zu wachsen. Im Gegensatz dazu wies der Stamm GP790 kein Wachstum auf. Aufgrund der fehlenden Malatdehydrogenase ist dieser Stamm nicht befähigt, Malat als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Meyer *et al.*, 2013). Die Deletion von *citA* hatte keinen Einfluss auf das Wachstum

von *B. subtilis*. Deletiert man jedoch *citZ*, so war das Wachstum des Stammes GP1281 ( $\Delta citZ$ ) beeinträchtigt. Als weitere Kontrolle wurde hier der Stamm GP1283 ( $\Delta citR$ ) verwendet, in dem das Gen *citR* deletiert wurde. Dieser zeigte ein ähnliches Wachstum im Vergleich zum Wildtyp 168. Somit hat der Repressor von *citA* keinen Einfluss auf das Wachstum von *B. subtilis*.



**Abbildung 4.23: Wachstumsversuch der Zitratsynthesemutanten in C-Malat-Medium**

Die Anzucht der Stämme erfolgte wie in der Abbildung 4.22. beschrieben.

Im nächsten Schritt wurde das Wachstum von Doppelmutanten, in denen eine Kombination der Gene *citZ*, *citA* und *citR* deletiert wurde, untersucht. Dazu wurden die Stämme GP1284 ( $\Delta citZ$ ,  $\Delta citA$ ), GP1285 ( $\Delta citZ$ ,  $\Delta citR$ ) und GP1286 ( $\Delta citR$ ,  $\Delta citA$ ) durch Transformation von GP1281 und GP1282 mit chromosomaler DNA der Stämme GP1282 und GP1283 erstellt. Die Anzucht der Stämme erfolgte wie bereits zuvor beschrieben. Dabei zeigten die Stämme GP1285 ( $\Delta citZ$ ,  $\Delta citR$ ) und GP1286 ( $\Delta citR$ ,  $\Delta citA$ ) das gleiche Wachstum wie die Stämme GP1281 ( $\Delta citZ$ ) und GP1282 ( $\Delta citA$ ). Dies lässt vermuten, dass unter diesen Wachstumsbedingungen (Minimalmedium mit Malat als einziger C-Quelle) CitR die Expression von *citA* im Stamm GP1281 nicht mehr reprimiert. CitR gehört zur Familie der LysR Repressoren, daher wäre es möglich, dass entweder die Akkumulation von Oxalacetat oder das Fehlen von Zitrat für diesen Effekt verantwortlich ist.

Die Deletion beider Zitratsynthasen im Stamm GP1284 ( $\Delta citZ$ ,  $\Delta citA$ ) führte zum Verlust des Wachstums in C-Malat-Medium. Dies ist der Beweis, dass CitA den Verlust von CitZ partiell kompensieren kann.

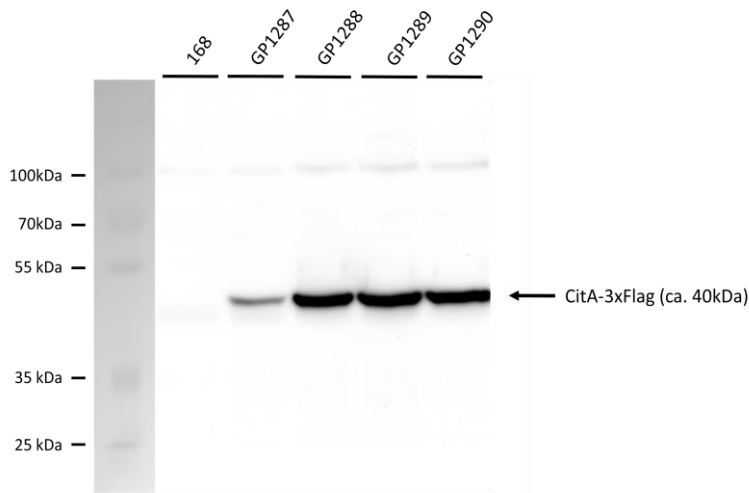
Somit muss CitA eine weitaus größere Rolle in der Synthese von Zitrat zugesprochen werden als bisher vermutet. In weiteren Versuchen sollte die Expression von CitA und die Enzymaktivität der Zitratsynthasen genauer charakterisiert werden.

#### 4.2.5. Untersuchung der Expression des Gens *citA*

Um einen möglichen Effekt der *citZ*-Deletion auf die Expression von *citA* zu untersuchen wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Fusion von CitA mit einem 3x Flag-Tag im Stamm GP1287 ermöglichte die sensitive und spezifische Detektion von CitA. Hierfür wurde die *citA*-3x-Flag-Fusion mit Hilfe des Plasmids pGP2517 über einfach homologe Rekombination am natürlichen Genort von *citA* integriert.

Im nächsten Schritt wurde die *citA*-3x-Flag-Fusion mit der Deletion von *citZ* bzw. *citR* kombiniert. Dafür wurde der Stamm GP1287 (*citA*-3x-Flag) mit chromosomaler DNA der Stämme GP1281 ( $\Delta citZ$ ), GP1283 ( $\Delta citR$ ) und GP1285 ( $\Delta citZ$ ,  $\Delta citR$ ) transformiert. Die erhaltenen Stämme wurden als GP1288 (*citA*-3x-Flag,  $\Delta citZ$ ), GP1289 (*citA*-3x-Flag,  $\Delta citR$ ) und GP1290 (*citA*-3x-Flag,  $\Delta citZ$ ,  $\Delta citR$ ) bezeichnet.

Für diesen Versuch wurden die Stämme 168, GP1287 (*citA*-3x-Flag), GP1288 (*citA*-3x-Flag,  $\Delta citZ$ ), GP1289 (*citA*-3x-Flag,  $\Delta citR$ ) und GP1290 (*citA*-3x-Flag,  $\Delta citZ$ ,  $\Delta citR$ ) in C-Malat-Medium angezogen und das Vorhandensein von CitA im Western Blot analysiert. Die Anzucht der Zellen erfolgte zunächst ÜT in LB-Medium. Die entsprechenden ÜT-Kulturen wurden für die Inokulation der ÜN-Kulturen in CSE-Glukose-Medium genutzt. Am nächsten Morgen wurden die ÜN-Kulturen abzentrifugiert und die Zellen in C-Malat-Medium resuspendiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift, um sämtliche Spuren Glukose zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inokulation der Hauptkultur in C-Malat-Medium, auf eine  $OD_{600}$  von ca. 0,05. Die Hauptkultur wurde bei einer  $OD_{600}$  von ca. 0,3 (exponentielle Phase) geerntet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit der French Press. Die Analyse des Gesamtzellextraktes mittels Western Blot ist in Abbildung 4.24. dargestellt.



**Abbildung 4.24: Nachweis von CitA im Western Blot.**

Die Anzucht der Stämme 168, GP1287 (*citA*-3x-Flag), GP1288 (*citA*-3x-Flag,  $\Delta$ *citZ*), GP1289 (*citA*-3x-Flag,  $\Delta$ *citR*) und GP1290 (*citA*-3x-Flag,  $\Delta$ *citZ*,  $\Delta$ *citR*) erfolgte in C-Malat-Medium bei 37°C. Die Malatkonzentration im Medium betrug 0,5%. Die Ernte der Zellen erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer  $OD_{600}$  von ca. 0,3. Jeweils 15  $\mu$ g der Proteinrohextrakte wurden im Western Blot analysiert. Für diesen Versuch wurde der FLAG-Antikörper verwendet. Der Pfeil rechts neben der Grafik zeigt das Signal für das Flag getaggte CitA mit einer Masse von ca. 40 kDa an.

Die Kontrolle GP1287 zeigte die Menge an CitA in den Zellen unter natürlichen Bedingungen an. Das Signal deutet darauf hin, dass *citA* nur sehr schwach exprimiert war. Im Gegensatz dazu wurde die volle Expression von *citA* in Abwesenheit des Repressors CitR erreicht. Der Stamm GP1289 (*citA*-3x-Flag,  $\Delta$ *citR*) zeigte eine ca. 15-fach höhere Menge an CitA in den Zellen als der Stamm GP1287 (*citA*-3x-Flag).

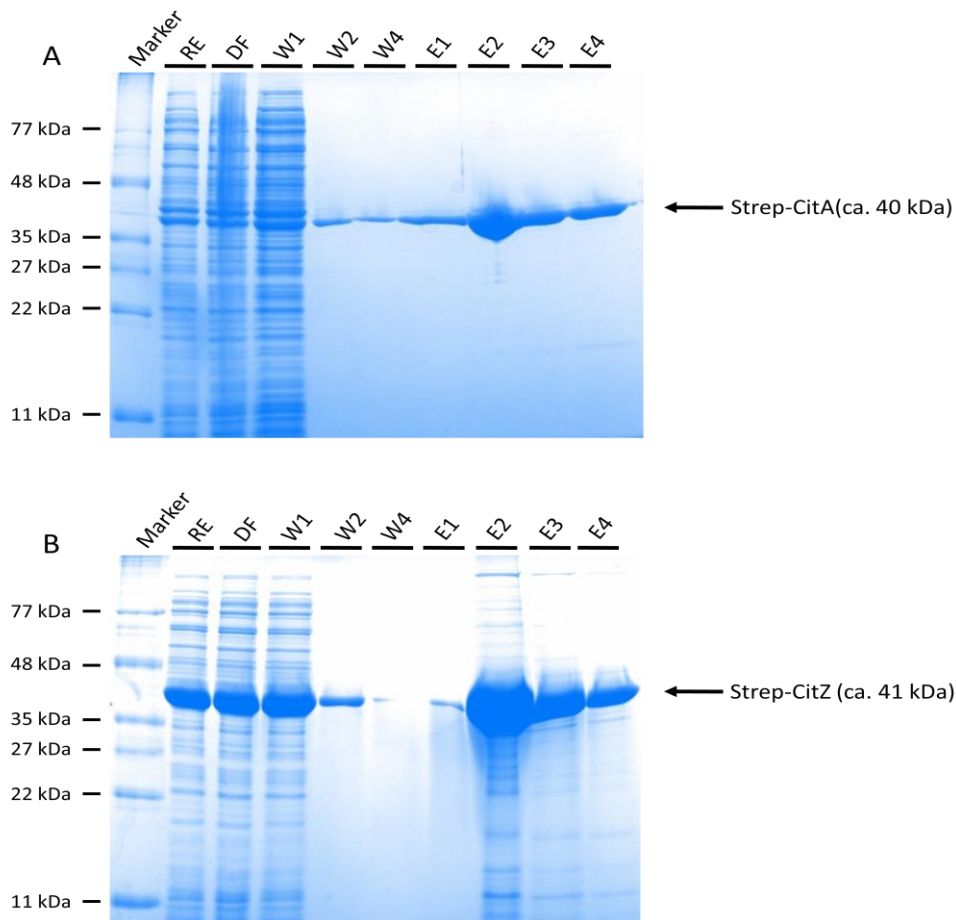
Betrachtet man die *citA*-Expression in GP1288 (*citA*-3x-Flag,  $\Delta$ *citZ*), so wird ersichtlich, dass trotz Vorhandenseins von CitR, eine maximale Expression von *citA* erreicht wurde. Hier wird die Vermutung bestätigt, dass durch die Akkumulation von Oxalacetat oder dem Fehlen von Ziträt der reprimierende Effekt von CitR auf die Expression von *citA* aufgehoben wird. Eine zusätzliche Deletion von *citR* in GP1288 hat keinen weiteren Einfluss auf die Menge an CitA in den Zellen.

Zusammenfassend zeigt dieser Versuch, dass in Abwesenheit von CitZ die Repression der *citA*-Expression durch CitR aufgehoben wird. Somit lässt sich die Frage beantworten, wie der Stamm GP797 Glutamat aus Malat, trotz fehlender Zitratsynthese, synthetisieren kann. Durch das Aktivieren der Zitratsynthese CitA wird der Zitratzyklus, der die Vorstufen für die Synthese der benötigten Aminosäuren liefert, vervollständigt.



#### 4.2.6. Charakterisierung der Zitratsynthasen CitA und CitZ aus *B. subtilis* *in vitro*

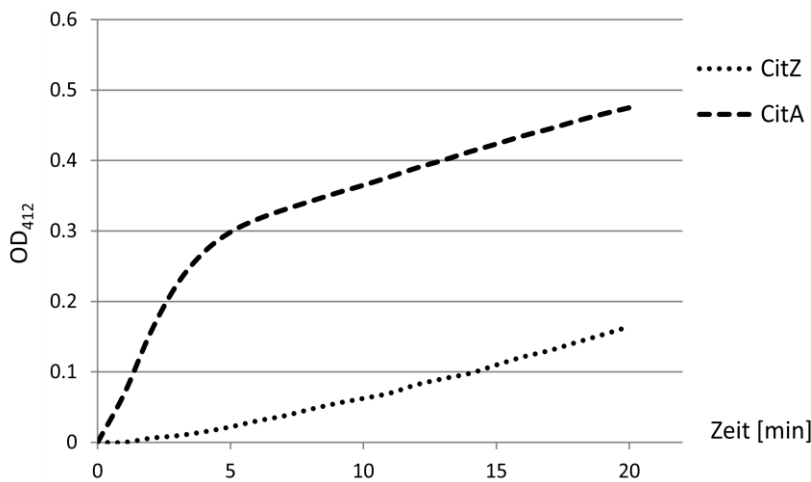
In *B. subtilis* gilt die Zitratsynthase CitZ als Einstiegspunkt in den Zitratzyklus. CitZ katalysiert die Kondensation von Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Zitrat. Neben *citZ* besitzt *B. subtilis* ein weiteres Gen, *citA*, das für eine potentielle Zitratsynthase kodiert. Über die physiologische Bedeutung von CitA ist bisher jedoch wenig bekannt (Jin und Sonenshein, 1994). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CitA eine weitaus größere Rolle bei der Synthese von Zitrat hat als bisher angenommen. Wachstumsversuche haben gezeigt, dass CitA den Verlust von CitZ partiell kompensieren kann. Daher sollten die Zitratsynthasen CitZ und CitA *in vitro* näher charakterisiert werden. Zunächst wurden die Plasmide pGP2515 (Strep-CitZ) und pGP2516 (Strep-CitA) erzeugt, die für die Überexpression und Aufreinigung beider Zitratsynthasen benötigt wurden. Die Testexpression ergab, dass sowohl CitZ als auch CitA im heterologen Wirt *E. coli* überexprimiert werden konnten. Im Anschluss erfolgten die Überproduktion und die Aufreinigung wie in Kapitel 3.3.7. beschrieben. Die Zitratsynthasen wurden mittels Streptactin-Sepharose-Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe Abbildung 4.25.). Die analysierten Proteinmassen stimmten mit den theoretischen Massen von 40 kDa für Strep-CitA und 41 kDa für Strep-CitZ überein. Die Elutionsfraktionen E2 und E3 wurden vereinigt und bei 4°C für 48 h dialysiert. Die Proteinkonzentration der CitA-Lösung und CitZ-Lösung wurde mit Bradford bestimmt. Die Konzentration der CitA-Lösung betrug 3,1 mg/ml und 2,6 mg/ml für die CitZ-Lösung. Im Anschluss erfolgte der Aktivitätstest für beide Zitratsynthasen.



**Abbildung 4.25: Aufreinigung der rekombinanten Proteine.**

Für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine Strep-CitA (pGP2516) und Strep-CitZ (pGP2515) wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet. Die Anzucht, der Aufschluss und die Proteinaufreinigung wurde wie im Abschnitt 3.3.7. beschrieben durchgeführt. Nach der Aufreinigung wurden 15  $\mu$ l der Elutionsfraktionen mittels einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Abbildung A) zeigt die Aufreinigung von Strep-CitA und in B) ist die Aufreinigung von Strep-CitZ dargestellt. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Coomassie Brilliantblau (RE=Rohextrakt, DF=Durchfluss, W=Waschfraktion und E=Elutionsfraktion).

Die aufgereinigten Proteine wurden direkt für den Enzymassay eingesetzt. Dabei wird bei geeigneten Pufferbedingungen die Synthese an Zitrat spektrophotometrisch ermittelt. Bei der Kondensationsreaktion von Acetyl-CoA und Oxalacetat entsteht neben Zitrat auch Coenzym A. Im nächsten Schritt reagiert Coenzym A mit DTNB (5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure - auch Ellmans Reagenz genannt) und bildet TNB (Trinitrobenzol). Mit Hilfe des Ellmans Reagenzes kann die Menge an gebildeten Thiolen in den Reaktionsansätzen bestimmt werden. Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Zitratsynthasen wurde die Absorption von TNB bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 412$  nm gemessen (Srere, 1972; Bergmeister, 1970).



**Abbildung 4.26: Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von CitZ und CitA.**

Die Produktion von Zitrat durch CitZ (gepunktete Linie) und CitA (gestrichelte Linie) wurde spektrophotometrisch bestimmt. Zur Berechnung von Enzymaktivitäten wurde die Absorption bei einer optischen Dichte von 412 nm gemessen. Die Änderung der optischen Dichte wurde gegen die Zeit in min aufgetragen.

Die in der Abbildung 4.26. dargestellten Enzymaktivitätsmessungen haben gezeigt, dass sowohl CitZ als auch CitA Zitrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA synthetisieren können. Für jeden Reaktionsansatz wurden 40 µg der entsprechenden Proteine eingesetzt. Im Anschluss wurde die Umsetzung von DTNB zu TNB für 20 min bei einer Wellenlänge von 412 nm aufgezeichnet. Die Daten zeigen, dass CitA eine etwa 3-fach höhere Aktivität besitzt als CitZ. Dabei zeigte CitZ eine gleichbleibende Umsatzrate von 0,008 AU/min. Im Gegensatz dazu veränderte sich die Umsatzrate von CitA in Abhängigkeit von der Zeit. Innerhalb der ersten 5 min des Versuches wurde eine Umsatzrate von 0,06 AU/min aufgezeichnet. Danach verringerte sich die Rate auf 0,011 AU/min.

Weitere Versuche sind nötig, um CitZ und CitA genauer zu charakterisieren.

Entgegen der Annahme, dass CitA keine Rolle bei der Synthese von Zitrat spielt, konnte innerhalb des Versuches die Synthese von Zitrat durch CitA nachgewiesen werden. Dies bestätigt noch einmal, dass CitA den Verlust von CitZ teilweise kompensieren kann. Diese Daten haben gezeigt, dass CitA in funktionale Zitratsynthese ist.

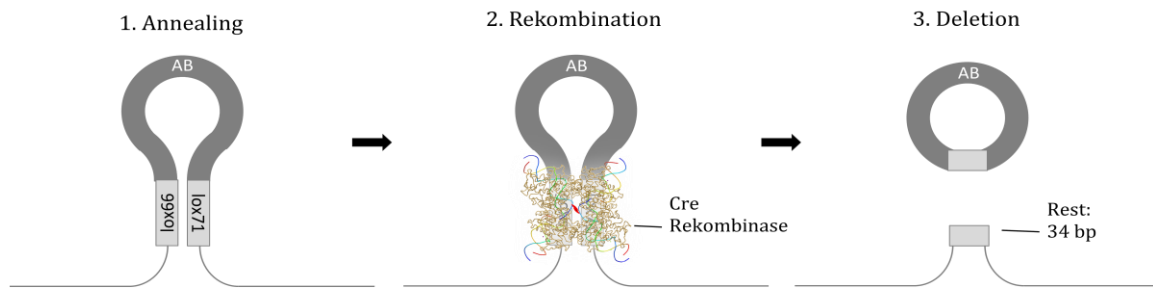
### 4.3. Studien hinsichtlich des Minimalgenoms von *B. subtilis*

Das „Minimal Genome Project“ hat das Ziel die grundlegenden Elemente des Lebens zu verstehen. Die einzelnen Bausteine können individuell genutzt werden, u.a. für die Selektion

auf Antibiotikaresistenz oder für die Optimierung von Syntheseverfahren. Aufgrund der Genomgröße von 4,1 Mb, der schnellen Wachstumsrate und der Fähigkeit, DNA aus der Umgebung aufzunehmen ist *B. subtilis* ein ausgezeichneter Kandidat für dieses Projekt (Ara *et al.*, 2007). Im Rahmen des „Minimal Genome Project“ werden große Bereiche der DNA deletiert, die nicht für das Wachstum unter optimalen Bedingungen benötigt werden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung des Cre/Lox-Systems für markerlose Deletionen in *B. subtilis*. Weiterhin sollten die Gene, die für Enzyme der Glykolyse kodieren, in einer funktionalen Kasette fusioniert werden.

#### **4.3.1. Markerlose Deletion mit Hilfe des Cre/Lox-Systems**

Herkömmliche Deletionen werden in *B. subtilis* häufig mit Hilfe der LFH-PCR hergestellt. Dabei wird das zu deletierende Gen mit einer Antibiotikaresistenzkasette ausgetauscht. Der Nachteil dieser Methode ist die Anzahl der aufeinanderfolgenden Deletionen. Bisher war es nicht möglich, mehr als 6 Bereiche in einem Stamm zu deletieren, da nicht ausreichend Marker zur Verfügung stehen. Vorhergehende Studien haben bereits gezeigt, dass das Cre/Lox-System für die Deletion einzelner Gene in *B. subtilis* verwendet werden kann (Kumpfmüller *et al.*, 2013). Dieses System wurde im Bakteriophagen P1 entdeckt und besteht aus einer Cre-Rekombinase sowie den so genannten Lox-Stellen. Diese Bereiche sind 34 bp lang und werden von der Cre-Rekombinase erkannt und die Rekombination der beiden Lox-Sequenzen katalysiert. Der dazwischenliegende Bereich wird dabei herausgeschnitten. Das, in der Arbeit von Kumpfmüller *et al.*, 2013 beschriebene Cre/Lox-System wurde hier mit der LFH-PCR kombiniert. Wird die Antibiotikaresistenzkasette einer LFH-PCR mit der Lox-Sequenz verbunden, so kann im Nachhinein die Resistenzkasette aus dem Genom herausgeschnitten werden. Lediglich 34 bp verbleiben am ursprünglichen Genort. Die Abbildung 4.27. zeigt schematisch den Ablauf der Rekombination. Im Abschnitt 3.3.6. befindet sich ein ausführliches Protokoll für die markerlose Deletion von Genen im Chromosom von *B. subtilis* mit Hilfe des Cre/Lox-Systems.



**Abbildung 4.27: Markerlose Deletion mit dem Cre/Lox-System.**

Mit Hilfe des Cre-Lox-Systems können Abschnitte im Genom von *B. subtilis* markerlos deletiert werden. Das zu deletierende Gen wird im ersten Schritt mit einer Resistenzkassette, die von den 34 bp Lox-Sequenzen flankiert sind, ausgetauscht. Diese Lox-Bereiche sind nahezu identisch und bilden eine Schleife bei dem Annealing aus. Die Cre-Rekombinase erkennt diesen Bereich und schneidet die Region zwischen den Lox-Stellen heraus (Benjamin Sieters).

#### 4.3.2. Die Deletion des *citRA*-Lokus mit Hilfe des Cre/Lox-Systems

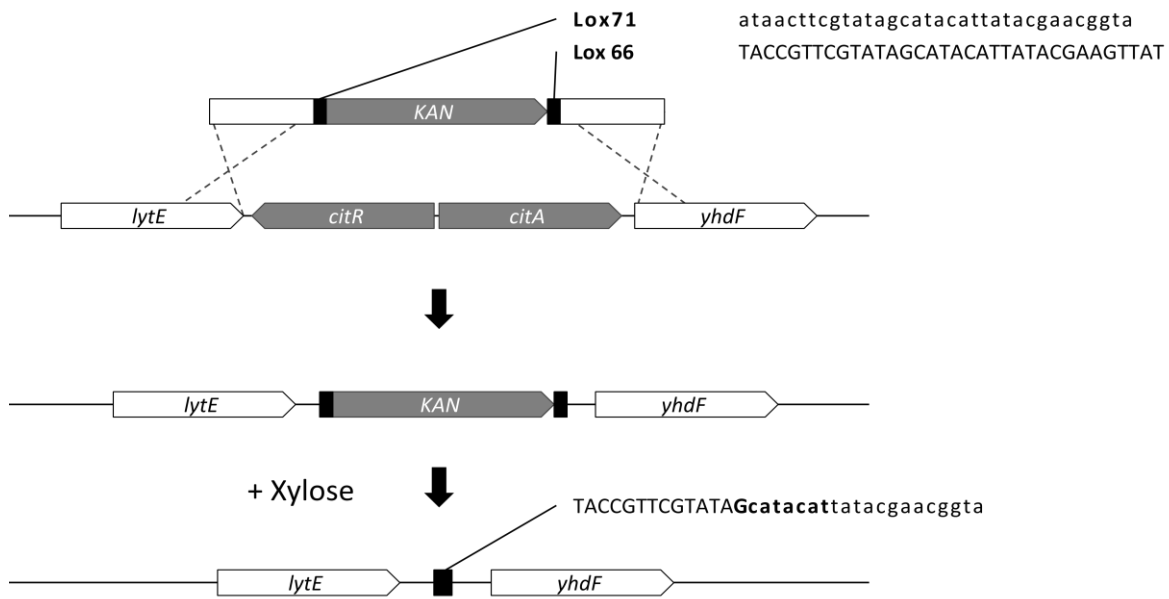
Zunächst musste die markerlose Deletion mit dem modifizierten Cre/Lox-System für *B. subtilis* getestet werden. Hierfür wurde der *citRA*-Lokus ausgewählt. Die bisherigen Daten zeigten, dass die unbedeutende Zitratsynthase CitA den Verlust von CitZ teilweise kompensieren kann. Da noch immer das Ziel bestand, einen Stamm zu konstruieren, der keine Enzyme des Zitratzyklus besitzt, sollten die Deletionen der Stämme GP718 ( $\Delta citG$ ), GP790 ( $\Delta citZ-mdh$ ), GP791 ( $\Delta sucCD$ ), GP1275 ( $\Delta citB$ ) und GP1276 ( $\Delta odhAB$ ) mit einer markerlosen Deletion der *citRA* und *sdhCAB* Bereiche kombiniert werden. Der daraus resultierende Stamm besitzt keinen funktionalen Zitratzyklus. Für die Konstruktion der Deletionsmutante ( $\Delta citRA$ ) von *B. subtilis* wurde zunächst eine ca. 1,5 kb Kanamycin-Resistenzkassette amplifiziert, die von den Lox71 und Lox66 Sequenzen flankiert war. Das Plasmid pGP2514 diente hierbei als Matrize. Des Weiteren wurden zwei Primerpaare verwendet, mit denen die flankierenden Bereiche der zu deletierenden Gene amplifiziert werden konnten. Diese Fragmente mit einer Größe von ca. 1000 bp mussten so gewählt werden, dass die Expression der angrenzenden Gene nicht beeinflusst wurde. An das strangauf- und -abwärts liegende DNA-Fragment wurde mit dem *reverse* Primer bzw. *forward* Primer jeweils eine 35 bp lange Sequenz angehängt. Diese Sequenz ist komplementär zu der Lox61 und Lox77 Sequenz des 5'- bzw. 3'-Endes der Resistenzkassette. In einer zweiten PCR wurden die strang- und -abwärts liegenden DNA-Fragmente mit der Resistenzkassette über die 35 Nukleotide lange Sequenz miteinander verbunden und

amplifiziert. Der Wildtypstamm von *B. subtilis* wurde direkt mit den erhaltenen PCR-Produkten transformiert.

Im Anschluss wurde die Resistenzkassette mit Hilfe der Xylose induzierbaren Cre-Rekombinase herausgeschnitten, die im *sacA*-Lokus integriert war. Die Cre-Rekombinase wurde über homologe Rekombination aus dem Stamm JK27 mittels Transformation mit chromosomaler DNA und anschließender Selektion auf Medium mit Zeocin in den Deletionsstamm eingebracht (Kumpfmüller *et al.*, 2013). Die Transformanten wurden vereinzelt und eine Einzelkolonie wurde in LB-Medium mit 0,5% Xylose angezogen, um die Expression der Cre-Rekombinase zu gewährleisten. Bei einer  $OD_{600}$  von ca. 0,4 wurden die Zellen auf  $10^{-6}$  verdünnt und auf SP-Medium ausplattiert. Am nächsten Tag wurden Kolonien gepickt und auf SP-Platten mit und ohne Kanamycin ausgestrichen. Dabei wurde der Verlust der Kanamycinresistenzkassette untersucht. Kolonien, die nur auf SP-Medium wachsen konnten, haben die Kanamycinresistenzkassette verloren. Mittels PCR konnte der korrekte Einbau bzw. das Herausschneiden der Resistenzkassette bestätigt werden. Die Sequenzierung zeigte, dass die Rekombination an den vorgesehenen Lox-Bereichen erfolgte. Der Stamm ohne *citRA*-Lokus erhielt die Bezeichnung GP1755 ( $\Delta citRA$ ). Die Abbildung 4.28. zeigt schematisch die Deletion des *citRA*-Lokus in GP1755 ( $\Delta citRA$ ).

Im nächsten Schritt erfolgte die Deletion des *sdhCAB*-Operons in GP1755 ( $\Delta citRA$ ). Zunächst wurde das Operon durch eine Kanamycinresistenz, flankiert von Lox-Sequenzen, über homologe Rekombination ausgetauscht. Die Induktion der Cre-Rekombinase mit Xylose führte zum Verlust der Resistenz gegenüber Kanamycin. Die Sequenzierung der strang- und -abwärts liegenden Region bestätigte die erfolgreiche Deletion des *sdhCAB*-Operons im Stamm GP1758 ( $\Delta citRA$ ,  $\Delta sdhCAB$ ).

Die Versuche haben gezeigt, dass mit Hilfe des modifizierten Cre/Lox-Systems zuverlässig mehrere Deletionen aufeinanderfolgend im Chromosom von *B. subtilis* eingefügt werden konnten. Die Kombination der Stämme GP1758 mit GP718 ( $\Delta citG$ ), GP790 ( $\Delta citZ-mdh$ ), GP791 ( $\Delta sucCD$ ), GP1275 ( $\Delta citB$ ) und GP1276 ( $\Delta odhAB$ ) wurde leider noch nicht beendet. Daher konnten zum derzeitigen Zeitpunkt noch keine Aussagen über das Wachstum des fertigen Deletionsstammes gemacht werden.



**Abbildung 4.28: Konstruktion einer *citRA* Deletionsmutante mit Hilfe des Cre/Lox-Systems.**

Durch doppelt homologe Rekombination wird der *citRA*-Locus durch eine ca. 1,5 kb Kanamycinresistenzkassette, die von den Lox61 und Lox77 Sequenzen flankiert ist, ersetzt. Nach Induktion der Expression der Cre-Rekombinase durch Xylose wird die Resistenzkassette herausgeschnitten. Die Mutante GP1755 wurde nach diesem Prinzip konstruiert. Ein 34 bp langes Fragment bestehend aus Bereichen der Lox61 und Lox77 Sequenz verbleibt nach der Rekombination im Chromosom. Die großen und kleinen Buchstaben repräsentieren den jeweiligen Teil der entsprechenden Lox-Sequenz (Benjamin Sieters).

#### 4.3.3. Reorganisation der Gene *pgi*, *fbaA* und *ptsGHI* im Genom von *B. subtilis*

Die Gene *pgi*, *fbaA* und das *ptsGHI*-Operon, die für die glykolytischen Enzyme Glukose-6-Phosphat Isomerase, Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase und das Aufnahmesystem für Glukose kodieren, sollten schrittweise zwischen die Gene *dnaE* und *ackA* eingefügt werden. Zusätzlich sollte die dazwischenliegende Region, bestehend aus 25 Genen, entfernt werden. Dies würde das Genom von *B. subtilis* um 20.000 bp bzw. 0,5% reduzieren. Die Abbildung 4.29. zeigt schematisch den Ablauf der Integration der glykolytischen Gene zwischen dem *dnaE* und dem *ackA*-Lokus. Hierbei wurde die Fähigkeit ausgenutzt über homologe Rekombination DNA-Fragmente in das Chromosom von *B. subtilis* einzubauen.

Zunächst wurde das Gene *pgi*, fusioniert mit einer Kanamycinresistenzkassette, zwischen die Gene *dnaE* und *ytrI* eingefügt. Hierfür wurden die Bereiche *dnaE*, *ytrI*, *pgi* und die Kanamycinresistenzkassette amplifiziert. Sämtliche Elemente, die für die Transkription und Translation von *pgi* notwendig sind, wurden bei der PCR ebenfalls mit berücksichtigt. Die vier Fragmente wurden in einer zweiten PCR-Reaktion miteinander über homologe Bereiche,

die an die Primer angehängt wurden, fusioniert. Der Wildtypstamm von *B. subtilis* wurde direkt mit den erhaltenen PCR-Produkten transformiert. Eine PCR mit der chromosomalen DNA der Transformanten deutete auf den korrekten Einbau der *pgi-aphA3*-Fusion zwischen *dnaE* und *ytrI* hin. Dies konnte durch Sequenzierung bestätigt werden. Der resultierende Stamm wurde als GP1751 bezeichnet.

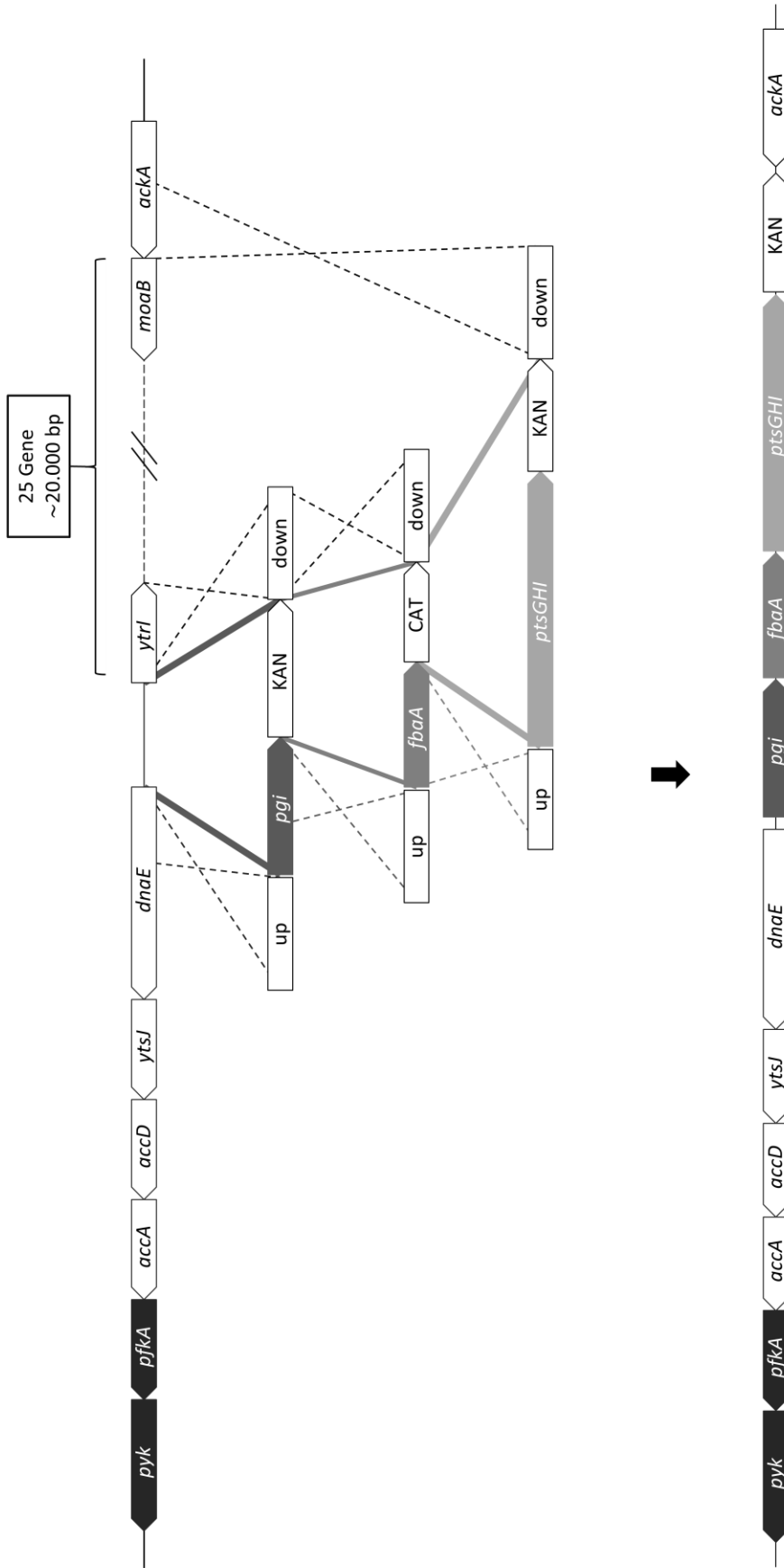
Im nächsten Schritt wurde die Kanamycinresistenzkassette des Stammes GP1751 gegen eine *fbaA-cat*-Fusion ausgetauscht. Zunächst wurden die einzelnen DNA-Fragmente amplifiziert. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden die Bereiche *dnaE-pgi*, *ytrI*, *fbaA* (inklusive Elemente der Translation und Transkription) und die Chloramphenicolresistenzkassette miteinander über homologe Bereiche, die an die Primer angehängt wurden, fusioniert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den Stamm GP1751 transformiert und durch Selektionsdruck die Kanamycinresistenzkassette gegen die *fbaA-cat*-Kassette mittels homologer Rekombination ausgetauscht. Anhand einer Sequenzierung des artifiziellen Locus wurde der Stamm GP1752 überprüft.

Im letzten Schritt wurde die Chloramphenicolresistenz des Stammes GP1752 gegen die *ptsGHI-aphA3*-Fusion ausgetauscht. Dabei wurden zusätzlich 25 Gene (*ytrI-moaB*) deletiert. Wie bereits beschrieben erfolgte zunächst die Amplifikation der Bereiche *pgi-fbaA*, *ackA*, *ptsGHI* und die Kanamycinresistenzkassette. Unter nativen Bedingungen wird die Expression des *ptsGHI*-Operons durch den transkriptionalen Antiterminator GlcT reguliert. Um diese Regulation zu umgehen wurde über den Primer ein artifizieller Promoter mit der Sequenz 5' TTGTCAAGTGAAGGCGCGCTATGCTACAATACAGCTTGAAATAGAGGAGG (die -35 und -10 Region des Promoters sind unterstrichen; die Shine Dalgarno Sequenz ist kursiv markiert) an das *ptsGHI*-Operon angehängt. Dafür wurde ein mittelstarker Promoter, der konstitutiv aktiv ist, verwendet (Stannek *et al.*, unpubliziert). Die vier DNA Fragmente wurden miteinander über homologe Bereiche, die an die Primer angehängt wurden, fusioniert. Der Stamm GP1752 wurde direkt mit den erhaltenen PCR-Produkten transformiert. Mittels PCR und Sequenzierung wurde der korrekte Einbau bestätigt. Der resultierende Stamm wurde als GP1757 bezeichnet.

Diese Versuche haben gezeigt, dass mittels PCR artifizielle Kassetten konstruiert und erfolgreich in das Chromosom von *B. subtilis* integriert werden können. So wäre es möglich weitere essentielle Stoffwechselwege miteinander zu kombinieren. Weiterhin besteht die



Möglichkeit die Resistenzkassette für die Integration des letzten Fragmentes mit Hilfe des zuvor beschriebenen Cre/Lox-Systems zu entfernen.



**Abbildung 4.29.: Schematische Darstellung der Konstruktion des Stammes GP1757.**

Die schrittweise Integration der Gene *pgl*, *fbaA* und des *ptsGHI* Operons zwischen den *dnaE* und *ackA* Locus erfolgte mittels homologer Rekombination. Zunächst wurden jeweils die Bereiche UP, DOWN, das zu integrierende Gen und die dazugehörige Antibiotikaresistenzkassette mittels PCR amplifiziert. In einer weiteren PCR-Reaktion wurden jeweils die vier Fragmente miteinander über homologe Bereiche der Primer fusioniert. Im Anschluss erfolgte die Transformation der PCR Produkte in die Stämme 168, GP1751 und GP1752. Der daraus resultierende Stamm GP1757 trägt eine Fusion der Gene *pgl*, *fbaA* und des *ptsGHI* Operons. Zusätzlich wurden die Gene *ytrI* bis *moaB* in GP1757 deletiert. Dies führte zu einer Reduzierung des Genoms um 20.000 bp (Benjamin Sieters).

#### 4.3.4. Funktionalität des *pgi-fbaA-ptsGHI* Konstrukts

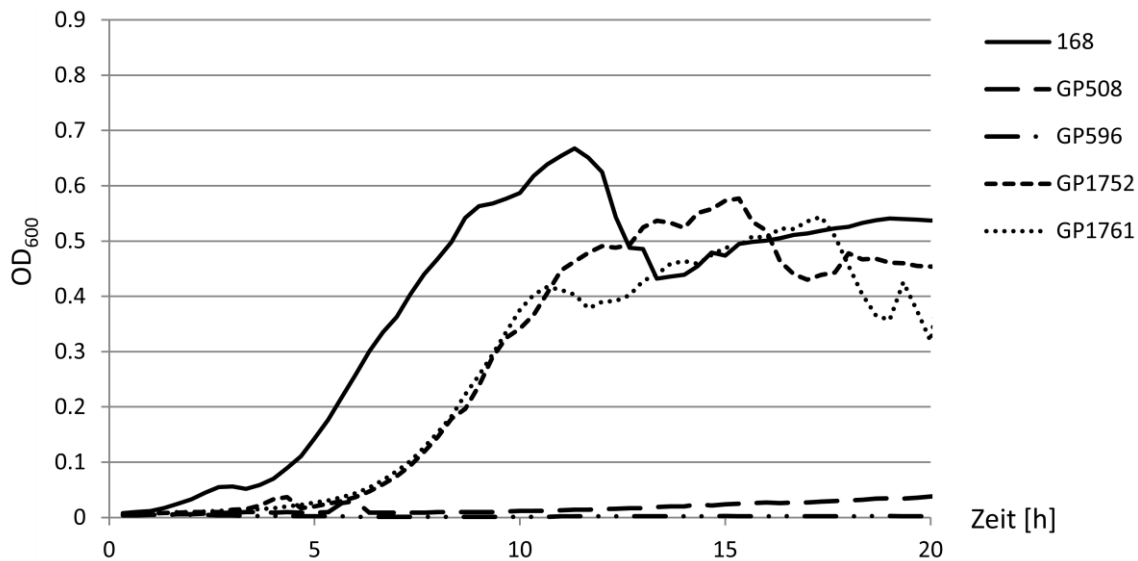
Um die Funktionalität der *pgi-fbaA-ptsGHI*-Fusion zu analysieren, wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Dafür wurden die glykolytischen Gene im nativen Lokus deletiert. Hier ist das Vermögen auf Minimalmedium zu wachsen, ein Indikator für die Funktionalität der *pgi-fbaA-ptsGHI*-Fusion.

Zunächst sollten die Stämme GP1761 (*pgi-fbaA*;  $\Delta$ *pgi* und  $\Delta$ *fbaA*) und GP1767 (*pgi-fbaA-ptsGHI*;  $\Delta$ *ptsGHI*) konstruiert werden. Dafür wurden die Stämme GP1752 (*pgi-fbaA*) und GP1757 (*pgi-fbaA-ptsGHI*) mit chromosomaler DNA der Stämme GP508 ( $\Delta$ *pgi*), GP596 ( $\Delta$ *fbaA*) und GP778 ( $\Delta$ *glcT-ptsGHI*) transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte jeweils auf SP-Medium mit den entsprechenden. Die Deletionen in den Stämme GP1761 und GP1767 wurden im Anschluss durch PCR überprüft.

Für die Analyse des Wachstums wurden die Stämme 168, GP508 ( $\Delta$ *pgi*), GP596 ( $\Delta$ *fbaA*), GP778 ( $\Delta$ *glcT-ptsGHI*), GP1752 (*pgi-fbaA*), GP1757 (*pgi-fbaA-ptsGHI*), GP1761 (*pgi-fbaA*;  $\Delta$ *pgi* und  $\Delta$ *fbaA*) und GP1767 (*pgi-fbaA-ptsGHI*;  $\Delta$ *ptsGHI*) zuerst in ÜN-Kulturen in LB-Medium angezogen. Die entsprechenden ÜN-Kulturen wurden für die Inokulation der ÜT-Kulturen in CSE-Glukose-Medium bzw. CSE-Glukose-Arginin-Medium genutzt. Nach 6h erfolgte die Inokulation der Hauptkultur (im gleichen Medium) auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,05. Das Wachstum der Stämme wurde im Anschluss in regelmäßigen Abständen durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm im „Platereader“ überwacht. GP1757 und alle Derivate benötigen Arginin im Medium, da bei der Integration des *ptsGHI*-Operons im ektopischen Lokus Gene deletiert wurden, die für die Synthese von Arginin benötigt werden.

Die Abbildung 4.30. zeigt, dass die Fusion von *pgi* und *fbaA* im ektopischen Lokus funktional war. Die Positiv- und Negativkontrolle zeigten das erwartete Wachstum. Der Laborstamm 168 war in der Lage, auf C-Minimalmedium mit Glukose gut zu wachsen. Im Gegensatz dazu wiesen die Stämme GP508 ( $\Delta$ *pgi*) und GP596 ( $\Delta$ *fbaA*) kein Wachstum auf. Den Stämmen GP508 und GP596 fehlt entweder das Enzym Glukose-6-Phosphat Isomerase oder Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase. Beide sind unabdingbar für das Wachstum auf Glukose. Die Stämme GP1752 und GP1761, die beide die *pgi-fbaA*-Fusion im ektopischen Lokus tragen, zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten in C-Glukose-Medium. Dabei spielte es keine Rolle, ob die native Kopie von *pgi* bzw. *fbaA* im Chromosom vorhanden war. Dies zeigt deutlich, dass die *pgi-fbaA*-Fusion funktional war. Im Vergleich zum Wildtyp 168 ist das

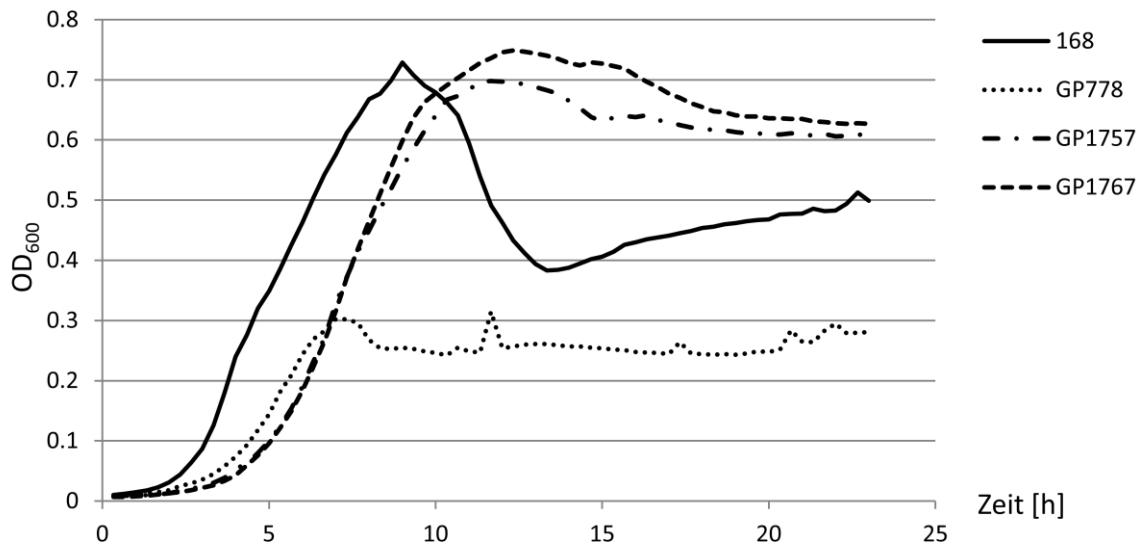
Wachstum der Stämme mit der *pgi-fbaA*-Fusion verzögert. Jedoch wird dieselbe maximale optische Dichte erreicht.



**Abbildung 4.30: Wachstumsversuch der *pgi-fbaA*-Fusion im ektopischen Lokus.**

Die Stämme 168, GP508 ( $\Delta pgi$ ), GP596 ( $\Delta fbaA$ ), GP1752 (*pgi-fbaA*), und GP1761 (*pgi-fbaA*;  $\Delta pgi$  und  $\Delta fbaA$ ) wurden ÜN in LB-Medium bei 37°C angezogen. Das Wachstum der Stämme ÜT erfolgte durch Inokulation in C-Glukose-Medium. Im Anschluss wurde die Hauptkultur (C-Glukose-Medium) zu einer OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37°C im „Platereader“ inkubiert. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm. Die Glukosekonzentration im Medium betrug 0,5%. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Wachstumskurve für mindestens drei unabhängige Experimente.

Im nächsten Schritt wurde die Funktionalität des *ptsGHI*-Operons mit dem artifiziellen Promoter am ektopischen Lokus untersucht. In der Abbildung 4.31. ist das Wachstum der entsprechenden Stämme dargestellt. Die Positiv- und Negativkontrolle zeigten das erwartete Wachstum. Der Laborstamm 168 war in der Lage auf C-Minimalmedium mit Glukose und Arginin gut zu wachsen. Im Gegensatz dazu wies der Stamm GP778 ( $\Delta glcT$ -*ptsGHI*) ohne funktionales Aufnahmesystem für Glukose nur ein geringes Wachstum auf. Dieser Stamm nutzt das vorhandene Arginin im Medium als Kohlenstoffquelle bis sämtliches Arginin aufgebraucht wurde. Danach erfolgte kein Wachstum mehr. Die Stämme GP1757 und GP1767, die eine ektopische Kopie des *ptsGHI*-Operons tragen, waren in der Lage, auf Minimalmedium mit Glukose und Arginin zu wachsen. Hiermit wurde bestätigt, dass die Fusion von *pgi*, *fbaA* und den *ptsGHI*-Operon funktional ist.



**Abbildung 4.31: Wachstumsversuch *pgi-fbaA*-Fusion im ektopischen Lokus.**

Das Wachstum der Stämme 168, GP508 ( $\Delta pgi$ ), GP596 ( $\Delta fbaA$ ), GP1752 (*pgi-fbaA*), und GP1761 (*pgi-fbaA*;  $\Delta pgi$  und  $\Delta fbaA$ ) wurden in C-Glukose-Medium untersucht. Die Hauptkultur wurde bei 37°C im „Platereader“ inkubiert. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm. Die Glukosekonzentration im Medium betrug 0,5%. Drei unabhängige Versuche zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten sämtlicher *B. subtilis* Stämme.

## 5. Diskussion

### 5.1. Die Bedeutung des Methylglyoxalmetabolismus

Die Bedeutung von Methylglyoxal wird sehr kontrovers diskutiert. Hier fällt sofort auf, dass das toxische Methylglyoxal in allen Lebewesen anzutreffen ist. Es verursacht irreversible Schäden an der DNA und den Proteinen der Zelle. Dabei wird häufig die Funktion der Proteine beeinträchtigt. Die erhöhte Mutationsrate der DNA kann ebenfalls Auswirkungen auf die Synthese von Proteinen oder die Regulation der Genexpression haben (Thornally, 2008). Schon geringste Mengen an Methylglyoxal beeinträchtigen das Wachstum von Bakterien (Nguyen *et al.*, 2009).

Dabei entsteht es in vielen Organismen als Nebenprodukt von Stoffwechselfvorgängen wie z.B. der Glykolyse. In Bakterien wird Methylglyoxal enzymatisch aus Dihydroxyacetonphosphat gebildet. Da es, wie bereits erwähnt, sehr toxisch für die Zelle ist, ist es unabdingbar, dass die Produktion und der Abbau von Methylglyoxal strikt reguliert werden. In Bakterien dient der Methylglyoxalmetabolismus als Überdruckventil. Unter guten Wachstumsbedingungen kann die hohe Aufnahmerate von Kohlenhydraten das Gleichgewicht der Glykolyse stören. Dies führt zu einer Akkumulation von Zuckerphosphaten, die toxisch für die Zelle sind. Unter diesen Bedingungen wird die Methylglyoxalsynthase aktiviert und vermindert den durch die Zuckerphosphate hervorgerufenen Zellstress. Somit gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Phosphathaushalt der Zelle und der Aktivität der Methylglyoxalsynthase (Töttemeyer *et al.*, 1998; Saadat und Harrison, 1999; Weber *et al.*, 2005; Landmann *et al.*, 2011).

Methylglyoxal ist auch in den Zellen des Menschen anzutreffen. Im menschlichen Körper wird es spontan durch Glukoseautooxidation und bei der Peroxidation von Lipiden gebildet (Baynes und Thorpe, 2000; Thornally, 1996). Im Menschen entstehen „Advanced Glycation End Products“ (AGEs) spontan durch die Reaktion von Methylglyoxal mit Amino- und Sulfhydrylgruppen in Proteinen. Diese Verbindungen beeinflussen die Funktion und Struktur von Proteinen und Nukleinsäuren. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen den

AGEs und Krankheiten wie Diabetes, Alzheimer und Arteriosklerose (Brownlee, 1995; Palinski *et al.*, 1995; Brownlee, 2001; Tan *et al.*, 2007). Diabetespatienten weisen eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an Glukose auf. Dies führt wiederum zu einem Anstieg der Methylglyoxalkonzentration in den Zellen. Vor kurzem konnte nachgewiesen werden, dass Methylglyoxal das Schmerzempfinden von Menschen erhöht, indem es an Nervenbahnen bindet, die für die Wahrnehmung von Schmerzen verantwortlich sind (Bierhaus *et al.*, 2012).

Der Abbau von Methylglyoxal und anderen reaktiven Aldehyden erfolgt mit Hilfe des Glyoxalasesystems. Über zwei enzymatische Reaktionen wird Methylglyoxal zu D-Laktat umgewandelt. Zunächst entsteht Hemithioacetal spontan aus Methylglyoxal. Die Glyoxalasen I und II katalysieren die Reaktion von Hemithioacetal über S-Lactoylglutathion zu D-Laktat. Zusätzlich gibt es Aldoketoreduktasen, die direkt Methylglyoxal zu Acetol umwandeln (Ferguson *et al.*, 1998; MacLean *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 2005). Diese Abbausysteme sind in vielen Organismen stark konserviert. *B. subtilis* stellt hier eine Ausnahme dar, da es kein Glutathion besitzt. Jedoch konnte im letzten Jahr gezeigt werden, dass das homologe bacillithiolabhängige Abbausystem für die Detoxifizierung verantwortlich ist. Das Substrat der Glyoxalase I, Hemithioacetal, entsteht in *B. subtilis* bei der spontanen Reaktion von Bacillithiol mit Methylglyoxal. Der weitere Abbau von Methylglyoxal ist identisch zu den bereits geschilderten Abbauwegen (Newton *et al.*, 2009; Gaballa *et al.*, 2010; Helmann, 2011; Fahrey *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013; Chandransu *et al.*, 2014;).

Methylglyoxal ist auch in der Biotechnologie anzutreffen. Als wichtiges Zwischenprodukt der 1,2-Propandiol synthese hat es eine sehr große Bedeutung. 1,2-Propandiol dient als Ausgangsprodukt für viele pharmazeutische oder kosmetische Produkte. Weiterhin findet es Anwendung als Lösungsmittel und Lebensmittelzusatz. Einige Mikroorganismen wie z.B. *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* sind in der Lage, Methylglyoxal in 1,2-Propandiol umzuwandeln. Aufgrund der hohen Nachfrage von 1,2-Propandiol ist es unabdingbar, den Prozess der enzymatischen Synthese von 1,2-Propandiol zu verstehen (Altaras *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2008; Lee und Dasilva, 2006).

In Anbetracht dieser Eigenschaften ist es von großer Bedeutung die Synthese, den Abbau und den Wirkungsmechanismus von Methylglyoxal zu untersuchen. Diese Arbeit liefert einen strukturellen Einblick in die Regulation der MgsA-Aktivität in *B. subtilis*.

## 5.2. Die Familie der Methylglyoxalsynthasen

Die ausschließlich in Bakterien vorkommenden Methylglyoxalsynthasen sind die einzigen Enzyme, die spezifisch Methylglyoxal aus Dihydroxyacetonphosphat synthetisieren können. Die anschließende Verwertung von Methylglyoxal zu Pyruvat über D-Laktat öffnet einen Nebenweg der Glykolyse. Bei diesem Bypass wird keine Energie gewonnen, er liefert jedoch inorganisches Phosphat, das für die Gewinnung von ATP und anderen Energieträgern benötigt wird. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass die Aktivität der Methylglyoxalsynthasen in Abhängigkeit von Phosphat bzw. phosphorylierten Intermediaten der Glykolyse reguliert wird (Hopper und Cooper 1971; Hopper und Cooper 1972; Cooper, 1984).

### 5.2.1. Die Struktur der Methylglyoxalsynthasen

Obwohl Methylglyoxalsynthasen in vielen Mikroorganismen anzutreffen sind, gibt es bisher kaum Informationen über deren Struktur und Regulation auf molekularer Ebene. In dieser Arbeit konnte die Struktur von MgsA aus *B. subtilis* gelöst werden. MgsA bildet einen hexameren Komplex (s. Abb. 4.19). Jede monomere Untereinheit wird aus 4  $\beta$ -Faltblättern gebildet, die von 6  $\alpha$ -Helices umgeben sind. Anhand der Struktur wird ersichtlich, dass das eigentliche „Hexamer“ ein Trimer aus Dimeren ist. Dabei ist die Anordnung des Hexamers als Trimer aus Dimeren ein weit verbreiteter Mechanismus. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Diadenylylzyklase CdaS aus *B. subtilis* ebenfalls ein Trimer aus Dimeren ist. CdaS synthetisiert das essentielle Signalmolekül c-di-AMP (Mehne *et al.*, 2014).

Dabei bilden drei MgsA-Dimere die hexagonale Form. Die Struktur zeigt, dass es zwei Dimerisierungsgrenzflächen gibt. Eine der beiden Grenzflächen (im späteren Verlauf als Grenzfläche 1 bezeichnet) wird durch die N-terminalen Helices von MgsA gebildet. (s. dazu die Grenzfläche zwischen den Moleküle in pink und in grau, in hellblau und in rot sowie in dunkelblau und in gelb der Abbildung 4.20). Diese Region ist durch Salzbrücken



gekennzeichnet. Eine genauere Analyse zeigt, dass die Aminosäuren Alanin-93 und Leucin-97 maßgeblich an dieser Interaktion beteiligt sind. Eine weitere Dimerisierungsgrenzfläche bilden die C-terminalen Helices von MgsA. Diese Grenzfläche (im späteren Verlauf als Grenzfläche 2 bezeichnet) wird durch Wasserstoffbrückenbindungen (s. dazu die Grenzfläche zwischen den Molekülen in rot und in dunkelblau, in gelb und in pink sowie in grau und in hellblau der Abbildung 4.20) ausgebildet. An der Ausbildung dieser Grenzfläche sind die Aminosäuren Threonin-107 und Threonin-111 beteiligt.

Die Struktur von MgsA aus *B. subtilis* ähnelt stark der von *E. coli*. Es gibt lediglich kleine Unterschiede in der Struktur der Monomere. Im Gegensatz zu MgsA aus *B. subtilis* wird MgsA aus *E. coli* aus 5  $\beta$ -Faltblättern, die von 5  $\alpha$ -Helices umgeben sind, ausgebildet. Eine zusätzliche Helix am N-Terminus von MgsA in *E. coli* erfüllt regulatorische Funktionen. Dies wird im nächsten Abschnitt näher diskutiert. Auch in *E. coli* ist die aktive Form von MgsA ein Hexamer, welches sich aus drei Dimeren zusammensetzt. Aufgrund der Anordnung der einzelnen Monomere ergeben sich auch hier mehrere Dimerisierungsgrenzflächen. Wie bereits für *B. subtilis* beschrieben, wird eine der beiden Dimerisierungsgrenzflächen durch Wasserstoffbrückenbindungen und die andere durch Salzbrücken ausgebildet. Anhand der Struktur des Hexamers aus *E. coli* wurde eine weitere Dimerisierungsgrenzfläche identifiziert. Hierbei bilden die Loops von drei MgsA-Monomeren, die in das Zentrum des Hexamers hineinragen, eine gemeinsame Interaktionsfläche aus. Die Bedeutung dieser Dimerisierungsgrenzfläche ist unbekannt (Saadat und Harrison, 1999). In *Thermus* sp., *Thermus thermophilus* und *Thermotoga maritima* bildet MgsA ebenfalls ein Hexamer aus, das in seiner Struktur dem von *B. subtilis* und *E. coli* sehr ähnlich ist (Pazhang *et al.*, 2010; Joint center for structural genomics, unpubliziert, 2004 und 2005).

### 5.2.2. Die Regulation der Methylglyoxalsynthasen

Enzyme haben eine sehr große biologische Bedeutung, da sie als Katalysatoren für die meisten Reaktionen des Stoffwechsels aller Organismen dienen. Damit unter bestimmten Nährstoffbedingungen nur die dafür benötigten spezifischen Reaktionen ablaufen, unterliegt die Aktivität einzelner Enzyme einer strengen Regulation. So kann unter anderem durch eine veränderte Genexpression indirekt Einfluss auf Enzymaktivitäten genommen werden. Denn nur unter spezifischen Bedingungen werden die benötigten Enzyme exprimiert. Die Aktivität

eines Enzyms kann auch durch verschiedene Mechanismen an die jeweiligen Nährstoffbedingungen angepasst werden. Dazu zählen Modifikationen, wie allosterische Wechselwirkungen, Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen, Aktivierung durch Spaltung von Proteinen oder Regulation der Enzymaktivität durch andere Proteine.

Die allosterische Regulation von Proteinen erfolgt durch Bindung eines Effektors. Das regulatorisch wirksame Molekül bindet an anderer Stelle als das Substrat. Dabei bewirkt die Bindung eine Veränderung der Konformation des entsprechenden Enzyms unter Beeinflussung des aktiven Zentrums (Goodey und Benkovic 2008). Im Laufe der Jahre wurde eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die einer allosterischen Regulation unterliegen. Ein bekanntes Beispiel hierfür stellt die Phosphofruktokinase dar (Marschke und Bernlohr, 1973).

Sämtliche in Bakterien charakterisierten Methylglyoxalsynthasen unterliegen einer allosterischen Regulation. Die Bindung von Phosphat inaktiviert MgsA durch eine Konformationsänderung. Folglich wird kein Methylglyoxal mehr produziert. In *E. coli* verursacht Phosphat eine Konformationsänderung der Grenzfläche 1. Wie bereits erwähnt, wird diese Interaktionsfläche durch Salzbrücken ausgebildet. Dabei erfolgt die Bindung von Phosphat an der zur Innenseite des Hexamers gerichteten Region der Grenzfläche 1. Hier ist das Lysin-21 an der Bindung von Phosphat beteiligt. Dabei reduziert sich die Anzahl der Salzbrücken von sechs auf zwei. Dies führt zur Störung in der Struktur, indem der Zugang zum aktiven Zentrum verändert wird. Als Konsequenz kann Dihydroxyacetonphosphat möglicherweise nicht mehr von MgsA gebunden werden. Das Alignment (siehe Abb. 4.2.) von MgsA verschiedener Mikroorganismen zeigt, dass im Vergleich zu *B. subtilis* der N-Terminus von MgsA aus *E. coli* zusätzlich zehn Aminosäuren besitzt. Dieser Bereich hat regulatorische Funktionen. Das allosterische Signal wird durch die Bindung von Phosphat über diese Region auf die benachbarte Untereinheit des MgsA-Hexamers übertragen (Saadat und Harrison, 1999). Auch in *Thermus* sp. bewirkt die Bindung von Phosphat eine Konformationsänderung, die zur Inaktivierung von MgsA führt. Untersuchungen bezüglich eines Fusionsproteins, bei dem MgsA aus *Thermus* sp. mit den zehn N-terminalen Aminosäuren aus *E. coli* fusioniert war, haben gezeigt, dass der allosterische Effekt von Phosphat verstärkt werden konnte. Dies bestätigte, dass der N-Terminus von MgsA indirekt

an der Regulation der Enzymaktivität in *E. coli* beteiligt ist (Farsi *et al.*, 2012; Pazhang *et al.*, 2010; Zareian *et al.*, 2011).

Auch in *B. subtilis* erfolgt die Regulation der Methylglyoxalsynthaseaktivität über Phosphat. Untersuchungen haben verdeutlicht, dass eine steigende Phosphatkonzentration die MgsA-Aktivität *in vitro* hemmt (Landmann, 2011). Eine zusätzliche Ebene der Regulation der MgsA-Aktivität stellt die direkte Protein-Protein Interaktion mit Crh dar. Im dephosphorylierten Zustand kann Crh einen Komplex mit MgsA eingehen, was zur Inaktivierung von MgsA führt und die Produktion von Methylglyoxal verhindert. Im Gegensatz dazu hat unter sehr guten Nährstoffbedingungen die steigende intrazelluläre Konzentration von Fruktose-1,6-bisphosphat und ATP einen stimulierenden Effekt auf die Kinaseaktivität der HPrK/P. Als Folge dessen wird Crh am Serin-46 durch die HPrK/P phosphoryliert und ist nicht mehr in der Lage, MgsA zu binden. Dadurch kann MgsA in seiner aktiven Form DHAP zu Methylglyoxal umsetzen (Landmann *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit konnten erste Einblicke gewonnen werden, wie Crh auf molekularer Ebene MgsA inaktiviert. Der hier durchgeführte genetische Screen lässt vermuten, dass Mutationen des N-terminalen Bereichs von MgsA die Interaktion mit Crh beeinflussen. Es wurden wiederholt Mutationen in diesem Bereich identifiziert, die eine stark eingeschränkte Interaktionsfähigkeit mit Crh zeigten. Folglich sind die Aminosäuren Lysin-2, Isoleucin-3 und Alanin-4 ausschlaggebend für die Struktur von MgsA und demzufolge wichtig für Regulation der Enzymaktivität ist. Bestärkt wird diese Annahme dadurch, dass exakt diese Region von MgsA in vielen Mikroorganismen konserviert ist (siehe Abb. 4.2.).

Weitere MgsA-Mutanten zeigten Mutationen im möglichen aktiven Zentrum von MgsA. In *E. coli* führt eine Mutation des Histidin-98 zu einer verminderten Umsatzrate von Dihydroxyacetonphosphat zu Methylglyoxal. Die verminderte Aktivität ist auf eine Konformationsänderung der Mutante H98Q zurückzuführen (Marks *et al.*, 2004). Dieser Bereich ist in *B. subtilis* und *E. coli* stark konserviert, daher ist anzunehmen, dass auch hier eine Mutation in dieser Region zu einer Konformationsänderung führt und so die Interaktion mit Crh verhindert wird.

Im nächsten Schritt sollte die biologische Bedeutung der identifizierten Aminosäurereste in MgsA genauer untersucht werden. Hierfür wurden kompensatorische Mutationen in Crh

identifiziert, die die Interaktion mit den entsprechenden MgsA Mutanten wiederhergestellt haben. Die in dieser Arbeit identifizierten kompensatorischen Crh-Mutanten sind im Anhang in der Tabelle 7.8. aufgelistet. Auffällig ist, dass sich die kompensatorischen Mutanten in den  $\alpha$ -Helices von Crh befinden. Dies zeigt, dass die Helices 1 und 2 von Crh an der Interaktion mit MgsA beteiligt sind. Diese Daten sind im Einklang mit vorherigen Studien, die sich mit der Interaktion von HPr oder Crh mit CcpA beschäftigt haben. Die Strukturen der paralogen Proteine HPr und Crh, welche eine Sequenzidentität von 45% haben, konnten bereits gelöst werden. Anhand dieser und der Struktur anderer bekannter Interaktionspartner wurden bereits wichtige Bereiche in HPr und Crh identifiziert, die an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind. In HPr befinden sich wichtige Aminosäurereste in den Helices 1 und 2, die für die Interaktion mit der HPrK/P und CcpA benötigt werden. Weiterhin ist der Loop vor der Helix 1, sowie nach der Helix 2 maßgeblich an der Interaktion beteiligt (Schumacher *et al.*, 2006, Schumacher *et al.*, 2007). Für die Interaktion von Crh mit CcpA zeigt sich ein ähnliches Bild. Es konnte gezeigt werden, dass die gleichen Bereiche wie in HPr an der Interaktion mit CcpA beteiligt sind (Schumacher *et al.*, 2007). Außerdem wurde in der Arbeit von Landmann *et al.*, 2011 gezeigt, dass Mutationen in der Helix 1 HPr befähigen, MgsA zu binden. Hier sind vor allem die Aminosäurereste 14, 15, 20 und 22 zu erwähnen.

Schaut man sich die erhaltenen Crh-Mutanten genauer an, so fällt auf, dass bei allen untersuchten MgsA-Mutanten dieselben kompensatorischen Mutationen aufgetreten sind. Dabei spielen die Reste Alanin-15, Prolin-18 und Isoleucin-47 eine besondere Rolle. Theoretisch wäre hier zu erwarten, dass jede MgsA-Mutante bestimmte kompensatorische Crh-Mutanten hervorbringt. Dies ist jedoch nicht der Fall. Möglicherweise bewirken alle Mutationen im N-Terminus von MgsA generell eine Konformationsänderung, die die Interaktion mit Crh beeinflusst. Daher kann man nicht genau sagen, ob Crh wirklich an den N-Terminus von MgsA bindet.

Das Modell des Crh/MgsA-Komplexes der Abbildung 4.20.B. liefert eine mögliche Erklärung. Die Computersimulation zeigt, dass die gemeinsame Interaktionsfläche zwischen den Helices 1 und 2 von Crh und der Basis der  $\beta$ -Faltblätter von MgsA ausgebildet wird. Es wird ersichtlich, dass der N-Terminus von MgsA eine Interaktion mit den Helices 1 und 2 von Crh eingeht. Hier wäre es möglich, dass das  $\beta$ -Faltblatt 1 sich zwischen die Helices von Crh

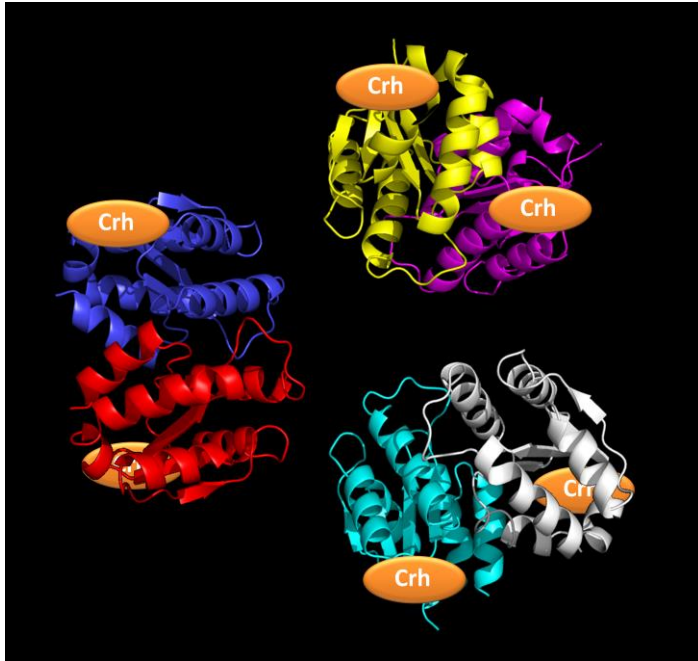
schiebt. Bei diesem Modell würden verschiedene Mutation des N-Terminus von MgsA die gleichen kompensatorischen Mutationen in Crh hervorbringen.

Um die Interaktionsfläche genauer zu untersuchen wurden „cross-linking“ Versuche mit BS3 durchgeführt. BS3 vernetzt Lysine in einem Abstand von 10 Ångström. Anhand dieser Experimente konnte bestätigt werden, dass Crh mit MgsA interagiert. Hier konnten ausschließlich Vernetzungen im N-terminalen Bereich von MgsA mit dem Bereich der Helix 2 von Crh identifiziert werden. Diese Bereiche müssen sich demzufolge in räumlicher Nähe befinden. Jedoch ergibt sich hier eine Diskrepanz zu den bereits erhaltenen Daten. Berücksichtigt man den Abstand zwischen den vernetzten Lysinresten, so ist es nicht möglich, dass Crh an den N-Terminus von MgsA bindet. Eine Bindung an den Loop nach dem Faltblatt 1 ist hier wahrscheinlicher. Nur dort befinden sich die identifizierten Lysinreste in entsprechender räumlicher Nähe, dass sie mit BS3 vernetzt werden können. In diesem Fall würde Crh im Zentrum des MgsA-Hexamers binden. Dies ist genau der Bereich, in dem die Regulation der MgsA-Aktivität in *E. coli* durch Phosphat erfolgt. Die Bindung von Phosphat an Lysin-21 bewirkt eine Konformationsänderung der Grenzfläche 1. Als Resultat ist MgsA inaktiv. In *B. subtilis* entspricht dies dem Lysin-10 (Saadat und Harrison, 1999).

### 5.2.3. Modell der Crh vermittelten Inaktivierung von MgsA

Anhand aller Daten liegt die Vermutung nahe, dass dephosphoryliertes Crh an das MgsA-Hexamer bindet. Die Bindung erfolgt dabei entweder am N-Terminus oder an dem Loop nach dem Faltblatt 1 von MgsA. Dies führt zur Destabilisierung des MgsA-Hexamers. Als Folge zerfällt das Hexamer in drei Dimere. In *E. coli* bewirkt die Bindung von Phosphat eine Konformationsänderung der Dimerisierungsgrenzfläche 1 des MgsA-Hexamers. Überträgt man die Daten auf das Modell der Regulation von MgsA in *B. subtilis*, ist anzunehmen, dass die Bindung von Crh ebenfalls eine Konformationsänderung der Grenzfläche 1 bewirkt. Auch hier werden wahrscheinlich die Salzbrücken der Interaktionsfläche aufgebrochen. Folglich liegt ein Heterotetramer aus jeweils 2 Molekülen Crh und MgsA vor. In der Abbildung 5.1. ist eines der beiden Modelle (Crh bindet an den N-Terminus von MgsA) der Crh-vermittelten Inaktivierung von MgsA dargestellt. Bei beiden Modellen führt die Bindung von Crh an MgsA zur Destabilisierung des MgsA-Hexamers wodurch das Hexamer in drei Dimere zerfällt.

Anhand der Struktur des Crh/MgsA-Komplexes könnte man mit Sicherheit sagen, welches der beiden Modelle den natürlichen Bedingungen entspricht.



**Abbildung 5.1: Modell der Crh vermittelten Inaktivierung von MgsA.**

Unter moderaten bzw. schlechten Wachstumsbedingungen liegt Crh in der Dephosphorylierten Form vor. Dadurch kann Crh an das MgsA-Hexamer binden. Je ein Crh Molekül bindet an den jeweiligen N-Terminus einer Untereinheit des MgsA-Hexamers. Die Bindung von Crh bewirkt eine Konformationsänderung der Dimerisierungsgrenzfläche 1 indem Salzbrücken aufgebrochen werden (zwischen den Molekülen dunkelblau und gelb, pink und grau sowie hellblau und rot). Daraufhin zerfällt das Hexamer in drei Dimere.

Die hier untersuchten MgsA-Mutanten zeigen ebenfalls eine verminderte Fähigkeit zur Eigeninteraktion. Anhand von Aktivitätstests konnte gezeigt werden, dass dadurch möglicherweise ebenfalls die Enzymaktivität beeinträchtigt wird. Die Struktur des MgsA-Hexamers zeigt, dass die Dimerisierungsgrenzflächen zwischen den MgsA-Untereinheiten durch die N-terminalen und C-terminalen Helices ausgebildet werden. In dieser Arbeit wurde der N-Terminus oder der Loop nach dem Faltblatt 1 in MgsA als möglicher Bindungsort von Crh identifiziert. Somit haben die Komplexe Crh/MgsA und MgsA nicht dieselbe Interaktionsfläche. Daher ist es naheliegend, dass die Mutationen in MgsA Konformationsveränderungen hervorrufen, die die Eigeninteraktion von MgsA beeinträchtigen. Kleine Veränderungen der Konformation der C- bzw. N-terminalen Helices von MgsA führen hier möglicherweise dazu, dass sich die Grenzflächen 1 und 2 nicht ausbilden können. Als Resultat ist MgsA inaktiv. Bereits winzige Änderungen der

Konformation nehmen Einfluss auf die Struktur von MgsA. Daher ist es nicht verwunderlich, dass sämtliche charakterisierten MgsA-Mutanten inaktiv sind.

Wie bereits geschildert, zeigten frühere Studien bezüglich der Methylglyoxalsynthese aus *E. coli* eine eingeschränkte Aktivität durch eine Mutation am Histidin-98 (Marks *et al.*, 2004). Histidin-98 und die umliegenden Aminosäuren bilden das aktive Zentrum von MgsA in *E. coli*. Im Alignment der Abbildung 4.2 sieht man, dass dieser Bereich ebenfalls stark konserviert ist. Daher ist anzunehmen, dass die gefundenen Mutationen in diesem Bereich ebenfalls in *B. subtilis* zu einer verminderten Aktivität von MgsA führen (Marks *et al.*, 2001; Marks *et al.*, 2004).

### 5.3. Das Verständnis über essentielle Prozesse in *B. subtilis*

Die Anwendung von *B. subtilis* in der Biotechnologie findet immer größere Beliebtheit. Die einfache Handhabung und Kultivierung machen das Bakterium bereits jetzt zu einem der wichtigsten Produzenten von Vitaminen, Antibiotika und Enzymen. Genau deshalb ist es unabdingbar, alle fundamentalen Prozesse des Lebens zu verstehen und essentielle Gene bzw. Stoffwechselwege zu charakterisieren. Als essentiell werden die Gene bezeichnet, die lebensnotwendig sind bzw. nicht unter bestimmten Bedingungen deletierbar sind. Hier wird deutlich, dass selbst Umwelteinflüsse ausschlaggebend sind, ob ein Gen als essentiell angesehen wird oder nicht. Mikroorganismen wie *B. subtilis* besitzen eine natürliche Resistenz gegenüber Störeinflüssen, die durch veränderte Umweltbedingungen hervorgerufen werden. Dies ist vor allem in der biotechnologischen Anwendung von großer Bedeutung, da die Mikroorganismen unter den gegebenen Bedingungen oftmals Strategien entwickeln, um ihre Lebensqualität zu erhöhen. Dies wiederum beeinflusst biotechnologische Prozesse. Eine Strategie, um diese Widerstandsfähigkeit zu vermindern ist die Identifizierung des Minimalgenoms eines Organismus. Hier ist das Ziel, nur die genetische Information, die für das Leben unter definierten Bedingungen nötig ist in einem Genom zu verbinden. Weiterhin liefern Studien über essentielle Gene bzw. Stoffwechselwege fundamentale Erkenntnisse über die Grundlagen des Leben (Commichau *et al.*, 2013; Jewett und Foster, 2010; Juhas *et al.*, 2011; Moya *et al.*, 2009). In den letzten Jahren haben sich eine Vielzahl von Wissenschaftlern mit der Identifizierung von essentiellen Genen beschäftigt (Christen *et al.*, 2011; de Berardinis *et al.*, 2008;

French *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2002; Kato und Hashimoto, 2007; Juhas *et al.*, 2011).

Allerdings gibt es weiterhin viele Lücken, die zum vollen Verständnis aller fundamentalen Prozesse des Lebens geschlossen werden müssen. Diese Arbeit liefert Erkenntnisse über die Bedeutung des Zitratzyklus und dessen Zuflüssen unter optimalen Wachstumsbedingungen für *B. subtilis*. Aktuell werden 261 als essentiell für *B. subtilis* angesehen (Commichau *et al.*, 2013).

#### **5.4. Die Bedeutung des Zitratzyklus und von dessen Zuflüssen für *B. subtilis***

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über die Bedeutung des Zitratzyklus für *B. subtilis* zu erlangen. Hier sollten die Auswirkung des Verlustes des Zitratzyklus und dessen Zuflüsse auf das Wachstum von *B. subtilis* untersucht werden.

##### **5.4.1. Auswirkungen des Verlustes des Zitratzyklus und von dessen Zuflüsse**

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen des Verlustes des Zitratzyklus und von dessen Zuflüssen auf das Wachstum von *B. subtilis* untersucht. Zunächst wurden Einzelmutanten der beteiligten Enzyme hergestellt, die im nächsten Schritt kombiniert wurden. Die Tabellen 4.5. und 4.6. zeigen einen Überblick über die konstruierten Stämme. Die Wachstumsversuche haben gezeigt, dass der Zitratzyklus nicht essentiell für das Wachstum von *B. subtilis* ist. Gleiches gilt für die Zuflüsse des Zitratzyklus. Hier sollte jedoch nicht vernachlässigt werden, dass dabei die Wachstumsbedingungen eine entscheidende Rolle spielen. Die durchgeführten Wachstumsversuche in Vollmedium haben gezeigt, dass sämtliche Deletionsmutanten das gleiche Wachstum wie der Wildtyp 168 besitzen. Denn durch die vorhandene Glukose im Medium wird hauptsächlich die Glykolyse genutzt um Glukose zu energiereichen Intermediaten abzubauen. Des Weiteren werden einige Enzyme des Zitratzyklus, wie zum Beispiel die Zitratsynthase CitZ, durch Glukose reprimiert (Blencke *et al.*, 2003). Zusätzlich sind alle benötigten Aminosäuren im Vollmedium vorhanden, so dass die Intermediate des Zitratzyklus nicht für die Synthese für zum Beispiel Glutamat benötigt werden.



Weiterhin hat sich gezeigt, dass unter weniger guten Bedingungen der Verlust des Zitratzyklus und dessen Zuflüssen das Wachstum von *B. subtilis* beeinträchtigt. In einem weniger reichhaltigen Medium, wie SP-Medium, hat der Verlust einzelner Gene einen Einfluss auf das Wachstum von *B. subtilis*. Die Deletion der Gene *sdhCAB*, *citB* und *odhAB* des Zitratzyklus führt möglicherweise zur Akkumulation von Zitrat.

CitB hat einen Effekt auf die Expression von *citZ*. Indem CitB die Stabilität des *citZ* Transkripts reguliert, wird die Akkumulation von Zitrat im Wildtyp 168 verhindert. Der Verlust von CitB führt zu einer erhöhten Expression von *citZ*, daraus resultiert eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an Zitrat. Die Akkumulation von Zitrat verhindert die Sporulation, da Zitrat als Chelator zweiwertige Kationen bindet, die für die durch SpoOA eingeleitete Sporulation benötigt werden. Erhöhte Zitratkonzentrationen den pH-Wert der Zelle ändern. Als Folge, tritt ein Wachstumsdefizit auf (Craig *et al.*, 1997; Matsuno *et al.*, 1999; Pechter *et al.*, 2013).

Ähnliches gilt auch für die Zuflüsse in den Zitratzyklus. Hier zeigt sich, dass besonders die Deletion der Glutamat-Dehydrogenasen einen Einfluss auf das Wachstum von *B. subtilis* hat. Möglicherweise fehlt hier Ammonium, als Folge kann kein Glutamin synthetisiert werden. Weiterhin beeinflussen die Abbauprodukte des Argininstoffwechsels das Wachstum von *B. subtilis*. Ohne funktionale Glutamat-Dehydrogenasen, akkumulieren die Abbauprodukte des Argininstoffwechsels (Gunka und Commichau, 2012).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Zitratzyklus und dessen Zuflüsse unter optimalen Wachstumsbedingungen nicht essentiell sind. Dies geht jedoch einher mit dem Verlust metabolischer Fähigkeiten. So ist zu erwarten, dass diese Deletionsstämme unter minimalen Bedingungen ein erhebliches Wachstumsdefizit aufweisen. Ein sehr gutes Beispiel hierfür ist die Verfügbarkeit von Aminosäuren. In Minimalmedium muss *B. subtilis* alle benötigten Aminosäuren synthetisieren. Unter diesen Bedingungen ist der Zitratzyklus essentiell, da er die wichtigen Vorstufen für die Synthese von Aminosäuren liefert. Das am häufigsten in der Zelle vorhandene Molekül Glutamat wird aus  $\alpha$ -Ketoglutarat hergestellt. Unter sehr spezifischen Bedingungen kann *B. subtilis* daher nicht ohne Zitratzyklus überleben.

In der Welt der Mikroorganismen gibt es auch einige Vertreter, die keinen vollständigen Zitratzyklus besitzen. *Listeria monocytogenes* besitzt keine  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase. Aus diesem Grund wird das wichtige Stoffwechselintermediat Oxalacetat ausschließlich über

die Carboxylierung von Pyruvat hergestellt (Eisenreich *et al.*, 2006; Schaer *et al.*, 2010; Glaser *et al.*, 2001).

Dies verdeutlicht, wie komplex die einzelnen Stoffwechselwege miteinander verbunden sind. Die Aussage „essentielle Stoffwechselwege“ sollte daher nur mit Bedacht verwendet werden. Nur unter Berücksichtigung spezifischer Wachstumsbedingungen kann man Stoffwechselwege als essentiell oder nicht essentiell einstufen.

#### **5.4.2. *odhB* ist nicht essentiell**

Das Gen *odhB*, welches für die E2 Untereinheit des  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes kodiert, galt bisher als einziges essentielles Gen des Zitratzyklus (Kobayashi *et al.*, 2003). Die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase katalysiert die Reaktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA. Diese Reaktion ist irreversibel. Hier ergibt sich die Frage: Warum ist *odhB* essentiell? Das Produkt der von der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase vermittelten Reaktion wird ausschließlich im Zitratzyklus generiert und benötigt. Auch ohne  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase könnte *B. subtilis* über die Carboxylierung von Pyruvat Oxalacetat, Fumarat, Succinat und Succinyl-CoA herstellen. Somit wäre es unwahrscheinlich, dass nur *odhB* als einziges Gen des Zitratzyklus essentiell ist. Die in dieser Arbeit konstruierten Stämme zeigen, dass *odhB* erfolgreich deletiert werden konnte. Somit ist der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex nicht essentiell für das Wachstum von *B. subtilis*. Die Deletion von *odhAB* führt zu einem unvollständigen Zitratzyklus. Dieser ähnelt dem, der bei *L. monocytogenes* beschrieben wurde (Eisenreich *et al.*, 2006; Schaer *et al.*, 2010; Glaser *et al.*, 2001). Allerdings kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass *odhB* möglicherweise noch eine weitere Funktion in der Zelle erfüllt. Aber auch wenn es noch eine weitere Funktion von OdhB geben würde, wäre diese unter diesen Bedingungen ebenfalls nicht essentiell.

#### **5.4.3. Die Bedeutung von CitA**

Neben CitZ kodiert das Genom von *B. subtilis* für eine weitere Zitratsynthase, CitA. Beide Enzyme katalysieren die Reaktion von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Zitrat. Jedoch ist die Bedeutung von CitA weitgehend unbekannt. Die Expression von CitA wird durch den

Transkriptionsfaktor CitR reguliert. Dieser gehört zur Familie der LysR Regulatoren (Jin und Sonenshein, 1994a; Jin und Sonenshein, 1994b).

Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die Expression und Regulation der Zitratsynthase CitA. Zunächst wurde eine *citZ* Einzelmutante erzeugt. Hierbei ist zu beachten, dass die strangabwärts liegenden Gene *icd* und *mdh* exprimiert werden. Anhand Wachstumsversuchen konnte dies bestätigt werden. Ohne funktionale Zitratsynthase fehlen diesem Stamm bedeutende Intermediate des Zitratzyklus, die für die Synthese von Aminosäuren benötigt werden. Daher war zu erwarten, dass der Stamm ( $\Delta$ *citZ*) nicht auf C-Minimalmedium mit Malat und Ammoniumsulfat als einziger Kohlenstoff und Stickstoffquelle wachsen kann. Jedoch konnte diese Mutante auf C-Minimalmedium mit Malat wachsen. Im Vergleich zum Wildtyp 168 verursacht der Verlust von CitZ ein Wachstumsdefizit (siehe Abbildung 4.21.).

Hier ergab sich die Frage, wie Glutamat aus Malat trotz fehlender Zitratsynthase synthetisiert werden kann. Es existiert allerdings noch eine weitere Zitratsynthase, CitA, die auch dazu in der Lage ist, Zitrat zu bilden. Allerdings haben bisherige Studien gezeigt, dass die Synthese von Zitrat größtenteils von der Zitratsynthase CitZ übernommen wird. CitA hat darauf nur einen geringen Effekt (Jin und Sonenshein, 1994). Weiterhin zeigen Expressionsdaten, dass die Zitratsynthase CitA generell sehr schwach exprimiert ist und folglich keinen großen Einfluss bei der Synthese von Zitrat hat. Lediglich unter Sporulationsbedingungen wird die Expression von *citA* leicht erhöht. Der Regulationsmechanismus ist jedoch unklar (Nicolas *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit wurde die Expression von *citA* erneut untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass *citA* unter normalen Bedingungen sehr schwach exprimiert ist. Der Verlust des Repressors CitR führt zur vollen Expression von CitA. Dies steht im Einklang mit allen bisherigen Daten bezüglich der Regulation von *citA* (Jin und Sonenshein, 1994a; Jin und Sonenshein, 1994b; Nicolas *et al.*, 2012). Betrachtet man die *citA*-Expression in einem  $\Delta$ *citZ* Hintergrund, so wird ersichtlich, dass trotz Vorhandenseins von CitR, eine maximale Expression von *citA* erreicht wurde. Hier hat eine zusätzliche Deletion von *citR* keinen weiteren Einfluss auf die Menge an CitA in den Zellen. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass in C-Minimalmedium mit Malat in Abwesenheit von CitZ die Repression der *citA*-Expression durch CitR aufgehoben wird. Somit lässt sich die Frage beantworten, wie der

Stamm ( $\Delta citZ$ ) Glutamat aus Malat, trotz fehlender Zitratsynthese, synthetisieren kann. Durch das Aktivieren der Zitratsynthese CitA wird der Zitratzyklus, der die Vorstufen für die Synthese der benötigten Aminosäuren liefert, vervollständigt.

Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung liefert der Repressor CitR, der zur Familie der LysR Regulatoren gehört. Diese Familie der Regulatoren ist innerhalb der Bakterien weit verbreitet und stark konserviert. Derzeitig sind über 800 Mitglieder dieser Familie der DNA-bindenden-Protein aufgrund von Sequenzidentität bekannt (Schell, 1993). Funktionale Orthologe sind auch in Eukaryoten und Archaeen vorhanden (Pérez-Rueda und Collado-Vides, 2001; Sun und Klein, 2004; Stec *et al.*, 2006).

Diese Regulatoren wirken entweder als Aktivatoren oder Repressoren einzelner Gene oder Operons. Häufig werden diese Regulatoren divergent transkribiert, können aber auch an einem anderen Ort lokalisiert sein (Heroven und Dersch, 2006; Hernández-Lucas *et al.*, 2008). Die Aktivität der LysR Regulatoren ist dabei Abhängig von einem Co-Faktor. Oft erfolgt die Regulation nach einem „Feedback Loop“ Mechanismus, bei dem entweder das Produkt oder ein Intermediat einer bestimmten Reaktion die Aktivität des Regulators beeinflusst (Celis, 1999; van Keulen *et al.*, 2003; Picossi *et al.*, 2007)

Hier ergibt sich die Vermutung, dass durch die Akkumulation von Oxalacetat oder das Fehlen von Zitrat der reprimierende Effekt von CitR auf die Expression von *citA* aufgehoben wird. Unter diesen Versuchsbedingungen würde Oxalacetat in den Zellen akkumulieren. Als möglicher Co-Inducer bindet Oxalacetat CitR. Folglich ist CitR nicht mehr in der Lage, an die DNA zu binden und die Expression von *citA* zu reprimieren. Aber auch Zitrat könnte der mögliche Co-Faktor von CitR sein. Folglich wird durch das Fehlen von Zitrat der reprimierende Effekt aufgehoben. Um diese Fragestellung zu lösen, sind weitere Versuche notwendig.

In *B. subtilis* gibt es 19 verschiedene Proteine (nach SubtiWiki) die zur Familie der LysR Regulatoren gehören. Einer der am besten charakterisierten Regulatoren ist GltC, der ein transkriptionaler Aktivator des *gltAB*-Operons ist. Dieses Operon kodiert für die Glutamat-Synthase, welche die Reaktion von Glutamin und  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat katalysiert. GltC aktiviert die Expression des *gltAB*-Operons in Anwesenheit von Zucker und Abwesenheit von Arginin. Zusätzlich wird die Aktivität von GltC von den Molekülen  $\alpha$ -Ketoglutarat bzw. Glutamat inhibiert und aktiviert (Bohannon und Sonenshein 1989;

---

Fisher, 1999; Commichau *et al.*, 2007; Picossi *et al.*, 2007). Am wichtigsten ist jedoch die Kontrolle der GltC-Aktivität durch RocG. RocG bindet und inaktiviert das Aktivatorprotein GltC. Dieser regulatorische Mechanismus erlaubt die strenge Kontrolle des Glutamastoffwechsels in Abhängigkeit der verfügbaren Kohlenstoff- und Stickstoffquellen (Belitsky und Sonenshein, 2004; Commichau *et al.*, 2007).

## 5.5. Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der Methylglyoxalsynthase-Aktivität in *B. subtilis* auf molekularer Ebene zu untersuchen. Die Struktur von MgsA liefert erste Hinweise darauf, wie die Aktivität von MgsA durch direkte Protein-Protein Interaktion mit Crh reguliert wird. Die Bindung von Crh bewirkt die Destabilisierung des MgsA-Hexamers. Folglich zerfällt MgsA in drei Dimere. Die genaue Interaktionsfläche von MgsA und Crh konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Genetische Daten zeigen jedoch, dass Mutationen im N-Terminus von MgsA die Interaktion mit Crh beeinflussen. Die identifizierten Mutationen in MgsA wirken sich sowohl auf das Bindungsverhalten von Crh als auch die MgsA-Aktivität aus. Zur besseren Charakterisierung der Interaktionsflächen von Crh und MgsA bzw. des aktiven Zentrum von MgsA wäre es hilfreich Mutanten zu isolieren, die entweder die Heteromerisierung bzw. die Aktivität von MgsA beeinflussen.

Zunächst sollten die in dieser Arbeit näher charakterisierten MgsA-Mutanten weiter biochemisch analysiert werden. Der Einfluss der Mutationen (I3L, A4T, H8R und D80A) auf die Struktur von MgsA sollte mit Hilfe der CD-Spektrometrie oder MALS untersucht werden. Dies würde erste Erkenntnisse liefern, wie diese Mutationen sowohl die Interaktionsfähigkeit mit Crh als auch die Aktivität von MgsA beeinflussen.

Anhand der Modelle des Crh/MgsA-Komplexes (siehe Diskussion) sollte es möglich sein, Aminosäurereste zu bestimmen, die möglicherweise an der Interaktion von MgsA und Crh beteiligt sind. Vorhersagen auf Grundlage dieser Modelle sollten *in vitro* durch Mutationsanalysen untersucht werden. Dabei könnten Aktivitätstest, B2H-Versuche, CD-Spektrometrie oder MALS-Analysen nähere Erkenntnisse über die Interaktionsfläche von Crh und MgsA liefern.

Es gibt zwei Dimerisierungsgrenzflächen zwischen den Untereinheiten des MgsA-Hexamers. Hier liegt die Vermutung nahe, dass wie in *E. coli* eine Konformationsänderung der Grenzfläche 1 MgsA inaktiviert. Um zu zeigen, dass die Regulation von MgsA in *B. subtilis* der von *E. coli* entspricht, müssten MgsA-Mutanten mit Mutationen in den Grenzflächen 1 und 2 erzeugt werden. Diese Mutanten sollten im Anschluss mit einem MgsA-Aktivitätstest, Massenspektrometrie oder MALS untersucht werden.

Die einfachste Lösung dieses Problems besteht darin, die Struktur des Crh/MgsA-Komplexes zu lösen. Hier besteht die Möglichkeit die Struktur anhand weiterer Kristallisationsansätze zu lösen. Eventuell wäre es hilfreich, die Kristallisationsansätze mit den verlinkten Proteinen MgsA und Crh zu wiederholen. Auch eine Ko-Auftreinigung beider Proteine könnte den Kristallisationsprozess verbessern.

Weiterhin liefert die Arbeit erste Erkenntnisse über die Zitratsynthase CitA. Unter normalen Wachstumsbedingungen wird die Expression von CitA durch den Repressor CitR reprimiert. Dieser reprimierende Effekt wird in Abwesenheit der Zitratsynthase CitZ aufgehoben. Dadurch ist CitA teilweise in der Lage, den Verlust von CitZ zu kompensieren. Da CitR zur Familie der LysR-Regulatoren gehört, ergibt sich hier die Vermutung, dass durch die Akkumulation von Oxalacetat oder das Fehlen von Zitrat der reprimierende Effekt von CitR auf die Expression von *citA* aufgehoben wird. Um diese Vermutung zu bestätigen, wäre es hilfreich, Gelshifts in An- und Abwesenheit von Oxalacetat und Zitrat durchzuführen.

Zusätzlich sollte der hier durchgeführte Aktivitätstest von CitA wiederholt werden, um repräsentative Aussagen treffen zu können.

## 6. Literaturverzeichnis

**Altaras, N. E., Etzel, M. R. & Cameron, D. C.** (2001) Conversion of sugars to 1,2-propanediol by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8. *Biotechnol Prog* **17**: 52-56.

**Ara, K., Ozaki, K., Nakamura, K., Yamane, K., Sekiguchi, J. & Ogasawara N.** (2007) Bacillus minimum genome factory: effective utilization of microbial genome information. *Biotechnol Appl Biochem* **46**: 169-78.

**Atmanene, C., Chaix, D., Bessin, Y., Declerck, N., Van Dorsseleer, A. & Sanglier-Cianferani, S.** (2010) Combination of noncovalent mass spectrometry and traveling wave ion mobility spectrometry reveals sugar-induced conformational changes of central glycolytic genes repressor/DNA complex. *Anal Chem* **82**: 3597-3605.

**Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Médigue, C. & A. Danchin.** (2009) From a consortium sequence to a unified sequence: *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155**: 1758-1775.

**Baynes, J. W. & Thorpe, S. R.** (2000) Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* **28**: 1708-1716.

**Behrens, B.** (2012) Identifizierung der für die Interaktion mit Crh wichtigen Aminosäuren in der Interaktionsfläche von MgsA in *Bacillus subtilis*. Bachelorarbeit. Georg-August-University of Göttingen.

**Belitsky, B. R. & Sonenshein, A. L.** (2004) Modulation of activity of *Bacillus subtilis* regulatory proteins GltC and TnrA by glutamate dehydrogenase. *J Bacteriol* **186**: 3399-407.

**Bi, W. & Stambrook, P. J.** (1998) Site-directed mutagenesis by combined chain reaction. *Anal Biochemistry* **256**: 137-140.

**Bierhaus, A., Fleming, T., Stoyanov, S., Leffler, A., Babes, A., Neacsu, C., Sauer, S. K., Eberhardt, M., Schnölzer, M., Lasitschka, F., Neuhuber, W. L., Kichko, T. I., Konrade, I., Elvert, R., Mier, W., Pirags, V., Lukic, I. K., Morcos, M., Dehmer, T., Rabbani, N., Thornalley, P. J., Edelstein, D., Nau, C., Forbes, J., Humpert, P. M., Schwaninger, M., Ziegler, D., Stern, D. M., Cooper, M. E., Haberkorn, U., Brownlee, M., Reeh, P. W. & Nawroth, P. P.** (2012) Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nat Med* **18**: 926-33.

**Blencke, H. M., Reif, I., Commichau, F. M., Detsch, C., Wacker, I., Ludwig, H. & Stülke, J.** (2006) Regulation of *citB* expression in *Bacillus subtilis*: integration of multiple metabolic signals in the citrate pool and by the general nitrogen regulatory system. *Arch Microbiol* **185**: 136-146.



- Blencke, H. M., Homuth, G., Ludwig, H., Mäder, U., Hecker, M. & Stülke, J.** (2003) Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab Eng* **5**: 133-149.
- Böck, A. & Neidhardt, F. C.** (1966) Properties of a mutant of *Escherichia coli* with a temperature-sensitive fructose-1,6-diphosphate aldolase. *J Bacteriol* **92**: 470-6.
- Bohannon, D. E. & Sonenshein, A. L.** (1989) Positive regulation of glutamate biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **171**: 4718-4727.
- Boylan, S. A., Redfield, A. R., Brody, M. S. & Price, C. W.** (1993) Stress-induced activation of the sigma B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **175**: 7931-7.
- 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.
- Brox, S. J., Napper, S., Wong, G., Mirza, A., Georges, F., Delbaere, L. T. & Waygood, E. B.** (1999) Identification of the *Escherichia coli* enzyme I binding site in histidine-containing protein, HPr, by the effects of mutagenesis. *Biochem Cell Biol* **77**: 07-513.
- Brownlee, M.** (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* **46**: 223-234.
- Brownlee, M.** (1995) The pathological implications of protein glycation. *Clin Invest Med* **18**: 275-281.
- Brownlee, M.** (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**: 813-820.
- Butcher, L. A. & Tomkins, J. K.** (1985) A comparison of silver staining methods for detecting proteins in ultrathin polyacrylamide gels on support film after isoelectric focusing. *Anal Biochem* **148**: 384-8.
- Celis, R. T.** (1999) Repression and activation of arginine transport genes in *Escherichia coli* K 12 by the ArgP protein. *J Mol Biol* **294**: 1087-1095.
- Christen, B., Abeliuk, E., Collier, J. M., Kalogeraki, V. S., Passarelli, B., Collier, J. A., Fero, M. J., McAdams, H. H. & Shapiro, L.** (2011) The essential genome of a bacterium. *Mol Syst Biol* **7**: 528.
- Claus, D. & Berkeley, R. C. W.** (1986) Bergeys manual of systematic bacteriology. *Bergeys Manual of systematic Bacteriology*.
- Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L. W., Daniel, R. A., Errington, J. & Edwards, D. H.** (2008) Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **68**: 1029-1046.

- Commichau, F. M.** (2006) Regulation der Glutamatsynthese in *Bacillus subtilis* durch die Glutamatdehydrogenase RocG und das Aktivatorprotein GltC. Doktorarbeit. Georg-August-University of Göttingen.
- Commichau, F. M., Gunka, K., Landmann, J. J. & Stülke, J.** (2008) Glutamate metabolism in *Bacillus subtilis*: gene expression and enzyme activities evolved to avoid futile cycles and to allow rapid responses to perturbations of the system. *J Bacteriol* **190**: 3557-3564.
- Commichau, F. M., Herzberg, C., Tripal, P., Valerius, O. & Stülke, J.** (2007) A regulatory protein-protein interaction governs glutamate biosynthesis in *Bacillus subtilis*: the glutamate dehydrogenase RocG moonlights in controlling the transcription factor GltC. *Mol Microbiol* **65**: 642-54.
- Commichau, F. M., Pietack, N. & Stülke, J.** (2013) Essential genes in *Bacillus subtilis*: a re-evaluation after ten years. *Mol Biosyst* **9**: 1068.
- Commichau, F. M., Wacker, I., Schleider, J., Blencke, H. M., Reif, I., Tripal, P. & Stülke, J.** (2007) Characterization of *Bacillus subtilis* mutants with carbon source-independent glutamate biosynthesis. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**: 106-13.
- Chandrangsu, P., Dusi, R., Hamilton, C.J. & Helmann J.D.** (2014) Methylglyoxal resistance in *Bacillus subtilis*: contributions of bacillithiol-dependent and independent pathways. *Mol Microbiol* **91**: 706-15.
- Cooper, R. A.** (1984) Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. *Annu Rev Microbiol* **38**: 49-68.
- Craig, J. E., Ford, M. J., Blaydon, D. C. & Sonenshein, A. L.** (1997) A null mutation in the *Bacillus subtilis* aconitase gene causes a block in Spo0A-phosphate-dependent gene expression. *J Bacteriol* **179**: 7351–7359.
- Cruz Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P. & Jahn, D.** (2000) Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J Bacteriol* **182**: 3072-3080.
- de Berardinis, V., Vallenet, D., Castelli, V., Besnard, M., Pinet, A., Cruaud, C., Samair, S., Lechaplais, C., Gyapay, G., Richez, C., Durot, M., Kreimeyer, A., Le Fèvre, F., Schächter, V., Pezo, V., Döring, V., Scarpelli, C., Médigue, C., Cohen, G. N., Marlière, P., Salanoubat, M. & Weissenbach, J.** (2008) A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol Syst Biol* **4**: 174.

- Deutscher, J., Aké, F. M., Derkaoui, M., Zébré, A. C., Cao, T. N., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E. & Joyet, P.** (2014) The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**: 231-56.
- Deutscher, J., Galinier, A. & Martin-Verstraete, I.** (2002) Carbohydrate uptake and metabolism. In *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*. Sonenshein, A.L. (ed). Washington, DC: ASM Press 129-150.
- Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P. W.** (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939-1031.
- Deutscher, J. & Engelmann, R.** (1984) Purification and characterization of an ATP-dependent protein kinase from *Streptococcus faecalis*. *FEMS Microbiology Letters* **23**: 157-162.
- Deutscher, J.** (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **11**: 87-93.
- Diesterhaft, M. & Freese, E.** (1972) Pyruvate kinase of *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* **268**: 373-80.
- Diethmaier, C.** (2008) CsrA-abhängige Regulation in *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Georg-August-University of Göttingen.
- Diethmaier, C.** (2011) Die Rolle von YmdB als Regulator der Zelldifferenzierung in *Bacillus subtilis*. Doktorarbeit. Georg-August-University of Göttingen.
- Doan, T. & Aymerich, S.** (2003) Regulation of the central glycolytic genes in *Bacillus subtilis*: binding of the repressor CggR to its single DNA target sequence is modulated by fructose-1,6-bisphosphate. *Mol Microbiol* **47**: 1709-1721.
- Eisenreich, W., Slaghuis, J., Laupitz, R., Bussemer, J., Stritzker, J., Schwarz, C., Schwarz, R., Dandekar, T., Goebe, I. W. & Bacher, A.** (2006) <sup>13</sup>C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2040-5.
- Fahey, R. C.** (2013) Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1830**: 3182-98.
- Farsi, Z., Pein, H., Pazhang, M., Zareian, S., Ranaei-Siadat, S. O. & Khajeh, K.** (2012) Conferral of allostery to *Thermus* sp. GH5 methylglyoxal synthase by a single mutation. *J Biochem* **152**: 531-8.

- Favier, A., Brutscher, B., Blackledge, M., Galinier, A., Deutscher, J., Penin, F., & Marion, D.** (2002) Solution structure and dynamics of Crh, the *Bacillus subtilis* catabolite repression HPr. *J Mol Biol* **317**: 131-144.
- Ferguson, G. P., Töttemeyer, S., MacLean, M. J., & Booth, I. R.** (1998) Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? *Arch Microbiol* **170**: 209-219.
- French, C. T., Lao, P., Loraine, A. E., Matthews, B. T., Yu, H., & Dybvig, K.** (2008) Large-scale transposon mutagenesis of *Mycoplasma pulmonis*. *Mol Microbiol* **69**: 67-76.
- Fisher, S.H.** (1999) Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! *Mol Microbiol* **32**: 223-232.
- Fillinger, S., Boschi-Müller, S., Azza, S., Dervyn, E., Branlant, G., & Aymerich, S.** (2000) Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium. *J Biol Chem* **275**: 14031-14037.
- Gaballa, A., Newton, G. L., Antelmann, H., Parsonage, D., Upton, H., Rawat, M., Claiborne, A., Fahey, R. C., & Helmann, J. D.** (2010) Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in *Bacilli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 6482-6486.
- Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M. C., Jaquinod, M., Stülke, J., Deutscher, J. & Martin-Verstraete, I.** (1997) The *Bacillus subtilis* *crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8439-8444.
- Galinier, A., Kravanja, M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kilhoffer, M. C., Deutscher, J. & Haiech, J.** (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1823-1828.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., García-del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, JM., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Pérez-Díaz, J. C., Purcell, R., Remmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J. A., Voss, H., Wehland, J. & Cossart P.** (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-52
- Goodey, N. M. & Benkovic, S. J.** (2008) Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nat Chem Biol* **4**: 474-82
- Görke, B., Fraysse, L. & Galinier, A.** (2004) Drastic differences in Crh and HPr synthesis levels reflect their different impacts on catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**: 2992-2995.

**Görke, B., & Stülke, J.** (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**: 613-624.

**Guérout-Fleury, A. M., Shazand, K., Frandsen, N., & Stragier P.** (1995) Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**: 335-6.

**Gunka, K. & Commichau, F. M.** (2012) Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation. *Mol Microbiol* **85**: 213-24.

**Gunka, K.** (2010) Der Einfluss der Glutamatdehydrogenasen auf die Verknüpfung des Kohlenstoff- und Stickstoffwechsels in *Bacillus subtilis*. Doktorarbeit. Georg-August-University of Göttingen.

**Hamoen, L. W., Venema, G. & Kuipers, O. P.** (2003) Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology* **149**: 9–17.

**Hecker, M., Pané-Farré, J. & U. Völker.** (2007) SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**: 215-236.

**Helmann, J. D.** (2011) Bacillithiol, a new player in bacterial redox homeostasis. *Antioxid Redox Signal* **15**: 123-33.

**Helmann, J. D., Wu, MF., Kobel, P. A., Gamo, F. J., Wilson, M., Morshedi, M. M., Navre, M. & Paddon, C.** (2001) Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J Bacteriol* **183**: 7318-28.

**Henkin, T. M., Grundy, F. J., Nicholson, W. L. & Chambliss, G. H.** (1991) Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacl* and *galR* repressors. *Mol Microbiol* **5**: 575-584.

**Hernández-Lucas, I., Gallego-Hernández, A. L., Encarnación, S., Fernández-Mora, M., Martínez-Batallar, A. G., Salgado, H., Oropeza, R. & Calva, E.** (2008) The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* **190**: 1658–1670.

**Heroven, A. K. & Dersch, P.** (2006) RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **62**: 1469–1483.

**Hopper, D. J. & Cooper, R. A.** (1971) The regulation of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase; a new control site in glycolysis? *FEBS Lett* **13**: 213-216.

**Hopper, D. J. & Cooper, R. A.** (1972) The purification and properties of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase. *Biochem J* **128**: 321-329.

- Hübner, S.** (2008) Untersuchung der Spezifität von Antiterminationsproteine in *Bacillus subtilis*. Doktorarbeit. Georg-August-University of Göttingen.
- Irani, M. H. & Maitra, P. K.** (1977) Properties of *Escherichia coli* mutants deficient in enzymes of glycolysis. *J Bacteriol* **132**: 398-410.
- Jault, J. M., Fiulaine, S., Nessler, S., Gonzalo, P., Di Pietro, A., Deutscher, J. & Galinier, A.** (2000) The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J Biol Chem* **275**: 1773-1780.
- Jewett, M. C. & Forster, A. C.** (2010) Update on designing and building minimal cells. *Curr opin Biotechnol* **21**: 697-703.
- Jin, S. & Sonenshein, A. L.** (1994) Identification of two distinct *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J Bacteriol* **176**: 4669–4679.
- Jin, S. & Sonenshein, A. L.** (1994) Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J Bacteriol* **176**: 4680-90.
- Jin, S. & Sonenshein, A. L.** (1996) Characterization of the major citrate synthase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**: 3658-60.
- Jitrapakdee, S., St Maurice, M., Rayment, I., Cleland, W. W., Wallace, J. C. & Attwood, P. V.** (2008) Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* **413**: 369–387.
- Joseph, P., Fantino, J. R., Herbaud, M. L. & Denizot, F.** (2001) Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 91-7.
- Jourlin-Castelli, C., Mani, N., Nakano, M. M. & Sonenshein, A. L.** (2000) CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the citB gene in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol.* **295**: 865-878.
- Juhas, M., Eberl, L. & Glass, J. I.** (2011) Essence of life: essential genes of minimal genomes. *Trends Cell Biol* **21**: 562–568.
- Jung, J. Y., Choi, E. S. & Oh, M. K.** (2008) Enhanced production of 1,2-propanediol by *tpi1* deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* **18**: 1797-1802.
- Kadner, R. J., Murphy, G. P. & Stephens, C. M.** (1992) Two mechanisms for growth inhibition by elevated transport of sugar phosphates in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **138**: 2007-2014.

**Kalapos, M. P.** (2008) Methylglyoxal and glucose metabolism: a historical perspective and future avenues for research. *Drug Metabol Drug Interact* **23**: 69-91.

**Karimova, G., Dautin, N. & Ladant, D.** (2005) Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* **187**: 2233-43.

**Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D.** (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5752-5756.

**Kato, J. & Hashimoto, M.** (2008) Construction of long chromosomal deletion mutants of *Escherichia coli* and minimization of the genome. *Methods Mol Biol* **416**: 279-93.

**Kim, I., Kim, E., Yoo, S., Shin, D., Min, B., Song, J. & Park, C.** (2004) Ribose utilization with an excess of mutarotase causes cell death due to accumulation of methylglyoxal. *J Bacteriol* **186**: 7229-7235.

**Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L. C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S. K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S. J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C. R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M. F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mael, C., Meima, R., Mellado, R. P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H. M., Rapoport, G., Rawlins, J. P., Rivas, L. A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H. H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J. F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H. B., Vagner, V., van Dijl, J. M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U. & Ogasawara, N.** (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4678-4683.

**Ko, J., Kim, I., Yoo, S., Min, B., Kim, K. & Park, C.** (2005) Conversion of methylglyoxal to acetol by *Escherichia coli* aldo-keto reductases. *J Bacteriol* **187**: 5782-5789.

**Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A., *et al.*, (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.**

- Kumpfmüller, J., Kabisch, J. & Schweder, T.** (2014) An optimized technique for rapid genome modifications of *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Methods* **95**: 350-2.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Landmann, J. J.** (2011) Das crh-Operon in *Bacillus subtilis*: Ein neuartiges Gensystem mit einer zentralen Rolle im Kohlenstoffmetabolismus. Doktorarbeit. Georg-August-University of Göttingen.
- Landmann, J. J., Busse, R. A., Latz, J. H., Singh, K. D., Stülke, J. & Görke B.** (2011) Crh, the paralogue of the phosphocarrier protein HPr, controls the methylglyoxal bypass of glycolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **82**: 770-87.
- Landmann, J. J., Werner, S., Hillen, W., Stülke, J. & Görke, B.** (2011) Carbon source control of the phosphorylation state of the *Bacillus subtilis* carbon-flux regulator Crh *in vivo*. *FEMS Microbiol Lett* **237**: 47-53.
- Lederberg, E. M. & Cohen, S. N.** (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **119**: 1072-4.
- Lee, W. & Dasilva, N. A.** (2006) Application of sequential integration for metabolic engineering of 1,2-propanediol production in yeast. *Metab Eng* **8**: 58-65.
- Lehnik-Habrink, M.** (2011) An mRNA degradation complex in *Bacillus subtilis*. Doktorarbeit. Georg-August-University of Göttingen.
- Liu, M., Durfee, T., Cabrera, J. E., Zhao, K., Jin, D. J. & Blattner, F. R.** (2005) Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 15921-15927.
- Lorca, G. L., Chung, Y. J., Barabote, R. D., Weyler, W., Schilling, C. H. & Saier, M. H., Jr.** (2005) Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK. *J Bacteriol* **187**: 7826-7839.
- Losick, R., Youngman, P. & P. J. Piggot.** (1986) Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **20**: 625-669.
- Ludwig, H., Homuth, G., Schmalisch, M., Dyka, F.M., Hecker, M. & Stülke, J.** (2001) Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the *gapA* operon. *Mol Microbiol* **41**: 409-422.
- Lüttmann, D., Heermann, R., Zimmer, B., Hillmann, A., Rampp, I. S., Jung, K. & 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**: 978-94.



- MacLean, M. J., Ness, L. S., Ferguson, G. P. & Booth, I. R.** (1998) The role of glyoxalase I in the detoxification of methylglyoxal and in the activation of the KefB K<sup>+</sup> efflux system in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **27**: 563-71.
- Marks, G. T., Harris, T. K., Massiah, M. A., Mildvan, A. S. & Harrison, D. H. T.** (2001) Mechanistic implications of methylglyoxal synthase complexed with phosphoglycolohydroxamic acid as observed by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Biochemistry* **40**: 6805-6818
- Marks, G. T., Susler, M. & Harrison, D. H. T.** (2004) Mutagenic studies on histidine 98 of methylglyoxal synthase: effects on mechanism and conformational change. *Biochemistry* **43**: 3802-3813
- Marschke, C. K. & Bernlohr, R. W.** (1973) Purification and characterization of phosphofructokinase of *Bacillus licheniformis*. *Arch Biochem Biophys* **156**: 1-16.
- Martin-Verstraete, I., Débarbouillé, M., Klier, A. & Rapoport, G.** (1990) Levanase operon of *Bacillus subtilis* includes a fructose-specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon. *J Mol Biol* **214**: 657-71.
- Matsuno, K., Blais, T., Serio, A. W., Conway, T., Henkin, T. M. & Sonenshein A. L.** (1999) Metabolic imbalance and sporulation in an isocitrate dehydrogenase mutant of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 3382–3391.
- Meadow, N. D., Fox, D. K. & Roseman, S.** (1990) The bacterial phosphoenolpyruvate: glycose phosphotransferase system. *Annu Rev Biochem* **59**: 497-542.
- Mehne, F. M.** (2013) Bildung und Homöostase von c-di-AMP in *Bacillus subtilis*. Doktorarbeit. Georg-August-University of Göttingen.
- Mehne F. M., Schröder-Tittmann, K., Eijlander, R. T., Herzberg, C., Hewitt, L., Kaefer, V., Lewis, R. J., Kuipers, O. P., Tittmann, K. & Stülke, J.** (2014) Control of the diadenylate cyclase CdaS in *Bacillus subtilis*: an autoinhibitory domain limits cyclic di-AMP production. *J Biol Chem* **289**: 21098-107.
- Meinken, C., Blencke, H. M., Ludwig, H. & Stülke, J.** (2003) Expression of the glycolytic *gapA* operon in *Bacillus subtilis*: differential syntheses of proteins encoded by the operon. *Microbiology* **149**: 751-761.
- Merzbacher, M., Detsch, C., Hillen, W. & Stülke, J.** (2004) *Mycoplasma pneumoniae* HPr kinase/phosphorylase. *Eur J Biochem* **271**: 367-74.
- Meyer, F.** (2009) Protein-Protein-Interaktionen im Citratzyklus von *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Georg-August-University of Göttingen.

- Michna, R. H., Commichau, F. M., Tödter, D., Zschiedrich, C. P. & Stülke, J.** (2014) SubtiWiki- a database for the model organism *Bacillus subtilis* that links pathway, interaction and expression information. *Nucleic Acids Res* **42**: D692-8.
- Miller, J.** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.
- Miwa, Y., Nakata, A., Ogiwara, A., Yamamoto, M. & Fujita, Y.** (2000) Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **28**: 1206-1210.
- Monder, C.** (1967) Alpha-keto aldehyde dehydrogenase, an enzyme that catalyzes the enzymic oxidation of methylglyoxal to pyruvate. *J Biol Chem* **242**: 4603-9.
- Moreno, M. S., Schneider, B. L., Maile, R. R., Weyler, W. & Saier, M. H., Jr.** (2001) Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol Microbiol* **39**: 1366-1381.
- Moya, A., Gil, R., Latorre, A., Peretó, J., Pilar Garcillán-Barcia, M. & de la Cruz, F.** (2009) Toward minimal bacterial cells: evolution vs. design. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 225-35.
- Murata, K., Fukuda, Y., Simosaka, M., Watanabe, K., Saikusa, T. & Kimura, A.** (1985) Metabolism of 2-oxoaldehyde in yeasts. Purification and characterization of NADPH-dependent methylglyoxal-reducing enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **151**: 631-636.
- Nakano, M. M. & Zuber, P.** (1998) Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu Rev Microbiol* **52**: 165-190.
- Nesterenko, M.V., Tilley, M. & Upton, S. J.** (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28**: 239-242.
- Newton, G. L., Rawat, M., La Clair, J. J., Jothivasan, V. K., Budiarto, T., Hamilton, C. J., Claiborne, A., Helmann, J. D. & Fahey R. C.** (2009) Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nat Chem Biol* **5**: 625-7
- Nguyen, T. T., Eiamphungporn, W., Mäder, U., Liebeke, M., Lalk, M., Hecker, M., Helmann, J. D. & Antelmann, H.** (2009) Genome-wide responses to carbonyl electrophiles in *Bacillus subtilis*: control of the thiol-dependent formaldehyde dehydrogenase AdhA and cysteine proteinase YraA by the MerR-family regulator YraB (AdhR). *Mol Microbiol* **71**: 876-894.

- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., Denham, E. L., Fogg, M. J., Fromion, V., Goelzer, A., Hansen, A., Härtig, E., Harwood, C. R., Homuth, G., Jarmer, H., Jules, M., Klipp, E., Le Chat, L., Lecointe, F., Lewis, P., Liebermeister, W., March, A., Mars, R. A., Nannapaneni, P., Noone, D., Pohl, S., Rinn, B., Rügheimer, F., Sappa, P. K., Samson, F., Schaffer, M., Schwikowski, B., Steil, L., Stülke, J., Wiegert, T., Devine, K. M., Wilkinson, A. J., van Dijl, J.M., Hecker, M., Völker, U., Bessières, P. & Noirot, P. (2012) Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* **335**: 1103-6.
- Nicholson, W. L., Park, Y. K., Henkin, T. M., Won, M., Weickert, M. J., Gaskell, J. A. & Chambliss, G. H. (1987) Catabolite repression-resistant mutations of the *Bacillus subtilis* alpha-amylase promoter affect transcription levels and are in an operator-like sequence. *J Mol Biol* **198**: 609-618.
- Niepmann, M. & Zheng, J. (2006) Discontinuous native protein gel electrophoresis. *Electrophoresis* **27**: 3949-51.
- Pérez-Rueda, E. & Collado-Vides, J. (2001) Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in archaea and bacteria. *J Mol Evol* **53**: 172–179.
- Saadat, D. & Harrison, D.H. (1999) The crystal structure of methylglyoxal synthase from *Escherichia coli*. *Structure* **7**: 309-317.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Bailey, J. E., Hochuli, M., Szyperski, T. & Wüthrich, K. (1997) Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nat Biotechnol* **15**: 448-452.
- Schär, J., Stoll, R., Schauer, K., Loeffler, D. I., Eylert, E., Joseph, B., Eisenreich, W., Fuchs, TM. & Goebel, W. (2010) Pyruvate carboxylase plays a crucial role in carbon metabolism of extra- and intracellularly replicating *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **192**: 1774-84.
- Schallmeyer, M., Singh, A. & Ward, OP. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* **50**: 1-17.
- Schell, M. A. (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**: 597–626.

- Schumacher, M. A., Allen, G. S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W. & Brennan, R. G.** (2004) Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* **118**: 731-741.
- Schumacher, M. A., Seidel, G., Hillen, W. & Brennan, R. G.** (2006) Phosphoprotein Crh-Ser46-P displays altered binding to CcpA to effect carbon catabolite regulation. *J Biol Chem* **281**: 6793-6800.
- Schumacher, M. A., Seidel, G., Hillen, W. & Brennan, R. G.** (2007) Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate. *J Mol Biol* **368**: 1042-1050.
- Seidel, G., Diel, M., Fuchsbauer, N. & Hillen, W.** (2005) Quantitative interdependence of coeffectors, CcpA and *cre* in carbon catabolite regulation of *Bacillus subtilis*. *Febs J* **272**: 2566-2577.
- Sharma, S. V., Arbach, M., Roberts, A. A., Macdonald, C. J., Groom, M. & Hamilton C. J.** (2013) Biophysical features of bacillithiol, the glutathione surrogate of *Bacillus subtilis* and other firmicutes. *Chembiochem* **14**: 2160-8.
- Singh, K. D.** (2008) The role of protein phosphorylation in regulation of carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*. Doktorarbeit. Georg-August-University of Göttingen.
- Singh, K. D., Schmalisch, M. H., Stülke, J. & Görke, B.** (2008) Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources. *J Bacteriol* **190**: 7275-7284.
- Sonenshein, A. L.** (2002) *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells (the krebs citric acid cycle). *ASM press*: 151-162.
- Srere, P. A.** (1972) The citrate enzymes: their structures, mechanisms, and biological functions. *Curr Top Cell Regul* **5**: 229-83.
- Srere, P. A., Böttger, B. & Brooks, G. C.** (1972) Citrate lyase: a pantothenate-containing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**: 1201-2.
- Stec, E., Witkowska-Zimny, M., Hryniewicz, M. M., Neumann, P., Wilkinson, A. J., Brzozowski, A. M., Verma, C. S., Zaim, J., Wysocki, S. & Bujacz, G. D.** (2006) Structural basis of the sulphate starvation response in *E. coli*: crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator. *J Mol Biol* **364**: 309-322.
- Stülke, J. & Hillen, W.** (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* **54**: 849-880.

- Sun, J. & Klein, A.** (2004) A LysR-type regulator is involved in the negative regulation of genes encoding selenium-free hydrogenases in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol Microbiol* **52**: 563–571.
- Tan, A. L., Forbes, J. M. & Cooper, M. E.** (2007) AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* **27**: 130-143.
- Thornalley, P. J.** (1996) Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol* **27**: 565-573.
- Thornalley, P. J.** (2008) Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact* **23**: 125-150.
- Töttemeyer, S., Booth, N. A., Nichols, W. W., Dunbar, B. & Booth, I. R.** (1998) From famine to feast: the role of methylglyoxal production in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **27**: 553-562.
- Pazhang, M., Khajeh, K., Asghari, S. M., Falahati, H. & Naderi-Manesh, H.** (2010) Cloning, expression, and characterization of a novel methylglyoxal synthase from *Thermus* sp. strain GH5. *Appl Biochem Biotechnol* **162**: 1519-28.
- Pechter, K. B., Meyer, F. M., Serio, A. W., Stülke, J. & Sonenshein, A. L.** (2013) Two roles for aconitase in the regulation of tricarboxylic acid branch gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **195**: 1525-37.
- Picossi, S., Belitsky, B. R. & Sonenshein, A. L.** (2007) Molecular mechanism of the regulation of *Bacillus subtilis* gltAB expression by GltC. *J Mol Biol* **365**: 1298–1313.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R.** (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543-594.
- Utter, MF. & Keech, DB.** (1963) Pyruvate carboxylase. I. nature of the reaction. *J Biol Chem* **238**: 2603-8.
- van Keulen, G., Ridder, A. N., Dijkhuizen, L. & Meijer, W. G.** (2003) Analysis of DNA binding and transcriptional activation by the LysR-type transcriptional regulator CbbR of *Xanthobacter flavus*. *J Bacteriol* **185**: 1245–1252.
- Weber, J., Kayser, A. & Rinas, U.** (2005) Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. II. Dynamic response to famine and feast, activation of the methylglyoxal pathway and oscillatory behaviour. *Microbiology* **151**: 707-716.
- Wells, C. F.** (1966) The spectra of 2,4-dinitrophenylhydrazone anions and the determination of carbonyl compounds in dilute aqueous solution. *Tetrahedron* **22**: 2685-2693.

**Woodcock, D. M., P.J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael & M. W. Graham** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478.

**Yoshida, K., Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C. M., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M., Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T. & Fujita, Y.** (2001) Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **29**: 683-692.

**Yu, B. J., Sung, B. H., Koob, M. D., Lee, C. H., Lee, J. H., Lee, W. S., Kim, M. S. & Kim, S. C.** (2002) Minimization of the *Escherichia coli* genome using a Tn5-targeted Cre/loxP excision system. *Nat Biotechnol* **20**: 1018-23.

**Zareian, S., Khajeh, K., Pazhang, M. & Ranjbar, B.** (2012) Rationalization of allosteric pathway in *Thermus* sp. GH5 methylglyoxal synthase. *BMB Rep* **45**: 748-53.

## 7. Anhang

### 7.1. Stämme

In den Tabellen 7.1. und 7.2. sind die in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Bakterienstämme aufgelistet.

Tabelle 7.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz bzw. Herkunft
<u><i>B. subtilis</i></u>		
168	<i>trpC2</i>	Laborsammlung
GP676	<i>trpC2 citA::ermC amyE::(gltA-lacZ cat)</i>	F.Commichau, Promo
GP684	<i>trpC2 odhA::cat amyE::(gltA'-lacZ aphA3)</i>	F.Commichau, Promo
GP718	<i>trpC2 ΔcitG::spec amyE::(gltA-lacZ aphA3)</i>	F.Commichau, Promo
GP810	<i>trpC2 ΔrocG::tet<sup>R</sup></i>	Katrin Gunka, Promo
GP1153	<i>trpC2 ΔansAB::erm<sup>R</sup></i>	Katrin Gunka, Promo
GP1160	<i>trpC2 ΔgudB::aphA3</i>	Katrin Gunka, Promo
JK27	<i>trpC2 sacA::(phl-P<sub>xyIA</sub>-cre)</i>	Kumpfmüller <i>et al.</i> , 2013
<u><i>E. coli</i></u>		
BL 21 (DE3)	B(834)-derivate <i>F lon ompT hsdS(r<sub>BMB</sub>) gal dcm[DE3]</i>	Novagen
BTH101	<i>F cyaA-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1 (Str<sup>r</sup>) hsdR2 mcrA1 mcrB1</i>	Karimova & Ladant, 2005
XL1-Blue (=R2262)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
XL10gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet<sup>R</sup> F'[proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>R</sup> Amy Tn5(Kan<sup>R</sup>)]</i>	Stratagene

Tabelle 7.2: In dieser Arbeit konstruierte Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz bzw. Herkunft
GP790	<i>trpC2 ΔcitZ-mdh::aphA3</i>	LFH-PCR → 168
GP791	<i>trpC2 ΔsucCD::tet</i>	LFH-PCR → 168
GP792	<i>trpC2 ΔsdhCAB::phleo</i>	LFH-PCR → 168
GP793	<i>trpC2 ΔpycA::cat</i>	LFH-PCR → 168
GP794	<i>trpC2 ΔcitZ-mdh::aphA3 ΔsucCD::tet</i>	GP791 → GP790
GP795	<i>trpC2 ΔcitZ-mdh::aphA3 ΔsucCD::tet ΔsdhCAB::phleo</i>	GP792 → GP794
GP796	<i>trpC2 ΔcitZ-mdh::aphA3 ΔsucCD::tet ΔsdhCAB::phleo ΔcitG::spec</i>	GP718 → GP795
GP797	<i>trpC2 ΔcitZ::spec</i>	LFH-PCR → 168
GP798	<i>trpC2 ΔrocG::tet ΔgudB::aphA3 ΔansAB::erm</i>	GP1153 → GP799
GP799	<i>trpC2 ΔrocG::tet ΔgudB::aphA3</i>	GP810 → GP1160
GP800	<i>trpC2 ΔrocG::tet ΔgudB::aphA3 ΔansAB::erm ΔcitZ::spec</i>	GP797 → GP798
GP1274	<i>trpC2 ΔodhA::cat</i>	LFH-PCR → 168
GP1275	<i>trpC2 ΔcitB::erm</i>	LFH-PCR → 168
GP1276	<i>trpC2 ΔodhAB::cat</i>	LFH-PCR → 168
GP1277	<i>trpC2 ΔcitZ-mdh::aphA3 ΔsucCD::tet ΔsdhCAB::phleo ΔcitG::spec ΔodhAB::cat</i>	GP1276 → GP796
GP1278	<i>trpC2 ΔcitZ-mdh::aphA3 ΔsucCD::tet ΔsdhCAB::phleo ΔcitG::spec ΔodhAB::cat ΔcitB::erm</i>	GP1276 + GP1275 → GP796
GP1279	<i>trpC2 ΔrocG::tet ΔgudB::aphA3 ΔansAB::erm ΔcitZ::spec ΔpycA::cat</i>	GP793 → GP800
GP1280	<i>trpC2 citA::ermC amyE::(gltA-lacZ cat) ΔcitZ::spec</i>	GP797 → GP676
GP1281	<i>trpC2 ΔcitZ::erm</i>	LFH-PCR → 168
GP1282	<i>trpC2 ΔcitA::cat</i>	LFH-PCR → 168
GP1283	<i>trpC2 ΔcitR::aphA3</i>	LFH-PCR → 168
GP1284	<i>trpC2 ΔcitZ::erm ΔcitA::cat</i>	GP1282 → GP1281
GP1285	<i>trpC2 ΔcitZ::erm ΔcitR::aphA3</i>	GP1283 → GP1281
GP1286	<i>trpC2 ΔcitA::cat ΔcitR::aphA3</i>	GP1283 → GP1282
GP1287	<i>trpC2 citA-3xFLAG spec</i>	pGP2517 → 168
GP1288	<i>trpC2 citA-3xFLAG spec ΔcitZ::erm</i>	GP1281 → GP1287



GP1289	<i>trpC2 citA-3xFLAG spec ΔcitR::aphA3</i>	GP1283 → GP1287
GP1290	<i>trpC2 citA-3xFLAG spec ΔcitZ::erm ΔcitR::aphA3</i>	GP1283 → GP1288
GP1751	<i>trpC2 dnaE-pgi-aphA3-ytrl</i>	LFH-PCR → 168
GP1752	<i>trpC2 dnaE-pgi-fbaA-cat-ytrl</i>	LFH-PCR → 1751
GP1753	<i>trpC2 ΔcitRA::aphA3-lox</i>	LFH-PCR → 168
GP1754	<i>trpC2 ΔcitRA::aphA3-lox sacA::(phl-P<sub>xyIA</sub>-cre)</i>	JK27 → GP1753
GP1755	<i>trpC2 ΔcitRA sacA::(phl-P<sub>xyIA</sub>-cre)</i>	GP1754 + 1% Xylose
GP1756	<i>trpC2 ΔcitRA sacA::(phl-P<sub>xyIA</sub>-cre) ΔsdhCAB::aphA3-lox</i>	LFH-PCR → GP1755
GP1757	<i>trpC2 dnaE-pgi-fbaA-ptsGHI-aphA3-ackA Δytrl-moaB::aphA3</i>	LFH-PCR → GP1752
GP1758	<i>trpC2 ΔcitRA ΔsdhCAB sacA::(phl-P<sub>xyIA</sub>-cre)</i>	GP1756 + 1% Xylose
GP1759	<i>trpC2 dnaE-pgi-fbaA-cat-ytrl Δpgi::spec</i>	GP508 → GP1752
GP1760	<i>trpC2 dnaE-pgi-fbaA-cat-ytrl ΔfbaA::erm</i>	GP596 → GP1752
GP1761	<i>trpC2 dnaE-pgi-fbaA-cat-ytrl ΔfbaA::erm Δpgi::spec</i>	GP1760 → GP1759
GP1762	<i>trpC2 dnaE-pgi-fbaA-CZ203/CZ204-aphA3- ackA Δytrl-moaB::aphA3</i>	LFH-PCR → GP1752
GP1763 (PGR2)	<i>PG1 dnaE-pgi-fbaA-CZ203/CZ204-aphA3-ackA Δytrl-moaB::aphA3</i>	GP1762 → PG1
GP1764 (PGR3)	<i>PG1 dnaE-pgi-fbaA-ptsGHI-aphA3-ackA Δytrl-moaB::aphA3</i>	GP1757 → PG1

## 7.2. Oligonukleotide

In den Tabellen 7.3. und 7.4. sind die in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Oligonukleotide aufgelistet.

Tabelle 7.3: In dieser Arbeit konstruierte Oligonukleotide.

Die eingefügten Schnittstellen sind unterstrichen.

Basen, die zur Erhaltung des Leserasters eingefügt worden sind, sind **gelb** hinterlegt.

Stopkodons, die eingefügt worden sind, sind **blau** hinterlegt.

Eingefügt Mutationen sind **rot** hinterlegt.

Die Flanken für Genfusionen sind **grün** hinterlegt.

Name	Sequenz (5' → 3')	Gen / Zweck
CZ14	5 'GCC <u>CTAGAG</u> G <b>GT</b> GACGTA <b>CTT</b> GCAAAGAG (56°C)	forward Primer, Klonierung von <i>yvcl</i> über <i>XbaI</i>
CZ15	5 'CGTC <u>CGGTACCCG</u> TTTGATGTGCTGCGGGTC (56°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>yvcl</i> über <i>KpnI</i>
CZ16	5 'CGTC <u>CGGTACCC</u> <b>CTA</b> TTTGATGTGCTGCGGG (58°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>yvcl</i> über <i>KpnI</i>
CZ17	5 'GCC <u>CTAGAG</u> G <b>GT</b> GATAAAAATGAGTGACTTTC (58°C)	forward Primer, Klonierung von <i>yvcN</i> über <i>XbaI</i>
CZ18	5 'CGTC <u>CGGTACCCG</u> CAAAAAATGAGTATTTAATT TCTC (58°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>yvcN</i> über <i>KpnI</i>
CZ19	5 'CGTC <u>CGGTACCC</u> <b>TTA</b> CAAAAAATGAGTATTTAA TTTC (58°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>yvcN</i> über <i>KpnI</i>
CZ20	5 'GCC <u>CTAGAG</u> G <b>GT</b> GACTAAAGTAAACATTGTT ATTATC (68°C)	forward Primer, Klonierung von <i>degU</i> über <i>XbaI</i>
CZ21	5 'CGTC <u>CGGTACCCG</u> TCTCATTCTACCCAGCCAT TTTTA (68°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>degU</i> über <i>KpnI</i>
CZ22	5 'CGTC <u>CGGTACCC</u> <b>CTA</b> TCTCATTCTACCCAGCCATT (68°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>degU</i> über <i>KpnI</i>
CZ23	5 'GCC <u>CTAGAG</u> G <b>AT</b> GGCTGCTTCAACATTAACG (60°C)	forward Primer, Klonierung von <i>sufC</i> über <i>XbaI</i>
CZ24	5 'CGTC <u>CGGTACCCG</u> CGCTTCTTGCCAACAGTTTC (64°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>sufC</i> über <i>KpnI</i>
CZ25	5 'CGTC <u>CGGTACCC</u> <b>TTA</b> CGCTTCTTGCCAACAG (60°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>sufC</i> über <i>KpnI</i>

CZ26	5 'GCCTCTAGAGATGGCAAACGAATTGACCATAC (64°C)	forward Primer, Klonierung von <i>ywbC</i> über <i>XbaI</i>
CZ27	5 'CGTCGGTACCGCCGCTGAAAGAACTCAAT CCAC (66°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>ywbC</i> über <i>KpnI</i>
CZ28	5 'CGTCGGTACCTTACCGCTGAAAGAACT CAATCC (66°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>ywbC</i> über <i>KpnI</i>
CZ29	5 'CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGCCAAA TTGAACT GTTCCATTAC (60°C)	reverse upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion des <i>hprK</i> -Operons
CZ30	5 'CCGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGCATC TATACGAAGGAAGAAATG (60°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion des <i>hprK</i> -Operons
CZ31	5 'CAGAAAACCGATAGAACAAGC (62°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion des <i>hprK</i> -operons
CZ32	5' GCGGATCCGGCGCAAGTGTAACAATTTG (60°C)	forward Primer, Klonierung des <i>hprK</i> -Operons über <i>BamHI</i>
CZ33	5' GCGAGCTCTTATTCAGCGGACTTTTTCAATC (62°C)	reverse Primer, Klonierung des <i>hprK</i> -Operons über <i>SacI</i>
CZ34	5 'GTTACTCACCGGGACATTG (58°C)	forward upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>yvcl</i>
CZ35	5 'CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGCCACTTCCAG ATTCGTTAATTC (58°C)	reverse upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>yvcl</i>
CZ36	5 'CCGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGGCTGCG GACAGGGCAAAC (60°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>yvcl</i>
CZ37	5 'CTCTTCAAATCCTGAAGGGC (60°C)	reverse downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>yvcl</i>
CZ38	5 'GCCAGCACCGCTCTGTG (58°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>yvcl</i>
CZ39	5 'CGAAAAGGGAAACTGTATATC (60°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>yvcl</i>

CZ40	5´GTATTCTGAAGTTCGTTCAAC (56°C)	forward Sequenzierungs- primer <i>dnaK</i>
CZ41	5´TTGCTTTGATCGCGCATGACA (53°C)	forward Primer, Amplifikation von <i>mgsA</i> für RT-Analyse
CZ42	5´GAAAACGTTCAATTTGAAGACCTG (53°C)	reverse Primer, Amplifikation von <i>mgsA</i> für RT-Analyse
CZ43	5´CACTACGCGTACTGTGAGC (60°C)	Sequenzierungsprimer für pAC6; Annealing im <i>lacZ</i> - Gen
CZ44	5´GCGTTAAATATCGCAGAGAGC (53°C)	forward Primer, Amplifikation von <i>rplP</i> für RT-Analyse
CZ45	5´GAGTCATCGCAATACGTGC (53°C)	reverse Primer, Amplifikation von <i>rplP</i> für RT-Analyse
CZ46	5´CTCGTACTCATATGTCATTTGCATCAGAAAC AAAAAAG (64°C)	forward Primer, Klonierung von <i>yvcL</i> über <i>NdeI</i> in pKES170
CZ47	5´GGCTCTAGATTTTAAAGTGACGGTTTGCCTG (66°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>yvcL</i> über <i>XbaI</i> in pKES170
CZ48	5´CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATATCG ACACCAGATGGTAAG (64°C)	reverse Primer, Herstellung von T7 mRNA ( <i>rpsJ</i> )
CZ49	5´CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAGCTT CGCAACGTCTTCAG (64°C)	reverse Primer, Herstellung von T7 mRNA ( <i>rpsE</i> )
CZ50	5´CTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAATTT CTTCACGTTTTACGAAC (66°C)	reverse Primer, Herstellung von T7 mRNA ( <i>rplP</i> )
CZ51	5´-P-TCGACTCTAGAGGTACCTTTTTTCGAACTG CGGGTGGCTCCACATGATTGTTTCCTCCTTA-3´	Hybridisierungsprimer (MCS) reverse zur Konstruktion von pGP2427
CZ52	5´-P-AGCTTGGTACCTCTAGAGTCGACTGGAGCC ACCCGCAGTTCGAAAAATGATAAGCATG-3´	Hybridisierungsprimer (MCS) forward zur Konstruktion von pGP2428
CZ53	5´-P-CTTATCATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCC AGTCGACTCTAGAGGTACCA-3´	Hybridisierungsprimer (MCS) reverse zur Konstruktion von pGP2428

CZ54	5´CGTC <u>GGTACCAT</u> GTTCATTTGCATCAGAAAC (56°C)	forward Primer, Klonierung von <i>yvcL</i> über <i>KpnI</i> in pGP2427
CZ55	5´G <u>CCCTAGATT</u> ATTTTAAAGTGACGGTTTGC (58°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>yvcL</i> über <i>XbaI</i> in pGP2427
CZ56	5´CGTC <u>GGTACCAAGGAGGAAACAAT</u> CATGTTCATTTGCATCAGAAAC (56°C)	forward Primer, Klonierung von <i>yvcL</i> über <i>KpnI</i> in pGP2428
CZ57	5´GCACG <u>CGTCGACT</u> TTTTAAAGTGACGGTTTGCC (56°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>yvcL</i> über <i>Sall</i> in pGP2428
CZ58	5´CATCCAGAACAACCTCTGC (58°C)	Sequenzierungsprimer forward für pDG148 und Derivat
CZ59	5´GCCGACTCAAACATCAAATC (58°C)	Sequenzierungsprimer reverse für pDG148 und Derivat
CZ60	5´CTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAGAA TTTCCGCAGTACCC (60°C)	reverse Primer, Herstellung von T7 mRNA ( <i>mgsA</i> )
CZ61	5´GGGCTGTCATACGAGTTTC (58°C)	forward Primer, Herstellung von T7 mRNA (kleine RNA vor dem <i>yvcI</i> -Operon)
CZ62	5´CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTATTCA TTATAAAAAGGGGG (58°C)	reverse Primer, Herstellung von T7 mRNA (kleine RNA vor dem <i>yvcI</i> -Operon)
CZ63	5´GGACCGCGTGGAAGAATG (58°C)	forward Primer, Herstellung von T7 mRNA ( <i>dapB</i> )
CZ64	5´CTAATACGACTCACTATAGGGAGACGATGA TGGCTCCGATCC (58°C)	reverse Primer, Herstellung von T7 mRNA ( <i>dapB</i> )
CZ65	5´GAATCACATGCTATCCGAGC (60°C)	forward Primer, Herstellung von T7 mRNA ( <i>ypjH</i> )
CZ66	5´CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGCCA TGCAAAGTGGTAAC (60°C)	reverse Primer, Herstellung von T7 mRNA ( <i>ypjH</i> )
CZ67	5´GCG <u>GGATCC</u> ATGGCACAAAAACATTTAAAG (56°C)	forward Primer, Klonierung von <i>ptsH</i> über <i>BamHI</i> in pGP380

CZ68	5' <u>CGATACAAATTCCTCGTAGGGCGCTCGG</u> TTACTT ATTAATAATTTATAGCTATTG (64°C)	reverse Primer Erythromycin ohne Terminator
CZ69	5' <u>GGCGAGCTCGATGAAA</u> CTTGCTTTGATCGCG (64°C)	forward Primer, Klonierung von <i>mgsA</i> über <i>SacI</i> in pGP172; Mutagenese von Ile3Leu
CZ70	5' <u>GGCGAGCTCGATGAAAATT</u> ACTTTGATCGCG (62°C)	forward Primer, Klonierung von <i>mgsA</i> über <i>SacI</i> in pGP172; Mutagenese von Ala4Thr
CZ71	5' <u>GGCGAGCTCGATGAAAATT</u> GCTTTGATCGCG (64°C)	forward Primer, Klonierung von <i>mgsA</i> über <i>SacI</i> in pGP172
CZ72	5' <u>GGCGAATTC</u> CATATTGAAATGAACCAAGCC (58°C)	forward Primer, Klonierung des <i>ypjD</i> Promoter über <i>EcoRI</i> in pAC7
CZ73	5' <u>GCGGGATCC</u> GGGCTAAAATATCCTTCTTTAAA (58°C)	reverse Primer, Klonierung des <i>ypjD</i> Promoter über <i>BamHI</i> in pAC7
CZ74	5' <u>CCGCAAGCTT</u> AGTAATTGACCCCTTTTATAATG (66°C)	forward Primer, Klonierung der kleinen RNA vor dem <i>yvcl</i> -Operon über <i>HindIII</i> in pGP2428
CZ75	5' <u>CGCGGTACC</u> CTCTTTTATTTATGGACAAAAAAGG (66°C)	reverse Primer, Klonierung der kleinen RNA vor dem <i>yvcl</i> -Operon über <i>KpnI</i> in pGP2428
CZ76	5' <u>CCGGACATCAGCGCCATTC</u> (62°C)	reverse Sequenzierungs- primer der p25-N Domäne der 2-hybrid Vektoren
CZ77	5' <u>GCGGGATCC</u> GCACGAAGGATTGTGTAAC (58°C)	reverse Primer, Klonierung des <i>rpsJ</i> Promoter über <i>BamHI</i> in pAC7
CZ78	5' <u>GGAATTC</u> CATATGGTTCAACAGAAAGTG GAAG (62°C)	forward Primer, Klonierung von <i>crh</i> über <i>NdeI</i> in pFDX4291
CZ79	5' <u>AAA</u> ACTGCAGCTAACTTCTTCTTGAACGTAAG (62°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>crh</i> über <i>PstI</i> in pFDX4291

CZ80	5´GCGGGATCCCGAAGTATTTGAAAGAGCTG (60°C)	forward Primer, Klonierung von <i>yvcL</i> über <i>BamHI</i> in pGP1331
CZ81	5´GCACGCGTCGACTTTTAAAGTGACGGTTTGCCC (60°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>yvcL</i> über <i>Sall</i> in pGP1331
CZ82	5´CGTCGGTACCCGTGCGTATAGATCAT GATTCTTTA (60°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>mgsA</i> (AS 1-33) über <i>KpnI</i>
CZ83	5´CGTCGGTACCCGCAGTGCACCGATTTGCTGG (60°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>mgsA</i> (AS 1-66) über <i>KpnI</i>
CZ84	5´CGTCGGTACCCGATCACATAAACGGATTA ATGCC (60°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>mgsA</i> (AS 1-99) über <i>KpnI</i>
CZ85	5´GGGAATTCCATATGCAGGATGTGGCGCCG (60°C)	forward Primer, Klonierung von <i>spoT1</i> aus <i>Ralstonia eutropha</i> über <i>NdeI</i> in pKES170
CZ86	5´CCTCTAGAGCCGTCGTTGCGGTGCGC (60°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>spoT1</i> aus <i>Ralstonia eutropha</i> über <i>XbaI</i> in pKES170
CZ87	5´GGGAATTCCATATGGTGACGTCCACCGAC (58°C)	forward Primer, Klonierung von <i>spoT2</i> aus <i>Ralstonia eutropha</i> über <i>NdeI</i> in pKES170
CZ88	5´CCTCTAGACTTTCTTTTCGCTGCAACA (58°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>spoT2</i> aus <i>Ralstonia eutropha</i> über <i>XbaI</i> in pKES170
CZ89	5´GGGAATTCCATATGTATCTGTTTGAAAGCCTG (56°C)	forward Primer, Klonierung von <i>spoT</i> aus <i>E. coli</i> über <i>NdeI</i> in pKES170
CZ90	5´CCTCTAGAATTTTCGGTTTCGGGTGACTT (58°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>spoT</i> aus <i>E. coli</i> über <i>XbaI</i> in pKES170
CZ91	5´P-GGCGTGGCAATCCCGGAGGGCCGCATC AAGGGCCTG	Mutageneseprimer für <i>ptsN</i> aus <i>Ralstonia eutropha</i> H67E

CZ92	5 'GCCTGCAGTCAGGGATGCCATGCGATC (60°C)	reverse Primer, Klonierung von EIIANtr aus <i>Ralstonia eutropha</i> über <i>PstI</i> in pBGG237
CZ93	5 'GGTTTTTCTCACGGAGACTG (60°C)	forward Primer, Amplifikation der <i>rpsJ</i> -Region für EMSA
CZ94	5 'GTTTAATTCGATATCGACACC (60°C)	reverse Primer, Amplifikation der <i>rpsJ</i> -Region für EMSA
CZ95	5 'GTTGATGCTCTTATGCGATTAG (62°C)	forward Primer, Amplifikation der <i>rpsJ</i> -Region für EMSA
CZ96	5 'CGTAATTCTTTAACGAAGCGC (60°C)	reverse Primer, Amplifikation der <i>rpsJ</i> -Region für EMSA
CZ97	5 'GAAAAGCTTTCTAACAAACCTG (60°C)	forward Primer, Amplifikation der <i>rpsJ</i> -Region für EMSA
CZ98	5 'CGTTCTGCATCAACTTTTACG (60°C)	reverse Primer, Amplifikation der <i>rpsJ</i> -Region für EMSA
CZ99	5 'GTATGGGCGGAGAGCAAATC (62°C)	forward Primer, Amplifikation der <i>rpsJ</i> -Region für EMSA
CZ100	5 'CTTTTTGACGCCATGGTTTAC (60°C)	reverse Primer, Amplifikation der <i>rpsJ</i> -Region für EMSA
CZ101	5 'CAAACATGCCATGGTTCAACAGAAAGTGGAAAG (62°C)	forward Primer, Klonierung von <i>crh</i> über <i>NcoI</i> in pETM-11
CZ102	5 'GCGGCGTC ATGAAAATTGCTTTGATCGCGC (62°C)	forward Primer, Klonierung von <i>mgsA</i> über <i>BspHI</i> in pETM-11
CZ103	5 'GAGGATCGAGATCTCGATC (58°C)	forward Sequenzierungsprimer pETM-11
CZ104	5 'CTAGTTATTGCTCAGCGGTG (60°C)	reverse Sequenzierungsprimer pETM-11



CZ105	5 'GCACGCGTCGACGAGAATCTTTATTTTCAGG GCGCCATGAAAATTGCTTTGATCGCGCATGAC (76°C)	forward Primer, Klonierung von <i>mgsA</i> über <i>Sall</i> in pWH844 mit TEV- Schnittstelle
CZ106	5 'CCGCAAGCTTTTATACATTGGCTCTTCTCCCCG (72°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>mgsA</i> über <i>HindIII</i> in pWH844
CZ107	5 'GCACGCGTCGACATGAAAATTGCTTTGATCGCG CATGAC (76°C)	forward Primer, Klonierung von <i>mgsA</i> über <i>Sall</i> in pWH844
CZ108	5 'CATAAAAGACGGTCTTTTTTTAC (60°C)	forward upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>pycA</i>
CZ109	5 'CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGCGGATTGCA ATTTCTCCCCTG (64°C)	reverse upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>pycA</i>
CZ110	5 'CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGGAAAAAT GGTGAGCCGATCC (60°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>pycA</i>
CZ111	5 'CACATATTCGCTTACACTTGG (60°C)	reverse downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>pycA</i>
CZ112	5 'GAATTGTCTGCTTTGCATGAC (60°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>pycA</i>
CZ113	5 'GGCATGAATAATCAAGTGATC (58°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>pycA</i>
CZ114	5 'CAGAATTAACAAGCATGGC (58°C)	forward upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citZ</i>
CZ115	5 'CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGTATCATCA ATAATAGAACTAAC (58°C)	reverse upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citZ</i>
CZ116	5 'CATGTCCTAGCTTATCAGAAC (60°C)	reverse downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citZ</i>
CZ117	5 'CATCGTGATGAAAACGAGGA (60°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>citZ</i>

CZ118	5´CAATGTTTTCAATGACTGTCAG (60°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>citZ</i>
CZ119	5´GAAAACAATATGCAACTTTAAATC (60°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>citZ</i>
CZ120	5´GATACAACAGCAGTTGCTTTG (60°C)	forward upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>sdhCAB</i>
CZ121	5´CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTG GACGACT AAATGCTGAATAAG (58°C)	reverse upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>sdhCAB</i>
CZ122	5´CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCG GATTGCA GCCTTGAATAGAG (58°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>sdhCAB</i>
CZ123	5´CTCATTTTCTCTTCATTTTCATGC (60°C)	reverse downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>sdhCAB</i>
CZ124	5´GAATTACAGATATCGACACTTC (60°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>sdhCAB</i>
CZ125	5´GTAGCTGTCTCATGATTTCC (60°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>sdhCAB</i>
CZ126	5´CAGCGAACCATTTGAGGTGATAGG GAACGATG ACCTTAATAATTG (60°C)	Phleomycinresistenz forward Primer mit Kan-Fähnchen
CZ127	5´CGATACAAATTCCTCGTAGGGCG CTCGGGTAGTA TTTTTTGAGAAGATCAC (60°C)	Phleomycinresistenz reverse Primer mit Kan-Fähnchen
CZ128	5´CCAAAGTGAAACCTAGTTTATC (60°C)	Check Primer für LFH (Phleo UP)
CZ129	5´CGAGACTTTGCAGTAATTGATC (62°C)	Check Primer für LFH (Phleo DOWN)
CZ130	5´GGCTTTTTCTTGCTTAGTCC (62°C)	reverse downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citZ</i>

CZ131	5 ´GAATGTCAACAAGAACAACGT (60°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>citZ</i>
CZ132	5 ´CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGCAGAT TACACAGGCCCTGAC (62°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citZ</i>
CZ133	5 ´GTTAATTGCCATGCAGCCAG (60°C)	forward downstream Sequenzierungsprimer <i>pycA</i>
CZ134	5 ´GATTATTTGCGCCAAGTCATG (60°C)	forward downstream Sequenzierungsprimer <i>sdhCAB</i>
CZ135	5 ´CAACAGTCGTAAGCGAAAATG (60°C)	forward upstream Sequenzierungsprimer <i>sdhCAB</i>
CZ136	5 ´GTTACAAACGGTACTCGTG (60°C)	forward downstream Sequenzierungsprimer <i>sucCD</i>
CZ137	5 ´GTATAAGCATGGTGATCCGC (60°C)	forward Sequenzierungsprimer <i>citZ</i>
CZ138	5 ´CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGCTATACCTGA ATCTTCTAACGC (60°C)	reverse upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citB</i>
CZ139	5 ´CCATGGGAGAGTCACTAGAG (60°C)	forward upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citB</i>
CZ140	5 ´GTATACGAAGAGAGATTAGAAG (62°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>citB</i>
CZ141	5 ´CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGCATCCTT CAAATGGTGCTTCG (62°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citB</i>
CZ142	5 ´CATTGTCAGAACGATCATCAG (62°C)	reverse downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citB</i>
CZ143	5 ´GCTGTTTATCTTCTCCTGAAG (60°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>citB</i>

CZ144	5 ' CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTG GTAAAAATC TTCCAATTCATTC (60°C)	reverse upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>odhA</i>
CZ145	5 'GGGTATGGCTGACGGCAAAG (62°C)	forward upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>odhA</i>
CZ146	5 'GGCTCTGTTCAAGGATCAGC (62°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>odhA</i>
CZ147	5 ' CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCG GAAC GTATTGTATCTGATAGCTT (60°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>odhA</i>
CZ148	5 'GCCCAGTATAACCGACTTGCG (60°C)	reverse downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>odhA</i>
CZ149	5 'CATAAGATAAAGCGATATACATC (62°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>odhA</i>
CZ150	5 ' CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCG CTGGAA GATCCTGAACAGCT (62°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>odhAB</i>
CZ151	5 'CAAGAACATTTTAATTAGTTTACATC (64°C)	reverse downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>odhAB</i>
CZ152	5 'CCATTGATTTGCTTCCTTCAC (62°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>odhAB</i>
CZ153	5 'CGTTACCTCGGTGCGAAAAG (62°C)	reverse Sequenzierungs- primer <i>citR</i>
CZ154	5 'GTTTGTCTGTCCATTGGGTTCC (62°C)	reverse Sequenzierungs- primer <i>citA</i>
CZ155	5 'GTATTCATTGCTGTGTACCGC (62°C)	reverse Sequenzierungs- primer <i>citR</i>
CZ156	5 '-P- CGCCAAAAGCATCATGGGGCTGAGGAGCC TTGCGGTAAGCACAGGC	Mutageneseprimer für <i>crh</i> (Met51 → Arg)
CZ157	5 '-P- CGCCAAAAGCATCATGGGGCTGTGGAGC CTTGCAGTAAGCACAGGC	Mutageneseprimer für <i>crh</i> (Met51 → Trp)

CZ158	5 'GTCATTCCCGGTCTTGAAGG (62°C)	Fusion von <i>dnaE-cggR-aphA3-ytrl</i> ; forward upstream Primer
CZ159	5 'GACTTGCTGAAGCAGGCTTG (62°C)	Fusion von <i>dnaE-cggR-aphA3-ytrl</i> ; upstream Sequenzierungsprimer
CZ160	5 'GTTTATTCAACTGTTAAGAGCCCATCTTTATC ACCTCACCTT (58°C)	Fusion von <i>dnaE-cggR-aphA3-ytrl</i> ; reverse upstream Primer (Überhang <i>cggR</i> )
CZ161	5 'GGCTCTTAACAGTTGAATAAAC (58°C)	Fusion von <i>dnaE-cggR-aphA3-ytrl</i> ; forward Primer <i>cggR</i>
CZ162	5 'CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGCAATGCCG CGATATGGTAAGG (66°C)	Fusion von <i>dnaE-cggR-aphA3-ytrl</i> ; reverse Primer <i>cggR</i> (Überhang <i>aphA3</i> )
CZ163	5 'CCGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGATCAG GAAGCAGGATTTATGG (60°C)	Fusion von <i>dnaE-cggR-aphA3-ytrl</i> ; forward downstream Primer <i>ytrl</i> (Überhang <i>aphA3</i> )
CZ164	5 'GCTTCTGTTTTATCAAAAAGG (60°C)	Fusion von <i>dnaE-cggR-aphA3-ytrl</i> ; reverse downstream Primer
CZ165	5 'CCTCAGAGTTATTTAATCAATTG (60°C)	Fusion von <i>dnaE-cggR-aphA3-ytrl</i> ; downstream reverse Sequenzierungsprimer
CZ166	5 'GCGCGGAATACGTTACGTCC (64°C)	Fusion von <i>dnaE-cggR-aphA3-ytrl</i> ; Sequenzierung <i>gapA</i>
CZ167	5 'GAAGACCTCCATAAACTGAATG (62°C)	Fusion von <i>dnaE-cggR-aphA3-ytrl</i> ; Sequenzierung <i>gapA</i>
CZ168	5 'ATTGAATTCTACCGTTCGTATAGCATAATTATA CGAAGTTATCCTTCCAGCGAACCATTTGAGGTGA TAGGTAAG (64°C)	forward Primer, Klonierung <i>aphA3</i> -Lox über <i>EcoRI</i> in pBluescript II KS
CZ169	5 'GCCICTAGATACCGTTCGTATAATGTATGCTA TACGAAGTTATGTAACGATCGATACAAATTCCTCG TAGGCGCTCGGGACC (66°C)	reverse Primer, Klonierung <i>aphA3</i> -Lox über <i>XbaI</i> in pBluescript II KS

CZ170	5 ' CCTATCACCTCAAATGGTTTCGCTG CTTACGCG ATTGCCCTTTATG (62°C)	reverse upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citR</i>
CZ171	5 'GAAAATACGACACAACGATCAG (62°C)	forward upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citR</i>
CZ172	5 'CATTACAGCTACGACAGCAG (60°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>citR</i>
CZ173	5 ' CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCG GTTCTCA TATTTTGCAGCGGTC (62°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citR</i>
CZ174	5 'CACCTCTTCTGCTTTCTGTC (60°C)	reverse downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citR</i>
CZ175	5 'GTAAACAATTCATCGTCAAATC (62°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>citR</i>
CZ176	5 ' CCTATCACCTCAAATGGTTTCGCTG GCCCTTTT CACCATCAATATG (62°C)	reverse upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citA</i>
CZ177	5 'CACAGGCGTTTTGGTTGCTC (62°C)	forward upstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citA</i>
CZ178	5 'GAACAACAGCTACTGGAAGC (60°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>citR</i>
CZ179	5 ' CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCG GTC AGCGCAATATACCGGTG (62°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citA</i>
CZ180	5 'GTATCCAAGCCGTGCTGTTTC (64°C)	reverse downstream Primer; LFH-PCR zur Deletion von <i>citA</i>
CZ181	5 'GGTCTGCCCTGTCATATAGG (62°C)	Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der LFH-PCR zur Deletion von <i>citR</i>
CZ182	5 'GCGAGCTCG ATGACAGCGACACGCGGTCT (64°C)	forward Primer, Klonierung von <i>citZ</i> über <i>SacI</i> in pGP172

CZ183	5´ACAGGATCCTTAGGCTCTTTCTTCAATCGG (62°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>citZ</i> über <i>BamHI</i> in pGP172
CZ184	5´GC GAGCTC GATGGTACATTACGGATTAAGG (60°C)	forward Primer, Klonierung von <i>citA</i> über <i>SacI</i> in pGP172
CZ185	5´ACAGGATCCTTATGAAAGAACTTCCTCGGG (60°C)	reverse Primer, Klonierung von <i>citA</i> über <i>BamHI</i> in pGP172
CZ186	5´ACAGGATCCTGAGCGCTTGAAACCTATAT GATTC (62°C)	forward Primer, Klonierung von <i>citA</i> über <i>BamHI</i> in pGP1331
CZ187	5´GCACGCGTCTGACTGAAAGAACTTCCTCGG GAATG (64°C)	forward Primer, Klonierung von <i>citA</i> über <i>Sall</i> in pGP1331
CZ188	5´GCCTTATCTTCCTTCCTTATG (60°C)	Fusion von <i>dnaE-pgi-aphA3-ytrI</i> ; forward upstream Primer
CZ189	5´ATGGCAAGCACGTCATCTTTGCCATCTTATC ACCTCACCTT (60°C)	Fusion von <i>dnaE-pgi-aphA3-ytrI</i> ; reverse upstream Primer (Überhang <i>pgi</i> )
CZ190	5´CAAAGATGACGTGCTTGCCAT (62°C)	Fusion von <i>dnaE-pgi-aphA3-ytrI</i> ; forward Primer <i>pgi</i>
CZ191	5´CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGCACCTT TCTGATTTTATAAAAAG (60°C)	Fusion von <i>dnaE-pgi-aphA3-ytrI</i> ; reverse Primer <i>pgi</i> (Überhang <i>aphA3</i> )
CZ192	5´CAAGTCCACTGTCAGCCTC (62°C)	Fusion von <i>dnaE-pgi-aphA3-ytrI</i> ; reverse downstream Primer <i>ytrI</i>
CZ193	5´GTATAATGTATGCTATACGAACGGTAGAGCA ACCAAACGCCTGTG (62°C)	reverse upstream Primer; LFH-PCR zur markerlosen Deletion von <i>citRA</i>
CZ194	5´GTATAGCATA CATTATACGAACGGTAGTCAGCG CAATATACCGGTG (62°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur markerlosen Deletion von <i>citRA</i>
CZ195	5´GTTTTAACAGCTGTAGGTCTC (60°C)	Fusion von <i>pgi-fbaA-cm-ytrI</i> ; forward upstream Primer in <i>pgi</i>

CZ196	5 'CCTGGATCATGTCGAGCTCGCACCTTTCTGATT TTATAAAAAG (62°C)	Fusion von <i>pgi-fbaA-cm-ytrl</i> ; reverse upstream Primer (Überhang <i>fbaA</i> )
CZ197	5 'GAGCTCGACATGATCCAGG (60°C)	Fusion von <i>pgi-fbaA-cm-ytrl</i> ; forward Primer <i>fbaA</i>
CZ198	5 'CCTATCCACCTCAAATGGTTCGCTGCATCGA TATTGGCTGTATCAAC (62°C)	Fusion von <i>pgi-fbaA-cm-ytrl</i> ; reverse Primer <i>fbaA</i> (Überhang <i>aphA3</i> )
CZ199	5 'CAACTGATAAAGAGCGCGGC (60°C)	Fusion von <i>pgi-fbaA-cm-ytrl</i> ; forward Sequenzierungsprimer in <i>pgi</i>
CZ200	5 'TACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAG TTATCCTTCCCAGCGAACCATTTGAGGTGATAG GTAAG (72°C)	forward Primer zur Amplifikation von <i>aphA3-Lox</i> aus pGP2514
CZ201	5 'TACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTT ATGTAACGATCGATACAAATTCCTCGTAGGCGCT CGGGAC (74°C)	reverse Primer zur Amplifikation von <i>aphA3-Lox</i> aus pGP2514
CZ202	5 'CTACATAAGGAGGACATTCGAC (64°C)	Fusion von <i>fbaA-ptsGHI-aphA3-ytrl</i> ; forward upstream Primer
CZ203	5 'GCGCGCCTTCACTGACAACATCGATATTGGCT GTATCAAC (62°C)	Fusion von <i>fbaA-ptsGHI-aphA3-ytrl</i> ; reverse upstream Primer (Überhang <i>ptsGHI</i> )
CZ204	5 'TTGTCAAGTGAAGGCGCGCTATGCTACAATAAG CTTGAAATAGAGGAGGTCAATTCTTATGTTTAA GC (62°C)	Fusion von <i>fbaA-ptsGHI-aphA3-ytrl</i> ; forward Primer <i>ptsGHI</i> (inkl. Artificieller Promoter)
CZ205	5 'CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGTTAAAT TGGTTTGACATACTATC (62°C)	Fusion von <i>fbaA-ptsGHI-aphA3-ytrl</i> ; reverse Primer <i>ptsGHI</i> (Überhang <i>aphA3</i> )
CZ206	5 'CCGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGGAGCT TCTTGTTTATGCTCTTG (62°C)	Fusion von <i>fbaA-ptsGHI-aphA3-ytrl</i> ; forward downstream Primer
CZ207	5 'GAATTGGCCATCGTGTCGTTT (64°C)	Fusion von <i>fbaA-ptsGHI-aphA3-ytrl</i> ; reverse downstream Primer



CZ208	5´GAAGTAACTGATATTCCAGATC (58°C)	Fusion von <i>fbaA-ptsGHI-aphA3-ytrI</i> ; downstream reverse Sequenzierungsprimer
CZ209	5´TACATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAA CGGTA GACGACTAAATGCTGAATAAGAAAG (62°C)	reverse upstream Primer; LFH-PCR zur markerlosen Deletion von <i>sdhCAB</i>
CZ210	5´AGGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACG AACGGTA GATTGCAGCCTTGAATAGAGATAC (62°C)	forward downstream Primer; LFH-PCR zur markerlosen Deletion von <i>sdhCAB</i>
CZ211	5´-P-CCATTCCGCTCGCC TGG AATATGGGT TGG CGGAAATTCTTGTGCG	Mutageneseprimer für <i>mgsA</i> (Thr107 → Trp; Thr111 → Trp)
CZ212	5´-P-CCATTCCGCTCGCC AGA AATATGGGT CGT GCGGAAATTCTTGTGCG	Mutageneseprimer für <i>mgsA</i> (Thr107 → Arg; Thr111 → Arg)
CZ213	5´-P-CATGAACCGGATGTCTCG TGG TTAATCCG TTGG TGTGATGTGTATTCCATTC	Mutageneseprimer für <i>mgsA</i> (Ala93 → Trp; Leu97 → Trp)
CZ214	5´-P-CATGAACCGGATGTCTCG AGA TTAATCCGT AGA GTGATGTGTATTCCATTC	Mutageneseprimer für <i>mgsA</i> (Ala93 → Arg; Leu97 → Arg)
CZ215	5´-P-GTAAACGCCAAAAGCATC TGG GGGCTGATGAG CCTTGC	Mutageneseprimer für <i>crh</i> (Met48 → Trp)
CZ216	5´-P-GTAAACGCCAAAAGCATC AGG GGGCTGATG AGCCTTGC	Mutageneseprimer für <i>crh</i> (Met48 → Arg)
CZ217	5´-P-CAGGGTTGAAAATTCAT GCG GCGACAGGT CTTCAAATTG	Mutageneseprimer für <i>mgsA</i> (Glu43 → Ala)
CZ218	5´-P-GACAGGTCTTCAAATT GCA CGTTTTCAATCCG GCC	Mutageneseprimer für <i>mgsA</i> (Glu50 → Ala)
CZ219	5´-P-CTGACCGCGCAGCCGCAT GCA CCGGATGT CTCGGCA	Mutageneseprimer für <i>mgsA</i> (Glu88 → Ala)
CZ220	5´-P-CAAATATGGGTACTGCG GCA ATTCTTGTG CGCACAC	Mutageneseprimer für <i>mgsA</i> (Glu113 → Ala)
CZ221	5´GACGCGATTTCCGCTGATTC (62°C)	reverse Primer für Sequenzierung von <i>citR</i>

CZ222	5´CAGAAGCTTTGAGACAGAAAG (60°C)	forward Primer für Sequenzierung von citR
CZ223	5´-P-AGCTTAAGGAGGAAACAATCATGTGGAGCC ACCCGCAGTTCGAAAAAGGTACCTCTAGAG-3´	Hybridisierungsprimer (MCS) forward zur Konstruktion von pGP2427

Tabelle 7.4: In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5´ → 3´)	Gen / Zweck
BG409	5´ CGCGTTGGCCGATTCATTAATGC	forward Primer Sequenzierung pKES170
BG410	5´ CCATCGGCGCTACGGCGTTTC	reverse Primer Sequenzierung pKES170
BG630	5´ TGCGGGGATGCCAGACTCC	reverse Primer Sequenzierung pKNT25
BG631	5´ CCGGCGCGAGCGATTTTCC	reverse Primer Sequenzierung pUT18
BG643	5´ TCTCGCCGGATGTA CTGG	forward Primer Sequenzierung pUT18C
BG644	5´ CGGCTCGTATGTTGTGTGG	forward Primer Sequenzierung pUT18
BG645	5´ GGGTGTTGGCGGGTGTCC	reverse Primer Sequenzierung pUT18C
BG647	5´ GGGGATGTGCTGCAAGGCC	reverse Primer Sequenzierung pKT25
BG648	5´ GGCTCGTATGTTGTGTGG	forward Primer Sequenzierung pKT25
cat check fwd	5´ CTAATGTCACTAACCTGCCC	Sequenzieren aus der <i>cm</i> - Kassette aus pGem- <i>cat</i> für LFH-PCR
cat check rev	5´ GTCTGCTTTCTTCATTAGAATCAATCC	Sequenzieren aus der <i>cm</i> - Kassette aus pGem- <i>cat</i> für LFH-PCR
cat- fwd (kan)	5´ CGGCAATAGTTACCCTTATTATCAAG	Amplifizieren der <i>cm</i> - Kassette aus pGem- <i>cat</i> für LFH-PCR

cat- rev (kan) ohne Terminator	5' CGATACAAATTCCTCGTAGGCGCTCGGTTA TAAAAGCCAGTCATTAGGCCTATC	Amplifizierung <i>cm</i> <sup>R</sup> Gen mit <i>kan</i> – tags ohne Terminator für LFH-PCR
cat- rev (kan)	5'CCAGCGTGGACCGGCGAGGCTAGTTACC C	Amplifizieren der <i>cm</i> -Kassette aus pGem- <i>cm</i> für LFH-PCR
FC17	5'AAAGGATCCGTGGCACAAGGTGAAAA ATTAC	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citZ</i>
FC18	5'TTTCTGCAGTTATTAGTCCATGTTTTGAT	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citZ</i>
FC24	5'AAAGGATCCATGGTACATTACGGATTAA AGG	forward Primer, Amplifikation <i>citA</i>
FC25	5' TTTCTCGAGTGAAAGAACTTCTCGGGA	reverse Primer, Amplifikation <i>citA</i>
FC50	5' GTCATATCCTAGCAGGCCTCCGG	LFH-PCR ( <i>yuxN</i> ), Deletion von <i>citG</i>
FC53	5' CGACCAAATTGCCACACGGCCG	LFH-PCR ( <i>gerAA</i> ), Deletion von <i>citG</i>
FC55	5'CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGCT GACAGACTATGAAAGAGCGCAGCT	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citZ</i>
FC59	5'CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGGC AGAGACACCTTCTGTCATGGGTG	LFH-PCR ( <i>smf</i> ), Deletion von <i>sucD</i>
FC60	5' GAACGTTTCTCTCAGGAAGTTCCTCG	LFH-PCR ( <i>smf</i> ), Deletion von <i>sucD</i>
FM3	5'AAAGGATCCATGACAGCGACACGCGGTC TTGAAG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citZ</i>
FM4	5'AAAGTCGACTCATTAGGCTCTTTCTTCAA TCGGAACGAATTTTTG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citZ</i>
FM8	5'AAAGTCGACTCATTATCCTTCTAATAAAA GCTGTTCCAGGATCTTCC	Sequenzierungsprimer Deletion <i>odhB</i>
FM13	5' GCCTGGCCTGGTTGCAGCG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citZ</i>
FM16	5' CCGGCGCTTGATCAGCTTCGC	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citG</i>
FM24	5'AAATCTAGAGATGGAATACAGAATTGAA CGAGACACCATGG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citG</i>
FM25	5'TTTGGTACCCGCGCCTTTGGTTTTACCAT GTCTCCGGGC	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citG</i>
FM30	5'AAATCTAGAGATGGCAAACGAGCAAAAA ACTGCAGCAAAAG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citB</i>

FM31	5' TTTGGTACCCGGGACTGCTTCATTTTTTC ACGAAGCACCATT	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citB</i>
FM32	5' CAGGCAGTACCGCCTGCAACAG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citB</i>
FM46	5' AAATCTAGAGATGTTTCAAATAGTATGA AACAAACGAATGAATTGGGAAG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>odhA</i>
FM48	5' GAGCGCGAGTGGCTGACAAGAAAG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>odhA</i>
FM50	5' GTGCTCCGCAAGCTGAATGGCG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>odhA</i>
FM53	5' AAATCTAGAGATGAATATCCATGAGTAC CAGGGAAAAGAAGTC	Sequenzierungsprimer Deletion <i>sucCD</i>
FM54	5' TTTGGTACCCGAACTAAGGATACGATTTT CTGCGCGCC	Sequenzierungsprimer Deletion <i>sucCD</i>
FM57	5' CCTCGCTCACCTCTTGTGCAGC	Sequenzierungsprimer Deletion <i>odhB</i>
FM60	5' AAATCTAGAGATGAGTCAATCAAGCATT ATCGTAGTCGGC	Sequenzierungsprimer Deletion <i>sdhCAB</i>
FM61	5' TTTGGTACCCGTTTCGCCACCTTCTTCTTC GAGTAATCC	Sequenzierungsprimer Deletion <i>sdhCAB</i>
FM86	5' CTGCCTTAAGAGCATCGCATGAGGTA	LFH-PCR: Deletion <i>sucC up- forward</i>
FM87	5' GGCAATCGGCGCAAGGGACG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>sucC</i>
FM87	5' GGCAATCGGCGCAAGGGACG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>sucC</i>
FM88	5' CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTG CACTTTACCTTCAGGAACAGATACCCC	LFH-PCR: Deletion <i>sucC up- reverse (kan)</i>
FR124	5' AAATCTAGATTGTCTCAGCAATCGATACA AAAAGT	Sequenzierungsprimer Deletion <i>pycA</i>
FR125	5' TTTGCATGCTTATGCTTTTTCAATTTCAAG GAGCAG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>pycA</i>
HMB12	5' CATTGGCTCCCTAAAGTCC	<i>ccpC</i> -Sequenzierungsprimer
HMB29	5' CGGGATCCCTCATTGAATAAGTAGGCTG	5'-Region von <i>ccpC</i> für <i>ccpC</i> - Operon Deletion, vorwärts
HMB60	5' AAAGTGCAGTTAAAATGGATTTTCCTGAT CC	<i>ccpC</i> -Gen, <i>revers</i> komplementär
HMB63	5' CCAAAGCAAGTAGATGATTTTC	Sequenzierungsprimer Deletion <i>citZ</i>

IW20	5' GTGATCCGCGGACAATGTC	Sequenzierungsprimer Deletion <i>rocG</i>
JG69	5'CGATACAAATTCCTCGTAGGGCGCTCGGT TCCACCATTTTTTCAATTTTTTATAATTTTT TAATCTG	Amplifikation der <i>spc</i> Resistenzkassette ohne Terminator aus pDG1726
JL18	5'GCCTCTAGAGATGGTTCAACAGAAAGTG GAAG	forward Primer, Amplifikation <i>crh</i>
JL19	5'CGTCGGTACCCGAACTTCTTCTTGAACGT AAGCAG	reverse Primer, Amplifikation <i>crh</i>
JL21	5'GCCTCTAGAGATGAAAATTGCTTTGATGC GC	forward Primer, Amplifikation <i>mgsA</i>
JL22	5'CGGTCGGTACCCGTACATTCGGCTCTTCT CCCC	reverse Primer, Amplifikation <i>mgsA</i>
kan-fwd	5' CAGCGAACCATTTGAGGTGATAGG	Amplifizieren der <i>kan</i> - Kassette aus pDG780 für LFH- PCR
kan-rev	5' CGATACAAATTCCTCGTAGGGCGCTCGG	Amplifizieren der <i>kan</i> - Kassette aus pDG780 für LFH- PCR
KG8	5' GGATGCAGCAAGGTCAAGATCAGCG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>rocG</i>
KG26	5' CTATTTCCACCCAGTATTCAGG	Sequenzierungsprimer Deletion <i>ansA</i>
KG28	5' ATGGCTTGGACCCGTTATTGGGG	LFH-PCR, Deletion <i>ansAB</i> (fwd <i>upstream</i> )
KG100	5' GCAGCAATAACACCGGCAATAA	LFH PCR, Deletion <i>gudB</i> (fwd <i>upstream</i> )
KG118	5' GCGGCTAAGAAGAGAGGCATCGATA	Sequenzierungsprimer Deletion <i>gudB</i>
ML16	5' TTTGGTACCCGTTTTTTGTTTTGGTCGTC GTTTACTTCTTC	forward Primer, Amplifikation <i>dnaK</i>
ML84	5' CTAATGGGTGCTTTAGTTGAAGA	<i>cm</i> check up-Fragment
ML85	5' CTCTATTCAGGAATTGTCAGATAG	<i>cm</i> check down-Fragment
ML103	5' CTCTTGCCAGTCACGTTAC	<i>spc</i> check up-fragment
ML104	5' TCTTGAGAGAATATTGAATGGAC	<i>spc</i> check down-fragment
ML107	5' GCTTCATAGAGTAATTCTGTAAAGG	<i>kan</i> check up-fragment
ML108	5' GACATCTAATCTTTTCTGAAGTACATCC	<i>kan</i> check down-fragment
ML109	5' GTCTAGTGTGTTAGACTTTATGAAATC	<i>mls</i> check up-fragment

ML159	5' AAATCTAGAGGTGAGTAAAGTTATCGGA ATCGAC	reverse Primer, Amplifikation <i>dnaK</i>
ML160	5' TTTGGTACCCGTTATTTTTGTTTTGGTC GTCGTTTACTTCTTC	reverse Primer, Amplifikation <i>dnaK</i>
ML109	5' GTCTAGTGTGTTAGACTTTATGAAATC	<i>mls</i> check up-fragment (sequencing of up-fragment)
ML110	5' CTTAATAATTCATCAACATCTACACC	<i>mls</i> check down-Fragment
M13_puc_f or	5' GTAAAACGACGGCCAGTG	Sequenzierprimer für pBS- Plasmide und alle puc- Derivate (z.B.pBQ200)
M13_puc_r ev	5' GGAAACAGCTATGACCATG	Sequenzierprimer für pBS- Plasmide und alle puc- Derivate (z.B.pBQ200)
<i>mls</i> check rev	5' GTTTTGGTCGTAGAGCACACGG	Sequenzieren aus der <i>erm</i> - Kassette für LFH-PCR
<i>mls</i> fwd	5' CAGCGAACCATTTGAGGTGATAGGGATC CTTAACTCTGGCAACCCTC	Amplifizierung <i>erm</i> <sup>R</sup> Gen mit <i>kan</i> – tags für LFH-PCR
<i>mls</i> rev	5' CGATACAAATTCCTCGTAGGCGCTCGGG CCGACTGCGCAAAGACATAATCG	Amplifizierung <i>erm</i> <sup>R</sup> Gen mit <i>kan</i> – tags für LFH-PCR
RB24	5' GGCGGATCCTTATACATTCGGCTCTTCTC CCCGAAG	Reverse Primer, Amplifikation <i>mgsA</i>
<i>spec</i> check fwd	5' GTTATCTTGGAGAGAATATTGAATGGAC	Sequenzieren aus der <i>spec</i> - Kassette für LFH-PCR
<i>spec</i> check rev	5' CGTATGTATTCAAATATATCCTCCTCAC	Sequenzieren aus der <i>spec</i> - Kassette für LFH-PCR
<i>spec</i> -fwd ( <i>kan</i> )	5' CAGCGAACCATTTGAGGTGATAGGGACT GGCTCGTAATAACGTAACGTGACTGGCAA GAG	Amplifizieren der <i>spec</i> - Kassette aus pDG1726/1726 für LFH-PCR
<i>spec</i> -rev ( <i>kan</i> )	5' CGATACAAATTCCTCGTAGGCGCTCGGC GTAGCGAGGGCAAGGGTTTATTGTTTTCTA AAATCTG	Amplifizieren der <i>spec</i> - Kassette für pDG1726/1726 für LFH-PCR
SK54	5' ATTTTATTCCTGGACGCGAA	Sequenzierung von <i>yvcJ</i>
SK55	5' GCTGAATGTAAGAGGAAAGGTT	Sequenzierung von <i>yvcK</i>
SK56	5' AACCTTTCCTTACATTCAGCAC	Sequenzierung von <i>yvcK</i>
Tet fwd2	5' GCTTATCAACGTAGTAAGCGTGG	Amplifizieren der <i>tet</i> -Kassette aus pDG1513-1515 für LFH- PCR

Tet rev	5' GAACTCTCTCCCAAAGTTGATCCC	Amplifizieren der <i>tet</i> -Kassette aus pDG1513-1515 für LFH-PCR
tet check fwd	5' CGGGCTACATTGGTGGGTACTTGTTG	Sequenzieren aus der <i>tet</i> -Kassette für LFH-PCR
tet check rev	5' CATCGGTCATAAAATCCGTAATG	Sequenzieren aus der <i>tet</i> -Kassette für LFH-PCR

Sämtliche aufgelisteten Oligonukleotide entstammen aus der Stammsammlung der AG Stülke. Der in dieser Tabelle aufgeführte Verwendungszweck, kann unter Umständen von dem eigentlichen Zweck abweichen (siehe dazu die Liste der Oligonukleotide der AG Stülke).

### 7.3. Plasmide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich München bezogen.

Tabelle 7.5: In dieser Arbeit bestellte Plasmide.

Name	Vektor	Insert
pGP2401	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>yvcI/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ14/CZ15
pGP2402	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>yvcI/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ14/CZ15
pGP2403	pUT18C/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>yvcI/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ14/CZ16
pGP2404	pKT25/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>yvcI/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ14/CZ16
pGP2405	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>yvcN/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ17/CZ18
pGP2406	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>yvcN/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ17/CZ18
pGP2407	pUT18C/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>yvcN/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ17/CZ19
pGP2408	pKT25/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>yvcN/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ17/CZ19
pGP2409	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>degU/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ20/CZ21
pGP2410	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>degU/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ20/CZ21
pGP2411	pUT18C/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>degU/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ20/CZ22
pGP2412	pKT25/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>degU/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ20/CZ22
pGP2413	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>sufC/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ23/CZ24

pGP2414	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>sufC/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ23/CZ24
pGP2415	pUT18C/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>sufC/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ23/CZ25
pGP2416	pKT25/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>sufC/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ23/CZ25
pGP2417	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>ywbC/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ26/CZ27
pGP2418	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>ywbC/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ26/CZ27
pGP2419	pUT18C/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>ywbC/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ26/CZ28
pGP2420	pKT25/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>ywbC/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ26/CZ28
pGP2421	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>dnaK/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit ML159/ML16
pGP2422	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>dnaK/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit ML159/ML16
pGP2423	pUT18C/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>dnaK/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit ML159/ML160
pGP2424	pKT25/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>dnaK/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit ML159/ML160
pGP2425	pAC6/ <i>BamHI</i> + <i>SacI</i>	PCR-Prod.: <i>HprK-Operon/BamHI</i> + <i>SacI</i> , mit CZ32/CZ33
pGP2426	pKES170/ <i>NdeI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>yvcL/NdeI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ46/CZ47
pGP2427	pDG148/ <i>HindIII</i> + <i>PstI</i>	Hybridisierungsprimer CZ223/CZ51
pGP2428	pDG148/ <i>HindIII</i> + <i>SphI</i>	Hybridisierungsprimer CZ52/CZ53
pGP2429	pGP2427/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>yvcL/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ54/CZ55
pGP2430	pGP2428/ <i>KpnI</i> + <i>Sall</i>	PCR-Prod.: <i>yvcL/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ56/CZ57
pGP2431	pGP380/ <i>BamHI</i> + <i>HindIII</i>	PCR-Prod.: <i>ptsH/BamHI</i> + <i>HindIII</i> , mit CZ67/FC104
pGP2432	pGP172/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>mgsA (Ile3Leu)/BamHI</i> + <i>SacI</i> , mit CZ69/SK60
pGP2433	pGP172/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>mgsA (Ala4Thr)/BamHI</i> + <i>SacI</i> , mit CZ70/SK60
pGP2434	pGP172/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>mgsA (His8Arg)/BamHI</i> + <i>SacI</i> , mit CZ71/SK60



pGP2435	pGP172/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>mgsA</i> (Gln62Arg)/ <i>BamHI</i> + <i>SacI</i> , mit SK59/SK60
pGP2436	pGP172/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>mgsA</i> (Asp80Ala)/ <i>BamHI</i> + <i>SacI</i> , mit SK59/SK60
pGP2437	pAC7/ <i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>ypjD</i> -Promoter/ <i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i> , mit CZ72/CZ73
pGP2438	pGP2428/ <i>KpnI</i> + <i>HindIII</i>	PCR-Prod.: kleine RNA vor <i>yvcl/KpnI</i> + <i>HindIII</i> , mit CZ74/CZ75
pGP2439	pAC7/ <i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>rpsJ</i> -Promoter/ <i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i> , mit CZ72/CZ73
pGP2440	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22; Lys-2 → Asn; Leu-47 → Leu
pGP2441	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22; Lys-2 → Asn; Leu-47 → Leu
pGP2442	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22; Ile-3 → Leu; Glu-50 → Glu
pGP2443	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22; Ile-3 → Thr
pGP2444	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22; Ala-4 → Thr
pGP2445	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Ala-4 → Val
pGP2446	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Ala-4 → Thr; Asn-136 → Ser
pGP2447	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; His-8 → Arg
pGP2448	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Lys-11 → Glu
pGP2449	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Asp-23 → Ile +2 AS : Stopp

pGP2450	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22; Ile-25 → Valin; Arg-127 → Arg
pGP2451	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Tyr-27 → Stopp; Thr-37 → Ser
pGP2452	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; His-29 → Gln
pGP2453	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22; Thr-34 → Ala; Asp-60 → Asn
pGP2454	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; His-42 → Arg; Gly-122 → Asp; Asn-136 → Ile
pGP2455	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22; Glu-43 → Gly
pGP2456	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Gly-58 → Glu
pGP2457	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Gly-59 → Arg
pGP2458	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Gln-62 → Arg; Leu-74 → Phe
pGP2459	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22; Gln-62 → Arg
pGP2460	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22; Ala-69 → Gly; Leu-97 → Ser
pGP2461	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Val-75 → Ala
pGP2462	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Phe-77 → Leu
pGP2463	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Phe-77 → Tyr

pGP2464	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Asp-80 → Ala
pGP2465	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Pro-81 → Ser
pGP2466	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Pro-89 → Ser
pGP2467	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Leu-94 → Leu; Val-116 → Met
pGP2468	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Leu-115 → Ile
pGP2469	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Thr-118 → Ile
pGP2470	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>mgsA/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG648; Leu-130 → Pro
pGP2471	pFDX4291/ <i>NdeI</i> + <i>PstI</i>	PCR-Prod.: <i>crh/NdeI</i> + <i>PstI</i> , mit CZ78/CZ79
pGP2472	pAC5/ <i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>rpsJ</i> -Promoter/ <i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i> , mit HE330/CZ77
pGP2473	pAC6/ <i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>rpsJ</i> -Promoter/ <i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i> , mit HE330/CZ77
pGP2474	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Val2 → Ala; Ala16 → Gly
pGP2475	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Pro18 → Ser; Gly58 → Gly
pGP2476	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Ile47 → Leu
pGP2477	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Glu7 → Val
pGP2478	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Glu7 → Val

pGP2479	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Ile47 → Leu; Glu14 → Glu
pGP2480	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Glu71 → Gly
pGP2481	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Pro18 → Ser
pGP2482	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Glu71 → Gly
pGP2483	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Ala16 → Gly
pGP2484	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Pro18 → Ala
pGP2485	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Ile47 → Leu
pGP2486	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Ile47 → Leu
pGP2487	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	Error-Prone-PCR-Prod.: <i>crh/KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit BG630/BG644; Ile47 → Leu; Thr59 → Asn
pGP2488	pGP1331/ <i>BamHI</i> + <i>PstI</i>	PCR-Prod.: <i>yvcL/BamHI</i> + <i>PstI</i> , mit CZ80/CZ81
pGP2489	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>mgsA</i> (AS1-33)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/CZ82
pGP2490	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>mgsA</i> (AS1-66)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/CZ83
pGP2491	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>mgsA</i> (AS1-99)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/CZ84
pGP2492	pAC5/ <i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>rpsJ</i> -Promoter/ <i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i> , mit HE330/HE331
pGP2493	pFDX4291/ <i>NdeI</i> + <i>PstI</i>	PCR-Prod.: <i>crh</i> (Ala20Thr)/ <i>NdeI</i> + <i>PstI</i> , mit CZ78/CZ79

pGP2494	pKES170/ <i>NdeI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>spoT1</i> aus <i>R. eutropha</i> H16/ <i>NdeI</i> + <i>XbaI</i> , CZ85/CZ86
pGP2495	pKES170/ <i>NdeI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>spoT2</i> aus <i>R. eutropha</i> H16/ <i>NdeI</i> + <i>XbaI</i> , CZ87/CZ88
pGP2496	pKES170/ <i>NdeI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>spoT</i> aus <i>E. coli</i> / <i>NdeI</i> + <i>XbaI</i> , CZ89 + CZ90
pGP2497	pBGG237/ <i>NheI</i> + <i>PstI</i>	PCR-Prod.: <i>ptsN</i> (H67A) aus <i>R. eutropha</i> H16/ <i>NheI</i> + <i>PstI</i> , KK05/CZ92
pGP2498	pKT25/ <i>XbaI</i> + <i>KpnI</i>	CCR-Prod.: <i>ptsN</i> (H67E) aus <i>R. eutropha</i> H16/ <i>XbaI</i> + <i>KpnI</i> , KK06/KK09/CZ91
pGP2499	pUT18/ <i>XbaI</i> + <i>KpnI</i>	CCR-Prod.: <i>ptsN</i> (H67E) aus <i>R. eutropha</i> H16/ <i>XbaI</i> + <i>KpnI</i> , KK06/KK09/CZ91
pGP2500	pBGG237/ <i>NheI</i> + <i>PstI</i>	PCR-Prod.: <i>ptsN</i> aus <i>R. eutropha</i> H16/ <i>NheI</i> + <i>PstI</i> , KK05/CZ92
pGP2501	pBGG237/ <i>NheI</i> + <i>PstI</i>	CCR-Prod.: <i>ptsN</i> (H67E) aus <i>R. eutropha</i> H16/ <i>NheI</i> + <i>PstI</i> , KK06/KK09/CZ91
pGP2502	pETM-11/ <i>NcoI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>crh</i> / <i>NcoI</i> + <i>BamHI</i> , mit CZ101/RB18
pGP2503	pETM-11/ <i>NcoI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>mgsA</i> / <i>NcoI</i> + <i>BamHI</i> , mit CZ102/RB24
pGP2504	pWH844/ <i>Sall</i> + <i>HindIII</i>	PCR-Prod.: <i>mgsA</i> / <i>Sall</i> + <i>HindIII</i> , mit CZ105/CZ106, inklusive TEV-Site über CZ105 eingefügt
pGP2505	pWH844/ <i>Sall</i> + <i>HindIII</i>	PCR-Prod.: <i>mgsA</i> / <i>Sall</i> + <i>HindIII</i> , mit CZ107/CZ106
pGP2506	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met51Arg)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL19/CZ156
pGP2507	pUT18C/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met51Arg)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL20/CZ156
pGP2508	pKT25/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met51Arg)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL20/CZ156

pGP2509	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met51Arg)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL19/CZ157
pGP2510	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met51Arg)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL19/CZ157
pGP2511	pUT18C/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met51Arg)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL20/CZ157
pGP2512	pKT25/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met51Arg)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL20/CZ157
pGP2513	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met51Arg)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL19/CZ157
pGP2514	pBluescript II/ <i>EcoRI</i> + <i>XbaI</i>	PCR-Prod.: <i>aphA3/EcoRI</i> + <i>XbaI</i> , mit CZ168/CZ169, <i>Lox</i> -Sequenz über beide Primer an die Resistenz angehängen
pGP2515	pGP172/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>citZ/SacI</i> + <i>BamHI</i> , mit CZ182/CZ183,
pGP2516	pGP172/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i>	PCR-Prod.: <i>citA/SacI</i> + <i>BamHI</i> , mit CZ184/CZ185,
pGP2517	pGP1331/ <i>BamHI</i> + <i>PstI</i>	PCR-Prod.: <i>citA/BamHI</i> + <i>PstI</i> , mit CZ186/CZ187
pGP2518	pGP172/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i>	CCR-Prod.: <i>mgsA</i> (Thr107Trp; Thr 111Trp)/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i> , mit SK59/SK60/CZ211
pGP2519	pGP172/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i>	CCR-Prod.: <i>mgsA</i> (Thr107Arg; Thr 111Arg)/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i> , mit SK59/SK60/CZ212
pGP2520	pGP172/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i>	CCR-Prod.: <i>mgsA</i> (Ala93Trp; Leu97Trp)/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i> , mit SK59/SK60/CZ213
pGP2521	pGP172/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i>	CCR-Prod.: <i>mgsA</i> (Ala93Arg; Leu97Arg)/ <i>SacI</i> + <i>BamHI</i> , mit SK59/SK60/CZ213
pGP2522	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met48Trp)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL19/CZ215
pGP2523	pUT18C/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met48Trp)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL20/CZ215
pGP2524	pUT18/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met48Arg)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL19/CZ216

pGP2525	pUT18C/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>crh</i> (Met48Arg)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL18/JL20/CZ216
pGP2526	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>mgsA</i> (Glu43Ala)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22/CZ217
pGP2527	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>mgsA</i> (Glu50Ala)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22/CZ218
pGP2528	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>mgsA</i> (Glu88Ala)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22/CZ219
pGP2529	p25N/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i>	CCR-Prod.: <i>mgsA</i> (Glu113Ala)/ <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , mit JL21/JL22/CZ220

Tabelle 7.6: In dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Zweck	Referenz
p25-N	Gen wird an den N-Terminus der T25-Domäne fusioniert (BACTH)	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pAC5	translationale <i>lacZ</i> -Fusion in <i>B. subtilis</i> ; Integration in <i>amyE</i>	Martin-Verstraete <i>et al.</i> , 1992
pAC6	transkriptionale <i>lacZ</i> -Fusion in <i>B. subtilis</i> ; Integration in <i>amyE</i>	Stülke <i>et al.</i> , 1997
pAC7	translationale <i>lacZ</i> -Fusion in <i>B. subtilis</i> ; Integration in <i>amyE</i>	Weinrauch <i>et al.</i> , 1991
pAG1	Ap <sup>R</sup> , pT7-Derivat, Crh aus <i>B. subtilis</i> (His-Tag)	Galinier <i>et al.</i> , 1997
pBlueskript II SK(-)	Zwischenklonierung	Stratagene
pDG148	Amplifizierung der <i>phleo</i> Resistenz	Joseph <i>et al.</i> , 2001
pGP380	konstitutive Expression von Proteinen mit einem N-terminalen Strep-Tag	Herzberg <i>et al.</i> , 2007
pDG646	Plasmid zur Amplifikation der <i>mls</i> -Kass. für LFH-PCR <i>erm</i> <sup>R</sup>	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995
pDG780	Plasmid zur Amplifikation der <i>kan</i> -Kass. für LFH-PCR <i>kan</i> <sup>R</sup>	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995
pDG1514	Plasmid zur Amplifikation der <i>tet</i> -Kass. für LFH-PCR <i>tet</i> <sup>R</sup>	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995
pDG1726	Plasmid zur Amplifikation der <i>spec</i> -Kass. für LFH-PCR <i>spec</i> <sup>R</sup>	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995

pETM-11	Fusion mit abspaltbaren (TEV) N-terminalen His-Tag, Überexpression in <i>E. coli</i>	EMBL
pGEM-cat	Plasmid zur Amplifikation der <i>cat</i> -Kass. für LFH-PCR <i>cat</i> <sup>R</sup>	Mascher-Lab
pGP172	Fusion mit N-terminalem Strep-Tag <sup>®</sup> II, Überexpression in <i>E. coli</i>	Merzbacher <i>et al.</i> , 2004
pGP1301	Plasmid zur Aufreinigung von Strep-MgsA	Landmann <i>et al.</i> , 2011
pGP1331	Vektor zur Konstruktion von 3xFLAG-Fusionsgenen im nativen Lokus	Lehnik-Habrink <i>et al.</i> , 2010
pKT25	Gen wird an den C-Terminus der T25-Domäne fusioniert (BACTH)	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pKT-25zip	pKT25:: <i>KpnI-EcoRI</i> Fragment mit dem Leucin-Zipper aus GCN4 (positiv Kontrolle)	Karimova <i>et al.</i> , 2001
pUT18	Gen wird an N-Terminus der T18-Domäne fusioniert (BACTH)	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUT18C	Gen wird an C-Terminus der T18-Domäne fusioniert (BACTH)	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUT18C-zip	pUT18C:: <i>EcoRI-KpnI</i> Fragment mit dem Leucin-Zipper von GCN4 (positiv Kontrolle)	Karimova <i>et al.</i> , 2001
pGP1164	Crh-T18 für BACTH	Landmann <i>et al.</i> , 2011
pGP1165	T18-Crh für BACTH	Landmann <i>et al.</i> , 2011
pGP1166	T25-Crh für BACTH	Landmann <i>et al.</i> , 2011
pGP1167	Crh-T25 für BACTH	Landmann <i>et al.</i> , 2011
pGP1172	MgsA-T18 für BACTH	Landmann <i>et al.</i> , 2011
pGP1173	T18-MgsA für BACTH	Landmann <i>et al.</i> , 2011
pGP1174	T25-MgsA für BACTH	Landmann <i>et al.</i> , 2011
pGP1175	MgsA-T25 für BACTH	Landmann <i>et al.</i> , 2011
pKES170	Plasmid zur Überproduktion von Proteinen unter <i>P<sub>tac</sub></i> -Kontrolle mit T7 Shine-Dalgarno Sequenz	Lüttmann <i>et al.</i> , 2009
pWH844	Fusion mit N-terminalen 6xHis-Tag, Überexpression in <i>E. coli</i>	Schirmer <i>et al.</i> , 1997



Tabelle 7.7: Überblick aller pGP1175 Derivate isoliert nach der Error-Prone PCR von *mgsA*.

Plasmid	AS Austausch	Basenpaar Austausch
pGP2440	Lys-2 → Asn; Leu-47 → Leu	A → C; bp 6 T → C; bp 141
pGP2441	Lys-2 → Asn; Leu-47 → Leu	A → C; bp 6 T → C; bp 141
pGP2442	Ile-3 → Leu; Glu-50 → Glu	A → C; bp 7 A → G; bp 150
pGP2443	Ile-3 → Thr	T → C; bp 8
pGP2444	Ala-4 → Thr	G → A; bp 10
pGP2445	Ala-4 → Val	C → G; bp 11
pGP2446	Ala-4 → Thr Asn-136 → Ser	G → A; bp 10 A → G; bp 407
pGP2447	His-8 → Arg	A → G; bp 23
pGP2448	Lys-11 → Glu	A → G; bp 31
pGP2449	Asp-23 → Ile +2 AS : Stopp	Δbp 70
pGP2450	Ile-25 → Valin; Arg-127 → Arg	A → G; bp 73 T → C; bp 381
pGP2451	Tyr-22 → Stopp; Thr-37 → Ser	T → A; bp 66 A → T; bp 109
pGP2452	His-29 → Gln	T → A; bp 87
pGP2453	Thr-34 → Ala; Asp-60 → Asn	A → G; bp 100 G → A; bp 178
pGP2454	His-42 → Arg; Gly-122 → Asp; Asn-136 → Ile	A → G; bp 125 G → A; bp 365 A → T; bp 407
pGP2455	Glu-43 → Gly	A → G; bp 128
pGP2456	Gly-58 → Glu	G → A; bp 173
pGP2457	Gly-59 → Arg	G → A; bp 175
pGP2458	Gln-62 → Arg; Leu-74 → Phe	A → G; bp 185 C → T; bp 219
pGP2459	Gln-62 → Arg	A → G; bp 185
pGP2460	Ala-69 → Gly Leu-97 → Ser	C → G; bp 206 T → C; bp 290
pGP2461	Val-75 → Ala	T → C; bp 224
pGP2462	Phe-77 → Leu	T → C; bp 229
pGP2463	Phe-77 → Tyr	T → A; bp 230
pGP2464	Asp-80 → Ala	A → C; bp 238
pGP2465	Pro-81 → Ser	C → T; bp 241

pGP2466	Pro-89 → Ser	C → T; bp 265
pGP2467	Leu-94 → Leu; Val-116 → Met	T → C; bp 280 G → A; bp 346
pGP2468	Leu-115 → Ile	C → A; bp 343
pGP2469	Thr-118 → Ile	C → T; bp 353
pGP2470	Leu-130 → Pro	T → C; bp 389

Tabelle 7.8: Übersicht aller pGP1164 Derivate isoliert nach der Error-Prone PCR von *crh*.

MgsA-Mutante	pGP1164 Derivat	AS Austausch	Basenpaar Austausch	
pGP2442 [Ile3Leu]	pGP2477	Glu7→Val	A → T; bp 20	
	pGP2478	Glu7→Val	A → T; bp 20	
	pGP2483	Ala16→Gly	C → G; bp 47	
	pGP2481	Pro18→Ser	C → T; bp 52	
	pGP2484	Pro18→Ala	C → G; bp 52	
	pGP2479		Ile47→Leu	A → C; bp 139
			Gln15→Gln	A → G; bp 45
	pGP2480	pGP2482	Glu70→Gly	A → G; bp 209
			Glu70→Gly	A → G; bp 209
pGP2444 [Ala4Thr]	pGP2474	Val2→Ala	T → C; bp 5	
		Ala16→Gly	C → G; bp 47	
	pGP2475	Pro18→Ser	C → T; bp 52	
		Gly58→Gly	C → T; bp 174	
pGP2447 [His8Arg]	pGP2476	Ile47→Leu	A → C; bp 139	
	pGP2485	Ile47→Leu	A → C; bp 139	
pGP2464 [Asp80Ala]	pGP2486	Ile47→Leu	A → C; bp 139	
	pGP2487	Ile47→Leu Thr59→Asn	A → C; bp 139 C → A; bp 176	

## 7.4. Messwerte des $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstests

Tabelle 7.9: Originalzahlenwerte der Quantifizierung der Interaktion zwischen den MgsA-Mutanten und Crh.

Zusammenfassung der Originalzahlenwerte der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung sämtlicher MgsA-Einzelmutanten in der exponentiellen Wachstumsphase.

Plasmid	AS Austausch	$\Phi$ LacZ	Abweichung
pGP2440	Lys-2 $\rightarrow$ Asn	86,4	6,18
pGP2441	Lys-2 $\rightarrow$ Asn	66,52	3,51
pGP2442	Ile-3 $\rightarrow$ Leu	63,25	3,14
pGP2443	Ile-3 $\rightarrow$ Thr	54,58	1
pGP2444	Ala-4 $\rightarrow$ Thr	53,44	4,06
pGP2445	Ala-4 $\rightarrow$ Val	148	5,6
pGP2447	His-8 $\rightarrow$ Arg	70,63	4,35
pGP2448	Lys-11 $\rightarrow$ Glu	88,9	3,1
pGP2452	His-29 $\rightarrow$ Gln	67,56	1,47
pGP2455	Glu-43 $\rightarrow$ Gly	54,25	3,45
pGP2456	Gly-58 $\rightarrow$ Glu	73,87	3,83
pGP2457	Gly-59 $\rightarrow$ Arg	87,2	7,05
pGP2459	Gln-62 $\rightarrow$ Arg	130,68	5,58
pGP2461	Val-75 $\rightarrow$ Ala	63,88	3,1
pGP2462	Phe-77 $\rightarrow$ Leu	70,98	6,05
pGP2463	Phe-77 $\rightarrow$ Tyr	66,45	2,39
pGP2464	Asp-80 $\rightarrow$ Ala	69,85	7,58
pGP2465	Pro-81 $\rightarrow$ Ser	71,31	3,39
pGP2466	Pro-89 $\rightarrow$ Ser	120,53	1,89
pGP2468	Leu-115 $\rightarrow$ Ile	70,77	1,06
pGP2469	Thr-118 $\rightarrow$ Ile	79,9	13,72
pGP2470	Leu-130 $\rightarrow$ Pro	89,94	7,37
pGP1175		441,78	44
p25N		71	4,55

Tabelle 7.10: Originalzahlenwerte der Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und Crh.

Zusammenfassung der Originalzahlenwerte der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung der prägnanten MgsA-Einzelmutanten (siehe Tabelle 4.1.) in der stationären Wachstumsphase.

<b>Plasmid</b>	<b>AS Austausch</b>	<b><math>\Phi</math> LacZ</b>	<b>Abweichung</b>
pGP2440	Lys-2 $\rightarrow$ Asn	158,01	84,17
pGP2441	Lys-2 $\rightarrow$ Asn	158,90	40,93
pGP2442	Ile-3 $\rightarrow$ Leu	111,98	44,03
pGP2443	Ile-3 $\rightarrow$ Thr	76,84	10,38
pGP2444	Ala-4 $\rightarrow$ Thr	104,65	22,05
pGP2445	Ala-4 $\rightarrow$ Val	233,20	62,67
pGP2447	His-8 $\rightarrow$ Arg	75,03	3,10
pGP2462	Phe-77 $\rightarrow$ Leu	104,77	11,50
pGP2463	Phe-77 $\rightarrow$ Tyr	98,39	28,22
pGP2464	Asp-80 $\rightarrow$ Ala	74,80	1,94
pGP1175		850,44	57,78
p25N		75	10

Tabelle 7.11: Originalzahlenwerte der Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und MgsA WT.

Zusammenfassung der Originalzahlenwerte der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung der prägnanten MgsA-Einzelmutanten (siehe Tabelle 4.1.) in der exponentiellen Wachstumsphase.

Plasmid	AS Austausch	$\Phi$ LacZ	Abweichung
pGP2440	Lys-2 $\rightarrow$ Asn	117,89	6,55
pGP2441	Lys-2 $\rightarrow$ Asn	183,46	11,5
pGP2442	Ile-3 $\rightarrow$ Leu	250,43	6,16
pGP2443	Ile-3 $\rightarrow$ Thr	160,45	13,59
pGP2444	Ala-4 $\rightarrow$ Thr	150,19	13,96
pGP2445	Ala-4 $\rightarrow$ Val	275,45	9,56
pGP2447	His-8 $\rightarrow$ Arg	255,66	3,15
pGP2462	Phe-77 $\rightarrow$ Leu	140,70	5,00
pGP2463	Phe-77 $\rightarrow$ Tyr	265,51	1,99
pGP2464	Asp-80 $\rightarrow$ Ala	138,92	11,14
pGP1175		686	28,71
p25N		51,28	3,05

Tabelle 7.12: Originalzahlenwerte der Quantifizierung der Interaktion zwischen MgsA-Mutanten und Crh-Mutanten.

Zusammenfassung der Originalzahlenwerte der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung der MgsA-Einzelmutanten (Ile3Leu, Ala4Thr, His8Arg und Asp80Ala) und den kompensatorischen Crh-Mutanten in der exponentiellen Wachstumsphase.

MgsA-Mutante	pGP1164 Derivat	$\Phi$ LacZ	Abweichung
pGP2442 [Ile3Leu]	pGP2478	302,92l	134,54
	pGP2481	293,96	120,92
	pGP2484	711,66	265,50
	pGP2485	592,99	96,72
	pGP2480	321,34	110,52
	pGP1164	60	28
pGP2444 [Ala4Thr]	pGP2483	495,20	37,04
	pGP2481	481,77	9,98
	pGP2484	437,76	58,39
	pGP2485	776,90	105,19
	pGP1164	52	16
pGP2447 [His8Arg]	pGP2486	228,36	99,05
	pGP1164	55	11
pGP2464 [Asp80Ala]	pGP2486	225,06	98,35
	pGP1164	45	13
pGP1175 [MgsA-WT]	pGP1164	772	183

## 7.5. Massenspektrometrische Analyse der MgsA und Crh Vernetzung

Tabelle 7.13: Überblick über die intramolekularen Protein-Vernetzungen der Probe Bottom 100.

Zusammenfassung der bei der Massenspektrometrie identifizierten Peptide die auf eine intramolekulare Verlinkung von Crh und MgsA hindeuten.

Protein	AS 1	AS 2	Peptid 1	Peptid 2
Crh	K5	K37	FTSDVFLEK*DGK	MVQQK*VEVR
Crh	K5	K37	FTSDVFLEK*DGKK	MVQQK*VEVR
Crh	K5	K40	MVQQK*VEVR	DGK*K
Crh	K37	K40	FTSDVFLEK*DGK*K	
Crh	K5	K41	MVQQK*VEVR	K*VNAK
Crh	K5	K41	VQQK*VEVR	K*VNAK
Crh	K37	K41	FTSDVFLEK*DGK	K*VNAK
MgsA	K12	K10	K*QDMVQFTTAYR	IALIAHDK*K

\* markiert sind die vernetzten Lysinreste der identifizierten Peptide

Tabelle 7.14: Überblick über die intramolekularen Protein-Vernetzungen der Probe Top 50. Zusammenfassung der bei der Massenspektrometrie identifizierten Peptide die auf eine intramolekulare Verlinkung von Crh und MgsA hindeuten.

Protein	AS 1	AS 2	Peptid 1	Peptid 2
Crh	K5	K41	MVQQK*VEVR	K*VNAK
Crh	K11	K40	LK*TGLQARPAALFVQEA	DGK*K
Crh	K37	K40	FTSDVFLEK*DGK*K	
MgsA	K12	K10	K*QDMVQFTTAYR	IALIAHDK*K
MgsA	K10	K11	IALIAHDK*K*K	

\* markiert sind die vernetzten Lysinreste der identifizierten Peptide

Tabelle 7.15: Überblick über die intermolekularen Protein-Vernetzungen der Probe Top 50. Zusammenfassung der bei der Massenspektrometrie identifizierten Peptide die auf eine intermolekulare Verlinkung von Crh und MgsA hindeuten.

Protein [AS]		Protein [AS]		Peptid 1	Peptid 2
MgsA	K12	Crh	K40	K*QDMVQFTTAYR	DGK*K
MgsA	K12	Crh	K40	KK*QDMVQFTTAYR	DGK*K
MgsA	K12	Crh	K41	K*QDMVQFTTAYR	K*VNAK
MgsA	K10	Crh	K40	IALIAHDK*K	DGK*K

\* markiert sind die vernetzten Lysinreste der identifizierten Peptide

Tabelle 7.16: Überblick über die intramolekularen Protein-Vernetzungen der Probe Top 100. Zusammenfassung der bei der Massenspektrometrie identifizierten Peptide die auf eine intramolekulare Verlinkung von Crh und MgsA hindeuten.

Protein	AS 1	AS 2	Peptid 1	Peptid 2
Crh	K5	K41	MVQQK*VEVR	K*VNAK
Crh	K11	K40	LK*TGLQARPAAL	DGK*K
Crh	K37	K40	SDVFLEK*DGK*K	
MgsA	K10	K12	IALIAHDK*K	K*QDMVQ
MgsA	K10	K11	IALIAHDK*K*K	
MgsA	K2	K12	SSSMK*IALIAHD	K*QDMV
MgsA	K40	K10	TGTTGLK*IHEATGL	LIAHDK*K

\* markiert sind die vernetzten Lysinreste der identifizierten Peptide

Tabelle 7.17: Überblick über die intermolekularen Protein-Vernetzungen der Probe Top 100. Zusammenfassung der bei der Massenspektrometrie identifizierten Peptide die auf eine intermolekulare Verlinkung von Crh und MgsA hindeuten.

Protein [AS]		Protein [AS]		Peptid 1	Peptid 2
MgsA	K12	Crh	K40	K*QDMVQFTTAYR	DGK*K
MgsA	K12	Crh	K41	K*QDMVQFTTAYR	K*VNAK
MgsA	K10	Crh	K40	IALIAHDK*KK	DGK*K
MgsA	K10	Crh	K40	IALIAHDK*K	DVFLEKDGK*K
MgsA	K10	Crh	K41	IALIAHDK*K	K*VNAK
MgsA	K11	Crh	K40	K*KQDMVQFTTAYR	DGK*K

\* markiert sind die vernetzten Lysinreste der identifizierten Peptide



## 7.6. Materialien

### 7.6.1. Chemikalien

Tabelle 7.18: Häufig verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Firma
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ammoniumacetat	Sigma, München
Ammoniumeisen(III)citrat	Sigma, München
Ammoniumpersulfat	Sigma, München
Antibiotika	Sigma, München
BSA	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Blockingreagenz	Roche Diagnostics, ManNhelm
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Casein, sauer hydrolysiert	Sigma, München
CDP*	Roche Diagnostics, ManNhelm
Coomassie Brilliant Blue, R350	Amersham, Freiburg
D(+)-Glukose	Merck, Darmstadt
Desthiobiotin	Iba, Göttingen
Dihydroxyacetonphosphat	Sigma, München
Dinitrophenylhydrazin	Sigma, München
DMSO	Sigma, München
dNTPs	Roche Diagnostics, ManNhelm
DTT	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Sigma, München
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Oxoid, Heidelberg
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Iod-Kaliumjodidlösung nach Lugol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid	Peqlab, Erlangen
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt

---

Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Malat	Sigma, München
Methylglyoxal	Sigma, München
Magermilchpulver, fettfrei	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Sigma, München
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Natriumsuccinat	Fluka, Buchs, Schweiz
Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose Superflow	Qiagen, Hilden
Nutrient Broth	Merck, Darmstadt
o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid	Sigma, München
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Ribose	Sigma, München
Roti <sup>®</sup> -Quant	Roth, Karlsruhe
Stärke	Sigma, München
<i>Strep</i> -Tactin Sepharose	Iba, Göttingen
TEMED	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Trypton	Oxoid, Heidelberg
Tween20	Sigma, München
X-Gal	Roth, Karlsruhe

---

Alle sonstigen verwendeten allgemeinen Chemikalien wurden von Merck, Serva, Fluka, Sigma oder Roth in p.a. Qualität bezogen.

## 7.6.2. Hilfsmittel

Tabelle 7.19: Im Labor verwendete Hilfsmittel.

Chemikalie	Firma
96-Well-Platten	Bio-Rad Laboratoies GmbH, München
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson Drogheda, Irland
Eppendorfgefäße	Greiner, Nürtingen
Falcon-Tubes	Sarstedt, Nürmbrecht
Gene Amp Reaction Tubes (PCR)	Perkin Elmer, Weiterstadt
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glimmer	Plano GmbH, Marburg
Halbmikroküvetten aus Kunststoff	Greiner, Nürtingen
Kunststoffpetrischalen	Greiner, Nürtingen
Membranfilter	Schleicher und Schüll, Dassel
NC45 (0,2µm Porengröße)	
Mikroliterpipetten (2µl, 20µl, 200µl, 1000µl, 5000µl)	Gilson, Düsseldorf Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nürmbrecht
Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nürmbrecht
Nylonmembran, positiv geladen	Roche Diagnostics, Mannheim
Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen
Poly-Prep Chromatography Columns	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spektralkohle	Ringsdorff, Bonn-Bad Godesberg
Zentrifugenbecher	Beckmann, München

### 7.6.3. Geräte und Apparaturen

Tabelle 7.20: Geräte und Apparaturen.

Gerät	Firma
Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Biofuge fresco	Heraeus Christ, Osterode
Blottingapparatur VacuGene™XI	Amersham, Freiburg
Brutschrank	New Brunswick Scientific, USA
Chemilumineszenzsystem	Peqlab, Erlangen
ChemiSmart	
DNA-Gelelektrophorese	Peqlab, Erlangen
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektronenmikroskop	Philips, Amsterdam
Feinwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen
French Press	Spectonic Unicam, England SLM Aminco, New York (USA) Jetzt betreut von (Fa. G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd)
Geldokumentationsanlage Geldoc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophoreseapparaturen	Waasetec, Göttingen EasyCast™ Minigelsystem, Peqlab, Erlangen
Heizblock Dri Block DB3	Waasetec, Göttingen
Horizontalschüttler 3006	GFL, Burgwedel
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Kugelmühle	Sartorius, Göttingen
Kühlzentrifuge	Heraeus Christ, Osterode
Kulturschüttler Innova 2300	New Brunswick, Neu-Isenburg
Kulturschüttler-Inkubator Innova 42	New Brunswick, Neu-Isenburg
Kulturschüttler-Inkubator Innova 44	New Brunswick, Neu-Isenburg
LabCycler	SensorQuest, Göttingen
Lumineszenzgerät	Peqlab, Erlangen
Magnet-Heizrührer	JAK Werk, Staufen
Magnetrührer	Ika, Staufen
Mikroprozessor pH-Meter Calimatic	Knick, Berlin
Mikrowelle	Bosch

Nanodrop ND-1000	Privileg
Spannungsgerät	Thermoscientific, Bonn
	Bio-Rad Laboratories California (USA)
	Biometra, Göttingen
	Pharmacia, Rochester (USA)
SpeedVac Concentrator Savant SPD 111V	Thermo Scientific, Bonn
Spektralphotometer Ultraspec 2000	Amersham, Freiburg
Sterilbank Herasave	Heraeus, Hanau
Superdex S200 16/600	GE Healthcare, München
Thermoblock	Waase, Göttingen
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen
LabCycler	SensorQuest, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Darmstadt
Ultraschallgerät Labsonic U	Braun, Melsungen
Ultrazentrifuge Sorvall Ultra Pro 80	Thermoscientific, Bonn
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Amsterdam
Vertikalgelelektrophoreseapparatur	Bio-Rad Laboratories, California
Mini Protean III System	USA
Vortex	Bender und Hobein, Bruchsal
Waage Sartorius universal	Sartorius, Göttingen
Wasserschüttelbad Innova 3100	New Brunswick, Neu-Isenburg
Wasservollentsalzanlage	Millipore, Schwalbach
Western Blot-Apparatur	Eigenbau
	G&P, Kassel
	Peqlab, Erlangen
Zell disruptionssystem	Constant Systems, UK
Zentrifuge	Beckman, München
	Eppendorf, Darmstadt
	Heraeus, Osterode
	Thermo Scientific, Bonn

### 7.6.4. Kommerziell erhältliche Systeme

Tabelle 7.21: Kommerziell erhältliche Systeme.

System	Firma
Gene Ruler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNeasy Blood & Tissue Kit 50	Qiagen, Hilden
High Pure RNA isolation kit	Roche Diagnostics, Mannheim
iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green	Bio-Rad Laboratories, California (USA)
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Nucleospin	Macherey-Nagel, Düren
Nylonmembran	Roche Diagnostics, Mannheim
Prestained Protein Marker	NEB Biolabs, Frankfurt am Main
PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories, California (USA)
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden
Unstained Protein Marker	NEB Biolabs, Frankfurt am Main

### 7.6.5. Proteine und Enzyme

Tabelle 7.22: Proteine und Enzyme.

Protein oder Enzym	Firma
Accuzyme-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Ampligase	Epicentre, Medison (USA)
Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente	Roche Diagnostics, ManNheim
DNase I	Roche Diagnostics, ManNheim
DNase I (RNase free)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
FastAP™	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym aus Hühnereiweiß (178000 U/mg)	Merck, Darmstadt
Pfu-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion™ DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo Finnland
RNase A	Roche Diagnostics, ManNheim
Restriktionsendonukleasen	NEB Biolabs, Frankfurt am Main MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Calf-Intestinal-Alkaline-Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, ManNheim
T7-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, ManNheim
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, ManNheim
Accuzyme-Polymerase	Bioline

## 7.6.6. Verwendete Internetangebote und Computerprogramm

Tabelle 7.23: Genutzte Internetangebote.

URL	Anbieter	Anwendung
<a href="http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/">http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/</a>	Institut Pasteur, Paris	Sequenzrecherche im Genom von <i>B. subtilis</i>
<a href="http://www.subtiwiki.uni-goettingen.de/">http://www.subtiwiki.uni-goettingen.de/</a>	AG Stülke, Georg August Universität Göttingen	Literaturrecherche zu <i>B. subtilis</i>
<a href="http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html">http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html</a>	University of Pittsburgh, USA	Berechnung der Schmelztemperatur von Primern
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	National Institutes of Health, Bethesda, USA	Literaturrecherche
<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php">http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php</a>	New England BioLabs	Erkennung von Restriktionsschnittstellen
<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>	European Bioinformatics Institute	Erstellen von Alignments
<a href="http://microbesonline.org/">http://microbesonline.org/</a>	Virtual Institute for Microbial Stress and Survival	Informationen über Gene verschiedener Prokaryoten
<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>	Uniprot Consortium	Sequenzen von Proteinen Blastanalysen Informationen über Proteine
<a href="http://bsubcyc.org/">http://bsubcyc.org/</a>	SRI International	Informationen über Gene von <i>B. subtilis</i>
<a href="http://ecocyc.org/">http://ecocyc.org/</a>	SRI International	Informationen über Gene von <i>E. coli</i>
<a href="http://www.pdb.org">http://www.pdb.org</a>	RCSB	Proteindatenbank
<a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a>	SIB Swiss Institute of Bioinformatics	Berechnung von Proteineigenschaften

Zusammenfassung der genutzten Internetangebote.



Tabelle 7.24: Genutzte Computerprogramme.

URL	Anbieter	Anwendung
Adobe® Photoshop® CS	Adobe	Text- und Datenverarbeitung
Bio1D	Vilber Lourmat	Auswertung von Chemilumineszenzsignalen
ChemoStar Aufnahmesoftware	Intas	Auswertung von Chemilumineszenzsignalen
CorelDraw Suite	Corel Corporation	Grafikherstellung
EditSeq™ 5.07	DNASTAR	Auswertung von Sequenzierdateien
Image J	NIH	Quantifizierung von Western Blots
Microsoft Office XP	Microsoft Inc.	Bildverarbeitung
Mendeley		Literaturrecherche und -verwaltung
Pymol	DeLano Scientific LLC, Schrödinger	Darstellung von 3D-Proteinstrukturen
SegMan™ II 5.07	DNASTAR	Auswertung von Sequenzierdateien
Swiss-pdb viewer v4.0.4	SIB Swiss Institute of Bioinformatics	Darstellung von 3D-Proteinstrukturen
VectorNTI	Invitrogen	Konstruktion von Plasmiden und Klonierungsstrategien

Zusammenfassung der genutzten Computerprogramme.

## *Curriculum vitae*

---



---

Christopher Zschiedrich  
 Leinestr. 18  
 D-37073 Göttingen, Germany  
 Date of Birth: 05.09.1984 Halle (Saale)  
 Phone: +49-(0)176/83017746  
 E-Mail: [czschie@gwdg.de](mailto:czschie@gwdg.de)

### **Experiences**

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 07/2011-present | <b>Ph.D. thesis</b> at the Department of General Microbiology, Georg-August University of Göttingen in the group of Prof. Dr. Jörg Stülke<br><i>"Functional characterization of the crh operon in Bacillus subtilis"</i><br><b>Strain development, Directed mutagenesis, qRT-PCR, Protein purification, Cross linking of Proteins, Western Blot, Gel filtration, Protein Crystallization</b>  |
| 01/2010-09/2010 | <b>Diploma thesis</b> at the Department of General Microbiology, Georg-August University of Göttingen in the group of Prof. Dr. Jörg Stülke<br><i>"Mutationsanalyse des Antiterminationsproteins GlcT aus Bacillus subtilis"</i> ( <i>"Mutational analysis of the antiterminator GlcT in Bacillus subtilis"</i> )<br><b>Strain development, Directed mutagenesis, Reportergene fusions, Protein fusions, Protein purification, Western Blot</b> |
| 10/2005-09/2010 | Study of Biology, Georg-August University of Göttingen<br>Subjects: <b>Microbiology</b> (major subject)<br><b>Human genetics</b> (minor subject)<br><b>Immunology</b> (minor subject)   |
| 08/2002-07/2004 | Christian-Wolff-Gymnasium, Halle (Saale)<br><b>"Abitur"</b> allows access to study at the university  |

### **Experiences abroad**

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 12/2012-05/2011 | Internship at DSM Nutritional Products, Kaiseraugst, Switzerland<br>Improving recombinant expression systems in <i>Bacillus subtilis</i><br><b>Protein fusions, Protein purification, Western Blot, Enzyme assays, Reportergene fusions</b> |
| 08/2001-07/2002 | Lapeer West High School, Lapeer Michigan, USA<br><b>"High School Diploma"</b>   |

**Skills****Languages**

German **mother tongue**  
 English **very good oral and written**  
 French basic knowledge

**IT**

Seqman/Chromas/**Vector NTI (sequence analysis)**  
**Axio Vision** (image editing, microscopy)  
**Adobe Photoshop** (image editing)  
 Microsoft Office (word, power point and excel)

**Soft Skills**

**Global Leadership** in the Knowledge Society  
**Competence development**  
**Student Representative** at the GGNB  
 Learning Skills  
 Effective scientific communication

**Technical Expertise****Micro-and  
Biomolecular**

conventional PCR, qRT-PCR, Combined Chain reaction, Error prone PCR, Long Flanking Homology-PCR, directed mutagenesis  
 Cloning (Cre-lox, TOPO TA, reporter gene fusions [lacZ, GFP], construction of vectors and protein fusions)  
 Strain development (bacterial, eukaryote)  
 Gene manipulation, transposon mutagenesis  
 Northern Blot, southern Blot  
 Bacterial, Yeast Two/Three Hybrid-Analyses

**Biochemical**

Overproduction and purification of proteins via affinity chromatography (His-Tag, Strep-Tag, GST-Tag), epigenetic tags (FLAG)  
 Protein analysis (Ultracentrifugation, chemical Cross linking of proteins *in vivo* and *in vitro* with novel crosslinker, Western Blot, EMSA)  
 Denaturing and native (Blue) gelelectrophoresis  
 Enzyme assays and kinetics  
 Gel filtration, crystallization and mass spectrometry

## Publications

Karstens K.\*, **Zschiedrich CP.\***, Bowien B., Stülke J., Görke B., **2014**  
Phosphotransferase protein EIIA<sup>Ntr</sup> interacts with SpoT, a key enzyme of the stringent response, in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*. 160(Pt 4):711-22

Michna RH., Commichau FM., Tödter D., **Zschiedrich CP.**, Stülke J., **2013**  
*SubtWiki*-a database for the model organism *Bacillus subtilis* that links pathway, interaction and expression information. *Nucleic Acids Res.* 42(Database issue):D692-8

Himmel S.\*, **Zschiedrich CP.\***, Becker S.\*, Hsiao HH., Wolff S., Diethmaier C., Urlaub H., Lee D., Griesinger C., Stülke J., **2012**

Determinants of interaction specificity of *Bacillus subtilis* GlcT antitermination protein: functionality and phosphorylation specificity depend on the arrangement of the regulatory domains. *J Biol Chem.* 287(33):27731-42

\*ex aequo

## Teaching experiences

2013	<p><b>Bachelor thesis</b> "Genomminimierung in <i>Bacillus subtilis</i>: Konsequenzen des Verlustes des Citratzyklus" ("Minimizing the genome of <i>Bacillus subtilis</i>: essentiality of the citric acid cycle")</p>
2012/2013	<p><b>Bachelor thesis</b> "Charakterisierung der Interaktion zwischen SpoT und EIIA<sup>Ntr</sup> aus <i>Ralstonia eutropha</i>" ("Characterization of the interaction of SpoT and EIIA<sup>Ntr</sup> in <i>Ralstonia eutropha</i>")</p>
2012	<p><b>Bachelor thesis</b> "Charakterisierung der Interaktionsfläche zwischen der Methylglyoxalsynthase A mit dem Phosphotransferaseprotein Crh in <i>Bacillus subtilis</i>" ("Characterization of the interaction surface of the methylglyoxal synthase A and the Carbon-flux regulating HPr in <i>Bacillus subtilis</i>")</p>
2012	<p>Internship: "Overproduction and activity assay of MgsA"</p>
2011/2012	<p><b>Bachelor thesis</b> "Identifizierung der für die Interaktion mit Crh wichtigen Aminosäuren in der Interaktionsfläche von MgsA in <i>Bacillus subtilis</i>" ("Identification of amino acid residues within MgsA responsible for the interaction with Crh in <i>Bacillus subtilis</i>")</p>

**Contribution to conferences (Posters)**

- 2013 | 7th Conference on Functional Genomics of Gram-positive Microorganisms- 17th International Conference on Bacilli, Montecatini Terme, Italy  
**“Molecular determination of the interaction surface of the carbon flux regulator Crh and the methylglyoxal synthase MgsA in *Bacillus subtilis*”**
- 2013 | Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Bremen, Germany  
**“The interaction surface of the carbon flux regulator Crh and the methylglyoxal synthase MgsA in *Bacillus subtilis*”**
- 2012 | Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Tübingen, Germany  
**“Insight into the (de)phosphorylation of the phospho-transferase proteins HPr and Crh in *Bacillus subtilis*”**

**Contribution to conferences (Talks)**

- 2014 | The PTS celebrates 50 years of transport and regulation, Göttingen, Germany  
**“Insights into binding of the carbon flux regulator Crh to the Methylglyoxal synthase MgsA in *Bacillus subtilis*”**