

Molekularbiologische Charakterisierung  
des Glukose-Phosphotransferase-System  
Regulators MtfA aus *Escherichia coli* K-12

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt beim  
Fachbereich Chemie/Biologie  
Arbeitsgruppe Genetik  
der Universität Osnabrück

von  
Ariane Staab  
März 2007

1. Gutachter: PD. Dr. K. Jahreis
2. Gutachter: Prof. Dr. K. Altendorf

## I Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Einführung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Phosphotransferase Systeme (PTS).....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Das Glukose-PTS .....</b>	<b>2</b>
1.3.1 MCP und PTS vermittelte Chemotaxis in <i>E.coli</i> .....	5
1.3.2 Der Glukosetransporter EIICB <sup>Glc</sup> .....	7
1.3.3 Geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Phosphorylierungskaskade des Glukose-PTS.....	7
1.3.4 Die Regulation des Genes <i>ptsG</i> .....	8
<b>1.4 Der Repressor Mlc.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Das Protein MtfA („Mlc titration factor A“) .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Stämme, Plasmide, Medien, Chemikalien .....</b>	<b>17</b>
2.1.1 verwendete Stämme.....	17
2.1.2 verwendete Vektoren.....	18
2.1.3 verwendeten Oligonukleotide.....	20
2.1.4 Chemikalien und Enzyme.....	23
2.1.5 Verwendete Medien.....	23
2.1.5.1 Minimalmedium (MM).....	23
2.1.5.2 Vollmedien (LBo, LB, 2xTY und MacConkey) .....	23
2.1.5.3 Medien für Glyzerinkulturen .....	24
2.1.5.4 Che - LT Platten 1% .....	24
2.1.5.5 Chemotaxis-Schwärmplatten.....	24
2.1.5.6 P1-Weichagar .....	24
2.1.5.7 Hefe-Medien.....	24
2.1.5.8 Antibiotikazusätze .....	25
2.1.5.9 IPTG / X-Gal .....	25

2.1.5.10 Anzucht von Bakterienstämmen.....	26
2.1.6 Häufig verwendete Puffer.....	26
<b>2.2 Allgemeine Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.2.1 Bakterienanzucht und Bestimmung der Zellzahl.....	27
2.2.2 Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration .....	27
2.2.3 Silberfärbung .....	27
<b>2.3 Genetische Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.3.1 P1-Transduktion .....	28
2.3.2 Transformation .....	28
2.3.2.1 Präparation kompetenter <i>E.coli</i> Zellen .....	28
2.3.2.2 DNA Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen.....	29
2.3.2.3 Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation .....	29
2.3.3 Blau-Weiß Selektion .....	29
<b>2.4 Gelelektrophoresen.....</b>	<b>30</b>
2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese .....	30
2.4.1.1 Analytische Agarosegele .....	30
2.4.1.2 Präparative Agarosegele .....	30
2.4.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
2.4.3 Native Gelelektrophorese .....	31
2.4.4 Wachstumskompetitionsversuche .....	31
<b>2.5 DNA und RNA Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.5.1 Isolierung extrachromosomaler DNA .....	32
2.5.2 Isolierung chromosomaler DNA .....	32
2.5.3 Isolierung von Gesamt-RNA und DNase Verdau .....	32
2.5.4 cDNA Synthese .....	32
2.5.5 DNA Restriktion.....	33
2.5.6 DNA Behandlung mit „Antarktischer Phosphatase“.....	33
2.5.7 „Klenow-Behandlung“ von DNA Fragmenten .....	33
2.5.8 Ligation von DNA Fragmenten.....	33
2.5.9 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.5.10 DNA Sequenzierung.....	34
2.5.11 Reverse Transkriptions Real Time PCR ( RT-RT PCR).....	34
2.5.12 Ortsgerichtete Mutagenese .....	35

2.5.13 Unspezifische Mutagenese .....	35
<b>2.6 Methoden zur Analyse von Proteinen.....</b>	<b>36</b>
2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	36
2.6.2 Western-Blot.....	36
2.6.3 Quantitativer $\beta$ -Galaktosidase Nachweis.....	36
2.6.4 Proteinreinigung .....	37
2.6.4.1 Reinigung von MtfA.....	37
2.6.4.2 Reinigung des Proteins Mlc.....	38
2.6.5 Dialyse .....	39
2.6.6 Entsalzung mit Hilfe der „HiTrap™ Desalting“ Säulen .....	39
2.6.7 Gelfiltration .....	39
2.6.8 Hefe Di-Hybrid System .....	39
2.6.8.1 Herstellung von Rohextrakten aus Hefekulturen.....	40
2.6.8.2 Quantitativer Nachweis der Protein-Protein Wechselwirkung mittels Bestimmung der $\beta$ - Galaktosidase Aktivität .....	40
2.6.9 bakterielles Di-Hybrid System .....	41
2.6.10 “Electrophoretic Mobility Shift Assays” (EMSA).....	42
2.6.11 Bioinformatische Analysen .....	43
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Genetische Charakterisierung von MtfA .....</b>	<b>44</b>
3.1.1. Erstellung eines Domänen-Modells für das Protein MtfA .....	45
3.1.1.1 Identifikation hochkonservierter AS von MtfA.....	45
3.1.1.2 Übersicht der durchgeführten Aminosäuresubstitutionen in MtfA .....	48
3.1.1.3 Darstellung des Testsystems LZ150F’:: $\emptyset$ ( <i>ptsG<sub>op</sub>-lacZ</i> ).....	50
3.1.1.4 Unspezifische Mutagenese von <i>mtfA</i> .....	51
3.1.1.5 Proteinnachweis der MtfA-Mutanten .....	52
3.1.1.6 Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen Mlc und den MtfA-Mutanten .....	54
3.1.1.7 Domänen-Modell von MtfA.....	56
3.1.2 Untersuchungen zur Funktion des carboxyterminalen Bereiches von MtfA .....	57
3.1.2.1 Klonierung des carboxyterminalen MtfA $\Delta$ 1-131 in den Expressionsvektor pTM3058	
3.1.2.2 Wechselwirkung zwischen Mlc und dem carboxyterminalen MtfA $\Delta$ 1-131 .....	59
3.1.2.3 Unspezifische Mutagenese des Proteins MtfA $\Delta$ 1-131 .....	60

3.1.2.4 Kopplung des Proteins MtfA $\Delta$ 1-131 an die Plasmamembran.....	60
3.1.2.4.1 Klonierung der entsprechenden Vektoren .....	60
3.1.2.5 Nachweis des membranständigen GFPs mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	62
3.1.2.6 Analyse des TMI,II-MtfA $\Delta$ 1-131.....	64
3.1.3 Untersuchungen zur Funktion des aminoterminalen Bereiches von MtfA .....	66
3.1.3.1 Untersuchung der Dimerisierung mit Hilfe des Hefe Di-Hybrid Systems.....	68
3.1.3.1.1 Konstruktion der verwendeten Vektoren.....	68
3.1.3.1.2 Analyse der Hefe Di-Hybrid Konstrukte.....	68
3.1.3.2 Analyse der MtfA-Dimerisierung mit Hilfe des bakteriellen LexA Di-Hybrid Systems.....	71
3.1.3.2.1 Konstruktion der Vektoren für das bakterielle Di-Hybrid System.....	72
3.1.3.2.2 Analyse der MtfA-Dimerisierung mit Hilfe des bakteriellen Di-Hybrid Systems.	73
3.1.4 Genetischer Nachweis der Interaktion zwischen Mlc und MtfA .....	74
3.1.4.1 Klonierung und Analyse der Vektoren pMM3 und pDM3 .....	74
3.1.5 Überprüfung des MtfA-Modells mit Hilfe des bakteriellen Di-Hybrid Systems .....	76
3.1.5.1 Klonierung und Analyse des carboxyterminalen MtfA-Fragmentes.....	76
3.1.5.2 Nachweis der Wechselwirkung zwischen Mlc und verschiedenen MtfA-Mutanten im bakteriellen Di-Hybrid System.....	77
3.1.6 Western-Blot Analyse der in Kapitel 3.1.3-3.1.6 verwendeten Proteine .....	80
3.1.7 Einfluss von EIIB <sup>Glc</sup> und EIIB* <sup>Glc</sup> auf die Wechselwirkung von MtfA mit dem Repressor Mlc.....	81
3.1.7.1 Klonierung der Vektoren pTMB5-8 .....	83
3.1.7.2 Analyse der Auswirkung der gemeinsamen Expression von EIIB* <sup>Glc</sup> und MtfA auf die Wechselwirkung mit Mlc .....	84
3.1.7.3 Nachweis der Proteine EIIB <sup>Glc</sup> , EIIB* <sup>Glc</sup> und MtfA im Western-Blot.....	85
<b>3.2 Physiologische Charakterisierung des Proteins MtfA – wie wird der Regulator MtfA reguliert ? .....</b>	<b>88</b>
3.2.1 Hat MtfA eine Auswirkung auf die Chemotaxis ? .....	89
3.2.1.1 Versuche zum Einfluss des Proteins MtfA auf das PTS und MCP Chemotaxisverhalten von <i>E.coli</i> K-12 .....	90
3.2.2 Untersuchungen zu den Promotoreigenschaften des Gens <i>mtfA</i> .....	93
3.2.2.1 Klonierung der Vektoren .....	94
3.2.2.2. Charakterisierung der Promotoren aus pKMS1-3 .....	95

3.2.3 Wachstumskompetitionsversuche zum Vergleich des MtfA-Wildtypstammes LJ200 mit einer isogenen MtfA-Mutante .....	97
3.2.3.1 Anzucht in unterschiedlichen Medien .....	98
3.2.3.2 Anzucht unter verschiedenen Temperaturbedingungen .....	101
3.2.3.2.1 Vollmedium .....	101
3.2.3.2.2 Minimalmedien.....	102
3.2.3.3 Anzucht unter Sauerstofflimitierung .....	104
3.2.4 Nachweis der Genexpression sowie der Proteinmenge von MtfA unter verschiedenen Wachstumsbedingungen in den Stammhintergründen K-12 und LJ110 .....	106
3.2.4.1 Analyse der <i>mtfA</i> Expression mittels RT-RT PCR.....	107
3.2.4.2 Analyse der MtfA-Mengen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen in den Stämmen K-12 und LJ110.....	108
3.2.5 Charakterisierung der mRNA Stabilität der <i>ptsG<sub>op</sub>-lacZ</i> Fusion mittels „Reverser Transkriptase-Real Time PCR“ (RT-RT PCR) .....	110
3.2.5.1 Optimierung der RNA Isolierung .....	110
3.2.5.2 Die <i>ptsG<sub>op</sub>-lacZ</i> Fusion.....	112
3.2.5.3 Optimierung der <i>ptsG</i> -PCR .....	113
3.2.5.4 Optimierung der <i>lacZ</i> -PCR.....	115
3.2.5.5 Vergleich der <i>ptsG</i> Expressionsniveaus in den Stämmen LJ110, LZ110 und LZ110/F' unter verschiedenen Wachstumsbedingungen .....	116
3.2.5.6 Vergleich der <i>ptsG</i> - und <i>lacZ</i> -Transkriptstabilität beim Wachstum auf Glukose und $\alpha$ -Methylglukose.....	118
<b>3.3 Biochemische Charakterisierung von MtfA .....</b>	<b>121</b>
3.3.1 Reinigung der Proteine MtfA und Mlc.....	122
3.3.1.1 Reinigung des Proteins MtfA .....	122
3.3.1.2 Reinigung des Proteins Mlc.....	127
3.3.2 Herstellung spezifischer Antikörper gegen MtfA und Mlc in Kaninchen.....	128
3.3.2.1 Generelle Vorgehensweise .....	128
3.3.2.2. Optimierung der Antikörper im Western-Blot .....	129
3.3.2.2.1 Optimierung der MtfA-Antikörper für die Western-Blot Analyse.....	129
3.3.2.2.2 Optimierung der Mlc-Antikörper für die Western-Blot Analyse .....	130
3.3.3 Nachweis der Dimerisierung von MtfA .....	131
3.3.3.1 Native Gelelektrophorese .....	131
3.3.3.2 SDS-Gelelektrophorese .....	133

3.3.3.3 Electrospray-Ionisation (ESI) .....	133
3.3.4 Kalibrierung der Gelfiltrationschromatographiesäule Superdex™ 200 10/300 GL ..	134
3.3.4.1 Nachweis des MtfA-Dimers mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie .....	135
3.3.5 Nachweis der Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA mittels Gelfiltrations- chromatographie .....	136
3.3.6 Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) .....	138
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>140</b>
<b>4.1 Charakterisierung der funktionellen Domänen von MtfA .....</b>	<b>141</b>
<b>4.2 Die Mlc-MtfA Wechselwirkung – ein weit verbreiteter Mlc- Inaktivierungsmechanismus ? .....</b>	<b>144</b>
<b>4.3 MtfA: ein Mlc Regulationsfaktor unter Hitzeschockbedingungen und beim Wachstum auf Glukose ? .....</b>	<b>151</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>157</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>158</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>159</b>

## II Abbildungsverzeichnis

Abb.1.3.1 Das Glukose-Phosphotransferase System (PTS).....	4
Abb.1.3.2 schematische Darstellung der PTS- und MCP-Chemotaxis in <i>E.coli</i> .....	5
Abb.1.3.3 Domänenstruktur der MCPs. Abbildung verändert nach (99).....	6
Abb. 1.3.4 Computersimulation zur Auswirkung der Menge von EIICB <sup>Glc</sup> auf den Phosphorylierungszustand von EIIA <sup>Glc</sup> und auf das PEP-Pyruvat Verhältnis. ....	8
Abb.1.3.5 Regulation der Expression des <i>ptsG</i> -Gens. ....	9
Abb.1.3.6 Promotor-Operatorbereich von <i>ptsG</i> . ....	10
Abb.1.3.7 Abbau der <i>ptsG</i> -mRNA durch das SgrR/SgrS System (vereinfachte, schematische Darstellung; verändert nach Vanderpool und Gottesmann 2004 (105)).....	11
Abb.1.4.1 Kristallstruktur Mlc Monomer und Mlc Dimer verändert nach Schiefner et al. (86)...	13
Abb.1.5.1 Anordnung von <i>mtfA</i> und seiner benachbarten Gene im <i>E.coli</i> Genom.....	14
Abb.1.5.2 MtfA-Ausgangsmodell .....	15
Abb.2.6.1 verwendetes Programm für die Affinitätschromatographie mittels „HisTrap <sup>TM</sup> FF“ Säulen Reinigung.....	38
Abb.2.6.2 verwendetes Gradienten Programm für die Anionenaustauschchromatographie mittels Mono- Q <sup>TM</sup> 5/50 GL.....	38
Abb.3.1.1 „BLAST Tree“ des MtfA Proteins .....	45
Abb.3.1.2 Aminosäuresequenzvergleich von MtfA .....	46
Abb.3.1.3 Testsystem zur Quantifizierung der MtfA-Mlc Wechselwirkung.....	51
Abb.3.1.4 Western-Blot Analyse der MtfA-Mutanten.....	53
Abb.3.1.5 Darstellung der $\beta$ -Galaktosidase Test Ergebnisse .....	55
Abb.3.1.6 Domänen-Modell von MtfA .....	57
Abb.3.1.7 Klonierungsstrategie des Vektors pTBY57 .....	58
Abb.3.1.8 Western-Blot Analyse von MtfA $\Delta$ 1-131 .....	59
Abb.3.1.9 Ergebnisse des $\beta$ -Galaktosidase Tests. ....	59
Abb.3.1.10 zeigt die Klonierung des Vektors pBTS2.....	61
Abb.3.1.11 zeigt die Analyse der verschiedenen GFP-Fusionen mittels Fluoreszenzmikroskopie. ....	63
Abb.3.1.12 Western-Blot Analyse der GFP-Proben.....	64
Abb.3.1.13 zeigt die Ergebnisse des $\beta$ -Galaktosidase Tests des <i>tmfrg</i> Gens im Teststamm LZ150/F <sup>'</sup> ::( <i>ptsG</i> <sub>op</sub> - <i>lacZ</i> ) unter den oben erläuterten Bedingungen.....	65
Abb.3.1.14 „Helix-Wheel“ Modell der leuzinreichen MtfA-Region. ....	67



Abb.3.1.15 Ergebnisse der Plattentests des Hefe Di-Hybrid Systems. ....	69
Abb.3.1.16 quantitativer $\beta$ -Galaktosidase Test mit den Rohextrakten der oben getesteten Proben. .....	71
Abb.3.1.17 Darstellung der verwendeten bakteriellen Di-Hybrid Klone.....	73
Abb.3.1.18 Ergebnisse der $\beta$ -Galaktosidase Tests. ....	73
Abb.3.1.19 Ergebnisse der $\beta$ -Galaktosidase Tests für den Nachweis der Mlc-MtfA-Interaktion im bakteriellen Di-Hybrid System. ....	75
Abb.3.1.20 zeigt die $\beta$ -Galaktosidase Test Ergebnisse des carboxyterminalen MtfA-Fragments (pMM4). ....	77
Abb.3.1.21 $\beta$ -Galaktosidase Test der MtfA-Mutanten im bakteriellen Di-Hybrid System. ....	78
Abb.3.1.22 Western-Blot Analyse der verschiedenen Fusionsproteine des bakteriellen Di-Hybrid Systems.....	80
Abb.3.1.23 Klonierung der Vektoren pTMB5-8. ....	84
Abb.3.1.24 Mittelwerte aus drei unabhängigen $\beta$ -Galaktosidase Tests. ....	85
Abb.3.1.25 Western-Blot Analyse der gleichzeitigen Expression von EIIB <sup>Glc</sup> bzw. EIIB* <sup>Glc</sup> und MtfA. ....	86
Abb.3.1.26 Quantifizierung des Western-Blots.....	86
Abb.3.2.1 Vergleich der MtfA-Sequenz mit der Sequenz des MCP aus <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579. ....	89
Abb.3.2.2 Auswertung der Vollmedium Chemotaxisversuche. ....	91
Abb.3.2.3 zeigt das Schwärmverhalten der Deletionsstämme JAS2 und JAS1 im Verhältnis zu der entsprechenden Wildtypkontrolle (in gelb) JWL184-1 und LJ110.....	92
Abb.3.2.4 A Darstellung des <i>mtfA</i> -Gens sowie seiner benachbarten Gene im <i>E.coli</i> K-12 Genom. .....	95
Abb.3.2.5 zeigt den Wachstumskompetitionsversuch des MtfA-WT Stammes LJ200 im Verhältnis zu JAS1 in Bezug auf verschiedene Anzuchtmedien. ....	99
Abb.3.2.6 Konkurrenz des WT MtfA Stammes LJ110 mit dem MtfA-Deletionsstamm LJM1. .....	100
Abb.3.2.7 zeigt Wachstumskompetitionsversuche in Bezug auf die Temperatur.....	102
Abb.3.2.8 zeigt die Ergebnisse der Temperatur Konkurrenzversuche mit Minimalmedium an. .....	104
Abb.3.2.9 zeigt die Wachstumskompetitionsversuche unter „semi-anaeroben“ Bedingungen. .	105
Abb.3.2.10 Ergebnisse der RT-RT PCR der <i>mtfA</i> Expression. ....	107

Abb.3.2.11 MtfA Proteinmengen nach Anzucht der Stämme K-12 und LJ110 in Glukose (Glc) und Glyzerin (Gly). .....	109
Abb.3.2.12 Unterschiedliche <i>mtfA</i> - mRNA- und MtfA-Proteinmengen in den Stämmen <i>E.coli</i> K-12 und LJ110. ....	109
Abb.3.2.13 zeigt PCR-Produkte mit der isolierten RNA und den im Folgenden verwendeten RTptsG+/- Primern. ....	111
Abb.3.2.14 RT-RT PCR Analyse mit der isolierten RNA .....	112
Abb.3.2.15 Darstellung der <i>ptsG<sub>op</sub>-lacZ</i> Fusion. ....	112
Abb.3.2.16A zeigt die PCR Ergebnisse der verschiedenen Verdünnungsstufen der cDNA aus LJ110. ....	114
Abb.3.2.17 RT-RT PCR Ergebnisse der Stämme LJ110, LZ110 und LZ110/F'::Ø( <i>ptsG<sub>op</sub>-lacZ</i> ). .....	117
Abb.3.2.18 Ergebnisse der RT-RT PCR. ....	119
Abb.3.3.1 Elutionsprofil MtfA Affinitätschromatographie mittels „HisTrap™ FF“ Säulen.....	123
Abb.3.3.2 Coomassiefärbung und Western-Blot Analyse nach Affinitätschromatographie.....	123
Abb.3.3.3 zeigt exemplarisch ein Entsalzungsprofil von MtfA. ....	124
Abb.3.3.4 MtfA Elutionsprofil nach Anionenaustauschchromatographie. ....	125
Abb.3.3.5 Silberfärbung der verschiedenen Proteinreinigungsstufen .....	125
Abb.3.3.6 (verändert nach E. Klang 2007(41)) .....	127
Abb.3.3.7 Optimierung der spezifischen MtfA-Antikörper .....	129
Abb.3.3.8 Induktionsversuch für die Mlc-Antikörperoptimierung Antikörperverdünnung 1:500 .....	130
Abb.3.3.9 natives Gel zur Identifikation eines MtfA-Dimers .....	131
Abb.3.3.10 zeigt einen Western-Blot eines nativen Geles mit MtfA Proben.....	132
Abb.3.3.11 Kalibrierungskurve der Gelfiltrationssäule.....	134
Abb.3.3.12 zeigt die Gelfiltrationsexperimente zum Nachweis des MtfA-Monomers und Dimers. ....	135
Abb.3.3.13 Mlc-Elutionsprofil nach der Gelfiltrationschromatographie .....	136
Abb.3.3.14 Elutionsprofil zum Nachweis der Mlc-MtfA Interaktion. ....	137
Abb.3.3.15 “Electrophoretic Mobility Shift Assay” mit dem <i>ptsG</i> Operatorfragment, dem Mlc Protein und verschiedenen Mengen an MtfA. ....	139
Abb.4.1.1 MtfA-Modell und Ausblick .....	143
Abb.4.2.1 schematische Darstellung der Wechselwirkung von Mlc und EIIB <sup>Glc</sup> bzw. Mlc und MtfA. ....	144

## II Abbildungsverzeichnis

---

Abb.4.2.2 zeigt die Möglichkeiten zur Mlc-Inaktivierung.....	147
Abb.4.3.1 aus Hayashi et al. (26) zeigt die Entstehung und Unterschiede der K-12 Stämme W3110 und MG1655.....	152
Abb.4.3.2 MtfA-Regulationsschema.....	154
Abb.4.3.3 Einfluss von MtfA auf die Chemotaxis (vereinfachte, schematische Darstellung)....	155

### III Tabellenverzeichnis

Tab.2.1.1 verwendete Stämme .....	17
Tab.2.1.2 verwendeter Hefestamm.....	17
Tab.2.1.3 verwendete Bakteriophagen .....	18
Tab.2.1.4 verwendete <i>E.coli</i> Vektoren .....	18
Tab.2.1.5 verwendete Hefevektoren.....	20
Tab.2.1.6 verwendete Oligonukleotide.....	20
Tab.2.1.7 Aminosäuren .....	25
Tab.2.1.8 Antibiotikalösungen .....	25
Tab.2.1.9 häufig verwendete Puffer .....	26
Tab.2.2.1 Lösungen für Silberfärbung.....	27
Tab.2.4.1: SDS-Gel Zusammensetzung .....	31
Tab.2.6.1 Zusammensetzung der EMSA Gele .....	42
Tab.2.6.2 verwendete Datenbanken und Softwareprogramme.....	43
Tab.3.1.1 Überblick über die ausgetauschten AS in MtfA.....	49
Tab.3.1.2 Zusammenstellung der verwendeten Plasmide .....	62
Tab.3.1.3 Informationen zu der Klonierung der Hefe Di-Hybrid Vektoren.....	68
Tab.3.1.4 Übersicht der Konstrukte des bakteriellen Di-Hybrid Systems .....	72
Tab.3.1.5 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Mlc-Wechselwirkung mit verschiedenen MtfA-Mutanten aus Kapitel 3.1.1.2 und aus dem bakteriellen Di-Hybrid System. ....	79
Tab.3.1.6 Zusammenfassung der Größen der Fusionsproteine des bakteriellen Di-Hybrid Systems.....	81
Tab.3.2.1 Chloramphenicol Resistenzen der Klone pKMS1-3 sowie der Kontrollen pSU19 und pKK232-8. ....	96
Tab.3.3.1 Proteinausbeute nach den verschiedenen Reinigungsschritten .....	126
Tab.3.3.2 Proteine zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule .....	134
Tab.3.3.3 gibt einen Überblick über die mittels Gelfiltration ermittelten Ergebnisse.....	138

## 1 Einleitung

### 1.1 Einführung

*Escherichia coli*, ein Gram negatives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes Eubakterium ist ein sehr gut untersuchter Modellorganismus. Neben seinem natürlichen Habitat, dem Darm von Mensch und Tier, kann es auch in der Umwelt überleben. Daher muss es in der Lage sein auf verschiedene, wechselnde Umweltbedingungen zu reagieren. Die vollständige Sequenzierung und Annotierung des *E.coli* Genoms konnte Aufschluss über die Funktion und Regulation von mehr als 50% aller Gene geben (12, 80). Dennoch gibt es ca. 25% uncharakterisierte offene Leseraster („orfs of unknown function“), die immer wieder neue Anknüpfungspunkte für weiterführende Grundlagenforschung bieten. Die fortschreitende funktionelle Aufklärung und Phänotypisierung der durch die Gene kodierten Proteine ermöglicht ein Einstieg in die Identifikation von komplexen Regulationsnetzwerken. Hierbei bietet auch *E.coli* aufgrund seiner sehr weit fortgeschrittenen Charakterisierung einen guten Modellorganismus. In Bezug auf den Stoffwechsel von *E.coli* konnten verschiedene Regulationsnetzwerke identifiziert werden, die die Komplexität der Regulation in Prokaryoten verdeutlichen (51).

Ein Beispiel für ein solches Regulationsnetzwerk sind die Phosphotransferase Systeme (PTS). Diese stellen ein zentrales Kohlenhydrat- (u.a. Hexosen, Hexitole und Disaccharide) (43) Aufnahme und Phosphorylierungssystem dar. Das hierzu benötigte Phosphat wird ausgehend vom durch die Glykolyse generiertem Phosphoenolpyruvat (PEP) über eine Enzymkaskade direkt auf die jeweiligen Substrate übertragen. Die phosphorylierungsabhängige Zustandsform der einzelnen Komponenten ermöglicht darüber hinaus die Kopplung an verschiedene weiterführende Regulationsmechanismen, was die PT-Systeme als Signaltransduktionssystem auszeichnet (52, 67, 68, 76).

Glukose stellt für *E.coli* die bevorzugte Kohlenstoffquelle dar, da sie nach der Aufnahme und Phosphorylierung über das Glukose-PTS direkt und ohne weitere Modifizierung in Stoffwechselwege wie die Glykolyse oder den Pentosephosphatweg eingehen kann.

Die einzelnen Komponenten der PT-Systeme sowie die für diese Arbeit relevanten weiteren Aspekte werden im Folgenden näher erläutert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden überwiegend Untersuchungen zum dem Glukose-PTS vorgenommen, so dass hierauf im Besonderen eingegangen wird.

## 1.2 Die Phosphotransferase Systeme (PTS)

Phosphotransferase Systeme sind in allen Gram-positiven und Gram-negativen Eubakterien zu finden, jedoch nicht in Archaeen oder Eukaryoten (94). Das PTS wurde erstmalig 1964 von Kunding, Gosh und Roseman beschrieben (45). Bis zum Jahre 1996 konnten 40 PTS Proteine sowie eine stetig steigende Anzahl von interagierenden nicht-PTS Proteinen identifiziert werden. Innerhalb einer Zelle können verschiedene PT-Systeme nebeneinander vorkommen. So konnten beispielsweise für *E.coli* K-12, neben zahlreichen potentiellen PTS-Regulationsproteinen, 21 verschiedene Phosphotransferase System nachgewiesen werden (103). Die verschiedenen PT-Systeme sind jeweils nach ihrem spezifischen Substrat benannt und wurden aufgrund von Sequenzübereinstimmungen und Komplementationsanalysen in sechs Familien eingeteilt (43). Die Aufnahme der Kohlenhydrate ist direkt an eine Phosphorylierung der jeweiligen Substrate gekoppelt. Das Phosphat wird ausgehend vom Phosphoenolpyruvat über die allgemeinen PTS Enzyme EI (PEP abhängige Histidinproteinkinase) und HPr (Histidin Protein oder hitzestabiles Protein) auf den substratspezifischen EII Komplex übertragen (76). Dieser besteht, je nach Familie aus drei (A,B,C) oder vier (A-D) Domänen. Diese Domänen können zu einem Komplex fusioniert (Mannitol-PTS) oder nur teilweise gekoppelt vorliegen (z.B. Glukose-PTS) (43). Die direkte Phosphorylierung der Substrate birgt zwei Vorteile. Zum einen können die phosphorylierten Kohlenhydrate direkt und schnell in die verschiedenen Abbauewege, z.B. in die Glykolyse oder den Pentosephosphatweg, eingeschleust werden. Zum anderen bietet dieses System einen Sensor für die Zellen über die Verfügbarkeit der Kohlenhydrate im Medium, bzw. in der Umwelt. Somit stellen die PT-Systeme nicht nur ein zentrales Kohlenhydrataufnahmesystem, sondern auch ein wichtiges Signaltransduktionssystem dar (52).

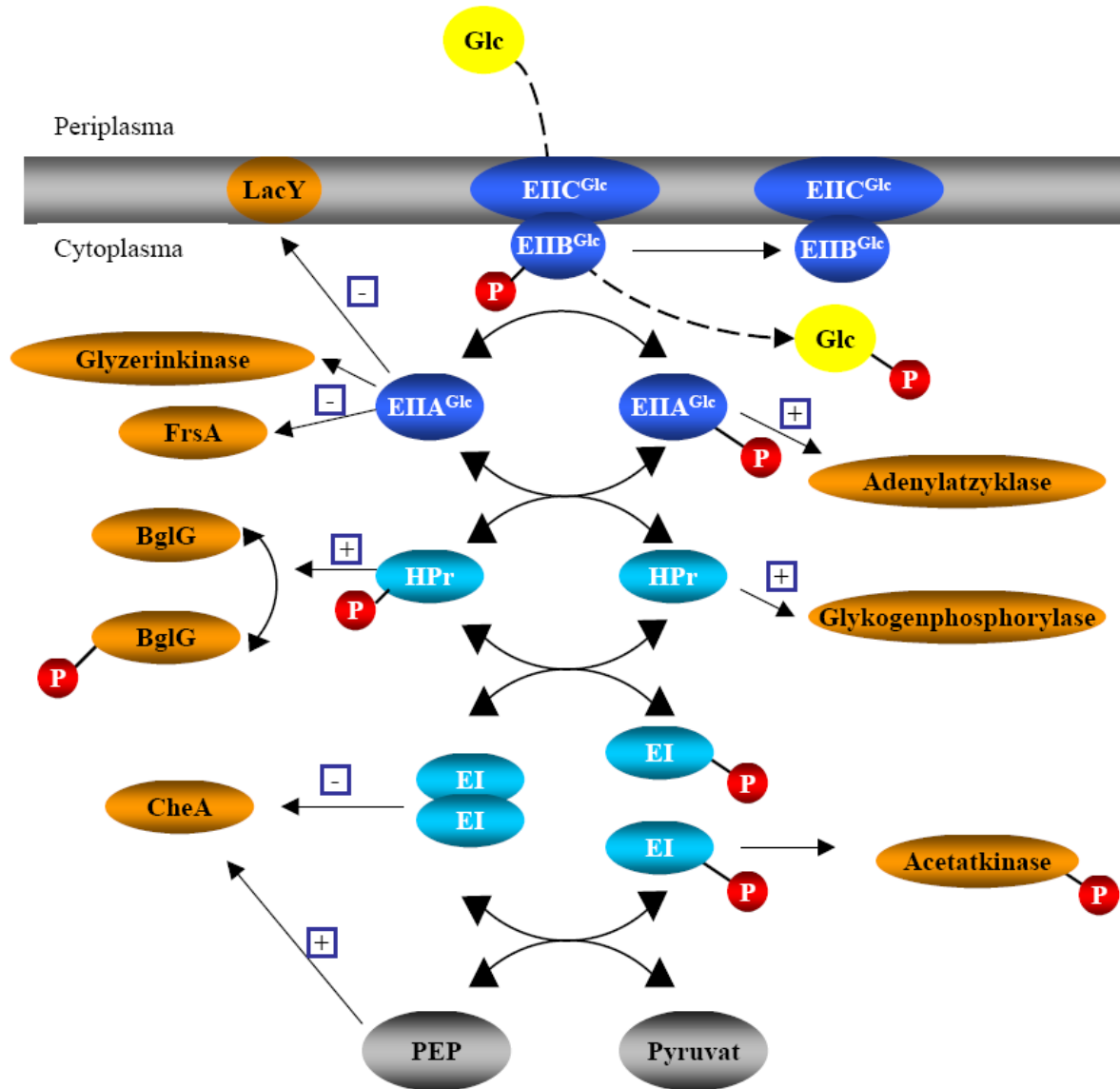
## 1.3 Das Glukose-PTS

Eine allgemeine PTS Übersicht gibt das Beispiel des Glukose-PTS in Abbildung 1.3.1. Hier ist neben der oben beschriebenen allgemeinen Phosphattransferkaskade die Interaktion mit verschiedenen Wechselwirkungspartnern dargestellt. Eine zentrale Rolle bei der Interaktion mit verschiedenen Systemen stellt das  $EIIA^{Glc}$  dar. In der unphosphorylierten Form, also wenn ein ausreichend großes Glukose-Angebot vorliegt, ist das Enzym  $EIIA^{Glc}$  durch direkte Protein-Protein Wechselwirkung in der Lage, an verschiedene nicht-PTS Transporter wie z.B. die in der Abbildung gezeigte Laktose Permease zu binden (82). Die durch diesen sogenannten **Indukto-**

**rausschluss** beeinflussten Systeme sind u.a. für die Aufnahme und Synthese von Induktoren anderer Nicht-PTS Kohlenhydrate verantwortlich (43, 50, 68). Somit wird mit Hilfe dieses Mechanismus die Aufnahme verschiedener, ebenfalls verfügbarer Kohlenhydrate verhindert. Des Weiteren kann das nicht phosphorylierte EIIA<sup>Glc</sup> an FrsA („fermentation, respiration switch“) binden und so die Rate des oxidativen Abbaus und der Vergärung der Glukose beeinflussen (42). Ebenso ist die direkte Protein-Protein Wechselwirkung des EIIA<sup>Glc</sup> mit der Glyzerinkinase (GlpK) gezeigt. Hierdurch wird die Bildung des Induktors Glyzerin-3-Phosphat aus Glyzerin blockiert (31).

Das Enzym EIIA<sup>Glc</sup> hat darüber hinaus in der phosphorylierten Form eine aktivierende Funktion in Bezug auf die Adenylatzyklase. Hierdurch wird die Bildung des „Hungersignals“ cAMP aus ATP induziert, welches in Verbindung mit dem CAP-Protein („cAMP accepting protein“) verschiedene metabolische Gene positiv oder negativ reguliert (69). Dieses Phänomen wird **Katabolitenrepression** genannt.

Auch die allgemeinen Komponenten der PT-Systeme haben verschiedene regulatorische Funktionen. So hat das unphosphorylierte HPr einen aktivierenden Einfluss auf die Glykogenphosphorylase, ein Enzym des Glykogenreservestoffwechsels (91). Das phosphorylierte HPr hat zudem einen positiven Einfluss auf die Phosphorylierung des Antiterminators BglG. Dieser beeinflusst das *bglGFB* Operon, welches die Proteine für den PTS abhängigen Transport und die Verstoffwechselung von  $\beta$ -Glukosiden kodiert (23). Das Enzym I hat im unphosphorylierten Zustand einen inhibierenden Einfluss auf die Phosphorylierung des CheA Proteins. Somit wird das Taumeln der Bakterien verhindert und die Phase der positiven Chemotaxis verlängert (56) (siehe Kapitel 1.3.1). Phosphoenolpyruvat hat hingegen einen leicht aktivierenden Einfluss auf die Autophosphorylierung von CheA. Im phosphorylierten Zustand kann das Enzym I sein Phosphat auf die Acetatkinase übertragen. Diese könnte eine Verbindung zwischen dem PTS und dem Tricarbonsäurezyklus darstellen (21). Unter der Voraussetzung, dass alle Glukose-PTS Enzyme vollständig induziert sind, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Phosphorylierungskaskade die Dimerisierung des Enzyms I. Nach erfolgter Phosphorylierung zerfällt das Dimer in Monomere, welche dann das Phosphat auf HPr übertragen können (14).



**Abb.1.3.1 Das Glukose-Phosphotransferase System (PTS)**

Die in gelb dargestellte Glukose wird über den Transporter  $EIIC^{Glc}$  in die Zelle transportiert und direkt durch die Phosphatgruppe der  $EIIB^{Glc}$ -Domäne zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Die generellen PTS Komponenten sind in hellblau, die spezifischen in dunkelblau dargestellt. Die hierfür benötigte Phosphatgruppe wird ausgehend vom Phosphoenolpyruvat mittels Autophosphorylierung auf das Histidin189 im Enzym I übertragen. Die Phosphorylierung erfolgt bei dieser Phosphoenolpyruvat (PEP) abhängigen Proteinkinase nur in der Dimerform des Enzym I. Von dem Enzym I wird die Phosphatgruppe auf das His15 des Histidinproteins (HPr) übertragen. Anschließend wird das glukosespezifische  $EIIA^{Glc}$  am Histidin90 phosphoryliert. Von hier aus wird das Phosphat schließlich auf das Cystein 421 des  $EIIB^{Glc}$  übertragen. Die Wechselwirkung der verschiedenen phosphorylierten oder unphosphorylierten Komponenten ist durch Pfeile zu den jeweils in orange dargestellten Wechselwirkungspartnern dargestellt. Die in blau eingerahmten Zeichen geben einen positiven (+) oder negativen (-) Einfluss an.



### 1.3.1 MCP und PTS vermittelte Chemotaxis in *E.coli*

In diesem Kapitel wird der Mechanismus der gezielten Bewegung von *E.coli* auf einen Lockstoff hin oder von einem Schreckstoff weg (Chemotaxis) aufgrund seiner Relevanz für diese Arbeit (vgl. Kapitel 3.2.1) erläutert.

Eine schematische Darstellung des Chemotaxis Systems aus *E.coli* ist in Abbildung 1.3.2 gezeigt.

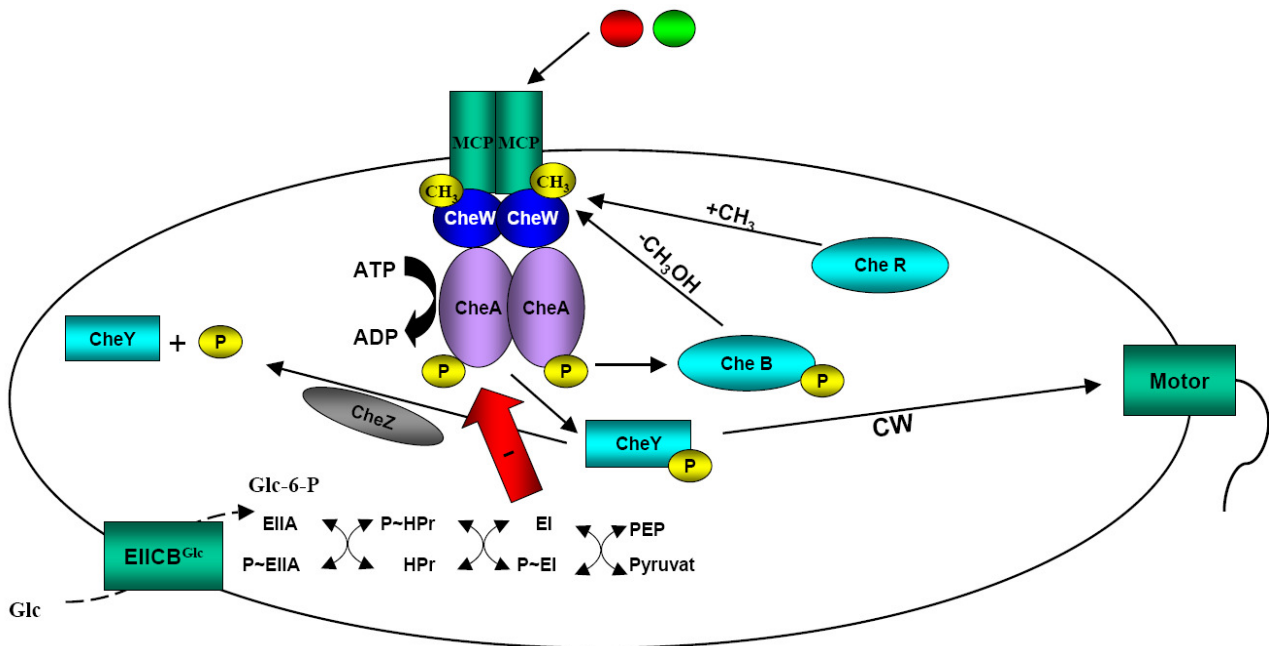


Abb.1.3.2 schematische Darstellung der PTS- und MCP-Chemotaxis in *E.coli*.

Erläuterungen siehe Text.

*E.coli* ist in der Lage, mit seinen sechs bis acht peritrichen Flagellen auf Lockstoffe hin- oder sich von Schreckstoffen weg zu bewegen. Die Wahrnehmung der jeweiligen Stoffe erfolgt über die verschiedenen MCP („methyl accepting chemotaxis protein“) Komplexe. Diese homodimeren Sensoren nehmen die entsprechenden Signale auf und leiten sie in das Innere der Zelle weiter. Dort wird das Signal an das ebenfalls als Dimer vorliegende Protein CheW („SH3-like coupling protein“) übertragen. Ausgehend hiervon wird die Histidin Kinase CheA autophosphoryliert. Das phosphorylierte CheA überträgt die Phosphatgruppe auf den entsprechenden Antwortregulator CheY. Dieser bindet im phosphorylierten Zustand an den Flagellenmotor, der dadurch seine Rotation von „counter clockwise“ in „clockwise“ verändert. Hierdurch wird eine Taumelbewegung und damit eine Richtungsänderung bewirkt. Des weiteren ist das phosphorylierte CheA in der Lage, das Protein CheB zu phosphorylieren. Dieses Protein ist eine Methyl-esterase und entfernt Methylgruppen von den Methylierungsdomänen der MCPs. Der Gegenspieler von CheB ist das CheR Protein, welches als Methyltransferase die Methylgruppen auf

verschiedene Glutamatreste der MCPs überträgt. Die Inaktivierung des **CheY** Proteins erfolgt über das Protein **CheZ**, welches die Hydrolyse des phosphorylierten **CheYs** stimuliert und somit wieder unphosphoryliertes **CheY** entstehen lässt. Dieses System wird, wie ebenfalls in Abbildung 1.3.2 gezeigt, in *E.coli* ebenfalls durch das unphosphorylierte Enzym I des PT-Systems reguliert. Dieses verhindert die Autophosphorylierung von **CheA** und verlängert somit die Schwimmphase und verhindert das Taumeln (20, 56, 99). Ein detaillierter Blick auf die Domänenstruktur der MCPs ist in Abbildung 1.3.3 gezeigt.



Abb.1.3.3 Domänenstruktur der MCPs. Abbildung verändert nach (99).

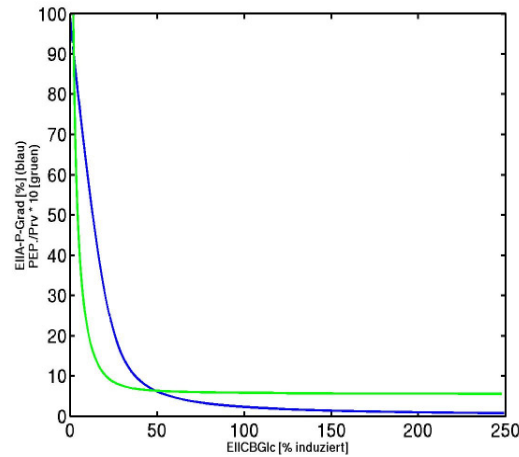
Heute unterscheidet man in *E.coli* je nach Erkennung der verschiedenen chemischen Stoffe sechs verschiedene MCPs (Tar, Tsr, Trg, Tap, Tcp und Aer). Bei dem Gram positiven Bakterium *B.subtilis* sind derzeit 10 verschiedene MCPs bekannt (44). Die meisten MCPs aus *E.coli* und *B.subtilis* haben die gleiche Domänenstruktur wie in Abbildung 1.3.3 schematisch gezeigt. Sie bestehen aus zwei Transmembrandomänen, die eine extrazelluläre Sensordomäne umschließen. Diese bindet die entsprechenden Lock- oder Schreckstoffe. Auf die zweite Transmembranhelix folgt intrazellulär eine „Linker“-Domäne. Diese gehört zu den HAMP- („histidine kinase, adenylyl cyclase, MCP and phosphatase“) oder sogenannten P-Typ „Linkern“. Hierdurch wird die Signalübertragung zwischen der extrazellulären Sensordomäne und der intrazellulären Signalweiterleitungsdomäne vermittelt (4). Trotz vorliegender Kristallstruktur ist der genaue Mechanismus jedoch unklar (30). Neben der Signaldomäne liegen die „methylierten Helices“ (MH1 und MH2). Diese tragen hochkonservierte Glutamin- und Glutamatreste. Letztere können direkt methyliert werden. Die Glutaminreste müssen zunächst noch mit Hilfe der Methylesterase CheB in Glutamate umgewandelt werden, bevor auch diese methyliert werden können. Generell wird durch diese Methylierung die Aktivität der Signaldomäne reguliert. Erhöhte Methylierungslevel aktivieren die Autophosphorylierung von CheA, ein geringes Methylierungsniveau wirkt hingegen inhibierend (99). Darüber hinaus konnte für Tsr, das spezifische MCP für Serin, Alanin, Glycin und Aminoisobutyrate gezeigt werden, dass eine erhöhte Methylierung die Affinität von Tsr für Serin um einen Faktor 10 vermindert (99).

### 1.3.2 Der Glukosetransporter EIICB<sup>Glc</sup>

Das Genprodukt des *ptsG*-Gens ist der Glukosetransporter EIICB<sup>Glc</sup>. Dieser besteht aus 477 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 50,65kDa. Dieses Enzym wird in die membranintegrale EIIC<sup>Glc</sup> und die daran gebundene und damit membranassoziierte EIIB<sup>Glc</sup> Domäne unterteilt. Beide Domänen sind durch einen Linkerbereich verbunden. Die EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne besitzt die Phosphatbindestelle C421. Die EIIC<sup>Glc</sup>-Domäne besitzt die Glukosebindestelle und ist der eigentliche Transporter. Die Struktur der EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne konnte mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden, wohingegen die Struktur der EIIC<sup>Glc</sup>-Domäne von den Arbeitsgruppen Erni (30) und Lengeler / Jahreis (Osnabrück) kontrovers diskutiert wird. In beiden Modellen wird übereinstimmend davon ausgegangen, dass der Glukosetransporter EIIC<sup>Glc</sup> aus acht transmembranen  $\alpha$ -Helices sowie einer vorausgehenden amphiphatischen Helix besteht. Der Unterschied der beiden Modelle ist in der Lokalisation der letzten beiden Transmembranhelices zu sehen. Während diese im „Erni“-Modell aus den AS 279-298 und AS304-323 bestehen, werden diese im „Osnabrücker“-Modell von den AS304-323 und AS355-371 gebildet. Hierdurch wird ein expandierter dritter cytoplasmatischer Loop postuliert, der vermutlich eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung spielt (53).

### 1.3.3 Geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Phosphorylierungskaskade des Glukose-PTS

Wenn alle Enzyme des Glukose-PTS vollständig induziert vorliegen, so ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt innerhalb der PTS Phosphorylierungskaskade die Dimerisierungsreaktion des Enzym I (14). Für das Katabolitenrepression verursachende unphosphorylierte EIIA<sup>Glc</sup> konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass auch nicht-PTS Substrate zu einer erhöhten Dephosphorylierung des EIIA<sup>Glc</sup> beitragen. Diese Regulation erfolgt über das PEP-Pyruvat Verhältnis, welches als Endprodukt der Glykolyse verschiedener Kohlenhydrate und als Phosphatdonor für die Phosphotransferase Systeme steht. Im Rahmen einer Kooperation von PD Dr. Knut Jahreis mit S. Fischer vom Max-Planck Institut für „Dynamik komplexer technischer Systeme“ in Magdeburg wurde die in Abbildung 1.3.4 dargestellte Modellierung des Einflusses der Menge von EIICB<sup>Glc</sup> auf das Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem EIIA<sup>Glc</sup> durchgeführt.



**Abb. 1.3.4 Computersimulation zur Auswirkung der Menge von EIICB<sup>Glc</sup> auf den Phosphorylierungszustand von EIIA<sup>Glc</sup> und auf das PEP-Pyruvat Verhältnis.**

Abbildung nach S. Fischer, nicht veröffentlichte Daten

Hierbei konnte unter Zugabe von gesättigten Mengen an Glukose und vollinduzierten Enzymen EI, HPr und EIIA<sup>Glc</sup>, sowie dem Ausschluss von alternativen Glukosetransportsystemen gezeigt werden, dass bei einer 100%igen Aktivität von EIICB<sup>Glc</sup> ca. 5% von EIIA<sup>Glc</sup> phosphoryliert vorliegen. Die phosphorylierte Menge an EIIA<sup>Glc</sup> bleibt bis zu einer 50%igen Aktivität auf diesem Level. Bei einer EIICB<sup>Glc</sup> Aktivität von 25% hingegen liegen ca. 30% von EIIA<sup>Glc</sup> phosphoryliert vor. Daher kann ausgehend von dieser Modellierung gezeigt werden, dass bei vollständig aktivem EIICB<sup>Glc</sup> die Phosphorylierung von EIIA<sup>Glc</sup> den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt innerhalb dieser Phosphorylierungskaskade darstellt. Daher verweisen diese Daten darauf, dass eine Feinregulation beispielsweise der Expression von *ptsG* ein wichtiger Parameter in Bezug auf die Gesamtregulation der PT-Systeme und damit verbundenen Signaltransduktionssysteme ist.

### 1.3.4 Die Regulation des Genes *ptsG*

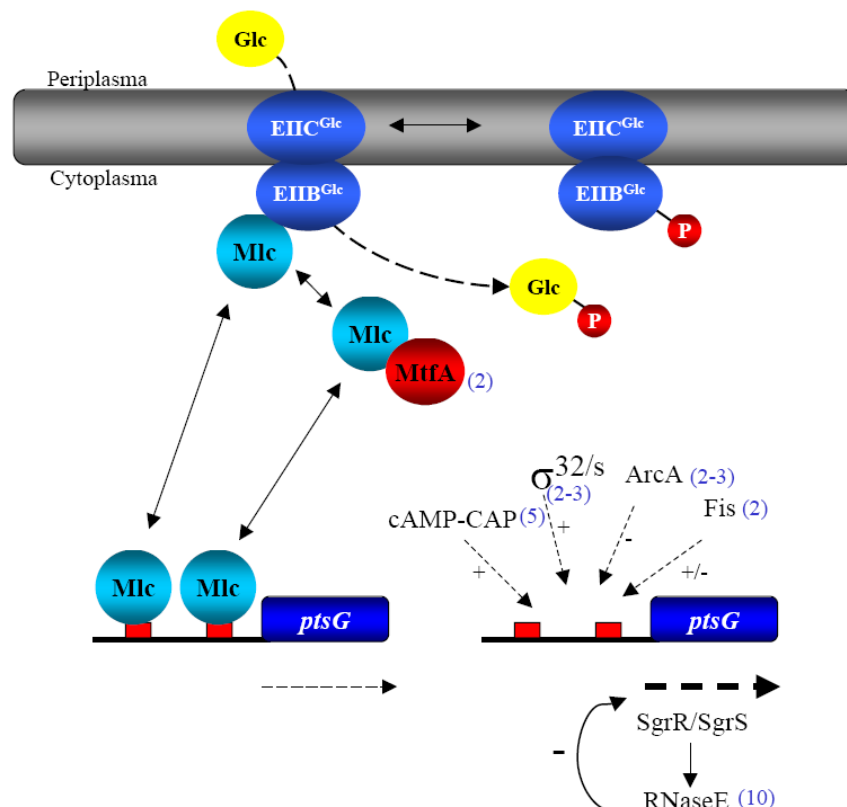
Die Relevanz der Expression und der damit verbundenen Menge von EIICB<sup>Glc</sup> ist im vorangegangenen Kapitel beschrieben. Daher wird hier auf die Regulation der *ptsG*-Expression eingegangen. Das Gen *ptsG* liegt als einzelnes Gen bei 25 Minuten im *E.coli* Genom und kodiert für den Glukosetransporter EIICB<sup>Glc</sup>. Im Laufe der letzten Jahre sind verschiedene Faktoren identifiziert worden, die die Expression des sehr wichtigen Glukose-Transporters auf transkriptioneller, sowie posttranskriptioneller Ebene regulieren. Die Abbildung 1.3.5 zeigt eine Übersicht über diese bisher charakterisierten regulatorischen Faktoren.

Die Regulation des *ptsG*-Gens wird im wesentlichen durch den globalen Repressor **Mlc** („make large colonies“) (29) negativ und durch cAMP-CAP positiv reguliert.

Abbildung 1.3.5 zeigt eine detaillierte Darstellung des *ptsG* Promotor-Operatorbereiches. Für die Bindung von Mlc konnten mittels „Footprint“ Analysen zwei Bindestellen im Bereich von P1 und P2 von *ptsG* charakterisiert werden (39). Für die positive Regulation durch CAP konnten ebenfalls zwei Bindestellen stromaufwärts von P1 ermittelt werden. Die Bindestellen von Mlc und CAP sind nicht überlappend, so dass Mlc und CAP keine direkten Konkurrenten in Bezug auf die Bindung an den *ptsG* Promotor-Operatorbereich darstellen (39).

Des weiteren wird die Expression von *ptsG* unter bestimmten Wachstumsbedingungen von weiteren Faktoren reguliert. Hier sind die alternativen Sigmafaktoren  $\sigma^{32}$  (Hitzeschockfaktor) und  $\sigma^S$  (stationäres Wachstum) zu nennen (88, 93).

Unter anaeroben Wachstumsbedingungen steht *ptsG* zudem unter der negativen Kontrolle von **ArcA**. In vitro Studien konnten die direkte Bindung von phosphoryliertem ArcA an drei verschiedenen Stellen im Bereich des P1 Promotors des *ptsG*-Gens (vgl. Abbildung 1.3.6) nachweisen (35). Darüber hinaus bindet ArcA an den Promotor des *pts* Operons *ptsHIcrr*.



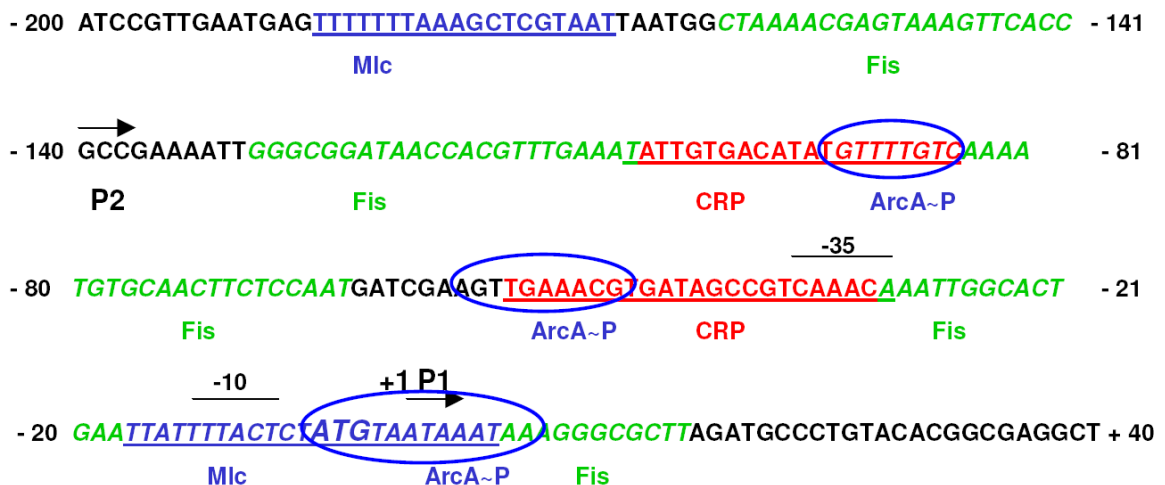
**Abb.1.3.5 Regulation der Expression des *ptsG*-Gens.**

Die blau in Klammern angegebenen Zahlen geben den jeweiligen Regulationsfaktor an.

Zwei der ArcA~P Bindestellen im Bereich des Promotors<sup>1</sup> des *ptsG*-Gens überlappen mit der CAP Bindestelle. Daher ist ArcA~P in der Lage, die Bindung von CAP, welche essentiell für die Transkription von *ptsG* ist, unter anaeroben Bedingungen zu verhindern (35).

Das histonähnliche DNA Bindeprotein **Fis** hat sowohl einen aktivierenden Einfluss auf den Repressor Mlc, als auch auf den die *ptsG* Expression aktivierenden cAMP-CAP Komplex. Wie in Abbildung 1.3.6 dargestellt überlappen die Bindestellen von Fis und Mlc sowie CAP.

In Bezug auf die Bindung von Mlc und Fis konnte gezeigt werden, dass beide Proteine unabhängig voneinander an den Promotorbereich von *ptsG* binden können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Mlc in Gegenwart von Fis eine stärkere Repression des P1 von *ptsG* vermitteln kann. In Bezug auf CAP konnte ebenfalls eine effektivere Aktivierung der *ptsG* Expression bei Anwesenheit von Fis gezeigt werden, wohingegen die Bindung von Fis alleine keine Aktivierung bewirkt (92).



**Abb.1.3.6 Promotor-Operatorbereich von *ptsG*.**

(verändert nach (92)) In schwarz gezeigt ist die Nukleotidsequenz des Promotor-Operatorbereiches von *ptsG* von Bp-200 bis +40. Blaue Nukleotide weisen auf die Mlc Bindestelle, rote auf die CAP Bindestelle hin. Grüne Nukleotide bezeichnen Fis- und blaue Kreise ArcA~P- Bindestellen. Das Startcodon ATG ist fettgedruckt und die Promotoren P1 und P2 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Neben der hier gezeigten transkriptionellen Regulation von *ptsG* konnte von Kimata et al. (40), Vanderpool und Gottesmann (105) und Kawamoto et al. (37) gezeigt werden, dass die *ptsG*-mRNA einer posttranskriptionellen Regulation durch das **SgrR/SgrS** System unterliegt. Hierbei wird das SgrR Protein durch hohe intrazelluläre Konzentrationen von Glc-6-P aktiviert und erhöht somit die Expression der als SgrS bezeichneten RNA. Diese wiederum wird mit Hilfe des RNA-Chaperons Hfq in einer definierten Struktur stabilisiert. Hfq dient darüber hinaus als „Hilfsprotein“ für die Bindung der *ptsG*-mRNA an SgrS, welche anschließend durch den RnaseE Degradationskomplex erkannt und abgebaut wird.

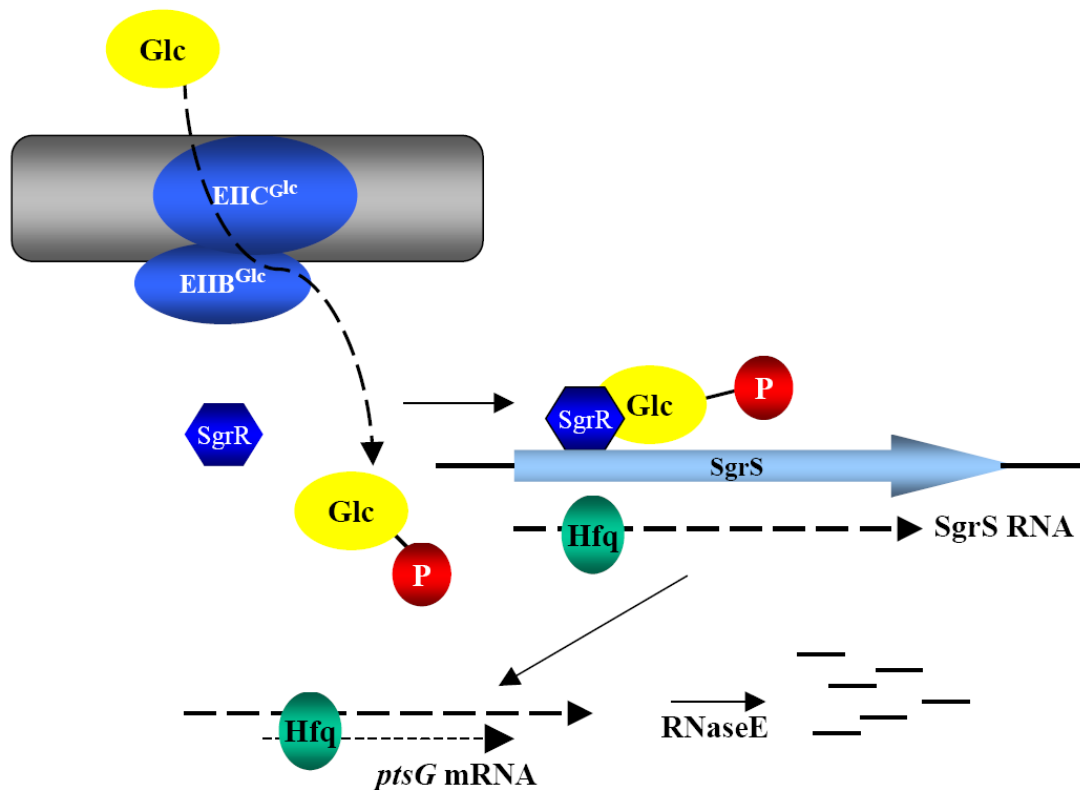


Abb.1.3.7 Abbau der *ptsG*-mRNA durch das SgrR/SgrS System (vereinfachte, schematische Darstellung; verändert nach Vanderpool und Gottesmann 2004 (105))

## 1.4 Der Repressor Mlc

Mlc ist ein globaler Repressor, der neben dem Einfluss auf das *ptsG*-Gen weitere u.a. metabolische Gene reguliert. Hier sollen in diesem Zusammenhang exemplarisch nur die Operone *ptsHIcrr* und *manXYZ* sowie das Gen *araC* genannt werden. Mlc gehört der ROK (“repressor, open reading frame, kinases”) Familie an und weist darüber hinaus eine 40%ige Übereinstimmung zum nahe verwandten NagC Repressor auf (18, 72). In vivo konnte jedoch keine Kreuzerkennung der jeweiligen Operatoren und damit keine wechselseitige Komplementation der beiden Repressoren beobachtet werden (74).

Das Gen für diesen Repressor liegt bei 35,9 Minuten im *E.coli* Genom und wurde *dgsA* („deoxy-glucose-sensitive“) genannt. Mlc selbst ist schwach autoreguliert. Der *mlc* P2 Promotor wird sowohl durch  $\sigma_{70}$ , als auch durch den alternativen Sigmafaktor  $\sigma_{32}$  reguliert. Daher wird die Expression von Mlc unter Hitzeschockbedingungen erhöht. Mlc besitzt zwei Bindestellen im Operatorbereich des *ptsG*-Gens. Darüber hinaus wurde von Tanaka et al.(102) gezeigt, dass der Repressor Mlc in der Lage ist, an die unphosphorylierte EIIb<sup>Glc</sup>-Domäne zu binden. Durch diese

Bindung wird der Repressor von dem Operatorbereich räumlich entfernt, wodurch eine Inaktivierung des Repressors und eine daraus resultierende Induktion der Expression des *ptsG*-Gens erfolgt. Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von Mlc zur Operatorbindestelle des *ptsG*-Gens oder des *ptsHI* Operators liegt bei  $10^{-8}$  M, die für *ptsG* und EIIB<sup>Glc</sup> bei  $10^{-7}$  M (65). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Mlc an EIIB<sup>Glc</sup> durch eine einzige Mutation im aminoterminalen Bereich von Mlc verhindert werden konnte. Daher ist die Bindestelle zur EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne im aminoterminalen Bereich von Mlc zu vermuten (101). Weiterführende Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass die unphosphorylierte EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne nur membrangebunden eine Inaktivierung des Mlc Proteins hervorrufen kann, obwohl die cytoplasmatisch exprimierte EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne in der Lage ist, Mlc zu binden. Daher scheint vor allem die Membranlokalisierung des EIIB<sup>Glc</sup> für die Inaktivierung von Mlc entscheidend zu sein. Dieses wurde von Tanaka et al. (101) durch Kopplung der EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne an die Laktose Permease gezeigt. Durch diese Lokalisation von EIIB<sup>Glc</sup> an die Plasmamembran konnte eine Inaktivierung von Mlc induziert werden (101). Von der Arbeitsgruppe von W. Boos in Konstanz konnte 2005 die Kristallstruktur von Mlc sowie die funktionellen Domänen charakterisiert werden (86). Einen Überblick hierüber soll die folgende Abbildung 1.4.1 geben. Die Domänen des 44,3kDa großen Proteins sind in verschiedenen Farben in der gezeigten Abbildung gekennzeichnet. Die grüne Domäne 1 (AS1-81; 395-406) trägt das „Helix-turn-Helix“ (HTH) und damit das DNA-bindende Motiv des Repressors Mlc. Die in gelb dargestellte Domäne 2 (AS 82.-194; 381-394) und die in blau dargestellte Domäne 3 (195-380) stellen die für die ROK-Repressoren typischen  $\alpha$  und  $\beta$  Strukturen dar. Hierbei wird jeweils ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt an einer Seite von zwei  $\alpha$ -Helices und an der anderen Seite von einer  $\alpha$ -Helix umgeben. Die in etwas hellerem grün und gelb dargestellten carboxyterminalen Helices gehören sowohl zu den Domänen 1 und 2 und stabilisieren die Orientierung des HTH Motives in Domäne 1. Die Domäne 3 beinhaltet die beiden Konsensusmotive, welche die ROK Familie charakterisieren und die das in grau dargestellte Zinkion binden. Die Dimerisierung von Mlc konnte im Bereich von Domäne 3 nachgewiesen werden (86). Die Bedingungen für eine Tetramerisierung, die von Seitz et al. (90) und Nam et al. (65) gezeigt werden konnte, ist in der Kristallstruktur nicht eindeutig gezeigt (65, 90). Darüber hinaus konnte von Seitz et al. (90) gezeigt werden, dass eine 18 AS carboxyterminale Deletion von Mlc weder in der Lage ist zu tetramerisieren.



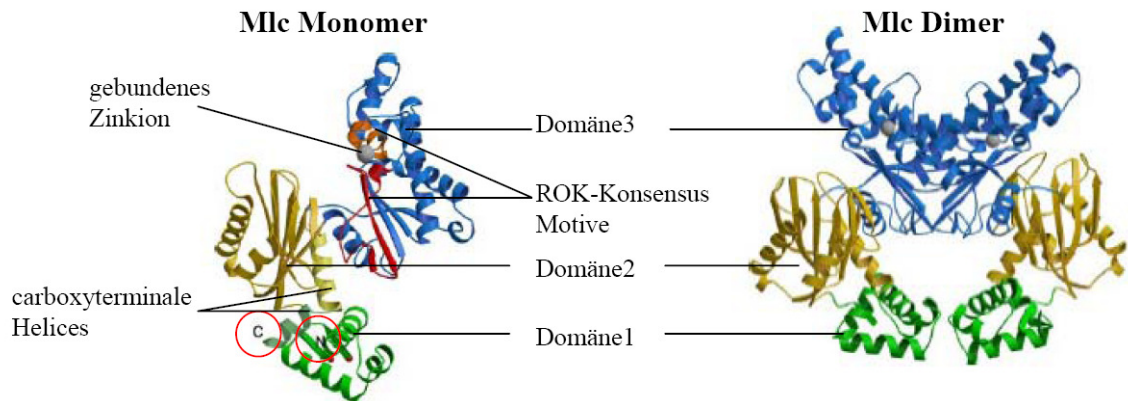


Abb.1.4.1 Kristallstruktur Mlc Monomer und Mlc Dimer verändert nach Schiefner et al. (86)

Vermutlich hierdurch bedingt kann Mlc somit nicht mehr seine Funktion als DNA bindender Repressor ausüben und ist darüber hinaus auch nicht mehr in der Lage, an EIIB<sup>Glc</sup> zu binden. Eine Deletion von 9 carboxyterminalen AS hingegen zeigte diesbezüglich keinerlei Einschränkungen.

Ausgehend von diesen Daten wurde für die Wirkung von Mlc in Bezug auf die Genexpression von Schiefner et al. (86) folgendes Modell postuliert. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die exponierte Stellung der amphiphatischen Helix im Carboxyterminus von Mlc den „Switch“ von seiner aktiven Form als Repressor zu seiner inaktiven, an EIIB<sup>Glc</sup> gebundenen Form vermitteln könnte. Im Rahmen der Aufklärung der Mlc Kristallstruktur konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob Mlc in vivo als Tetramer vorliegt. In vitro konnte Mlc mit Hilfe von Gelfiltrationsexperimenten als Tetramer identifiziert werden.

## 1.5 Das Protein MtfA („Mlc titration factor A“)

Auf der Suche nach weiteren *ptsG* regulierenden Faktoren mittels Transposonmutagenese wurde dreimal unabhängig voneinander das offene Leseraster *b1976* (= *yee1*) identifiziert (11). Weitere Untersuchungen zu diesem uncharakterisierten offenen Leseraster wurde im Rahmen der Dissertation von A.-K. Becker, sowie der Diplomarbeit von J.-E. Muus durchgeführt (10, 64). Ergänzende Arbeiten zu dieser Arbeit wurden im Rahmen der Masterarbeit von K. Homann (28) und der Diplomarbeit von E. Klang (41) gemacht.

Die zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Informationen zu dem durch das Gen *mtfA* kodierte Protein MtfA werden im Folgenden beschrieben. Wie bereits in der Abbildung 1.3.5. zu sehen ist, konnte das Protein MtfA im Rahmen der Dissertation von A.-K. Becker als Mlc titrierender Faktor identifiziert werden. Die Bindung dieser zwei Proteine konnte mit Hilfe von „Surface-

Plasmon Resonance (97)“ Untersuchungen nachgewiesen werden. Hierbei wurde eine Dissoziationskonstante von  $1,4 \cdot 10^{-8}$  M ermittelt. Darüber hinaus konnte mit dieser Methode gezeigt werden, dass eine aminoterminal Mlc Deletion von neun AS eine stark reduzierte Wechselwirkung von Mlc und MtfA zeigte. Eine aminoterminal Deletion von 18 AS im Mlc Protein zeigte keinerlei Wechselwirkung mit MtfA. Daher konnte mit Hilfe dieser Versuche die für die Bindung von MtfA verantwortliche Region im Mlc Protein nachgewiesen werden (10, 11, 89). Die Charakterisierung der entsprechenden Region im MtfA war u.a. Bestandteil dieser Arbeit. Das Gen *mtfA* wird von der „Ecocyc“ Datenbank als ein 798 Basenpaar langes Gen bei 44,01 Minuten mit den Koordinaten 2041675 bis Basenpaar 2042472 im *E.coli* K-12 Genom beschrieben. Das Gen wird stromaufwärts durch das in gegensätzlicher Orientierung liegende Gen *serU* und stromabwärts durch das in gleicher Orientierung liegende Gen *asnT* benachbart. Diese beiden Gene kodieren für t-RNAs. Abbildung 1.5.1 verdeutlicht diese Anordnung. Das zugehörige Protein MtfA besteht aus 265AS und hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 30129 Dalton.

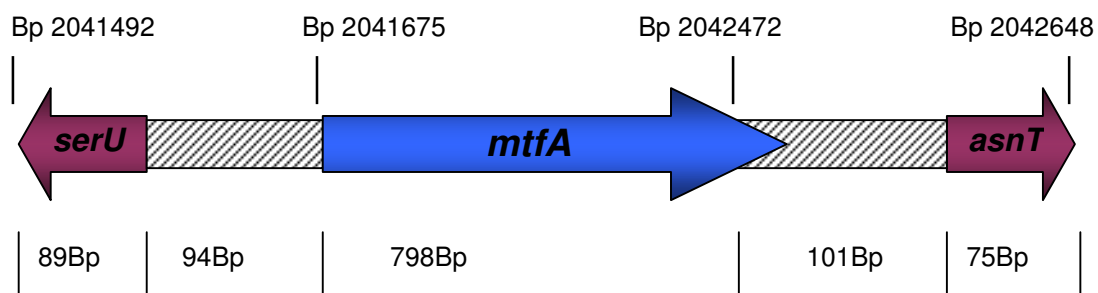
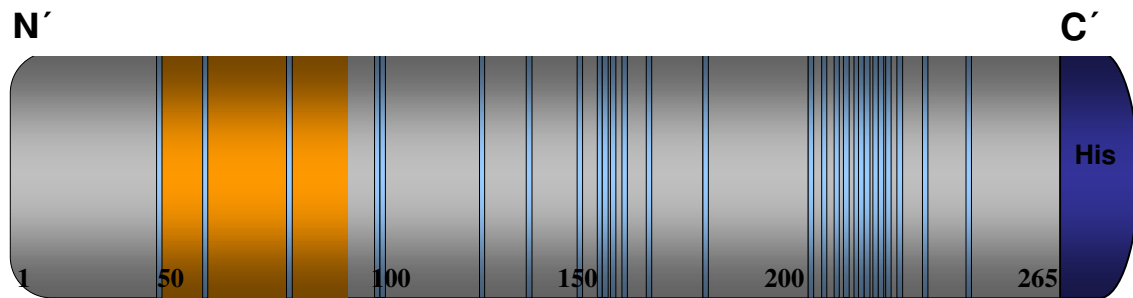


Abb.1.5.1 Anordnung von *mtfA* und seiner benachbarten Gene im *E.coli* Genom

Im Rahmen der Dissertation von A.-K. Becker konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das Protein MtfA cytoplasmatisch vorliegt. Diese Beobachtung konnte von Baba et al. (7) mit Hilfe von *mtfA-gfp* Fusionen bestätigt werden. Des weiteren wurde die Bildung von Homodimeren, ausgehend von SDS-Gelen (10) und Gelfiltrationsexperimenten (89), postuliert. Darüber hinaus wurde von A.-K.Becker im Rahmen ihrer Dissertation ein leuzinreicher Bereich im Aminotermi- nus des Proteins identifiziert. Physiologisch zeigte eine Deletion des *mtfA* Genes beim Wachs- tum auf Glukose eine um 15 Minuten erhöhte Generationszeit, welche vermutlich durch eine reduzierte Anzahl von Glukosetransportern (EIICB<sup>Glc</sup>) hervorgerufen wird. Hierdurch bedingt konnte auch ein verringerter Glukoseeffekt in Laktose/Glukose Diauxieexperimenten erklärt werden. Die Deletion von MtfA zeigt darüber hinaus keine Auswirkungen auf den Phänotyp, eine Überexpression wurde in den Studien von Baba et al. (7) als toxisch beschrieben, dieses konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Ausführliche Datenbankverglei-

che und „BLAST“ Analysen erbrachten bislang keinerlei signifikante Ähnlichkeiten zu bereits charakterisierten Domänen oder Proteinen anderer Organismen. Mit Hilfe eines ausführlichen Aminosäuresequenzvergleiches unterschiedlicher potentieller MtfA Proteine aus verschiedenen Enterobakterien sowie anderen Proteobakterien der  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  Subgruppen ergab sich ein Überblick über hochkonservierte und damit funktionell potentiell wichtige AS. Daher lag zu Beginn dieser Arbeit das in Abbildung 1.5.2 gezeigte schematisches Modell des MtfA Proteins vor. Die konservierten AS sind in blau gezeigt und die leuzinreiche Region ist in orange unterlegt.



**Abb.1.5.2 MtfA-Ausgangsmodell**

Der leuzinreiche Bereich wurde für den Bereich von AS40-90 eingezeichnet. Die konservierten AS sind in blau dargestellt.

Für verschiedene Experimente dieser Arbeit wurde der Vektor pTMByeel verwendet. Dieser wurde von A.-K. Becker im Rahmen ihrer Dissertation hergestellt. Für die Klonierung des *mtfA*-Gens wurde vor dem eigentlichen Startkodon ein *Pst*I Schnitt und im 3' Bereich des Gens ein *Hind*III Schnitt eingefügt. Des weiteren wurde an MtfA ein carboxyterminaler „His-Tag“ bestehend aus fünf Histidinen angefügt (10). Die Begriffe Vektor und Plasmid werden im Rahmen dieser Arbeit äquivalent verwendet.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ausgehend von den Ergebnissen der vorangegangenen Arbeiten von T. Zeppenfeld (107) und A.-K. Becker (10) war es das Ziel dieser Arbeit, das als „Mlc titration factor“ identifizierte Protein MtfA näher zu charakterisieren. Diese Charakterisierung sollte sowohl auf der genetischen, der biochemischen und der physiologischen Ebene erfolgen.

Somit stellte sich zu Beginn der Arbeit die Frage, wie die funktionelle Domänenstruktur des Proteins MtfA in Bezug auf die Wechselwirkung mit Mlc und einer potentiellen Dimerisierung aussieht. Hierüber sollten systematische MtfA Mutagenesen Aufschluss geben. Ein sich aus diesen Ergebnissen ergebendes MtfA-Domänen-Modell stellte die Voraussetzung für eine weitere Charakterisierung und Überprüfung des Modells mit verschiedenen Di-Hybrid Analysen dar.

Eine weitere Charakterisierung der MtfA Wechselwirkung zum Repressor Mlc ergab sich durch biochemische Methoden, wie z.B. der Gelfiltration oder der „Electrophoretic mobility shift assays“. Ebenso sollten die Proteine MtfA und Mlc gereinigt und spezifische Antikörper hergestellt werden.

Mit dem auf diese Weise ermöglichten spezifischen MtfA Nachweis mittels Western-Blot versprochen MtfA Expressionsstudien unter verschiedenen Wachstumsbedingungen Aufschluss über seine physiologische Bedeutung zu geben. Ergänzend hierzu versprochen RT-RT PCR Analysen, Wachstumskompetitionsversuche, sowie *mtfA*-Promotorstudien weiteren Aufschluss in Bezug auf die Fragestellung – „Wie wird der Regulator MtfA reguliert?“ zu geben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Stämme, Plasmide, Medien, Chemikalien

#### 2.1.1 verwendete Stämme

Tab.2.1.1 verwendete Stämme

<i>E. coli</i> Stämme	Geno-/Phänotyp	Referenz, bzw. Konstruktion
K-12	Wildtyp	K. Jahreis; LKS
CSH36	$\Delta(lac-pro) supE thi-1 / F' lacI pro A^+ B^+$	(59)
Dh5 $\alpha$	$F' glnV44 thiA-1 \Delta(argF-lac) U169 deoR endA1 gyrA96 hsdR17 recA1 relA1 supE44 (\text{\O}80lacZ\Delta M15) Nal^R$	(25)
JAS1	LJ110 $\Delta mtfA::Tn10 Kan^R$	diese Arbeit
JAS2	JWL184-1 $\Delta mtfA::Tn10 Kan^R$	diese Arbeit
JAS3	LZ150 $\Delta cyaA::Tn10 Kan^R$	diese Arbeit
JAS4	LZ150 $\Delta dgsA::Tn10 Kan^R$	diese Arbeit
JM109	$thi-1 \Delta(lac-proA,B) U169 gyrA1,96 recA1 endA1 relA1 hsdR17 supE44/F' traD36 proA^+ B^+ lacI^f \Delta M15$	(106)
JWL184-1	$F' nagE167$	(49)
LAB61	P1 $LAB113xLAB38 zce-726::Tn10 ptsG2$	(13)
LJ1	MG1655 $Fnr^+$	K Jahreis LKS
LJ110	W3110 $Fnr^+$	(108)
LJ120	$\Delta(ptsG)::cat man-8 zea-225::Tn10 Tet^R$	(108)
LJ121	$\Delta(ptsG)::cat man-8 zea-225::Tn10 Tet^R$	(108)
LJ130	LJ110 $\Delta(manXYZ)::cat$	(108)
LJ138	LJ130 $\Delta dgsA::Tn10 Kan^R$	(108)
LJ141	LJ110 $\Delta(ptsHicrr)::kan mgI-500::Tn10 Tet^R galP::cat$	(108)
LJ200	LJ110 $csc^+ cscB1 Csc^{3+}$	(33)
LJB41	LJ110 $\Delta mtfA::Tn10 Kan^R$ aus LJB43	(108)
LJB43	LJ231-3 $mtfA::MiniTn10 Kan^R$ aus LCL2I-2	(11)
LJM1	LJ200 $\Delta mtfA::Tn10 Kan^R$	diese Arbeit
LMH111	LZ110 $Tet^S$	(27)
LR2-175	$gaP63 manI161 manA162 (ptsM) nagE167 glcA168 (ptsG) fru-174$	(97)
LS1	LJ110 $\Delta(cyaA850)::kan$	(95)
LZ110	LJ110 $\Delta (argF-lacZ) U169 zae::Tn10 Tet^R$	(108)
LZ150	LZ110 $\Delta(ptsG)::cat$	(108)
PS8	$metB1 trpR55 galK2 \Delta(argF' lac) U169 hsdR514 recA56 supE44 supF58 tonA$	(54)
SU202	$lexA71::TN5 su1A211 sulA::lacZ \Delta(lacIPOZYA) 169 F' lacI^f lacZ\Delta M15::Tn9$	(19)
XL1-Blue	$recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacF' proAB lacI^f \Delta M15 Tn10 Tet^R$	Stratagene
XL1-Red	$endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac mutD5 mutS mutT Tn10 Tet^R$	Stratagene

Tab.2.1.2 verwendeter Hefestamm

Hefestamm	Geno-/Phänotyp	Referenz
PJ69-4 $\alpha$	MAT $\alpha$ $trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4\Delta gal80\Delta LYS::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ$	(34)

Tab.2.1.3 verwendete Bakteriophagen

Bakteriophage	Eigenschaften	Referenz
P1kc		(55)

## 2.1.2 verwendete Vektoren

Tab.2.1.4 verwendete *E.coli* Vektoren

Vektorbezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Referenz bzw. Konstruktion
pBAD24	Amp <sup>R</sup>	Klonierungsvektor	(24)
pBGH24	Amp <sup>R</sup>	pBAD24 mit <i>ptsG</i>	(95)
pBGH24-1	Amp <sup>R</sup>	pBGH24 <i>PstI</i> Schnitt in <i>ptsG</i>	diese Arbeit
pBJS1	Amp <sup>R</sup>	pBAD24 mit <i>dgsA</i>	diese Arbeit
pBJS2	Amp <sup>R</sup>	pBAD24 mit <i>dgsA-his</i>	diese Arbeit
pBLP2	Amp <sup>R</sup>	pBAD24 mit <i>ptsG-gfp</i>	(95)
pBLP3	Amp <sup>R</sup>	pBLP2 mit <i>XbaI</i> Schnitt in <i>ptsG</i>	diese Arbeit
pBR328	Amp <sup>R</sup> Cam <sup>R</sup>	Klonierungsvektor	(96)
pBSM1	Amp <sup>R</sup>	pBAD24 mit <i>mtfA</i>	Diese Arbeit
pBTS1	Amp <sup>R</sup>	pBGH24 mit <i>tmfrg</i> falsches Leseraster	diese Arbeit
pBTS2	Amp <sup>R</sup>	pBGH24 mit <i>tmfrg</i>	diese Arbeit
pBTS3	Amp <sup>R</sup>	pBGH24 <i>ptsGΔ223-1498</i>	diese Arbeit
pBTS4	Amp <sup>R</sup>	pBTS2 mit <i>PstI</i> Schnitt	diese Arbeit
pBTS5	Amp <sup>R</sup>	pBAD24 <i>ptsGΔ223-1498-gfp</i>	Diese Arbeit
pDL804	Amp <sup>R</sup>	bakterielles Di-Hybrid System	(19)
pDM1	Amp <sup>R</sup>	pDL804 mit <i>mtfA</i> Bp 5-268	diese Arbeit
pDM2	Amp <sup>R</sup>	pDL804 mit <i>mtfA</i> Bp 5-770	diese Arbeit
pDM3	Amp <sup>R</sup>	pDL804 mit <i>dgsA</i>	diese Arbeit
pGEM <sup>®</sup> -T	Amp <sup>R</sup>	Klonierungsvektor	Promega
pKK232-8	Amp <sup>R</sup>	Vektor für Promotorstudien	Pharmacia
PKMS1	Amp <sup>R</sup>	pKK232-8/ <i>serU-mtfA</i> intergenisch-	diese Arbeit
PKMS2	Amp <sup>R</sup>	pKK232-8/ <i>serU-mtfA</i> intergenisch+	diese Arbeit
pKMS3	Amp <sup>R</sup>	pKK232-8/ <i>mtfA</i>	diese Arbeit
pMM1	Tet <sup>R</sup>	pMS604 mit <i>mtfA</i> Bp12-238	diese Arbeit
pMM2	Tet <sup>R</sup>	pMS604 mit <i>mtfA</i> Bp12-817	diese Arbeit
pMM3	Tet <sup>R</sup>	pMS604 mit <i>dgsA</i>	diese Arbeit
pMM4	Tet <sup>R</sup>	pMS604 mit <i>mtfA</i> Bp 257-812	diese Arbeit
pMM5	Tet <sup>R</sup>	pMM2 mit S142F	diese Arbeit
pMM6	Tet <sup>R</sup>	pMM2 mit N145Q	diese Arbeit
pMM7	Tet <sup>R</sup>	pMM2 mit D156N	diese Arbeit
pMM8	Tet <sup>R</sup>	pMM2 mit W177Y	diese Arbeit
pMM9	Tet <sup>R</sup>	pMM2 mit Y243S	diese Arbeit
pMS604	Tet <sup>R</sup>	bakterielles Di-Hybrid System	(19)
pSU19	Cam <sup>R</sup>	Klonierungsvektor	(58)
pTBY1	Amp <sup>R</sup>	L40T	(64)
pTBY2	Amp <sup>R</sup>	L40A	(28)
pTBY3	Amp <sup>R</sup>	L40E	(64)
pTBY4	Amp <sup>R</sup>	K51R	(64)
pTBY5	Amp <sup>R</sup>	A70D	(28)
pTBY6	Amp <sup>R</sup>	A70S	(64)
pTBY7	Amp <sup>R</sup>	V77A	(64)
pTBY8	Amp <sup>R</sup>	Y94S	(64)
pTBY9	Amp <sup>R</sup>	P95S	(64)
pTBY10	Amp <sup>R</sup>	G120S	(64)
pTBY11	Amp <sup>R</sup>	G120S/Q121L	(64)
pTBY12	Amp <sup>R</sup>	W132Y/P451P	(64)
pTBY13	Amp <sup>R</sup>	S142F	diese Arbeit
pTBY14	Amp <sup>R</sup>	S142A	(28)

Vektorbezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Referenz bzw. Konstruktion
pTBY15	Amp <sup>R</sup>	N145Q/E190G	diese Arbeit
pTBY16	Amp <sup>R</sup>	N145D	diese Arbeit
pTBY17	Amp <sup>R</sup>	N145Q	diese Arbeit
pTBY18	Amp <sup>R</sup>	I148E	diese Arbeit
pTBY19	Amp <sup>R</sup>	I148Y	diese Arbeit
pTBY20	Amp <sup>R</sup>	H149K	diese Arbeit
pTBY21	Amp <sup>R</sup>	H149Q	diese Arbeit
pTBY22	Amp <sup>R</sup>	E150D	diese Arbeit
pTBY23	Amp <sup>R</sup>	E150Q	diese Arbeit
pTBY24	Amp <sup>R</sup>	H153Q	diese Arbeit
pTBY25	Amp <sup>R</sup>	H153K	diese Arbeit
pTBY26	Amp <sup>R</sup>	D156E	diese Arbeit
pTBY27	Amp <sup>R</sup>	D156N/D161E	diese Arbeit
pTBY28	Amp <sup>R</sup>	D156N	diese Arbeit
pTBY29	Amp <sup>R</sup>	G160S	diese Arbeit
pTBY30	Amp <sup>R</sup>	D161E	(28)
pTBY31	Amp <sup>R</sup>	W177Y	diese Arbeit
pTBY32	Amp <sup>R</sup>	Y205S	diese Arbeit
pTBY33	Amp <sup>R</sup>	A207D/Y205H	diese Arbeit
pTBY34	Amp <sup>R</sup>	A207D	diese Arbeit
pTBY35	Amp <sup>R</sup>	A207S	(28)
pTBY36	Amp <sup>R</sup>	P210S	diese Arbeit
pTBY37	Amp <sup>R</sup>	E212Q	diese Arbeit
pTBY38	Amp <sup>R</sup>	E212D	diese Arbeit
pTBY39	Amp <sup>R</sup>	F214M	diese Arbeit
pTBY40	Amp <sup>R</sup>	A215D	diese Arbeit
pTBY41	Amp <sup>R</sup>	A215S	(28)
pTBY42	Amp <sup>R</sup>	V216D	diese Arbeit
pTBY43	Amp <sup>R</sup>	V216L	(28)
pTBY44	Amp <sup>R</sup>	V216L/L217I	(28)
pTBY45	Amp <sup>R</sup>	S218A	diese Arbeit
pTBY46	Amp <sup>R</sup>	E219Q	diese Arbeit
pTBY47	Amp <sup>R</sup>	E219D	diese Arbeit
pTBY48	Amp <sup>R</sup>	E219D/F214F	diese Arbeit
pTBY49	Amp <sup>R</sup>	F222M/K189E	diese Arbeit
pTBY50	Amp <sup>R</sup>	F222M	diese Arbeit
pTBY51	Amp <sup>R</sup>	P225S	diese Arbeit
pTBY52	Amp <sup>R</sup>	P233S-1	diese Arbeit
pTBY53	Amp <sup>R</sup>	P233S-2	diese Arbeit
pTBY54	Amp <sup>R</sup>	Y243S	diese Arbeit
pTBY55	Amp <sup>R</sup>	V77A/S142F	diese Arbeit
pTBY56	Amp <sup>R</sup>	pTMByeeI mit <i>Pst</i> I Schnitt	diese Arbeit
pTBY57	Amp <sup>R</sup>	pTM30 mit <i>mfrg</i>	diese Arbeit
pTIM101	Amp <sup>R</sup> Spec <sup>R</sup>	IR von Tn1721 Derivat von pIC-19H	(108)
pTIM101 $\Delta$ ( <i>scrY<sub>op</sub>-gfp</i> )	Amp <sup>R</sup> Spec <sup>R</sup>		(95)
pTM110	Amp <sup>R</sup>	pTM30 mit <i>ptsG</i>	(107)
pTM30	Amp <sup>R</sup>	Klonierungsvektor	(63)
pTM30mlchis	Amp <sup>R</sup>	pTM30 mit <i>dgsA</i> und N <sup>+</sup> His-Tag <sup>+</sup>	(28)
pTMByeeI-1	Amp <sup>R</sup>	<i>yeell</i> mit „His-Tag“	(11)
pTMByeeI	Amp <sup>R</sup>	<i>yeelS</i> mit „His-Tag“	(11)
pTMB1	Amp <sup>R</sup>	pTM30 mit <i>ptsG</i> $\Delta$ I-1148	diese Arbeit
pTMB2	Amp <sup>R</sup>	pTM30 mit <i>ptsGC421A</i> $\Delta$ I-1148	diese Arbeit
pTMB3	Amp <sup>R</sup>	PTM30 mit Bhis	diese Arbeit
pTMB4	Amp <sup>R</sup>	PTM30 mit B*his	diese Arbeit
pTMB5	Amp <sup>R</sup>	pTMByeeI mit Bhis aus pTMB3	diese Arbeit
pTMB6	Amp <sup>R</sup>	pTMByeeI mit Bhis aus pTMB4	diese Arbeit
pTMB7	Amp <sup>R</sup>	pTMByeeI mit Bhis aus pTMB3	diese Arbeit

Vektorbezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Referenz bzw. Konstruktion
pTMB8	Amp <sup>R</sup>	pTMB <sub>yeel</sub> mit Bhis aus pTMB4	diese Arbeit
pTMC421A	Amp <sup>R</sup>	pTM30 mit <i>ptsGC421A</i>	diese Arbeit
pTMF1	Amp <sup>R</sup>	pTMB <sub>yeel</sub> Δ1-401 ( <i>tmfrg</i> )	diese Arbeit
pusI21	Kan <sup>R</sup>	Tra <sup>+</sup> Km <sup>r</sup> Kan <sup>+</sup> inserted in <i>rafY</i>	(104)

Tab.2.1.5 verwendete Hefektoren

Vektorbezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Referenz bzw. Konstruktion
pGAD424A	Amp <sup>R</sup> LEU2 2μm	Transkriptionsaktivierungsdomäne von desGal4p-Proteins	(9)
pGAD424A/PFK1	Amp <sup>R</sup> LEU2 2μm	Kontrolle Hefe Di-Hybrid System	J. Heinisch LKS
pGAM1	Amp <sup>R</sup> LEU2 2μm	pGAD424 mit <i>mtfA</i> <sub>leu</sub>	diese Arbeit
pGAM2	Amp <sup>R</sup> LEU2 2μm	pGAD424 mit <i>mtfA</i>	diese Arbeit
pGBD-C2	Amp <sup>R</sup> TRP1 2μm	DNA-Bindedomäne des GAL4-Proteins	(34)
pGBD-C2/PFK1	Amp <sup>R</sup> TRP1 2μm	Kontrolle Hefe Di-Hybrid System	J. Heinisch LKS
pGBM1	Amp <sup>R</sup> TRP1 2μm	pGBD-C2 mit <i>mtfA</i> <sub>leu</sub>	diese Arbeit
pGBM2	Amp <sup>R</sup> TRP1 2μm	pGBD-C2 mit <i>mtfA</i>	diese Arbeit
pVA3	Amp <sup>R</sup> TRP1 2μm	Kontrolle Hefe Di-Hybrid	(85)
pTD1	Amp <sup>R</sup> LEU2 2μm	Kontrolle Hefe Di-Hybrid	(9)

### 2.1.3 verwendeten Oligonukleotide

Tab.2.1.6 verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
A207D-	TTCAGCAGGATCGCTGTCTGCATAAGCATCAATG	Mutagenese <i>mtfA</i>
A207D+	CATTGATGCTTATGCAGACAGCGATCCTGCTGAA	Mutagenese <i>mtfA</i>
A215D-	ATATTCAGAAAGTACGTCAAACATTCAGCAGG	Mutagenese <i>mtfA</i>
A215D+	CCTGCTGAATGTTTTGACGTACTTTCTGAATAT	Mutagenese <i>mtfA</i>
A70D-	GTAGGCAAATAGAAGATCTATCCGGCAGCTTC	Mutagenese <i>mtfA</i>
A70D+	GAAGCTGCCGGATAGATCTTCTATTTTGCCTAC	Mutagenese <i>mtfA</i>
BTH1	TGTGAAATGCTCGAGAAGTGG	BTH
BTH2	TAAATTAAGATCTCATGAAAAACC	BTH
BTH3	GCCGAAAACAGATCTGTATCATT	BTH
BTH4	GCAGAAGTTGGTGACCTGGAAAGTAC	BTH
BTH5	CAAATGGCTCGAGATAAATTAAG	BTH
BTH6	CGCCGAATTCGAGTCTGTATC	BTH
BTH7	GCAGAAGGTGACCTGGAAAGTAC	BTH
BTH8	GTTAGGTCTCGAGCTTGTG	BTH
BTH9	GATAAATTAAGATCTCATGAAAACCATC	BTH
DgsA-NcoI	GTATGCCATGGTTGCTGAAAACCAGCCTGGGC	Mlc Klonierung
DgsA-PstI	GTTAAAAAACTGCAGCCCTGCAACAGACGAATCAAC	Mlc Klonierung
E150D-	GTCCAGCTTATGAGCGACATCATGAATAATCAGGTTAAA	Mutagenese <i>mtfA</i>
E150D+	TTTAACTGATTATTCATGATGTCGCTCATAAGCTGGAC	Mutagenese <i>mtfA</i>
E150Q-	GTCCAGCTTATGAGCGACTTGATGAATAATCAGGTTAAA	Mutagenese <i>mtfA</i>
E150Q+	TTTAACTGATTATTCATCAAGTCGCTCATAAGCTGGAC	Mutagenese <i>mtfA</i>
G120S-	CTTGCTGCCAGCTCTGACTTGACTGAACAATACG	Mutagenese <i>mtfA</i>
G120S+	CGTATTGTTCAAGTCAGAGCTGGCAGCAAG	Mutagenese <i>mtfA</i>
G160S-	TCCGCTGGCGCGATCGCTGTTACGGGTGTCCAG	Mutagenese <i>mtfA</i>
G160S+	CTGGACACCCGTAACAGCGATCGCGCCAGCGGA	Mutagenese <i>mtfA</i>
H149K-	CAGCTTATGAGCGACTTCTTTAATAATCAGGTTAAAACC	Mutagenese <i>mtfA</i>
H149K+	GGTTTTAACCTGATTATTAAGAAGTCGCTCATAAGCTG	Mutagenese <i>mtfA</i>
H149Q-	CAGCTTATGAGCGACTTCTTTAATAATCAGGTTAAAACC	Mutagenese <i>mtfA</i>





Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
S218A+	TGTTTTGCCGTA CT TGTGAATATTTCTTTAGC	Mutagenese <i>mtfA</i>
TM1,2frg-	AGCAAATGCATTCTTCTGCAGAATTGAGAGAATTCCTCC	Mutagenese
TM1,2frg+	CTCTCAATTCTGCAGAAGAATGC	Mutagenese
TM1,2frg+	GGAGGAATTCTCTCAATTCTGCAGAAGAATGCATTTGCT	Mutagenese
V216D-	GAAATATTCAGAAAGGTCGGCAAAACATT CAGC	Mutagenese <i>mtfA</i>
V216D+	GCTGAATGTTTTGCCGACCTTTCTGAATATTT C	Mutagenese <i>mtfA</i>
V77A+neu	CTATTTTGCTACCCGCTCTGGAGTTAGGACTG	Mutagenese <i>mtfA</i>
V77A-neu	CAGTCCTAACTCCAGAGCGGGTAGGCAAAATAG	Mutagenese <i>mtfA</i>
W132Y-	ATCTTGATATCCAAGTAGTTCAAACGATTGG	Mutagenese <i>mtfA</i>
W132Y+	CCTATCGTTTTGAACTACTTGGATATACAAGAT	Mutagenese <i>mtfA</i>
W177Y-	CATGAAGATCGTGTTCTGAGCCAGCAACCTCAG	Mutagenese <i>mtfA</i>
W177Y+	CGTGAGGTTGCTGGCTACGAACACGATCTTCATG	Mutagenese <i>mtfA</i>
Y94S-	CCACAAATGGCGCAGGAGAAATTAAGACTTCATG	Mutagenese <i>mtfA</i>
Y94S+	CAT GAAGTCCTTAATTTCTCCTGCGCCATTTGTGG	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeI 10	CTGGAGTTAGGACTGGAATG	Cy5 Sequenzierung
YeeI 11	AATGAACAACATTCAGGAAG	Cy5 Sequenzierung
YeeI 12	ACCGCATCAGGCGCCTTAGT	Cy5 Sequenzierung
YeeI 13	CTTCATGAATAATCAGTTA	Cy5 Sequenzierung
YeeI14	GAATCCAGTTCAAAGCCC	Sequenzierung
YeeID156E-	GCGATCGCCGTTACGGGTTTCCAGCTTATGAGCGACTTC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeID156E+	GAAGTCGCTCATAAGCTGGAACCCGTAACGGCGATCGC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeID156N-	GCGATCGCCGTTACGGGTTTCCAGCTTATGAGCGACTTC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeID156N+	GAAGTCGCTCATAAGCTGAACCCGTAACGGCGATCGC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIE212D-	GAAAGTACGGCAAAACAGTCAGCAGGATCGCTGGCTGC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIE212D+	GCAGCCAGCGATCCTGCTGACTGTTTTGCCGTA CT TTC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIE212Q-	GAAAGTACGGCAAAACATTGAGCAGGATCGCTGGCTGC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIE212Q+	GCAGCCAGCGATCCTGCTCAATGTTTTGCCGTA CT TTC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIE219D-	GGGGCGCTAAAGAAATAGTCAGAAAGTACGGCAAAAC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIE219D+	GTTTTGCCGTA CT TTTCTGACTATTTCTTTAGCGCCCC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIE219Q-	GGGGCGCTAAAGAAATATTGAGAAAGTACGGCAAAAC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIE219Q+	GTTTTGCCGTA CT TTTCTCAATATTTCTTTAGCGCCCC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIF214M-	CAGAAAGTACGGCCATACATTCAGCAGGATCGCTGGC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIF214M+	GCCAGCGATCCTGCTGAATGTATGGCCGTA CT TTC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIF222M-	GTTCTGGGGCGCTCATGAAATATTCAGAAAGTACGGC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIF222M+	GCCGTA CT TTTCTGAATATTTCTATGAGCGCCCCAGAAC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIFragment+	GAAGTGGCTGCAGATACAAGATTTCTTTGATGCTTC	Klonierung <i>mfrg</i>
YeeIfrg-Pst	AACGATGGCGTATCCCTGCAGGCCGCA GT TGTGCC	Klonierung <i>mfrg</i>
YeeI ganz-	ATGAACATTCGTCGCCGAAAACG	Promotorstudien
YeeI ganz+	GTGCAATTTTGTTC AAGTGACGA	Promotorstudien
YeeIRT+	TGCGCCATTTGTGGTCGATGA	RT-RT PCR
YeeI-	GCATGAAGATCGTGTTCCAGCCA	RT-RT PCR
YeeIP210S-	GGCAAAACATTCAGCACTATCGCTGGCTGCATAAGC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIP210S+	GCTTATGCAGCCAGCGATAGTGCTGAATGTTTTGCC	Mutagenese <i>mtfA</i>
Yeeiprom-	CTGCAAAGTTGAAGCTTAATGAAC	Promotorstudien
YeeI prom+	CAGCCGCTCCGGGATCCCTCCGTT C	Promotorstudien
YeeI prombam-	CTTGTACTTTCCGGATCCACTTAA	Promotorstudien
YeeI promhind+	GCCGCTCAAGCTTCTCTCCGTT CAG	Promotorstudien
YeeI promkurz-	CAGGGCCACTTAAGCTTCGTTTTGC	Promotorstudien
YeeI promkurz+	GCAAAACGAAGCTTAAGTGGCCCTG	Promotorstudien
YeeIY205S-	CAGGATCGCTGGCTGCACTAGCATCAATGCTCGC	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIY205S+	GCGAGCATTGATGCTAGTGCAAGCCAGCGATCCTG	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIY243S-	CTGCAAAGGATCTTGTGACTAAATTGGCAGAAACGTTGCCA	Mutagenese <i>mtfA</i>
YeeIY243S+	TGGCAACGTTTTCTGCCAATTTAGTCAACAAGATCCTTTGCAG	Mutagenese <i>mtfA</i>
yeeIRT+	TGCGCCATTTGTGGTCGATGA	RT-RT PCR
Yeest-	TTATGCTGCAGGATAAATTAAGACTTCATGAAAAC	Hefe Di-Hybrid
Yeest+	ATCAGAATCCCTTCCCTGGCAGGCACTATCG	Hefe Di-Hybrid
Yeest3+	AAGAATTCGCACATCAAACCTGCCCTTCCCTGGCAG	Hefe Di-Hybrid

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
Yeast4-	CATTAGCGTGCTGCAGTCTCTG	Hefe Di-Hybrid
Ymlcpms-	GGAGAAAATACCGCTCGAGGCGCCTTAG	BTH
Ymlcpms+	GGACTGGAATGGCTGCAGGGTTTTTCAT	BTH

## 2.1.4 Chemikalien und Enzyme

Handelsübliche Chemikalien, Detergenzien, Lösungsmittel, Kohlenhydrate und Antibiotika wurden, wenn nicht anders angegeben von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Difco (Michigan, USA), Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisendorf) bezogen. Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) (Schwalbach) oder der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Kits für verschiedene DNA-Techniken wurden von den Firmen Qiagen (Düsseldorf) und Promega (Mannheim) verwendet. Oligonukleotide wurden bei der Firma Thermo Electron Corporation (104) bestellt.

## 2.1.5 Verwendete Medien

### 2.1.5.1 Minimalmedium (MM)

Als Minimalmedium wurde ein Standard-Phosphatmedium nach Tanaka et al. (100) verwendet. Die benötigte Kohlenhydratquelle wurde, wenn nicht anders angegeben, nach dem Autoklavieren zu einer Endkonzentration von 0,2% (w/v) zugesetzt. Minimalmedium Platten enthielten zusätzlich 15g/l Agar (Invitrogen).

### 2.1.5.2 Vollmedien (LBo, LB, 2xTY und MacConkey)

Flüssiges **LBo** (Luria-Bertani) Medium setzte sich aus 10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefe-Extrakt und 5g/l NaCl zusammen. Diese Bestandteile wurden auf 1000ml mit Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Vollmediumplatten wurde vor dem Autoklavieren zusätzlich 15g/l Agar (Invitrogen) zugesetzt. Für **LB** Medium, welches für die P1 Transduktion verwendet wurde, wurde dem LBo Medium nach dem Autoklavieren Glukose (0,2% (w/v) Endkonzentration), sowie CaCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 2,5mM) zugegeben. Des weiteren wurde für die Anzucht für Miniplasmidpräparationen und für verschiedene andere Versuche **2xTY** Medium verwendet. Hierbei handelt es sich um ein sehr nährstoffreiches Vollmedium, welches aus 16g/l Bacto-Trypton, 10g/l Hefeextrakt und 5g/l NaCl bestand. Darüber hinaus wurden MacConkey Indikatorplatten verwendet (57). Diese zeigen aufgrund des enthaltenen Indikatorfarbstoffes Neutralrot die Vergärung der zugesetzten Kohlenhydrate durch eine Rotfärbung des Mediums an. Das MacConkey Medium bestand aus 40g/l MacConkey Agar Base (Difco) in 1000ml Wasser. Die zu testende Kohlenstoffquelle wurde nach dem Autoklavieren in einer Endkonzentration von 1% (w/v) steril zugegeben. Eine Ausnahme stellte Mannose dar, welches zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v) zugegeben wurde.

### 2.1.5.3 Medien für Glyzerinkulturen

Für die Herstellung von Glyzerindauerkulturen wurden zwei salzarme Vollmedien verwendet. Die Anzucht der Kulturen erfolgte in 10ml „Slant“ Medium. Dieses bestand aus 20g/l Bacto-Trypton, 10g/l Hefeextrakt, sowie 2,3ml 87%igem Glyzerin. Hierzu wurde gegebenenfalls nach dem Autoklavieren steril ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Die Anzucht erfolgte über Nacht, anschließend wurde die Gesamtkultur abzentrifugiert, in 4ml 50:50 Medium (5g Trypton, 2,5g Hefeextrakt, 288ml 87% Glyzerin, 212ml Wasser) resuspendiert und in 2x2ml Portionen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.1.5.4 Che - LT Platten 1%

Für die Chemotaxis-Schwärmtests wurden sehr weiche Vollmedium Platten folgender Zusammensetzung verwendet: 10g/l Trypton; 5g/l NaCl; 3,5g/l Difco-Agar. Nach dem 15minütigen Autoklavieren wurde 1ml sterile 1M  $\text{MgSO}_4$  Lösung hinzugefügt.

### 2.1.5.5 Chemotaxis-Schwärmplatten

Diese „Chemotaxis-Minimal“ Platten wurden verwendet, um verschiedene Lockstoffe zu testen. Die Platten bestanden aus 3,9ml/l 1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6,1ml/l 1M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1ml/l 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,7g/l Difco-Agar. Nach dem Autoklavieren wurde 1ml einer sterilen, 1M  $\text{MgSO}_4$ -Lösung sowie die zu testenden Substrate (Kohlenhydrate 300 $\mu\text{M}$ , AS 200 $\mu\text{M}$  Endkonzentration) zugegeben. Des Weiteren wurde 1mM Glukonat oder Glyzerin, sowie bei Bedarf Antibiotika und bei vorhandenen Auxotrophien AS (alle 20mg/l außer Methionin/ Cystein 40mg/l und Threonin 50mg/l) oder Vitamine (5mg/l) zugegeben.

### 2.1.5.6 P1-Weichagar

P1 Weichagar, der für die Herstellung und Titration von P1-Lysaten verwendet wurde, bestand aus 8g/l Bacto-Trypton, 5g/l NaCl und 4,5g Difco Agar.

### 2.1.5.7 Hefe-Medien

Für die Versuche des Hefe Di-Hybrid Systems wurden folgende Medien zur Anzucht der Hefestämme verwendet:

**Vollmedium:** (YEPD)

1% Hefeextrakt

2% Pepton

Kohlenstoffquelle: 2% Glucose

Für Platten wurden dem Medium zusätzlich 1,5% Difco Agar zugesetzt

**Synthetisches Komplettmedium:**

0,67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (YNB) AS wurden als Aminosäuremix wie folgt nach (109) zugegeben:

**Tab.2.1.7 Aminosäuren**

Aminosäure	Endkonzentration [mg/l]	Aminosäure	Endkonzentration [mg/l]
Adeninsulfat	20	L-Phenylalanin	50
L-Arginin	20	L-Serin	400
L-Histidin	20	L-Threonin	200
L-Isoleucin	30	L-Tryptophan	20
L-Leucin	100	L-Tyrosin	30
L-Lysin	30	L-Valin	150
L-Methionin	20	Uracil	20

Der pH Wert des Mediums wurde auf 6,3 eingestellt. Zur Herstellung von Platten wurde dem Medium 1,5% Difco Agar zugefügt. Die Anzucht der Hefen erfolgte bei 30°C. Für den Blau-Weiß „Screen“ in Hefen wurde synthetisches Komplettmedium mit sterilem Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 auf eine Endkonzentration von 20mM gebracht und anschließend mit X-Gal [5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-D-Galactopyranosid] (100µl einer Stammlösung von 10mg/ml in Dimethylformamid) beschichtet.

**2.1.5.8 Antibiotikazusätze**

Die Antibiotikallösungen wurden als 100fache Stocklösungen hergestellt und in jeweils einfacher Konzentration (siehe Endkonzentration) in den jeweiligen Medien eingesetzt. Antibiotika in Ethanol wurden bei -20°C, die in H<sub>2</sub>O im Kühlschrank gelagert.

**Tab.2.1.8 Antibiotikallösungen**

Antibiotikum	Stocklösung [mg/50ml]	Lösungsmittel	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	500	50% Ethanol	100
Tetrazyklin	50	50% Ethanol	10
Chloramphenicol	125	50% Ethanol	25
Kanamycin	125	H <sub>2</sub> O	25
Streptomycin	250	H <sub>2</sub> O	50
Spectinomycin	500	H <sub>2</sub> O	100

**2.1.5.9 IPTG / X-Gal**

IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) wurde als eine 100mM Stocklösung in Wasser angesetzt. X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-D-Galactopyranosid) wurde als 2%ige Stocklösung in DMF (Dimethylformamid) angesetzt. IPTG wurde in verschiedener Konzentration für die Induktion des *lac*-Systems in verschiedenen Vektorhintergründen verwendet. Darüber hinaus wurden X-Gal (0,02%) und IPTG (1mM) für den Nachweis der α-Komplementation der β-Galaktosidase im sogenannten „Blau-Weiß Screen“ verwendet.

### 2.1.5.10 Anzucht von Bakterienstämmen

Wenn im Ergebnisteil nicht anders angegeben, wurden die Zellen ausgehend von einer Übernachtskultur in selektivem Vollmedium frisch zu einer  $OD_{650}=0.05$  (bzw.  $OD_{420}=0,05$ ) angeimpft. Nach einer Verdopplung wurden die Zellen ggf. mit IPTG oder Arabinose induziert und anschließend bis zu einer  $OD_{650}=1$  (bzw.  $OD_{420}=1$ ) bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Ernte für Western-Blots oder quantitative  $\beta$ -Galaktosidase Tests erfolgte in der Regel bei einer  $OD_{650}=1$ .

### 2.1.6 Häufig verwendete Puffer

Tab.2.1.9 häufig verwendete Puffer

Puffer	Komponenten	Konzentration	Bemerkungen
Anodenpuffer 1 für Western-Blot	Tris-HCl pH9,4 Methanol	300mM 20%	
Anodenpuffer 2 für Western-Blot	Tris-HCl pH 9,4 Methanol	30mM 20%	
Blotpuffer 1x	Tris Glycin Methanol	29mM 192mM 20%	
GLB (Glyzerinloadingbuffer) 5x	Glyzerin TBE Bromphenolblau Xylencyanolblau	50% 0,5x 0,25% 0,25%	
Kathodenpuffer für Western-Blot	$\epsilon$ -Amino-Capronsäure Tris-HCl pH 9,4 Methanol	40mM 25mM 20%	
Laufpuffer für native Gele 10x	Tris Glycin	15g/500ml 72g/500ml	pH Wert nicht einstellen
PP1 pH 7,2	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	50mM 50mM	So lange mischen, bis gewünschter pH eingestellt ist
Probenpuffer für native Gele 2x	Tris-HCl pH 6,8 Glyzerin Bromphenolblau $\text{H}_2\text{O}$	0,5M 1ml 87% 2ml 1% 1ml 4ml	
SDS Elektrophoresepuffer 10x	Tris Glycin SDS	250mM 1,92M 35mM	pH 8,2-8,3 darf nicht eingestellt werden
SDS Probenpuffer 2x 9ml	10% SDS 87% Glyzerin Tris pH 6,76 Bromphenolblau $\beta$ -Mercaptoethanol	4ml 2,3ml 250mM 0,02% 10%	
TBE 10x	Tris Borsäure EDTA	89mM 89mM 2mM	pH8,3
TBS 1x	Tris-HCl pH7,5 NaCl	10mM 150mM	
TE 1x	Tris-HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0	10mM 1mM	
TNT 1x	Tris-HCl pH 7,5 NaCl Tween 20	20mM 500mM 0,05%	

## 2.2 Allgemeine Methoden

### 2.2.1 Bakterienanzucht und Bestimmung der Zellzahl

Die verschiedenen Bakterienkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C aerob im Schüttel-wasserbad oder auf dem Schüttler im Brutschrank kultiviert. Die Anzahl der Zellen wurde durch eine photometrische Absorptionsmessung im Spektralphotometer bestimmt. Eine Absorptionseinheit von 1 bei einer Wellenlänge von 650nm (Messung von Kulturen in Vollmedium) entspricht einer Bakteriendichte von  $1 \times 10^9$  Zellen/ml. Bei der Messung von Minimalmedium wurde die Wellenlänge 420nm verwendet. Hierbei entspricht eine OD von 1 =  $5 \times 10^8$  Zellen/ml. Soweit nicht anders angegeben wurde für die Bakterienanzucht eine Vorkultur in Vollmedium zu einer  $OD_{650} = 0,05$  in frischem Medium verdünnt. Nach einer Verdopplung ( $OD_{650} = 0,1$ ) wurden die Kulturen bei Bedarf induziert und bei einer  $OD_{650} = 1$  für verschiedene Zwecke (z.B. Western-Blot,  $\beta$ -Galaktosidase Test etc.) geerntet.

### 2.2.2 Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration

Für die photometrische DNA- oder RNA-Konzentrationsbestimmung wurde die Probe in 700 $\mu$ l H<sub>2</sub>O 1:50 verdünnt und die OD bei 260 und 280nm mit Hilfe einer Quarzküvette bestimmt. Die  $OD_{260} = 1$  entspricht einer Konzentration von 50 $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNA, bzw. 40 $\mu$ g/ml RNA. Der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen und gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der jeweiligen Nukleinsäuren.

### 2.2.3 Silberfärbung

Für die Silberfärbung von Proteinen im SDS-Gel wurde folgendes Protokoll verwendet. Zunächst wurden die SDS-Gele für eine Stunde in Fixierlösung äquilibriert und anschließend 3x20 Minuten mit 50% Ethanol gewaschen. Danach wurden die Gele eine Minute in Thiosulfatlösung inkubiert und 3x für 20 Sekunden in H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach einer 20minütigen Inkubation in der Imprägnierlösung, wurden die Gele wiederum 3x für 20 Sekunden in H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Banden mit Entwicklerlösung sichtbar gemacht, die Gele kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen, und anschließend für 15 Minuten mit Stopplösung inkubiert.

**Tab.2.2.1 Lösungen für Silberfärbung**

Lösung	Zusammensetzung
Fixierer	500ml Methanol, 120ml Essigsäure, 0,5ml Formaldehyd ad 1000ml
Thiosulfatlösung	0,04g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O ad 200ml
Imprägnierlösung	0,4g AgNO <sub>3</sub> , 150 $\mu$ l 37% Formaldehyd ad 200ml
Entwicklerlösung	12g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 4ml Thiosulfatlösung, 100 $\mu$ l 37% Formaldehyd ad 200ml
Stopplösung	23g Na <sub>2</sub> EDTA (= Titriplex-2I) ad 1000ml

## 2.3 Genetische Methoden

### 2.3.1 P1-Transduktion

Zur Durchführung der P1-Transduktion wurde die von Lengeler (48) modifizierte Methode nach Arber (5) angewendet. Zur Herstellung von Lysaten wurden 0,25ml Übernachtskultur in LB Medium des Stammes genommen, aus welchem das P1-Lysat hergestellt werden sollte. Diese wurde mit 2,5 ml P1 Weichagar und  $5 \cdot 10^6$  Phagen/ml eines Starterlysates in einem Zentrifugenröhrchen vermischt und auf eine vorgewärmte (37°C) LB Platte gegeben. Als Kontrolle diente eine Platte, auf die nur die entsprechende Menge Phagen und eine Platte, auf die nur die entsprechende Menge Bakterien, jeweils in Weichagar gegeben wurde. Sobald eine konfluente Lyse der Bakterien erreicht war (nach 3-4h), wurde diese Platte mit 3ml LB Medium überschichtet. Das LB Medium wurde zusammen mit dem Weichagar abgekratzt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Vermischung mit 1ml Chloroform wurden die Phagen 10min in einer Tischzentrifuge bei 5000rpm abzentrifugiert. Der Überstand, der die Phagen enthielt, wurde abgenommen und mit etwas Chloroform zur Abtötung der Restbakterien aufbewahrt. Um den Phagentiter der Lysate zu bestimmen, wurden eine  $10^{-6}$  und eine  $10^{-7}$  Verdünnung des Lysates in LB Medium hergestellt. Hiervon wurden jeweils 0,1ml zu wiederum 2,5ml P1 Weichagar und einem Tropfen Indikatorbakterien (Vorkultur in LB Medium) gegeben. Diese Mischung wurde anschließend auf vorinkubierte LB Platten gegeben und die Anzahl der Plaques am nächsten Tag ausgezählt. Für die P1 Transduktion wurden 0,8 ml der zu transduzierenden Bakterien (Übernachtskultur 1:5 verdünnt) mit 0,2ml P1-Lysat ( $1 \cdot 10^9$  Phagen/ml) 20min ohne Schütteln im 37°C Wasserbad inkubiert. Durch die Zugabe von 5ml steriler Citrat-Saline ( 8,5g/l NaCl, 14,7g/l Na-Citrat) wurde die Reaktion gestoppt. Citrat bindet  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen und verhindert somit die  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Adsorption der neuen Phagen. Anschließend wurden die Zellen 10min bei 5000rpm zentrifugiert und danach zweimal in Citrat-Saline gewaschen, schließlich in 0,2ml Citrat-Saline resuspendiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Die erhaltenen Transduktanten wurden anschließend auf LBo Platten gereinigt und einem Markertest unterzogen.

### 2.3.2 Transformation

Unter einer Transformation versteht man die Aufnahme von freier DNA in ein Bakterium. Bei den in dieser Arbeit verwendeten *E.coli* bzw. Hefestämmen war es notwendig, die Kompetenz künstlich zu induzieren. Die entsprechenden Techniken sind in den folgenden Kapiteln zusammenstellt.

#### 2.3.2.1 Präparation kompetenter *E.coli* Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen wurde mittels Rubidiumchlorid-Methode (25) oder der  $\text{MgCl}_2 / \text{CaCl}_2$  Methode (83) durchgeführt. Hierzu wurden Zellen einer Übernachtskultur 1:100 in 20ml LBo Medium verdünnt und bis zu einer  $\text{OD}_{650} = 0,5-0,8$  bei 37°C aerob kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in  $\frac{1}{2}$  Ausgangsvolumen Lösung A (10mM  $\text{RbCl}_2$ , 10mM MOPS pH 7,0) resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen in kalter Lösung B (10mM  $\text{RbCl}_2$ , 50mM  $\text{CaCl}_2$  100mM MOPS pH 6,5) resuspendiert und für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte wiederum nach der Zentrifugation das Re-



suspendieren in 1/10 Ausgangsvolumen Lösung B. Anschließend wurden die Zellen auf Eis bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt oder nach Zugabe von 50% Glycerin bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Alternativ zu diesem Protokoll erfolgte die Induktion der Kompetenz mit Hilfe von  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$ . Hierbei wurde die gleiche Menge an Zellen zunächst in  $\frac{1}{2}$  Ausgangsvolumen 0,1M  $\text{MgCl}_2$  resuspendiert, 10min auf Eis inkubiert und anschließend in 0,1M  $\text{CaCl}_2$  aufgenommen. Nach weiteren 25min auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 1/10 des Ausgangsvolumens  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert.

### 2.3.2.2 DNA Transformation chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

200 $\mu\text{l}$  kompetente Zellen wurden mit einem gesamten Ligationsansatz oder mit 2-5 $\mu\text{l}$  Plasmid DNA versetzt, 60min auf Eis inkubiert und anschließend einem 90sekündigen Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  unterzogen. Danach erfolgte eine 5minütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 1ml 2xTY Medium ohne Antibiotikum erfolgte für 60min die phänotypische Expression bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Roller. Die abzentrifugierten und in LBo Medium resuspendierten Zellen wurden anschließend auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 2.3.2.3 Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation

Zur Herstellung von chemisch kompetenter Hefezellen für Versuche des Di-Hybrid Systems wurden 10ml YEPD-Medium mit dem Hefestamm PJ694- $\alpha$  angeimpft und über Nacht bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (3min 4000rpm) wurde der Überstand entfernt, die Zellen in 1ml sterilem Wasser resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss an einen weiteren Zentrifugationsschritt (2min 5000rpm) wurde das Zellsediment mit 1ml TE/LiAc (10% 10x TE, 10% 10x LiAc; 80%  $\text{H}_2\text{O}$ ) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 200 $\mu\text{l}$  TE/LiAc aufgenommen und in 50 $\mu\text{l}$  Portionen aliquotiert. Zur Transformation wurde jedem Aliquot kompetenter Hefezellen 5 $\mu\text{l}$  Heringssperma-DNA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 300 $\mu\text{l}$  40% PEG4000 Lösung und 2 $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA zugegeben. Die Transformationsansätze wurden anschließend bei 800rpm und  $30^{\circ}\text{C}$  im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) für 30min inkubiert und anschließend einem 15minütigen Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  unterzogen. Danach wurden die Zellen bei 7000rpm für 30Sekunden abzentrifugiert, der Überstand mit einer neuen Pipette abgenommen und das Sediment in 1ml  $\text{H}_2\text{O}$  steril resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 5000rpm für 1min wurden die Zellen in 100 $\mu\text{l}$  YEPD-Medium aufgenommen und auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Die Selektionsplatten wurden zwei bis drei Tage bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 2.3.3 Blau-Weiß Selektion

Diese Methode dient der Selektion auf  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität und wurde unter anderem im Rahmen von Klonierungen verwendet. Das Substrat X-Gal wird durch die  $\beta$ -Galaktosidase gespalten, wodurch eine sichtbare Blaufärbung entsteht. Zur Blau-Weiß Selektion wurden 0,3ml einer 1:1 Mischung aus 100mM IPTG und 2% X-Gal (in DMF) auf den jeweiligen Platten ausplattiert.

## 2.4 Gelelektrophoresen

### 2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

#### 2.4.1.1 Analytische Agarosegele

PCR-Produkte oder über Restriktion geschnittene DNA-Fragmente wurden mit GLB (Endkonzentration 1x) Puffer versetzt und je nach Größe mit Hilfe von 0,7%igen, 1,0 %igen oder 1,5%igen Agarosegelen (SeaKem LE Agarose, Biozym) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit 1xTBE gefüllten Elektrophoresekammer (Biometra). Die Proben wurden so lange bei ca. 170V elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Bromphenolblaubande sich noch ca. einen Zentimeter vor dem Gelende befand. Anschließend wurden die Gele für ca.10min in einem Ethidiumbromidbad (10µl/100ml) gefärbt und mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (LTF Labortechnik) mittels UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Als Standard dienten je nach Größe der zu analysierenden Banden der 1kB Standard der Firma Invitrogen oder der 100bp Standard der Firma NEB.

#### 2.4.1.2 Präparative Agarosegele

Die präparative Auftrennung von Gelfragmenten für Klonierungen erfolgte mit Hilfe von 0,7%igen Agarosegelen (Invitrogen) Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte wie in Kapitel 2.4.1.1 beschrieben. Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 365nm sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Hierdurch sollte verhindert werden, dass energiereiche UV-Strahlung die DNA schädigt. Anschließend wurden die Gele mit Hilfe der Geldokumentationsanlage fotografiert. Die Extraktion der DNA-Fragmente aus den Gelen erfolgte mittels dem „QIAquick Gel Extraction Kit (50)“ oder dem „MiniElute Gel Extraction Kit (50)“ der Firma Qiagen. Die Durchführung dieser Methoden erfolgte nach den angegebenen Protokollen.

### 2.4.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll nach (46). Für diese Art der Gelelektrophorese wurde das BioRad „Mini Protean 3 Cell“ System verwendet, bei dem Gele von ca. 8x9cm verwendet werden. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden Gele verschiedener Polyacrylamid-Bisacrylamid Konzentrationen gewählt. Kleine Proteine wurden mit hochprozentigen Gelen, größere mit geringeren Mengen an Polyacrylamid-Bisacrylamid aufgetrennt. Die Gel-Zusammensetzungen sind in Tab. 2.4.1 zusammengestellt. Der Lauf erfolgte für das Sammelgel bei 100V. Bei dem Eintritt der Proben in das Trenngel erfolgte die Auftrennung bei einer Spannung von 150-200V. Die Polymerisation erfolgte durch die angegebenen Mengen an 10%igem Amoniumpersulfat (APS) und Temed.

**Tab.2.4.1: SDS-Gel Zusammensetzung**

	Trenngel				Sammelgel
	7,5%	10%	15%	16,5%	
Polyacrylamid-Bisacrylamid 30%/0,8%	3,0ml	4,0ml	6,0ml	6,6ml	1ml
H <sub>2</sub> O	5,88ml	4,88ml	2,88ml	2,28ml	6,2ml
1,5M Tris pH8,8	3,0ml	3,0ml	3,0ml	3,0ml	
10% SDS	120µl	120µl	120µl	120µl	100µl
0,5M Tris pH6,8	-	--	-	-	2,5ml
Summe	12ml	12ml	12ml	12ml	9,8ml
10% APS	80µl	80µl	80µl	80µl	65µl
Temed	10µl	10µl	10µl	10µl	8µl

### 2.4.3 Native Gelelektrophorese

Um Proteine unter nativen Bedingungen aufzutrennen, wurde das gleiche BioRad System wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben verwendet. Bei den Gelen handelte es sich um Tris-HCl (10-20%) Gradientengele, die ebenfalls von der Firma BioRad bezogen wurden. Mit Hilfe dieser Methode kann der Polymerisierungsgrad von Proteinen nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht hingegen ist den meisten Fällen nicht abschätzbar, da die Proteine in ihrer nativen Faltung in dem Gel aufgetrennt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden gereinigte Proteine mit Probenpuffer versetzt und maximal 30µg Protein pro Tasche aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x Lauffpuffer bei 4°C und 10mA so lange, bis die Lauffront aus dem Gel herausgelaufen war. Zum Nachweis der Proteine wurden die Gele anschließend mit Coomassie (0,1% Serva Blue, 10% Essigsäure, 25% Methanol) gefärbt und danach in H<sub>2</sub>O mit Zellstoff entfärbt.

### 2.4.4 Wachstumskompetitionsversuche

Zur Eingrenzung der physiologischen Funktion von MtfA wurde das Wachstumsverhalten von einem MtfA-WT Stamm in Konkurrenz zu einem isogenen MtfA-Deletionsstamm untersucht. Die Unterscheidung der beiden Stämme erfolgte wie im Ergebnisteil beschrieben mit Hilfe von MacConkey Sucrose Platten. Zur Mischung der beiden Stämme wurden diese zunächst getrennt voneinander in Vollmedium oder Minimalmedium mit Glycerin als Übernachtskultur angezogen. Die Stämme wurden dann wiederum einzeln in den entsprechenden Medien (LBo, MM Glycerin und MM Glukose) zu einer OD<sub>420</sub>=0,05 angeimpft. Ausgehend hiervon wurden 1:1 Mischungen der Stämme in den jeweiligen Medien hergestellt. Anschließend wurden die jeweiligen Kulturen jeden Tag in neues Medium überimpft. Aus einem Teil der Kultur wurden Verdünnungen hergestellt. Jeweils 2x 100µl wurden auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und am nächsten Tag wurde die Anzahl der roten und weißen Kolonien bestimmt. Bei den Vollmedien wurden jeweils 10<sup>-6</sup> und Verdünnungen, bei den Minimalmedien wurden jeweils 2x 100µl einer 10<sup>-5</sup> Verdünnung ausplattiert. Die Anzucht der Kulturen erfolgte bei den im Ergebnisteil angegebenen Temperaturen unter Sauerstoffzufuhr.

Für die Anzucht unter semi-anaeroben Bedingungen wurden die Kulturen in Wassermannröhrchen gefüllt und mit Paraffinöl bis zum oberen Rand überschichtet.

## 2.5 DNA und RNA Methoden

### 2.5.1 Isolierung extrachromosomaler DNA

Plasmid-DNA wurde aus verschiedenen Stämmen mit Hilfe des Kits „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach dem angegebenen Protokoll isoliert. Die DNA wurde jeweils mit 50µl sterilem H<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.5.2 Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach der Phenol/Chloroform-Methode. Hierbei wurden 100ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert und das Pellet bei Bedarf eingefroren. Nach dem Resuspendieren in 15ml STE Puffer (10mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA; frisch zugegeben: 100µg/ml Proteinase K, 0,5% SDS) erfolgte eine Inkubation für 6 Stunden bei 50°C. Nach erfolgreicher Lyse der Zellen wurde die DNA mit einem äquivalenten Volumen an Phenolchloroform versetzt und anschließend für 20 Minuten bei 4000rpm und 10-12°C zentrifugiert. Die obere Phase enthielt die DNA und wurde mit Hilfe einer abgeschnittenen Spitze abgenommen. Von dieser Lösung wurde das Volumen bestimmt und eine Konzentration von 0,3M Na-Acetat pH5,5 eingestellt. Des Weiteren wurden 2 Volumina 100%iges Ethanol zugegeben. Bei diesem Schritt fiel die DNA sichtbar aus und konnte mit einer sterilen Pasteurpipette aufgewickelt werden. Die erhaltene DNA wurde in einem neuen Zentrifugenröhrchen zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Ethanol vollständig verdampft war, wurde die DNA in 5ml TE bei 4°C über Nacht gelöst.

### 2.5.3 Isolierung von Gesamt-RNA und DNase Verdau

RNA für die Analyse mittels Reverser Transkriptase Real Time PCR (RT-RT PCR (siehe Kapitel 2.5.11)) wurde mit Hilfe des „RNeasy® Mini Kits“ (Qiagen, Hilden) nach dem angegebenen Protokoll isoliert. Anschließend wurde die noch vorhandene genomische DNA mit Hilfe des „Turbo DNA-free™ Kits“ der Firma Ambion entfernt. Hierzu wurden 5µl RNA aus dem vorherigen Eluat mit 25µl RNase freiem H<sub>2</sub>O, 3,5µl Puffer und 1µl DNase versetzt. Diese Mischung wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde erneut 1µl DNase hinzugegeben und erneut 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 3,5µl Inaktivierungsreagenz hinzugefügt und der gesamte Ansatz 2min bei 13000rpm abzentrifugiert. Im Überstand, in dem sich nun die DNA-freie RNA befand, wurde abgenommen und in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei -80°C eingefroren.

### 2.5.4 cDNA Synthese

Die cDNA wurde mit Hilfe des „Revert Aid™ H Minus cDNA synthesis Kit“ (Fermentas) aus den jeweiligen RNA Proben hergestellt. Für die komplette Umschrift der RNA in cDNA wurden der im Kit enthaltende „Random Hexamer Primer“ verwendet. Die cDNA Synthese erfolgte nach dem angegebenen Protokoll.

### 2.5.5 DNA Restriktion

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ist es möglich, doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen zu schneiden. Je nach Enzym entstehen dabei glatte „blunt“ oder überhängende „sticky“ Enden. Zur Restriktion von DNA wurde 1-3Units Enzym (wenn nicht anders angegeben von der Firma NEB) pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. Der Ansatz wurde nach einer 1-3stündigen Inkubation mit GLB versetzt und auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt.

### 2.5.6 DNA Behandlung mit „Antarktischer Phosphatase“

Nach einer DNA Restriktion wurde der geschnittene Vektor anschließend bei Bedarf mit „Antarktischer Phosphatase“ (NEB) behandelt. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, welches das Entfernen von 5' Phosphatgruppen von DNA oder RNA katalysiert. Somit kann eine Selbstligation des Vektors verhindert werden. Hierzu wurde zu einem Restriktionsansatz 1/10 Volumen des spezifischen Puffers, sowie  $1\mu\text{l}$  (=5Units) „Antarktische Phosphatase“ zugegeben. Der Gesamtansatz wurde 15 min bei 5'-überhängenden und glatten Enden, und 60min bei 3'-überhängenden Enden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 5min bei 65°C hitzeinaktiviert.

### 2.5.7 „Klenow-Behandlung“ von DNA Fragmenten

Die „Klenow“-Polymerase stellt ein Fragment der DNA Polymerase I ohne die 5'-3' Exonukleaseaktivität dar. Das Auffüllen von 5'-überhängenden- oder das Abspalten von 3'-überhängenden Enden nach einer Restriktionsanalyse oder einer PCR wurde mit Hilfe der „Klenow“-Polymerase nach der von (6) beschriebenen Methode durchgeführt. Hierzu wurden pro  $\mu\text{g}$  DNA 0,5 Units „Klenow“-Polymerase (NEB) hinzugegeben. Der Ansatz wurde zunächst für 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 1,3 mM dNTPs hinzugefügt und für weitere 15 min bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung für 10min bei 75°C.

### 2.5.8 Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation von Vektoren mit PCR Fragmenten, oder aus präparativen Agarosegelen extrahierten DNA Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4 DNA Ligase (Fermentas). Wenn nicht anders angegeben wurde folgender Ligationsansatz verwendet:

- 1,5  $\mu\text{l}$  Ligasepuffer (Fermentas)
- 1 $\mu\text{l}$  Ligase 5 Weiss Units/ $\mu\text{l}$  (Fermentas)
- 2 $\mu\text{l}$  Vektor
- 10,5 $\mu\text{l}$  „Insert“-DNA

Die Inkubation erfolgte wie vom Hersteller angegeben für 1Stunde oder über Nacht bei 22°C. Alternativ wurden PCR-Produkte ohne vorherige „Klenow“-Behandlung in den pGEM<sup>®</sup>-T Vektor der Firma Promega nach dem dort angegebenen Protokoll kloniert. Der Ligationsansatz wurde direkt und wenn nicht anders angegeben komplett in die folgende Transformation eingesetzt.

### 2.5.9 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Polymerasekettenreaktion verschiedener DNA Fragmente wurden die Thermocycler „T-Personal“ und „T-Gradient“ der Firma Biometra verwendet. Wenn nicht anders angegeben wurde der unten aufgeführte Reaktionsansatz gewählt. Die „Annealingtemperatur“ ist abhängig von der Länge und des GC-Gehaltes der Primer und wurde daher für jede PCR mit Hilfe des Gradientencyclers neu optimiert.

Allgemeiner Reaktionsansatz	allgemeines Programm:	
5µl Reaktionspuffer	94°C Denaturierung	} x 35-40
5µl DNA (bei Plasmiden 1:100 verdünnt)	94°C 30'' Denaturierung	
5µl dNTPs (je 2mM)	variable Annealingtemperatur	
5µl Primer + (10pmol/µl)	72°C 30'' Elongation	
5 µl Primer- (10pmol/µl)	72°C 3'finale Elongation	
1µl Taq-Polymerase	4°C Abkühlung	
ad 50 µl H <sub>2</sub> O		

Während dieser Arbeit wurden je nach Anwendung verschiedene Taq- oder Hotstart Polymerasen (Taq DNA Polymerase (Roche) (1U/µl), Takara Taq HS (5U/µl), Immolase™ DNA Polymerase (5U/µl) (Bioline), Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen)) verwendet. Zur Reinigung der PCR-Produkte für Klonierungen wurde das Wizard®-PCR-Preps DNA Purification System (Promega) verwendet. Für Fragmente ≤ 200bp wurde das Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll benutzt.

### 2.5.10 DNA Sequenzierung

Zu Beginn der Arbeit wurden neue Klonierungsprodukte, durch Mutagenese veränderte Genbereiche oder Plasmide mit Hilfe des Amersham ALF Express nach vorgegebener Anleitung selber nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (84) sequenziert. Für die Sequenzreaktion wurde das „Cycle Reader™ Auto DNA Sequencing Kit“ (Fermentas) oder alternativ das „ALFexpress AutoRead Sequencing Kit“ (Amersham Biosciences) verwendet. Des weiteren wurde für das Sequenzgel das „Repro Gel Long Read“ (Amersham Biosciences) verwendet. Alternativ wurden verschiedene Proben im Zentrum für Medizinische Genetik Osnabrück sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte hier mit Hilfe des ABI3100Avant.

### 2.5.11 Reverse Transkriptions Real Time PCR ( RT-RT PCR)

Für die RT-RT PCR wurde der „Icycler“ der Firma BioRad verwendet. Hierzu wurden die verwendeten Proben zunächst unter verschiedenen Bedingungen angezogen. Anschließend wurde die Gesamt-RNA (Kapitel 2.5.3) isoliert, ein genomischer DNA Verdau (Kapitel 2.5.3) durchgeführt und cDNA synthetisiert (Kapitel 2.5.4). Anschließend wurde mit Hilfe des 2x BioRad „iQ™ SYBR Green Supermix“ eine 25µl PCR Reaktion angesetzt. Hierbei wurde folgender PCR Ansatz gewählt:

12,5µl SYBR Green Mix  
 2,5µl Primer + (10pmol/µl)  
 2,5µl Primer - (10pmol/µl)  
 6,5µl H<sub>2</sub>O

Das PCR Profil wurde je nach Art der Probe und der Primer neu optimiert und wird daher einzeln im Ergebnisteil angegeben. Die PCR wurde unter den jeweils angegebenen Bedingungen durchgeführt und die Auswertung mit der entsprechenden Software gemacht.

### 2.5.12 Ortsgerichtete Mutagenese

Die *mtfA*-Mutationen, ausgehend von dem Vektor pTMB<sub>yeel</sub>, sowie verschiedene Restriktionserkennungs - schnittstellen wurden mit Hilfe der ortsgereichten Mutagenese generiert. Diese wurden mit dem „QuickChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) durchgeführt. Hierzu wurden jeweils spezifische Oligonukleotide entwickelt, die die entsprechenden Basensubstitutionen enthielten und auf beiden Seiten der eingefügten Mutationen noch ca. 6 Triplets der flankierenden Wildtypsequenz umfassten. Der PCR Ansatz wurde wie folgt gewählt:

Reaktionszusammensetzung	verwendetes Programm									
5µl Puffer	<table> <tr> <td>95°C</td> <td>30''</td> <td rowspan="4">} 16 x</td> </tr> <tr> <td>95°C</td> <td>30''</td> </tr> <tr> <td>55°C</td> <td>60''</td> </tr> <tr> <td>68°C...</td> <td>120'' pro kB Vektor</td> </tr> </table>	95°C	30''	} 16 x	95°C	30''	55°C	60''	68°C...	120'' pro kB Vektor
95°C		30''	} 16 x							
95°C		30''								
55°C		60''								
68°C...		120'' pro kB Vektor								
5µl DNA (1:100 verdünnt)										
1,25µl Primer + (10pmol/µl)										
1,25µl Primer- (10pmol/µl)										
1µl dNTP Mix										
36,5µl H <sub>2</sub> O										
1µl Pfu Turbo Polymerase										

Um den Erfolg der Mutagenese zu überprüfen, wurden die Plasmide an den entsprechenden Stellen sequenziert. Nach dem Nachweis der entsprechenden Mutation wurde das gesamte Gen durchsequenziert, um eventuelle PCR Artefakte nachzuweisen.

### 2.5.13 Unspezifische Mutagenese

Um ein Plasmid einer unspezifischen Mutagenese zu unterziehen, wurde es in den Stamm XL1-Red (Stratagene) transformiert. Dieser Stamm hat verschiedene Deletionen in unterschiedlichen Genen (*mutS*, *mutD*, *mutT*) für verschiedene DNA-Reparatursysteme. Durch diese Mutationen ist die Mutageneserate im Gegensatz zu einem *E.coli* Wildtypstamm um das 5000fache erhöht. Dadurch können mit Hilfe dieses Stammes relativ einfach und schnell unspezifische Mutationen erzeugt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels dieser Methode versucht, Mutationen im Gen *mtfA* sowie im *mfrg* Gen zu erzeugen. Hierzu wurde der Stamm XL1-Red mit dem entsprechenden Plasmid transformiert, in LBo Medium angezogen, über Nacht inkubiert und am nächsten Tag in frisches Medium überimpft. Dieses Verfahren wurde 8-10 Tage lang wiederholt. Von jedem Tag wurde jeweils 1ml Kultur abzentrifugiert und anschließend eine Miniplasmidisolierung (Kapitel 2.5.1) durchgeführt. Hiernach wurden die Plasmide für beide Projekte in den Teststamm LZ150/F<sup>'</sup>::Ø(*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*) transformiert und auf einer LBo Amp Platte mit 150µl 100mM IPTG und 150µl 2% X-Gal (in Dimethylformamid) ausplattiert. Dunkelblaue oder entsprechend weiße Kolonien wurden anschließend auf einer LBo Amp X-Gal und LBo Amp IPTG/X-Gal Platte übertragen und auf ihren Phänotyp hin überprüft.

## 2.6 Methoden zur Analyse von Proteinen

### 2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zum Nachweis der Proteinkonzentration wurde das BioRad "Protein Assay Reagenz" verwendet. Hierbei wurde eine bestimmte Menge Protein mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 800µl gebracht. Anschließend wurde das verdünnte Protein mit 200µl des oben angegebenen Bradford Reagenz versetzt. Der Ansatz wurde 5-60 Minuten inkubiert und anschließend wurde die OD<sub>795</sub> bestimmt. Mit Hilfe von verschiedenen BSA Konzentrationen (0,2,4,6,8 und 10 mg/ml) wurde eine Eichgerade erstellt. Somit konnten die jeweiligen Proteinmengen abgeschätzt werden.

### 2.6.2 Western-Blot

Für die Analyse verschiedener Proteine mittels Western-Blot wurden diese in einem SDS-Gel aufgetrennt (siehe Kapitel 2.4.2) und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran (Protran Schleicher & Schuell) übertragen. Das „Blotten“ wurde nach dem sogenannten „Semidry“-Verfahren (Trans Blot SD Semdry transfer cell BioRad) durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierfür zwei verschiedene Puffersysteme verwendet. Zum einen wurde das SDS-Gel sowie 4 dicke Filterpapiere in 1x Blotpuffer 30min äquilibriert und anschließend 40 min bei 20V geblottet. Bei dem alternativen Verfahren wurde die Membran sowie drei Filterpapiere in Kathodenpuffer jeweils 3 weitere Filterpapiere in Anodenpuffer 1 bzw. 2, 5 Minuten äquilibriert (Puffer siehe Kapitel 2.1.6). Nach diesem Protokoll wurde mit einer Stromstärke von 1mA/cm<sup>2</sup> und für 60 Minuten geblottet. Nach dem Blotvorgang wurden die nun auf der Membran befindlichen Proteine mittels „Ponceau S“ (0,2% Ponceau S, 3% TCA) angefärbt und fixiert. Das SDS-Gel wurde zur Überprüfung des Blotvorganges mit Coomassie oder durch Silberfärbung gefärbt. Für die Hybridisierung mit verschiedenen Antikörpern wurde die Membran zunächst mit 3% BSA (Bovine Serum Albumin) eine Stunde oder über Nacht geblockt und anschließend 1x 10min mit TNT gewaschen. Der erste Antikörper wurde in 1% BSA und wenn nicht anders angegeben 1:2000 in TBS-Puffer verdünnt. Der zweite Antikörper (wenn nicht anders angegeben :Goat anti-Rabbit IRDye™ 680 (LI-COR) oder Goat anti-Mouse IRDye 700 DX (Rockland)) wurde in 5% Magermilchpulver in TBS 1:5000 verdünnt eingesetzt. Die Membran wurde mit beiden Antikörpern jeweils für eine Stunde inkubiert und nach jeder Inkuabtion jeweils 3x10min mit TNT Puffer gewaschen. Nach einem abschließenden Waschschrift in TBS Puffer wurden die Banden mit Hilfe des Infrarotscanners (Odyssey) der Firma LI-COR sichtbar gemacht.

### 2.6.3 Quantitativer β-Galaktosidase Nachweis

Diese Methode wurden angewendet, um die spezifische Aktivität der β-Galaktosidase z.B. bei verschiedenen Testsystemen zum indirekten Nachweis der Genexpression eines *lacZ*-Fusionsgens zu testen. Hierfür wurden die Zellen selektiv in LBo Medium angezogen, ggf. induziert und bis zu einer OD<sub>650</sub>= 1 inkubiert. Anschließend wurde 1ml der Kultur abzentrifugiert, in PP1 (siehe Kapitel 2.1.6) gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 2ml PP1 aufgenommen. Von 1ml wurde die OD<sub>650</sub> bestimmt. Mit dem zweiten Milliliter wurde der β-Galaktosidase Nachweis geführt. Hierzu wurden 20µl Toluol zugegeben und anschließend 1min durchmischt, danach erfolgte eine 10minütige Inkubation auf Eis und eine 5 minütige Äquilibrierung bei 37°C. Zu Beginn des Testes wurden als Sub-



strat für die  $\beta$ -Galaktosidase 100 $\mu$ l 10mM  $\beta$ -ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D- Galactopyranosid) zugegeben und nach erfolgter Gelbfärbung wurde die Reaktion mit Hilfe von 1,5ml 250mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  abgestoppt. Die Inkubationsdauer bis zur Gelbfärbung wurde zeitlich erfasst. Die spezifische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{V_A \times \text{OD}_{420}}{4,5 \times T \times \text{OD}_{650} \times 0,24 \times 1} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg Protein} \times \text{min}} \right]$$

$V_A$  = Volumen des Reaktionsansatzes (2,6ml)

$T$  = Reaktionszeit [min]0,24 =Umrechnungsfaktor für die Berechnung der Proteinmenge aus der Extinktion

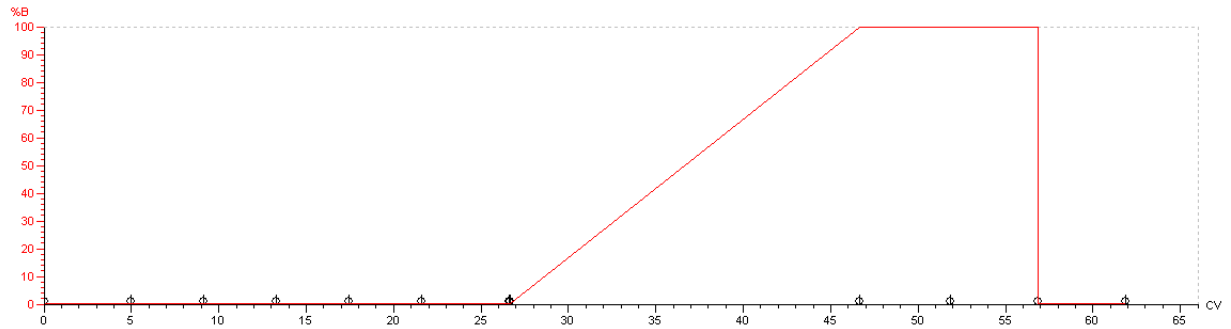
4,5 = Extinktionskoeffizient for Ortho-Nitrophenolat ( $E_{420} = 4500$ ) [ $\text{cm}^{-1} \times \text{M/l}$ ]

1 ml= Volumen der resuspendierten Zellen

## 2.6.4 Proteinreinigung

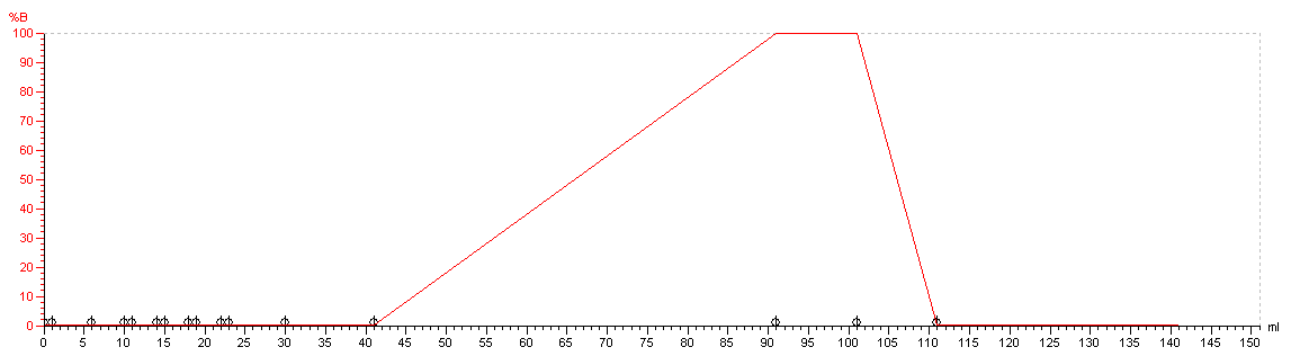
### 2.6.4.1 Reinigung von MtfA

Das MtfA-Wildtyp Protein sowie verschiedene MtfA-Mutanten wurden nach folgendem Protokoll in einer Zweischrittreinigung gereinigt. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe der ÄKTA-FPLC der Firma GE Healthcare mit den im Folgenden beschriebenen Säulen. Das *mtfA*-Gen, sowie verschiedene Derivate davon wurden lokalisiert auf dem Plasmid pTMByeel, bzw. seinen Derivaten in den Stamm JM109 transformiert und in 2xTY Medium mit Ampicillin als Übernackkultur angezogen. Am nächsten Morgen wurde 1 Liter 2xTY Medium mit Ampicillin versetzt und mit Hilfe der Übernackkultur zu einer  $\text{OD}_{650} = 0,05$  angeimpft. Nach 40 Minuten wurde IPTG (500 $\mu$ M Endkonzentration) zugegeben und die Zellen bis zu einer  $\text{OD}_{650} = 3-4$  wachsen gelassen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (Centrikon T-125 Kendro) und in Puffer A (300mM NaCl; 2mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 100mM KPi; 10% Glycerin) für die „HisTrap™ FF Säule“ Reinigung 1x gewaschen und anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen in 10ml Puffer A resuspendiert, in 2ml Portionen aufgeteilt und mit Hilfe von Ultraschall (Branson Digital Sonifier Model 250-D) aufgeschlossen. Hierbei wurde jeweils für 60 Sekunden (10 Sekunden Schall, 10 Sekunden Pause) und einer Amplitude von 10% mit einer Mikrotipspitze beschallt. Anschließend wurden die Zellen zweimal bei 13000rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 10 Minuten zentrifugiert. Der proteinhaltende Überstand wurde jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die komplette Gesamtproteinsuspension wurde anschließend mit Hilfe eines 2ml „Loops“ auf eine Affinitätschromatographie Säule („HisTrap™ FF Säule“ (GE Healthcare)) aufgetragen und mit Hilfe der ÄKTA-FPLC (GE Healthcare) nach folgendem Programm gereinigt.



**Abb.2.6.1** verwendetes Programm für die Affinitätschromatographie mittels „HisTrap™ FF“ Säulen Reinigung

Nach dem Auftragen der Probe auf die Säule wurden diese so lange mit Puffer A bei einer Flussrate von 1ml/min gespült (hier ca.25ml), bis die UV Anzeige wieder auf 0 stand und somit kein Protein mehr heruntergespült wurde. Anschließend wurde der oben abgebildete Gradient verwendet, um die Proben von der Säule zu eluieren. Hierbei wurden Puffer A und B (300mM NaCl; 2mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 100mM Kpi pH8; 010% Glycerin; 300mM Imidazol) so als linearer Gradient gemischt, bis eine Konzentration von 100% Puffer B nach 20 ml erreicht war. Es wurde dann mit 10ml Puffer B gespült und anschließend nochmals mit 5ml Puffer A. Anhand des Elutionsprofils wurden die entsprechenden MtfA enthaltenden Fraktionen analysiert, vereinigt und über Nacht gegen 20mM Tris pH 8,0 dialysiert. Anschließend wurde in der Regel als zweiter Reinigungsschritt eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Hierzu wurde die dialysierte Probe bei 13000rpm und 4°C für 10min abzentrifugiert, um eventuell ausgefallene Bestandteile von dem löslichen Protein zu trennen. Der Überstand wurde wiederum vollständig auf die vorher äquilibrierte Anionenaustauschersäule (Mono-Q™ 5/50 GL) aufgebracht. Hierbei wurde nach folgendem Gradientenprotokoll vorgegangen (siehe Abb. 2.6.2). Die Elution erfolgte mit 20mM Tris pH 8,0 und 1M NaCl. Die MtfA enthaltenden Proben wurden wiederum gegen Tris-Puffer pH 8,0 über Nacht dialysiert und anschließend mit 50% Glycerin bei -20°C eingefroren. Als Alternative zum Einfrieren wurden die Proteine zur baldigen Verwendung bei 4°C im Tris-Puffer pH8,0 aufbewahrt.



**Abb.2.6.2** verwendetes Gradienten Programm für die Anionenaustauschchromatographie mittels Mono- Q™ 5/50 GL

### 2.6.4.2 Reinigung des Proteins Mlc

Das Protein Mlc wurde in Kooperation mit K. Homann und E. Klang durchgeführt. Für das Protein Mlc war es ausreichend eine Affinitätschromatographie mittels „HisTrap™ FF“ (GE-Healthcare) Säulen nach dem oben beschriebenen Prinzip durchzuführen. Das Protein wurde für die verschiedenen Versuche, wie EMSA oder Gelfiltration

jeweils frisch gereinigt. Detaillierte Angaben sind in den entsprechenden Arbeiten von K. Homann (28) und E. Klang (41) zu finden.

### 2.6.5 Dialyse

Zur Umpufferung von Proteinen wurde die Methode der Dialyse verwendet. Hierbei wurden Dialyseschläuche (Viskuis Dialyseschlauch Type 20/33, Serva oder Slide-A-Lyzer Dialyse Cassette, Pierce) in dem entsprechenden Dialysepuffer eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Proben eingefüllt und zunächst eine Stunde, nach einem Pufferwechsel über Nacht, bei 4°C im Kühlraum dialysiert.

### 2.6.6 Entsalzung mit Hilfe der „HiTrap™ Desalting“ Säulen

Alternativ zur Dialyse wurden die gereinigten Proteine mit Hilfe der Entsalzungssäule mittels der ÄKTA-FPLC der Firma GE-Healthcare entsalzt. Hierbei handelt es sich um eine Gelfiltrationssäule, so dass die Proteine von den entsprechenden Salzen oder Imidazol aufgrund ihrer verschiedenen Diffusionseigenschaften in der Matrix voneinander getrennt werden können. Hierzu wurden jeweils 1ml Probe auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 4ml/min mit Puffer (20mM Tris pH 8,0) so lange gespült, bis alle Probenbestandteile eluiert waren.

### 2.6.7 Gelfiltration

Für die Gelfiltration wurde die Säule Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare) verwendet.

Es wurden Proteine bekannter Größe als Standard auf die Säule aufgetragen (Molecular Weight Standard for Gelfiltration Chromatography (Sigma) und HMW Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia)). Die Durchführung der Gelfiltration wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Puffer: 50mM Tris pH 7,5, 300mM NaCl gemacht. Die Berechnung der Proteingrößen wurde mit Hilfe einer im Rahmen dieser Arbeit erstellten Eichgerade ermittelt.

### 2.6.8 Hefe Di-Hybrid System

Protein-Protein Interaktionen können in vivo mit Hilfe des Di-Hybrid Systems in Hefe untersucht werden. Hierbei werden Fusionsproteine des einen Interaktionspartners mit der DNA-Bindedomäne und des anderen mit der Transkriptions-Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors (in diesem Fall Gal4p) hergestellt. Beide Fusionsproteine besitzen eine Kernlokalisationssequenz. Bei erfolgter Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine kann diese anhand der Transkription von drei verschiedenen Reportergenen (*lacZ*, *his*, *ade*) nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *S. cerevisiae* Stamm PJ694- $\alpha$  verwendet. Dieser verfügt über verschiedene Reporterkassetten, die eine Wachstumsselektion auf Histidin- und Adeninmangel-Medium ermöglichen, bzw. für eine  $\beta$ -Galaktosidase kodieren. Die beiden Vektoren mit deren Hilfe die Fusionsproteine der DNA-Binde- und Aktivierungsdomäne hergestellt wurden, heißen pGAD424 und pGBD-C2. Bei beiden Vektoren handelt es sich um sogenannte „shuttle“ Vektoren, die auch in *E.coli* verwendet werden können und einen entsprechenden „ori“ besitzen. Als Selektionsmarker für *E.coli* tragen sie das *bla*-Gen, welches für eine  $\beta$ -Laktamase und daher für eine Ampicil-

linresistenz kodiert. Beide Vektoren besitzen einen 2 $\mu$ m-Replikationsursprung für *S.cerevisiae*. Der Vektor pGAD424 trägt das LEU-2 Gen und pGBD-C2 das TRP-1 GEN zur Selektion in *S.cerevisiae*. Der Vektor pGAD424 kodiert für die Transkriptions-Aktivierungsdomäne des Gal4-Proteins unter der Kontrolle des ADH1-Promotors mit dem ADH1 Terminator. Der Vektor pGBD-C2 kodiert für die DNA Bindedomäne des Gal4-Proteins ebenfalls unter der Kontrolle des ADH1-Promotors mit ADH1-Terminator. Die Stärke einer Protein-Protein Wechselwirkung steht im Di-Hybrid System im direkten Verhältnis zu dem Expressionsniveau der Reportergene. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe dieses Systems die Dimerisierung des Proteins MtfA untersucht. Daher wurden die entsprechenden *mtfA*-Genbereiche in die Vektoren pGAD424 und pGBD-C2 kloniert. Anschließend wurden die jeweiligen Vektoren mit verschiedenen Kontrollen und in verschiedener Kombination in den *S.cerevisiae* Stamm PJ69-4 $\alpha$  transformiert. Zur Abschätzung der Interaktion der Proteine wurden die Transformanten über Nacht in Selektionsmedium angezogen und am nächsten Morgen auf eine OD<sub>600</sub> = 0,25 eingestellt. Nach einer vierstündigen Inkubation wurde eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,6 und 1 erreicht. Jeweils 5 $\mu$ l einer unverdünnten und einer 10<sup>-2</sup> verdünnten Kultur wurden auf die entsprechenden Selektionsplatten aufgetropft. Hierbei wurden die folgenden Selektionsplatten verwendet:

1. SC ohne Leuzin, Tryptophan und Adenin
2. SC ohne Leuzin, Tryptophan und Histidin
3. SC ohne Leuzin und Tryptophan, mit sterilem 0,5M Kaliumphosphatpuffer pH7,0 (Endkonzentration 20mM), auf die für einen Blau-Weiß „Screen“ 0,1ml X-Gal ausgestrichen wurde.

Die ersten beiden Selektionsmedien wurden für zwei bis drei Tage bei 30°C, der 3. Typ wurde für einen Tag bei 30°C und für weitere drei Tage bei 37°C inkubiert und anschließend ausgewertet.

### 2.6.8.1 Herstellung von Rohextrakten aus Hefekulturen

Zur Herstellung von Rohextrakten für die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden die Zellen über Nacht bei 30°C im entsprechendem Selektionsmedium angezogen. Anschließend wurden daraus 20ml neues Selektionsmedium zu einer OD<sub>600</sub>= 0,25 angeimpft, die Kulturen für 7h bei 30°C inkubiert und anschließend geerntet. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser und einmaligem Waschen mit 50mM Kaliumphosphatpuffer pH7,0 wurden die Zellen in 500 $\mu$ l 50mM Kaliumphosphatpuffer pH7,0 aufgenommen und mit einem gleichen Volumen an Glasperlen [ $\varnothing$ = 0,45-0,5mm] versetzt. Nun wurde der Ansatz für 7 min bei 4°C auf einem IKA-Vibrax-VXR aufgeschlossen und anschließend mit 500 $\mu$ l 50mM Kaliumphosphatpuffer pH7,0 versetzt. Nach dem Absetzen der Glasperlen wurde der Überstand abgenommen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Überstände für 10min bei 4°C und 13000rpm in einer Mikrofuge abzentrifugiert. Die Überstände wurden wiederum in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 2.6.8.2 Quantitativer Nachweis der Protein-Protein Wechselwirkung mittels Bestimmung der $\beta$ - Galaktosidase Aktivität

Zur Quantifizierung der Protein-Wechselwirkung wurde die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität aus den Rohextrakten bestimmt. Hierfür wurden je 950 $\mu$ l, auf 30°C vorgewärmter LacZ-Puffer (60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 40mM NAH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM KCl; 1mM MgSO<sub>4</sub>; 1mg/ml ONPG pH7,0) mit 50 $\mu$ l Rohextrakt gemischt und bei 30°C bis zur Gelbfärbung inku-

biert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500µl 1M Natriumcarbonatlösung beendet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der OD<sub>420</sub> in einem Photometer (UV mini1240 Shimadzu). Die spezifische Aktivität der β-Galaktosidase wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Aktivität [mU/mg Protein]} = \frac{\Delta E/\text{min} \times V_{\text{ges}}}{\epsilon \times m_{\text{prot}} \times V_{\text{RE}} \times d}$$

$\Delta E/\text{min}$  = Extinktionsänderung pro Minute

$E$  = Extinktionskoeffizient (für 2-Nitrophenol:  $\epsilon = 4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$V_{\text{ges}}$  = Gesamtvolumen des Testansatzes in der Küvette (1500µl)

$V_{\text{RE}}$  = Volumen des eingesetzten Rohextraktes ( in µl)

$D$  = Schichtdicke der Küvette (1cm)

$m_{\text{prot}}$  = Proteinkonzentration des Rohextraktes (mg/ml)

### 2.6.9 bakterielles Di-Hybrid System

Für den Nachweis von Proteininteraktionen mit Hilfe des bakteriellen Di-Hybrid Systems wurde das LexA basierte Systems von Dmitrova et al.(19) verwendet. LexA gehört zu der „winged helix-turn-helix“ Familie der Transkriptionsfaktoren. Das Protein besteht aus einer aminoterminalen DNA-Bindedomäne und einer carboxyterminalen Dimerisierungsdomäne. Der Repressor LexA kann nur als Dimer als aktiver Repressor fungieren und demnach hat der zugehörige Promotor zwei benachbarte Bindestellen für LexA. Für dieses System wurden verschiedene Veränderungen in eine Hälfte der palindromen Bindestelle des Repressors eingebaut, so dass eine Homodimerbildung ausgeschlossen werden kann (19). Als Kontrollen wurden die beiden Repressoren mit einem „Fos-zipper“ (Plasmid pMS604) oder „Jun-zipper“ (Plasmid pDL804) fusioniert. Hierbei handelt es sich um eukaryotische Proteine, die einen „Leuzinrißverschluss“ bilden. Bei einer Koexpression dieser Plasmide im SU202 Stammhintergrund wird unter Zugabe von 1mM IPTG eine nahezu vollständige Repression des *lacZ* Reportergenes erreicht, so dass im anschließenden β-Galaktosidase Test nur eine sehr geringe spezifische Aktivität der β-Galaktosidase nachgewiesen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die Dimerisierung des MtfAs sowie dessen Interaktion mit dem Repressor Mlc nachzuweisen. Hierzu wurden die jeweiligen Motive des „Fos- bzw. Junzippers“ gegen die zu untersuchenden Proteine ausgetauscht und ebenfalls ein β-Galaktosidase Test zur Analyse und Quantifizierung dieser Wechselwirkung durchgeführt. Die Plasmide wurden jeweils in den Stamm SU202 kotransformiert und für eine Übernachtskultur unter selektiven Bedingungen in LBo Medium angezogen. Hierbei wurden jeweils zwei Übernachtskulturen parallel angezogen, wobei einer ÜK bereits 1mM IPTG zugefügt wurde. Am nächsten Morgen wurden jeweils 10 ml der Kultur mit Hilfe der Übernachtskultur zu einer OD<sub>650</sub>=0,05 angeimpft. Hierbei wurden der bereits induzierten Kultur wiederum 1mM IPTG zugefügt. Die Kulturen wurden bis zu einer OD<sub>650</sub>= 0,4-0,6 inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1ml der Kultur abzentrifugiert und für den quantitativen β-Galaktosidase Test (siehe Kapitel 2.6.3) eingesetzt.

### 2.6.10 “Electrophoretic Mobility Shift Assays” (EMSA)

Die Electrophoretic Mobility Shift Assays wurde in Kooperation mit und ausschließlich von E. Klang im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (41). Der Vollständigkeit halber ist diese Methode hier nach Angaben von E. Klang aufgeführt. „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ sind auch bekannt als „Bandshift“ – oder „Gelshift Assays“ (38). Diese Methode dient der Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen mit DNA. Das Prinzip beruht darauf, dass ungebundene DNA in einem nicht denaturierenden Gel eine höhere elektrophoretische Mobilität besitzt als proteingebundene DNA. Man bezeichnet proteingebundene DNA als „geschifft“ gegenüber ungebundener DNA. Mlc und MtfA wurden unmittelbar nach ihrer Reinigung in EMSAs auf ihre Aktivität hin getestet. Des Weiteren wurde Mlc auf seine Bindung zu verschiedenen Operatoren mit dieser Methode untersucht. Für den Nachweis der DNA wurden zwei komplementäre Oligonukleotidfragmente mit einer Infrarot-Markierung am 5'-Ende versehen (5'-IRDye700 oder 5'-IRDye800). Für das Zusammenlagern von synthetisch hergestellter DNA wurden gleiche Mengen mit „Annealingpuffer“ (Amersham) auf 95°C erhitzt, und im Wasserbad langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *ptsG* Operatorfragment wurden die Oligonukleotide ptsGO1 und ptsGO2 verwendet. Die Operatorfragmente wurden mit 10µg Rinderserumalbumin (BSA), 0,5µg Heringssperma-DNA oder poly[d(I-C)] (beides Roche) als nichtmarkierte heterologe DNA, mit 100nM ZnCl<sub>2</sub> und 0,5mM MgCl<sub>2</sub> versetzt. Der Bindungsansatz wurde mit BSA-versetztem HEPES-Puffer (1µg/µl) auf ein Endvolumen von 20µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur für die Bindung von Mlc an ein Operatorfragment. Für den Aktivitätstest von MtfA wurden zuerst Mlc und MtfA für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor DNA dazugegeben und ein weiterer Inkubationsschritt folgte. Danach wurde zum Bindungsansatz 5µl 50%igem Glycerin gegeben und dieser auf ein 1mm dickes, natives 5%iges Acrylamid/Bisacrylamid-Gel aufgetragen. Um den Gelferlauf besser verfolgen zu können, wurde in eine Tasche 5µl GLB, welches mit 5µl 50%igem Glycerin gemischt wurde, aufgetragen. In der nachfolgenden Tabelle ist die Zusammensetzung für 5 Gele à 1mm mit einer Acrylamid /Bisacrylamid-Konzentration von 5% und einer Größe von ca. 8x6cm aufgeführt.

**Tab.2.6.1 Zusammensetzung der EMSA Gele**

Komponente	Volumen
40%ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (40:1)	5ml
50%iges Glycerin	2,5ml
0,5xTBE, pH8	32,5ml
10%iges Ammoniumpersulfat (APS)	375µl
N,N;N';N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	42µl

Vor dem Gießen wurden die Platten des Gelsystems (Mighty SmallIII SE250/SE260 der Firma Hoefer) mit 5% Dimethyldichlorsilane (Repel-Silane) in Chloroform silanisiert um das Transferieren des Gels nach der Elektrophorese auf Whatman-Papier (Schleicher & Schuell) zu erleichtern. Die Detektion und Quantifizierung der DNA erfolgte mit Hilfe des Odyssey Scanners der Firma LI-COR Biosciences.

### 2.6.11 Bioinformatische Analysen

Mit der Hilfe von verschiedenen, frei zugänglichen Internetdatenbanken oder Softwareprogrammen wurden wichtige Informationen zu Genen, Proteinen, AS- und Nukleotidsequenzen erhalten. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Programme:

**Tab.2.6.2 verwendete Datenbanken und Softwareprogramme**

Programm	Internetseite /Softwarebezeichnung	Verwendung
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi</a>	Vergleich von Proteinsequenzen (blastp) und Nukleotidsequenzen (blastn)
National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	allgemeine Informationen zu Genomen, Genen, Proteinen und Veröffentlichungen
Ecocyc Datenbank	<a href="http://biocyc.org">http://biocyc.org</a>	Informationen zum <i>E.coli</i> Genom, sowie Proteinen
Drosophila Genomprojekt	<a href="http://fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl">http://fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl</a>	Promotoranalysen
Clone Manager	Sci Ed Software, USA Version 8.0	Sequenzanalysen, Vektorverwaltung, in siliko Klonierungen
Icycler BioRad	ICycler™iQ Optical System Software Version 3.0a	Analyse der RT-RT PCR Daten
ÄKTA-FPLC	Unicorn 5.10	FPLC Software
Odyssey-Scanner	Odyssey 2.1	Western-Blot und EMSA Analyse
Geldokumentation	Biocapt	Dokumentation Agarosegele
Pepwheel	<a href="http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/pepwheel.html">http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/pepwheel.html</a>	Erstellen des „Helix-Wheel“-Modells
SOPMA	<a href="http://npsa-pbil.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl">http://npsa-pbil.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl</a>	Nachweis von Sekundärstrukturen

### 3. Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind in drei Themenbereiche unterteilt. Ausgangspunkt dieser Arbeit war das strukturell und funktionell völlig unbekannte Protein MtfA. Basierend auf den Arbeiten von T. Zeppenfeld (107) und A.-K. Becker (10) konnte es funktionell als Mlc bindendes und damit die *ptsG* Expression aktivierendes Protein identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weiterführende genetische (Kapitel 3.1), physiologische (Kapitel 3.2) und biochemische Charakterisierung (Kapitel 3.3) von MtfA vorgenommen.

#### 3.1 Genetische Charakterisierung von MtfA

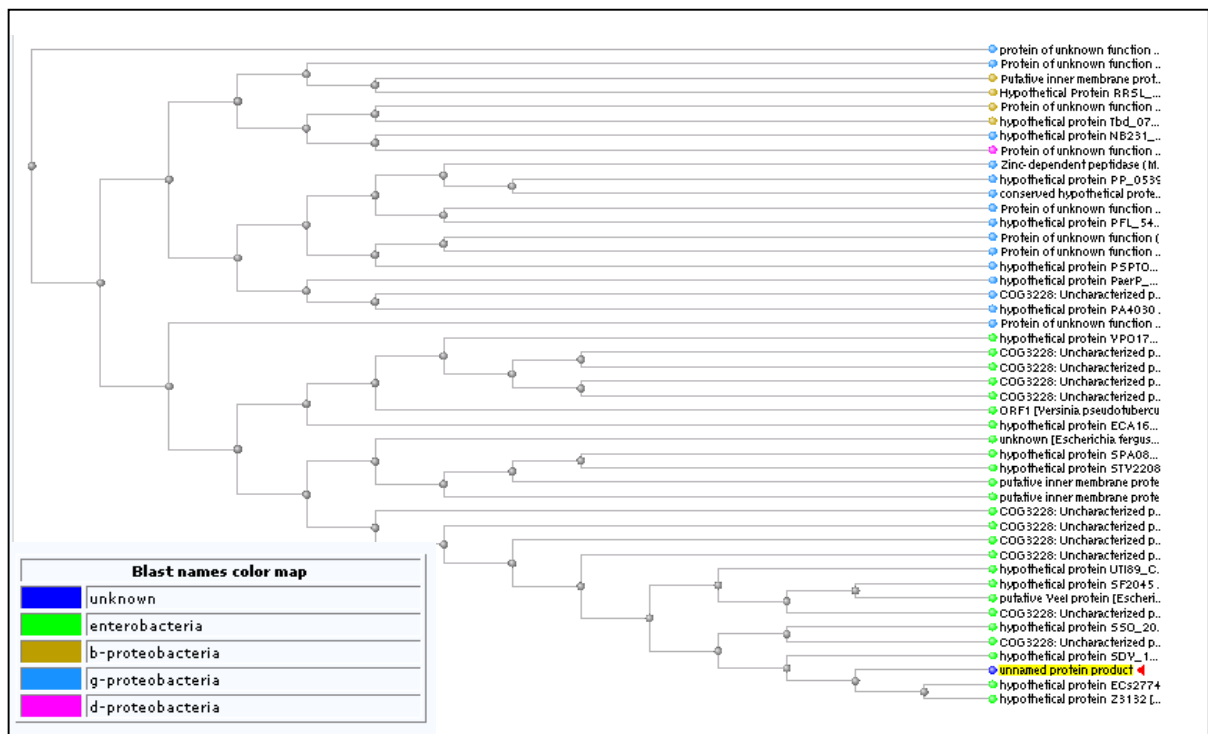
Im Rahmen der genetischen Charakterisierung von MtfA wurde zunächst eine systematische Mutagenese von 54 hochkonservierten AS durchgeführt. Hiermit konnten funktionelle AS für die Wechselwirkung mit Mlc identifiziert und eine Mlc Bindedomäne im carboxyterminalen Bereich von MtfA postuliert werden. Zur Stützung dieser Hypothese wurde ein carboxyterminales MtfA-Fragment hergestellt, welches auch nach Kopplung an die Plasmamembran keine eindeutige Wechselwirkung mit Mlc zeigte. Das postulierte Domänenmodell konnte, wie im Folgenden beschrieben, mit verschiedenen Di-Hybrid Systemen weiterführend charakterisiert werden. Mit Hilfe des bakteriellen Di-Hybrid Systems konnte schließlich die Mlc Wechselwirkungsdomäne im carboxyterminalen Bereich von MtfA - unabhängig von der erstgenannten Methode - bestätigt werden. Des weiteren beschäftigt sich das folgende Kapitel 3.1 mit dem Einfluss der EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne auf die Mlc-MtfA Wechselwirkung. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatische, unphosphorylierte EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne unter bestimmten Bedingungen einen inhibierenden Einfluss auf die Mlc-MtfA Interaktion zeigte. Ob dieser Effekt auf eine konkurrierende Bindestelle zwischen MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> an Mlc, oder auf eine durch EIIB<sup>Glc</sup> induzierte Konformationsänderung in Mlc zurückzuführen ist, lässt sich weiterhin diskutieren.



### 3.1.1. Erstellung eines Domänen-Modells für das Protein MtfA

#### 3.1.1.1 Identifikation hochkonservierter AS von MtfA

Das Protein MtfA ist in der „ncbi“ Datenbank annotiert als "hochkonserviertes bakterielles Protein“. Mit Hilfe des BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“) Programms konnte gezeigt werden, dass mindestens 30% identische AS nicht nur in der Gruppe der Enterobakterien, sondern auch in der  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  Subgruppe der Proteobakterien zu finden sind. Abbildung 3.1.1 zeigt eine Stammbaumanalyse von MtfA.



**Abb.3.1.1 „BLAST Tree“ des MtfA Proteins**

Diese Abbildung wurde mit Hilfe des „TreeView“ Programms der „ncbi“ Datenbank erstellt. Der Ermittlung der Homologie liegt das so genannte „Fast Minimum Evolution“ Prinzip zugrunde, bei dem mit Hilfe eines spezifischen Algorithmus der genetische Abstand zwischen den zu *mtfA* homologen Genen verschiedener Bakterienstämme ermittelt wurde. Das als Referenzsequenz verwendete MtfA aus *E.coli* K-12 ist gelb unterlegt.

Für eine weitere Charakterisierung dieses, bis zu Beginn der Arbeit physiologisch und biochemisch weitgehend uncharakterisierten Proteins, wurde mit Hilfe des „Clustal-W“ Programms ein Aminosäuresequenzvergleich mit neun zu MtfA homologen Proteinen aus verschiedenen Bakterien durchgeführt. Bei der Auswahl der verglichenen Proteine aus den verschiedenen Organismen wurde darauf geachtet, dass unterschiedlich nah verwandte (39-100% identische AS zu MtfA aus *E.coli* K-12) Proteine verwendet wurden. Aufgrund dieser Auswahl konnten mit Hilfe des Aminosäuresequenzvergleichs hochkonservierte AS (AS) in MtfA identifiziert werden.

Wie in Abbildung 3.1.2 zu sehen ist, sind 25 der 265 AS des nativen MtfA als hochkonserviert (\*) und 25 weitere AS als konserviert (.) zu bezeichnen. Um einen Aufschluss über die funktionelle Bedeutung dieser AS in Bezug auf die Mlc-Interaktion zu bekommen, wurden die in gelb markierten AS im Rahmen dieser Arbeit systematisch ausgetauscht. Anschließend wurde mit Hilfe einer F'-Plasmid kodierten *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion im LZ150 Stammhintergrund getestet, welchen Effekt diese Mutationen auf die Mlc-MtfA Interaktion haben.

#### Abb.3.1.2 Aminosäuresequenzvergleich von MtfA

Diese Abbildung zeigt einen Sequenzvergleich von MtfA mit orthologen Proteinen aus folgenden Bakterienstämmen: (die in Klammern angegebenen Prozentzahlen bezeichnen die prozentuale Anzahl der identischen AS zu MtfA aus *E.coli* K-12)

*Escherichia coli* K-12 als Referenz, *Escherichia coli* 0157:H7 (100%), *Escherichia fergusonii* (89%), *Salmonella typhimurium* LT2 (87%), *Yersinia pestis* KIM (75%), *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (47%), *Pseudomonas syringae* pf. *Tomato str.* DC3000 (51%), *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris str.* ATCC 33913 (42%), *Ralstonia solanacearum* (39%), *Nostoc punctiforme* (43%). Die Nummerierung der AS bezieht sich auf die klonierte Version des Proteins (Vektor pTMByeeI). Ausgehend von diesem Vektor wurden die Mutagenesen durchgeführt. Das klonierte *mtfA* Gen unterscheidet sich von dem WT-Gen durch ein zusätzliches Triplet am 5' Ende des Gens. Daher entspricht der Nummerierung im WT-Protein ausgehend vom 2. Startcodon der angegebenen Zahl -1 der in der Abbildung angegebenen Zahl. Der Aminosäurevergleich der verschiedenen Proteine wurde mit Hilfe des „ClustalW“ Programms durchgeführt. Die grünen Markierungen deuten auf die zwei alternativen Startpunkte von MtfA hin. Die blau gekennzeichneten AS zeigen eine Häufung von Leuzinen im Bereich zwischen AS40 und AS92 an. Die in gelb markierten AS zeigen hochkonservierte AS an, die im Rahmen dieser Arbeit gezielt ausgetauscht wurden. Die rosa markierten AS wurden per Zufallsmutagenese ausgetauscht.

	Start 1	Start 2
<i>E. coli</i> K-12	-----M <sup>Q</sup> FCSSDEFASKT <sup>M</sup> IKWPWKVQE-----	SAHQ TALPWQEALS-IPLLTCLT
<i>E. coli</i> O157:H7	-----MQFCSSDEFASKTM <sup>I</sup> KWPWKVQE-----	SAHQ TALPWQEALS-IPLLTCLT
<i>E. fergusonii</i>	-----MIKWPWK <sup>T</sup> ND-----	AGRNMALPWDEALA-IPVLANLQ
<i>S. typhimurium</i> LT2	-----MIKWPWKAQE-----	ITQNE DWPWDDALA-IPLLVNLT
<i>Y. pestis</i>	-----MIKWLWKANK-----	PQAEMLAQWHEALN-IPLLAPLN
<i>C. violaceum</i>	-----MTDAIP <sup>S</sup> QEFMLLDWMRRLGGKR-	IPALLSRLRDEAAG-MPLLEGLS
<i>P. syringae</i>	-----MWSLRN <sup>W</sup> RRRRTLAR-	HPVAEELWQQV <sup>R</sup> KR---LPILDGLS
<i>X. campestris</i>	-----MLRWLRRP-----	PAALDDALWQAVCTE-CAWVTALD
<i>R. solanacearum</i>	-----MLSRLSQ <sup>W</sup> LSRRARSRLARYAISDALWTRT <sup>L</sup> SG-	LPFLLDWP
<i>N. punctiforme</i>	MIQTIIAFLII <sup>G</sup> LILTGILINPVLV <sup>K</sup> RRRNR---	LKYRFPPLWNAI IENNLPIYLYLS
.		
	40	51
<i>E. coli</i> K-12	EQEQSK <sup>L</sup> VT <sup>L</sup> AERF <sup>L</sup> QQ <sup>K</sup> R <sup>L</sup> V <sup>P</sup> LQGF <sup>E</sup> LD <sup>S</sup> LRSCRI <sup>A</sup> L <sup>L</sup> F <sup>C</sup> LPV <sup>L</sup> E <sup>L</sup> G- <sup>L</sup> EW <sup>L</sup> DGFHEV <sup>L</sup>	70
<i>E. coli</i> O157:H7	EQEQSKLVT <sup>L</sup> AERF <sup>L</sup> LQ <sup>K</sup> R <sup>L</sup> V <sup>P</sup> LQGF <sup>E</sup> LD <sup>S</sup> LRSCRI <sup>A</sup> L <sup>L</sup> F <sup>C</sup> LPV <sup>L</sup> E <sup>L</sup> G- <sup>L</sup> EW <sup>L</sup> DGFHEV <sup>L</sup>	
<i>E. fergusonii</i>	PDEQSKLVQLADRF <sup>L</sup> LQ <sup>K</sup> R <sup>L</sup> V <sup>P</sup> LQGF <sup>E</sup> LD <sup>P</sup> LKNARIAL <sup>L</sup> F <sup>C</sup> LPV <sup>L</sup> E <sup>L</sup> G- <sup>I</sup> EW <sup>L</sup> DGFHEV <sup>L</sup>	
<i>S. typhimurium</i> LT2	AQEQARLIALAERF <sup>L</sup> LQ <sup>K</sup> R <sup>L</sup> V <sup>L</sup> QGF <sup>E</sup> LD <sup>S</sup> LSKSARIAL <sup>I</sup> F <sup>C</sup> LP <sup>I</sup> E <sup>L</sup> G- <sup>I</sup> EW <sup>L</sup> DGFHEV <sup>L</sup>	
<i>Y. pestis</i>	EPEQQRLVSVASQLLQ <sup>K</sup> R <sup>F</sup> IPLQGL <sup>I</sup> LTP <sup>L</sup> MQARLALL <sup>F</sup> ALPVMELG- <sup>A</sup> KW <sup>L</sup> DGFHEV <sup>L</sup>	
<i>C. violaceum</i>	TEETDRLVRLAGELLLAKAVT <sup>G</sup> LEDMEVDDAMRCRLAL <sup>Q</sup> LALPGMNLG- <sup>M</sup> RAYENWREAI	
<i>P. syringae</i>	TEQDAHLRDACV <sup>L</sup> FLNDK <sup>H</sup> LSALPGV <sup>E</sup> LD <sup>D</sup> EQR <sup>L</sup> FLAAQ <sup>Q</sup> LP <sup>L</sup> LSL <sup>G</sup> ELN <sup>W</sup> YQ <sup>G</sup> FHE <sup>I</sup> V	
<i>X. campestris</i>	PPRQHRLRALTTQ <sup>F</sup> LQ <sup>K</sup> T <sup>I</sup> SPVHGL <sup>T</sup> LTPHDAVLLAAT <sup>C</sup> CLP <sup>L</sup> LN <sup>I</sup> G- <sup>A</sup> AGWRGWSQLI	
<i>R. solanacearum</i>	QAALARLRETAT <sup>L</sup> FIAEKE <sup>F</sup> TTA <sup>H</sup> GLAL <sup>T</sup> DEM <sup>V</sup> SIAAQASV <sup>P</sup> I <sup>L</sup> E <sup>L</sup> G- <sup>I</sup> AWYRGWRGVV	
<i>N. punctiforme</i>	PNEIRRLQGH <sup>I</sup> QV <sup>F</sup> LAEK <sup>Q</sup> F <sup>I</sup> GC <sup>R</sup> GLQVTEEMKLSIASVAC <sup>L</sup> VLLNER- <sup>G</sup> QYFPRLRSIL	
	94	120
<i>E. coli</i> K-12	I <sup>Y</sup> PAPFVVDDEWEDDIG <sup>L</sup> VHN <sup>Q</sup> RIV <sup>Q</sup> SG <sup>S</sup> WQ <sup>Q</sup> GP <sup>I</sup> VLN <sup>W</sup> L <sup>D</sup> I <sup>Q</sup> D-----	S <sup>F</sup> DAS <sup>G</sup> FN <sup>L</sup> I
<i>E. coli</i> O157:H7	IY <sup>P</sup> APFVVDDEWEDDIG <sup>L</sup> VHN <sup>Q</sup> RIV <sup>Q</sup> SG <sup>S</sup> WQ <sup>Q</sup> GP <sup>I</sup> VLN <sup>W</sup> L <sup>D</sup> I <sup>Q</sup> D-----	S <sup>F</sup> DAS <sup>G</sup> FN <sup>L</sup> I
<i>E. fergusonii</i>	IY <sup>P</sup> APFVVDDEWQDD <sup>F</sup> L <sup>V</sup> HN <sup>Q</sup> R <sup>V</sup> V <sup>Q</sup> SG <sup>S</sup> WQ <sup>Q</sup> GP <sup>I</sup> ILN <sup>W</sup> L <sup>D</sup> I <sup>Q</sup> D-----	S <sup>F</sup> DAS <sup>G</sup> FN <sup>L</sup> I
<i>S. typhimurium</i> LT2	IY <sup>P</sup> APFVVDDEWEDDIG <sup>L</sup> VHS <sup>Q</sup> RVV <sup>Q</sup> SG <sup>S</sup> WQ <sup>Q</sup> GP <sup>I</sup> ILN <sup>W</sup> L <sup>D</sup> I <sup>Q</sup> D-----	S <sup>F</sup> DAS <sup>G</sup> FN <sup>L</sup> I
<i>Y. pestis</i>	IY <sup>P</sup> SPF <sup>I</sup> VAEDWQDD <sup>L</sup> L <sup>V</sup> HS <sup>Q</sup> SV <sup>Q</sup> SG <sup>S</sup> W <sup>E</sup> Q <sup>Q</sup> GP <sup>I</sup> VLN <sup>W</sup> Q <sup>D</sup> I <sup>Q</sup> D-----	S <sup>F</sup> DL <sup>S</sup> GFN <sup>L</sup> V
<i>C. violaceum</i>	LYPAPFVVRNRWQD <sup>G</sup> I <sup>G</sup> L <sup>T</sup> HEGE <sup>Q</sup> V <sup>L</sup> I <sup>G</sup> QA <sup>H</sup> YQ <sup>G</sup> PLV <sup>F</sup> SWP <sup>D</sup> VNE-----	S <sup>P</sup> LLD <sup>G</sup> WNVV
<i>P. syringae</i>	LYPDDFVSPQRHRDAS <sup>G</sup> VEHEW <sup>D</sup> GEHS <sup>G</sup> EAWLQ <sup>G</sup> PV <sup>I</sup> LAW <sup>P</sup> GVLS-----	S <sup>G</sup> DWD <sup>G</sup> YNLV
<i>X. campestris</i>	VYPDAFRVQ <sup>R</sup> THMDAAGVM <sup>H</sup> AWDD <sup>T</sup> LIGE <sup>A</sup> WEH <sup>G</sup> PL <sup>I</sup> VSWAD <sup>V</sup> QAD---	LAD <sup>P</sup> TAG <sup>F</sup> NVV
<i>R. solanacearum</i>	LYPGEFLIRGEAMDE <sup>D</sup> GVV <sup>H</sup> DVR <sup>Q</sup> EASGEAAANGL <sup>V</sup> LSWQ <sup>D</sup> IEL <sup>G</sup> SVL <sup>A</sup> GPDM <sup>Q</sup> PNV <sup>V</sup>	
<i>N. punctiforme</i>	VYPNAYFVKETTSIG <sup>K</sup> YVVE <sup>E</sup> RRVAR <sup>L</sup> GESWTND <sup>Q</sup> LVL <sup>S</sup> WE <sup>Q</sup> VK <sup>H</sup> D---IDN <sup>W</sup> SDGRNVV	
	149	153
<i>E. coli</i> K-12	I <sup>H</sup> EVA <sup>H</sup> K <sup>L</sup> D <sup>T</sup> RNG <sup>D</sup> RAS <sup>G</sup> VP----	F <sup>I</sup> PL <sup>R</sup> EV <sup>A</sup> G <sup>W</sup> EHD <sup>L</sup> HAAMN <sup>N</sup> I <sup>Q</sup> EE <sup>I</sup> ELV <sup>G</sup> EN-----
<i>E. coli</i> O157:H7	IHEVAHKLDTRNGDRASGVP----	FIP <sup>L</sup> REV <sup>A</sup> G <sup>W</sup> EHD <sup>L</sup> HAAMN <sup>N</sup> I <sup>Q</sup> EE <sup>I</sup> ELV <sup>G</sup> EN-----
<i>E. fergusonii</i>	IHEVAHKLDTRNGDRASGVP----	L <sup>I</sup> P <sup>L</sup> REV <sup>A</sup> G <sup>W</sup> EHD <sup>L</sup> HAAMN <sup>N</sup> I <sup>Q</sup> DE <sup>I</sup> DLV <sup>G</sup> ES-----
<i>S. typhimurium</i> LT2	IHEVAHKLDMRNGDRASGIP----	F <sup>I</sup> P <sup>L</sup> R <sup>D</sup> V <sup>A</sup> G <sup>W</sup> EHD <sup>L</sup> HAAMN <sup>N</sup> I <sup>Q</sup> DE <sup>I</sup> DLV <sup>G</sup> ES-----
<i>Y. pestis</i>	IHEAAHKLDMRNGGHSNGVP----	P <sup>I</sup> AM <sup>R</sup> D <sup>V</sup> AV <sup>W</sup> EHD <sup>L</sup> HAMN <sup>N</sup> I <sup>Q</sup> DE <sup>I</sup> DM <sup>V</sup> GE-----
<i>C. violaceum</i>	IHEAAHQ <sup>F</sup> DMLDGPANG <sup>A</sup> PP----	L <sup>H</sup> K <sup>G</sup> M <sup>D</sup> RAA <sup>W</sup> SRAW <sup>N</sup> Q <sup>A</sup> Y <sup>R</sup> Q <sup>F</sup> CRE <sup>V</sup> D <sup>H</sup> GV <sup>E</sup> G-----
<i>P. syringae</i>	IHELAKLDMLNGDANG <sup>L</sup> PP----	L <sup>H</sup> S <sup>D</sup> M <sup>R</sup> V <sup>T</sup> D <sup>W</sup> AS <sup>V</sup> M <sup>Q</sup> S <sup>A</sup> F <sup>D</sup> DL <sup>N</sup> R <sup>Q</sup> L <sup>D</sup> Q <sup>D</sup> PA-----
<i>X. campestris</i>	VHEMAHKLDALD <sup>G</sup> ALD <sup>G</sup> T <sup>P</sup> P----	L <sup>P</sup> AA <sup>Q</sup> Y <sup>R</sup> D <sup>W</sup> ARD <sup>F</sup> Q <sup>Q</sup> A <sup>Y</sup> T <sup>A</sup> F <sup>C</sup> R <sup>Q</sup> V <sup>D</sup> A <sup>G</sup> T <sup>Q</sup> T-----
<i>R. solanacearum</i>	MHEFTHKLDMLNGEAD <sup>G</sup> IP <sup>A</sup> FS <sup>S</sup> RLH <sup>A</sup> GLD <sup>R</sup> E <sup>Q</sup> W <sup>A</sup> DD <sup>L</sup> Y <sup>A</sup> E <sup>Y</sup> D <sup>A</sup> F <sup>A</sup> E <sup>R</sup> CD <sup>R</sup> I <sup>P</sup> ERR <sup>W</sup> D <sup>A</sup> D	
<i>N. punctiforme</i>	LHEFAHQ <sup>L</sup> DQED <sup>G</sup> KAE <sup>G</sup> V <sup>P</sup> I----	L <sup>Q</sup> SN <sup>S</sup> D <sup>Y</sup> T <sup>I</sup> W <sup>A</sup> K <sup>V</sup> M <sup>T</sup> EE <sup>Y</sup> Q <sup>Q</sup> L <sup>C</sup> N <sup>D</sup> V <sup>L</sup> Q <sup>G</sup> A <sup>K</sup> T-----
	205	210
<i>E. coli</i> K-12	---AASIDAYAASD <sup>P</sup> AE <sup>C</sup> FAV <sup>L</sup> SEY <sup>F</sup> FS <sup>A</sup> PE <sup>L</sup> FAP <sup>R</sup> FP <sup>S</sup> SLW <sup>Q</sup> R <sup>F</sup> C <sup>Q</sup> F <sup>Y</sup> Q <sup>Q</sup> DP-----	
<i>E. coli</i> O157:H7	---AASIDAYAASD <sup>P</sup> AE <sup>C</sup> FAV <sup>L</sup> SEY <sup>F</sup> FS <sup>A</sup> PE <sup>L</sup> FAP <sup>R</sup> FP <sup>S</sup> SLW <sup>Q</sup> R <sup>F</sup> C <sup>Q</sup> F <sup>Y</sup> Q <sup>Q</sup> DP-----	
<i>E. fergusonii</i>	---AASIDAYAATD <sup>P</sup> AE <sup>C</sup> FAV <sup>L</sup> SEY <sup>F</sup> FS <sup>A</sup> PE <sup>L</sup> FAP <sup>R</sup> FP <sup>A</sup> LW <sup>Q</sup> R <sup>F</sup> C <sup>Q</sup> F <sup>Y</sup> Q <sup>Q</sup> DP-----	
<i>S. typhimurium</i> LT2	---AASIDAYAATD <sup>P</sup> AE <sup>C</sup> FAV <sup>L</sup> SEY <sup>F</sup> FS <sup>A</sup> PE <sup>L</sup> FAP <sup>R</sup> FP <sup>A</sup> LW <sup>Q</sup> R <sup>F</sup> C <sup>Q</sup> F <sup>Y</sup> R <sup>Q</sup> DP-----	
<i>Y. pestis</i>	---GASMDAYAASN <sup>P</sup> AE <sup>C</sup> FAV <sup>L</sup> SEY <sup>F</sup> FS <sup>A</sup> PE <sup>L</sup> LE <sup>G</sup> R <sup>F</sup> PA <sup>V</sup> Y <sup>Q</sup> H <sup>F</sup> CR <sup>F</sup> Y <sup>R</sup> Q <sup>D</sup> P-----	
<i>C. violaceum</i>	-----WLD <sup>P</sup> Y <sup>A</sup> SEN <sup>P</sup> GE <sup>F</sup> FAV <sup>L</sup> SE <sup>A</sup> FF <sup>E</sup> IP <sup>H</sup> LARR <sup>D</sup> Y <sup>P</sup> E <sup>L</sup> Y <sup>R</sup> LL <sup>S</sup> Q <sup>F</sup> Y <sup>R</sup> Q <sup>D</sup> P-----	
<i>P. syringae</i>	---Q <sup>T</sup> V <sup>I</sup> D <sup>P</sup> Y <sup>A</sup> AQ <sup>D</sup> P <sup>G</sup> E <sup>F</sup> FAV <sup>T</sup> SEY <sup>F</sup> FS <sup>A</sup> P <sup>D</sup> LL <sup>H</sup> ES <sup>Y</sup> PA <sup>V</sup> A <sup>Y</sup> Q <sup>L</sup> Q <sup>A</sup> F <sup>Y</sup> R <sup>Q</sup> D <sup>T</sup> -----	
<i>X. campestris</i>	-----D <sup>I</sup> D <sup>P</sup> Y <sup>A</sup> AE <sup>A</sup> PE <sup>E</sup> FF <sup>F</sup> AV <sup>L</sup> SEY <sup>H</sup> FS <sup>A</sup> P <sup>Q</sup> V <sup>I</sup> A <sup>R</sup> EM <sup>P</sup> R <sup>V</sup> AA <sup>H</sup> L <sup>T</sup> R <sup>F</sup> Y <sup>G</sup> AS <sup>P</sup> -----	
<i>R. solanacearum</i>	P <sup>I</sup> L-S <sup>L</sup> L <sup>D</sup> P <sup>Y</sup> GA <sup>Q</sup> HP <sup>A</sup> E <sup>F</sup> FAV <sup>A</sup> SEV <sup>F</sup> F <sup>V</sup> E <sup>P</sup> AAL <sup>Q</sup> D <sup>T</sup> L <sup>P</sup> AL <sup>Y</sup> ALL <sup>Q</sup> A <sup>F</sup> Y <sup>L</sup> Q <sup>D</sup> P-----	
<i>N. punctiforme</i>	-----V <sup>M</sup> H <sup>S</sup> Y <sup>G</sup> AT <sup>N</sup> PA <sup>E</sup> FF <sup>A</sup> V <sup>A</sup> T <sup>E</sup> T <sup>F</sup> FE <sup>K</sup> P <sup>H</sup> Q <sup>L</sup> L <sup>S</sup> K <sup>H</sup> P <sup>A</sup> L <sup>Y</sup> E <sup>Q</sup> L <sup>Q</sup> R <sup>Y</sup> Y <sup>Q</sup> L <sup>D</sup> P <sup>G</sup> Q <sup>W</sup> V <sup>F</sup> R <sup>M</sup> U	
	.	.
<i>E. coli</i> K-12	LQRLH-HANDT-DSFSATNV-----	H
<i>E. coli</i> O157:H7	LQRLH-HANDT-DSFSATNVH-----	
<i>E. fergusonii</i>	LLRLR-QNEDP-AGNSSHQLH-----	
<i>S. typhimurium</i> LT2	SQRLR-VSAAE-GDYGESEH-----	
<i>Y. pestis</i>	LARLKRWENSLA-DNPPENTH-SHR-----	
<i>C. violaceum</i>	AARLPPVDEESV-MPVQPSFRMULARBEGINN	
<i>P. syringae</i>	LARLN----ALR-HQDPAYRDH-----	
<i>X. campestris</i>	FAHAPPN-----	
<i>R. solanacearum</i>	ARRML---DAGR-HAEPATP-----	
<i>N. punctiforme</i>	LARBEGINNF <sup>R</sup> MULARENDEF <sup>R</sup> MULARENDE-	

### 3.1.1.2 Übersicht der durchgeführten Aminosäuresubstitutionen in MtfA

Die Tabelle 3.1.1 zeigt eine Zusammenstellung aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutagenesen sowie die entsprechenden Nukleotidsubstitutionen. Zusätzlich sind bereits die Mittelwerte des quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase Tests vorweggenommen. Eine graphische Darstellung und eine ausführliche Erläuterung der Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.1.6 dargestellt. Einige der Mutagenesen wurden im Rahmen der Großpraktika von F. J. Bink und J.-E. Muus, sowie im Rahmen der Diplomarbeiten von J.-E. Muus (64) und der Masterarbeit von K. Homann (28) durchgeführt. Bei dem Austausch der AS wurde darauf geachtet, dass alle hochkonservierten AS in einer möglichst konservativen Art und Weise ausgetauscht wurden. Somit wurden beispielsweise geladene AS gegen andere geladene (z.B. D161E) oder kleine, unpolare AS gegen unpolare AS ähnlicher Größe (z.B. A70S) ausgetauscht. Bei Austauschen, die zu einer multiplen Faktorenveränderung wie Größe, Polarität und Hydrophobizität führen, wäre es sehr wahrscheinlich, dass eine solche Veränderung eine Auswirkung auf die generelle Faltung und somit auf die Funktion des Proteins hat. Bei recht konservativen Austauschen hingegen, gibt eine Verringerung in der Wechselwirkung mit Mlc einen Hinweis auf die funktionelle Notwendigkeit dieser Aminosäure. Die in Abbildung 3.1.2 gelb gekennzeichneten AS wurden wie in Tabelle 3.1.1 dargestellt ausgetauscht. Für alle wurde als Grundlage das Plasmid pTMByeel, welches das *mtfA* Wildtyp (WT) Gen mit einem carboxyterminalen „His-Tag“ trägt, verwendet. Hierdurch entstanden die Vektoren pTBY1-54. Die verwendeten Oligonukleotide für die Mutagenesen sind der Tabelle 2.1.6 des Material- und Methodenteils zu entnehmen. Nach dem Nachweis der Mutation und der vollständigen Sequenzierung zum Ausschluss weiterer Mutationen wurden die erhaltenden Vektoren jeweils in den Teststamm LZ150/F<sup>'</sup>:: $\emptyset$ (*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*) (Abbildung 3.1.3) transformiert. Anschließend wurden die Zellen angezogen und bei einer OD<sub>650</sub>=1 geerntet. Danach wurde zunächst ein Western-Blot mit den verschiedenen Proben zur Überprüfung der Proteinstabilität durchgeführt (siehe Abbildung 3.1.4). Danach wurde mittels quantitativem  $\beta$ -Galaktosidase Test die Wechselwirkung der jeweiligen Mutanten mit dem Repressor Mlc charakterisiert. Die Zahlenwerte der  $\beta$ -Galaktosidase Tests sowie die Aussagen über die Proteinstabilität werden zur besseren Übersicht bereits in Tabelle 3.1.1 aufgeführt. Sie werden aber erst in Kapitel 3.1.1.5 und 3.1.1.6 näher erläutert. In einigen Fällen wurde mit Hilfe der vollständigen Sequenzierung nach der Mutagenese eine weitere, zunächst unbeabsichtigte Mutation nachgewiesen. In diesem Fall wurde die Mutagenese wiederholt und die zusätzliche Mutation, sofern sie einen im Vergleich zum Wildtyp-MtfA veränderten Phänotyp zeigte, ebenfalls als Einzelmutation hergestellt und analysiert. Im Falle einer so genannten „stillen Mutation“ (W132Y/P127P)

wurde keine Wiederholung der Mutagenese durchgeführt, da in diesem Fall die  $\beta$ -Galaktosidase Ergebnisse dem Wildtyp entsprachen. Im Fall der „stillen Mutation“ E219D/F214F wurde eine erneute Mutagenese durchgeführt, da hier bei der Doppelmutante ein auffälliger Phänotyp zu verzeichnen war. Dieser könnte auf eine verminderte mRNA-Stabilität aufgrund der zusätzlichen Basensubstitution zurückzuführen sein. Ergänzend zu dem gezielten Austausch von Aminosäuren, wurde eine unspezifische Mutagenese mit Hilfe des XL1-Red Stammes durchgeführt. Diese diente dazu, Aufschluss über weitere potentiell wichtige AS neben den durch den Aminosäuresequenzvergleich als hochkonserviert gekennzeichneten AS zu bekommen. Die hierdurch erhaltenen AS sind ebenfalls in der Referenz gekennzeichnet. Hierauf wird in Kapitel 3.1.1.4 Bezug genommen.

### Tab.3.1.1 Überblick über die ausgetauschten AS in MtfA

Diese Tabelle gibt einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit ausgetauschten AS innerhalb des MtfAs. Angegeben sind Art und Lokalisation des Aminosäureaustausches, sowie die dadurch bedingte Triplet-Nukleotidänderung. (Spalten 2 und 3). Zusätzliche, durch die PCR aufgetretene Mutationen sind in Spalte 4 gezeigt. Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase Tests (Spalte 5), sowie die nachgewiesene Proteinstabilität (Spalte 6) sind ebenfalls erfasst. Die genauere Erläuterung dieser Ergebnisse wird in den nachfolgenden Kapiteln 3.1.1.5 und 3.1.1.6 gezeigt.

Vektor-Bezeichnung	Aminosäureaustausch	Nukleotidsubstitution	Zusatzmutation	Mlc-MtfA WW in %	Proteinstabilität	Referenz
pTBY1	L40T	TTA→ACA	-	93	WT	(64)
pTBY2	L40A	TTA→GCA	-	86	WT	(28)
pTBY3	L40E	TTA→GAA	-	45	WT	(64)
pTBY4	K51R	AAG→AGG	-	109	WT	(64)
pTBY5	A70D	GCA→GAT	-	27	WT	(64)
pTBY6	A70S	GCA→TCA	-	97	WT	(28)
pTBY7	V77A	GTT→GCT	-	108	WT	Zufallsmutagenese
pTBY8	Y94S	TAT→TCT	-	92	WT	(64)
pTBY9	P95S	CCT→TCT	-	86	WT	(64)
pTBY10	G120S	GGT→AGT	-	94	WT	(64)
pTBY11	G120S/Q121L	GGT→AGT	CAG→CTG	86	WT	(64)
pTBY12	W132Y/P127P	TGG→TAC	CCT→CCA	65	WT	(64)
pTBY13	S142F	TTC→TTT	-	26	WT	Zufallsmutagenese
pTBY14	S142A	TCT→GCT	-	44	WT	(28)
pTBY15	N145Q/E190G	AAC→CAA	GAA →GGA	26	WT	diese Arbeit
pTBY16	N145D	AAC→GAC	-	19	WT	diese Arbeit
pTBY17	N145Q	AAC→CAA	-	32	WT	diese Arbeit
pTBY18	I148E	ATT→GAA	-	19	< WT	diese Arbeit
pTBY19	I148Y	ATT→TAT	-	49	WT	diese Arbeit
pTBY20	H149K	CAT→AAA	-	67	WT	diese Arbeit
pTBY21	H149Q	CAT→CAA	-	34	WT	diese Arbeit
pTBY22	E150D	GAA→GAT	-	106	WT	diese Arbeit
pTBY23	E150Q	GAA→CAA	-	96	WT	diese Arbeit
pTBY24	H153Q	CAT→CAA	-	75	WT	diese Arbeit
pTBY25	H153K	CAT→AAA	-	106	WT	diese Arbeit
pTBY26	D156E	GAC→GAA	-	63	WT	diese Arbeit
pTBY27	D156N/D161E	GAC→AAC	GAT→GAA	83	WT	diese Arbeit
pTBY28	D156N	GAC→AAC	-	24	WT	diese Arbeit
pTBY29	G160S	GGC→AGC	-	86	WT	diese Arbeit
pTBY30	D161E	GAT→GAA	-	108	WT	(28)
pTBY31	W177Y	TGG→TAC	-	94	WT	(64)
pTBY32	Y205S	TAT→AGT	-	77	WT	diese Arbeit

Vektor-Bezeichnung	Aminosäure-austausch	Nukleotid-substitution	Zusatz-mutation	Mlc-MtfA WW in %	Protein-stabilität	Referenz
pTBY33	A207D/Y205H	GCC→GAC	TAT→CAT	34	WT	diese Arbeit
pTBY34	A207D	GCC→GAC	-	51	WT	diese Arbeit
pTBY35	A207S	GCC→TCC	-	66	WT	(28)
pTBY36	P210S	CCT→AGT	-	84	WT	diese Arbeit
pTBY37	E212Q	GAA→CAA	-	85	WT	diese Arbeit
pTBY38	E212D	GAA→GAC	-	116	WT	diese Arbeit
pTBY39	F214M	TTT→ATG	-	74	WT	diese Arbeit
pTBY40	A215D	GCC→GAC	-	19	<WT	diese Arbeit
pTBY41	A215S	GCC→TCC	-	62	WT	(28)
pTBY42	V216D	GTA→GAC	-	48	WT	diese Arbeit
pTBY43	V216L	GTA→TTA	-	94	WT	(28)
pTBY44	V216L/L217I	GTA→TTA	CTT→ATT	30	WT	(28)
pTBY45	S218A	TCT→GCT	-	59	WT	diese Arbeit
pTBY46	E219Q	GAA→CAA	-	62	WT	diese Arbeit
pTBY47	E219D	GAA→GAC	-	47	WT	diese Arbeit
pTBY48	E219D/F214F	GAA→GAC	TTT→TTC	13	WT	diese Arbeit
pTBY59	F222M/K189E	TTT→ATG	AAG→GAG	65	WT	diese Arbeit
pTBY50	F222M	TTT→ATG	-	52	WT	diese Arbeit
pTBY51	P225S	CCA→TCA	-	93	WT	diese Arbeit
pTBY52	P233S-1	CCT→TCT	-	20	instabil	diese Arbeit
pTBY53	P233S-2	CCT→TCT	-	96	WT	diese Arbeit
pTBY54	Y243S	TAT→AGT	-	11	WT	diese Arbeit

### 3.1.1.3 Darstellung des Testsystems LZ150F'::Ø(*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*)

Mit Hilfe des in Abb. 3.1.3 schematisch dargestellten Testsystems wurden die MtfA-Mutanten in Bezug auf ihre Mlc-Interaktionsfähigkeit überprüft. Ausgehend von quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase Tests konnte so die Wechselwirkung des Repressors Mlc mit den verschiedenen MtfA-Mutanten quantifiziert werden. Die Abbildung 3.1.3 zeigt schematisch den *E.coli* Stamm LZ150 mit einer auf dem F' Plasmid kodierten *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion. Der Stamm trägt eine *cat*-Insertion im *ptsG* Gen, so dass das EIICB<sup>Glc</sup> und damit der zweite Wechselwirkungspartner von Mlc nicht vorhanden ist. Das *mtfA* Gen wird durch das Plasmid pTMByeel kodiert und unter der Kontrolle des *tac*-Promotors und des *lacZ* Operators exprimiert. Hierdurch war es möglich, die Expression des Gens mit verschiedenen Mengen an IPTG zu steuern. WT-MtfA ist in der Lage, den Repressor Mlc von der Promotorregion des *ptsG*-Gens wegzutitrieren. Die Folge davon ist in diesem System die verstärkte Expression des *lacZ*-Gens, welche mit Hilfe des quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase Tests nachgewiesen werden konnte.

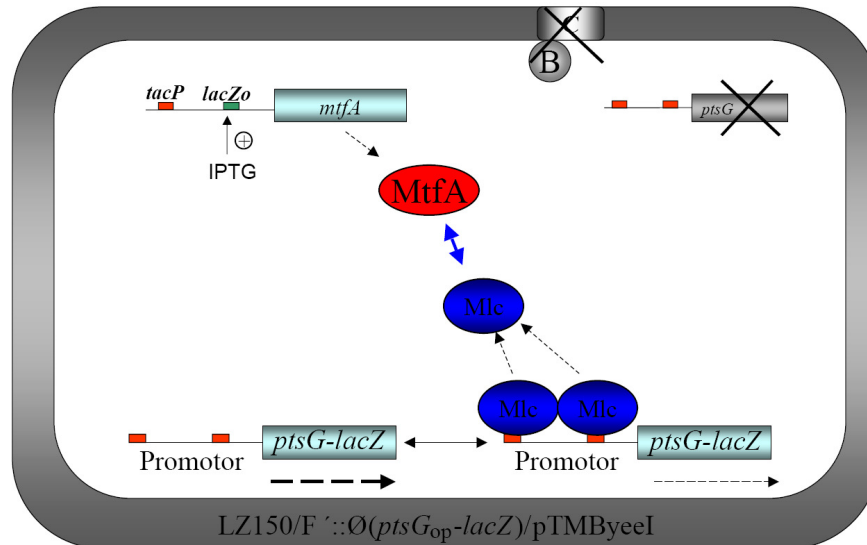


Abb.3.1.3 Testsystem zur Quantifizierung der MtfA-Mlc Wechselwirkung

### 3.1.1.4 Unspezifische Mutagenese von *mtfA*

Zusätzlich zu der spezifischen Mutagenese wurde eine Zufallsmutagenese mit dem WT-*mtfA* Gen ausgehend von dem Plasmid pTMByeel durchgeführt. Hierdurch sollten weitere, ebenfalls notwendige Aminosäurereste für die Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA identifiziert werden. Die unspezifische Mutagenese wurde mit Hilfe des Mutagenesestammes XL1-Red durchgeführt. Dieser trägt Mutationen in den DNA Reparaturgenen *mutS*, *mutD* und *mutT* und hat damit im Vergleich zu einem WT *E.coli* Stamm eine um das 5000fache erhöhte Mutationsrate. Die erhaltenen Vektoren wurden zunächst in den Teststamm transformiert und zur ersten Selektion auf einer LBo Amp IPTG/X-Gal Platte ausplattiert. X-Gal als Substrat für die  $\beta$ -Galaktosidase (Blaufärbung nach erfolgter Spaltung) diente als Nachweis für die Interaktion des Repressors Mlc mit möglichen Mutanten von MtfA. Mittels dieses ersten „Blau-Weiß Screenings“ wären, bei einer verbesserten Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA, dunkelblaue Kolonien, bei einer verminderten oder gar keiner Wechselwirkung weiße oder hellblaue Kolonien zu erwarten gewesen. Daher wurden so selektionierte Kolonien von Interesse (dunkelblaue oder weiße Kolonien) in einem zweiten Schritt zunächst auf eine LBo Amp X-Gal Platte und anschließend auf eine LBo Amp IPTG/X-Gal Platte übertragen. Dieses diente der Identifizierung, ob der entsprechende Phänotyp erstens reproduzierbar und zweitens die Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA mittels IPTG induzierbar war.

Im Rahmen der Durchführung dieser Versuche zeigte sich jedoch, dass das hier gewählte Selektionssystem nicht sensitiv genug war und die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Blaufärbungen relativ schwierig erschien. Je länger die Kolonien auf der Platte waren, desto blauer

wurden diese und es konnten keine Unterscheidungen mehr vorgenommen werden. Von ursprünglich insgesamt drei verschiedenen Mutageneseansätzen und den daraus resultierenden ca. 30 Plasmidgemischen konnten nur drei dunkelblaue, sowie zwei weiße Kolonien eindeutig identifiziert werden. Das heißt, die dunkelblauen Kolonien zeigten auf der Platte ohne IPTG eine weiße Färbung und auf der Platte mit IPTG eine dunkelblaue Färbung. Die weißen Kolonien zeigten auf beiden Platten weiße Kolonien. Die untersuchten dunkelblauen Kolonien zeigten in der anschließenden Sequenzierung keinerlei Abweichungen zur Wildtypsequenz und waren demnach eher auf eine erhöhte X-Gal Konzentration an der entsprechenden Stelle der Platte zurückzuführen. Bei der ersten erhaltenen weißen Kolonie wurde ebenfalls keine Abweichung zur Wildtypsequenz innerhalb des *mtfA*-Gens nachgewiesen. Bei der zweiten weißen Kolonie hingegen konnte eine Doppelmutation V77A /S142F (pTBY55) nachgewiesen werden. Diese Doppelmutante zeigte im quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase Test ebenfalls eine reduzierte Wechselwirkung zu Mlc (Daten nicht gezeigt). Somit wurden beide Mutationen spezifisch und getrennt voneinander hergestellt (pTBY7 und pTBY13). Zur weiteren Auswertung sind diese in den folgenden Abbildungen zusammen mit den im Rahmen der spezifischen Mutagenese hergestellten Mutanten dargestellt.

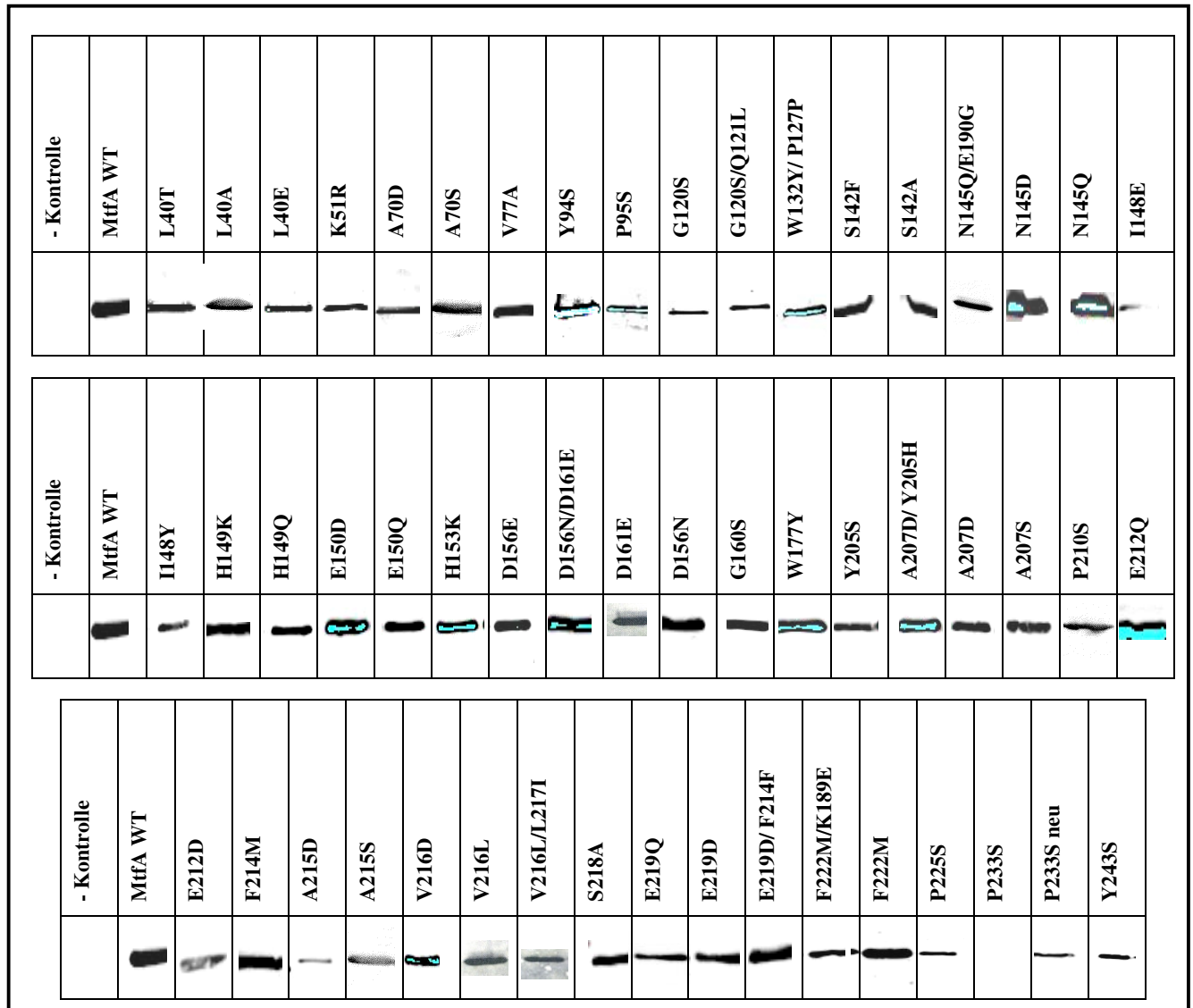
Aufgrund der relativ schlechten „Mutanten-Ausbeute“ bei diesem Verfahren wurde im verwendeten Teststamm mittels P1 Transduktion das *cyaA* Gen, welches für die Adenylatzyklase kodiert, deletiert. Somit wurde von dem Teststamm kein cAMP hergestellt. Wie in der Einleitung gezeigt, wirkt cAMP in Bezug auf die Expression des *ptsG*-Gens als Aktivator. Somit sollte durch das gezielte Ausschalten und die kontrollierte Zugabe von cAMP (5mM) ein geringeres Basalniveau und damit eine reduzierte Blaufärbung auf den Indikatorplatten eingestellt werden. Leider erbrachte auch diese Alternative keine verbesserten Unterscheidungsmöglichkeiten der Blautöne.

### 3.1.1.5 Proteinnachweis der MtfA-Mutanten

Mit Hilfe der Western-Blot Analyse wurde die Stabilität der verschiedenen Mutantenproteine MtfA1-54 ausgehend von den Plasmiden pTBY1-54 überprüft. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pTM30, als Positivkontrolle das von dem Wildtypvektor pTMByeeI exprimierte Protein verwendet. Aufgrund der Vielzahl der darzustellenden Proteinsignale wurden die einzelnen Banden aus verschiedenen Blots zusammengestellt. Aus Übersichtsgründen sind die einzelnen Proteine hier mit der Mutation benannt. Wie in Abb. 3.1.4 zu sehen ist, zeigte die Negativkon-



trolle (pTM30) kein Signal, die MtfA-WT Kontrolle hingegen ein deutliches Proteinsignal bei einer Größe von 32kDa (Standard nicht dargestellt).



**Abb.3.1.4 Western-Blot Analyse der MtfA-Mutanten**

Hierzu wurden die jeweiligen Plasmide (pTBY1-54) in den Stammhintergrund JM109 transformiert und anschließend angezogen. Nach der Ernte von 1ml Zellen bei  $OD_{650} = 1$  wurden die Proben 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt, 10 Minuten gekocht und 15µl der Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Western-Blot Analyse mit „Anti-His“ Antikörpern und mit einem Infrarotlabel markiertem Anti-Maus Antikörper.

Da für diese Abbildung die Proben aus unterschiedlichen Versuchen und von unterschiedlichen „Blots“ verwendet wurden, lassen sich die gezeigten Proteinmengen nicht direkt miteinander vergleichen. Einige schwach aussehende Signale (z.B.G120S) entsprachen auf dem Blot der MtfA-Wildtypkontrolle, so dass nur die im Folgenden herausgestellten Mutanten eine verringerte Proteinstabilität aufwiesen. Daher wird nur zwischen Konzentrationen, die annähernd dem „WT entsprechen“, „deutlich geringeren Konzentrationen“ oder „kein Protein nachweisbar“ unterschieden. Die meisten generierten Proteine zeigten eine WT ähnliche Proteinkonzentration. Die

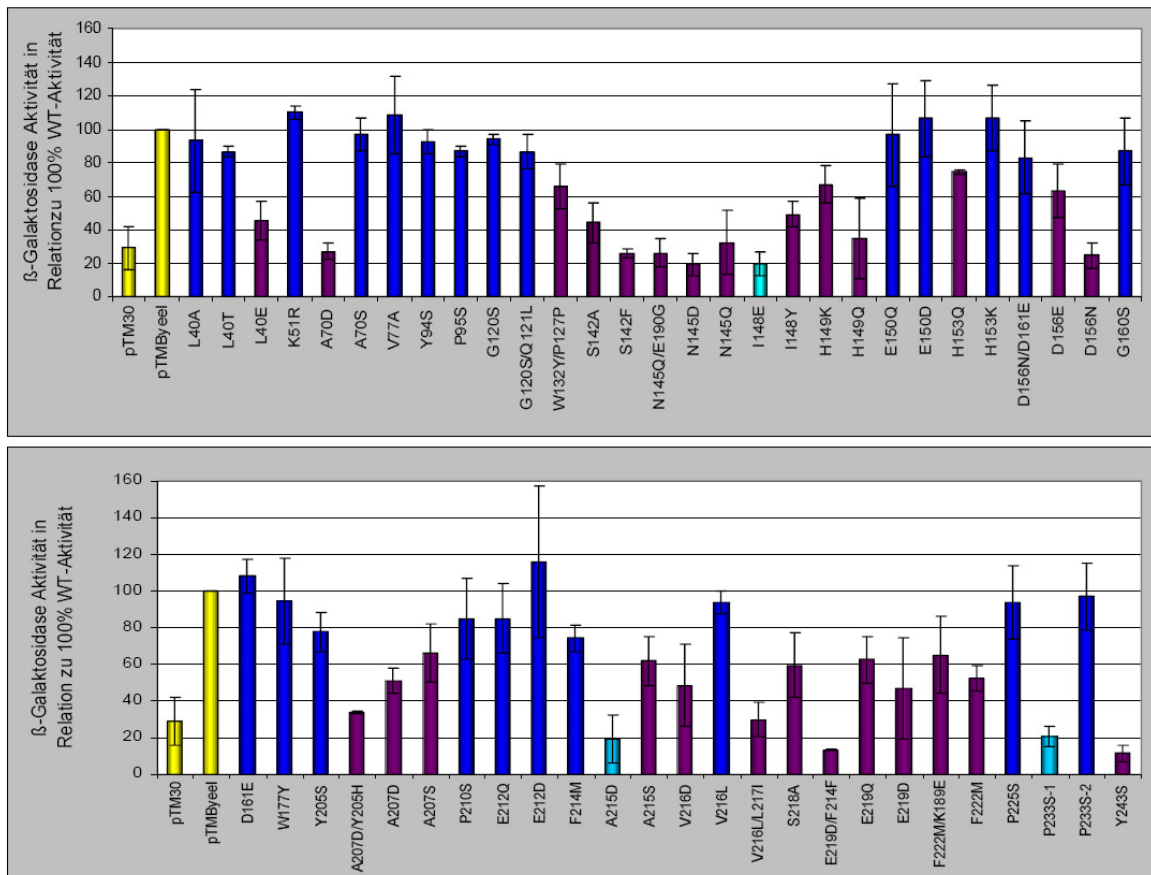
Proteine I148E und A215D zeigten eine deutlich geringere Konzentration im Gegensatz zu der Wildtypkontrolle. Bei der Probe P233S konnte gar kein Protein nachgewiesen werden. In diesem Fall konnte das Protein jedoch nach einer erneuten Mutagenese nachgewiesen werden, obwohl die Sequenzen der beiden Klone neben der gewünschten Probe keinerlei Abweichungen zur *mtfA* Wildtypsequenz zeigten. Dieses Phänomen könnte auf eine zusätzliche Mutation im Promotorbereich von *mtfA* zurückzuführen sein, die hier nicht überprüft wurde. Da alle *mtfA* Derivate vollständig sequenziert wurden, konnten weitere Mutationen, Deletionen oder Insertionen, ausgeschlossen werden. Somit konnte davon ausgegangen werden kann, dass die jeweils eingeführte Mutation für die verminderte Proteinstabilität verantwortlich war.

### 3.1.1.6 Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen Mlc und den MtfA-Mutanten

Um den Effekt der verschiedenen Mutationen im *mtfA* Gen (siehe Tab.3.1.1) auf die Mlc Interaktion zu testen, wurden die entsprechenden Vektoren pTBY1-54 in den Teststamm LZ150/F': $\emptyset$ (*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*) transformiert. Für jede Mutante wurden anschließend zwei Kulturen aus der gleichen Vorkultur in Selektionsmedium angezogen. Eine der Kulturen wurde mit 100 $\mu$ M IPTG induziert. Mit den geernteten Zellen wurden anschließend  $\beta$ -Galaktosidase Tests durchgeführt. Dieser Test wurde für jede Mutante mindestens dreimal unabhängig und mit verschiedenen Einzelkolonien gemacht.

Aufgrund der daraus resultierenden Vielzahl von Daten wurden die einzelnen Ergebnisse der jeweiligen induzierten Proben für jeden Test in Relation zur jeweils parallel gemessenen MtfA-Wildtyp Kontrolle gesetzt. Die nachgewiesene Enzymaktivität dieser Kontrolle wurde jeweils als 100% definiert. Die entsprechenden Enzymaktivitäten der jeweiligen induzierten Mutanten wurden darauf bezogen und der prozentuale Anteil im Verhältnis zum WT berechnet. Aus den erhaltenen Daten wurden die in Abb. 3.1.5 gezeigten  $\beta$ -Galaktosidase Werte und die zugehörigen Standardabweichungen ermittelt.

Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pTM30 in den verwendeten Teststamm transformiert. Die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten der Negativkontrolle wurden ebenfalls in Relation zu den jeweiligen MtfA Wildtypwerten gesetzt. Dieser Wert spiegelt das Basalniveau der  $\beta$ -Galaktosidase wider.



**Abb.3.1.5 Darstellung der β-Galaktosidase Test Ergebnisse**

In dieser Abbildung sind die Ergebnisse der β-Galaktosidase Tests gezeigt, die indirekt die Wechselwirkung zwischen Mlc und den MtfA-Mutanten 1-54 quantifizieren. Die verschiedenen Mutanten sind in der Reihenfolge dargestellt, wie sie auch in der Primärstruktur des Proteins zu finden sind. Aufgrund der Übersichtlichkeit der Ergebnisse wurden wiederum die Mutationen als Beschriftung und nicht die Nummerierung 1-54 gewählt. Die Durchführung der Tests erfolgte wie im Material- und Methodenteil beschrieben. Die Kontrollen (Negativkontrolle pTM30, Positivkontrolle pTMByeel) sind gelb, Proteine mit einer wildtypähnlichen Mlc Interaktion (>80% WT) in blau und die Proteine mit einer verminderten Wechselwirkung (<80% WT) in violett dargestellt. Bei den in grün markierten Mutanten konnte im Rahmen der Western-Blot Analyse (siehe Kapitel 3.1.1.5) kein Protein oder eine deutlich verminderte Proteinestabilität nachgewiesen werden. Die Mutanten, die mit 1 oder 2 gekennzeichnet sind, wurden aufgrund einer zunächst verminderten Proteinestabilität oder sehr geringer β-Galaktosidase Werte wiederholt hergestellt und sind daher entsprechend gekennzeichnet.

Generell konnten anhand der β-Galaktosidase Ergebnisse zwei Kategorien von Mutanten bestimmt werden:

1. die in blau dargestellten zeigten eine wildtypähnliche Mlc Interaktion (>80% WT)
2. die in violett dargestellten zeigten eine verminderte Mlc Interaktion (<80% WT)

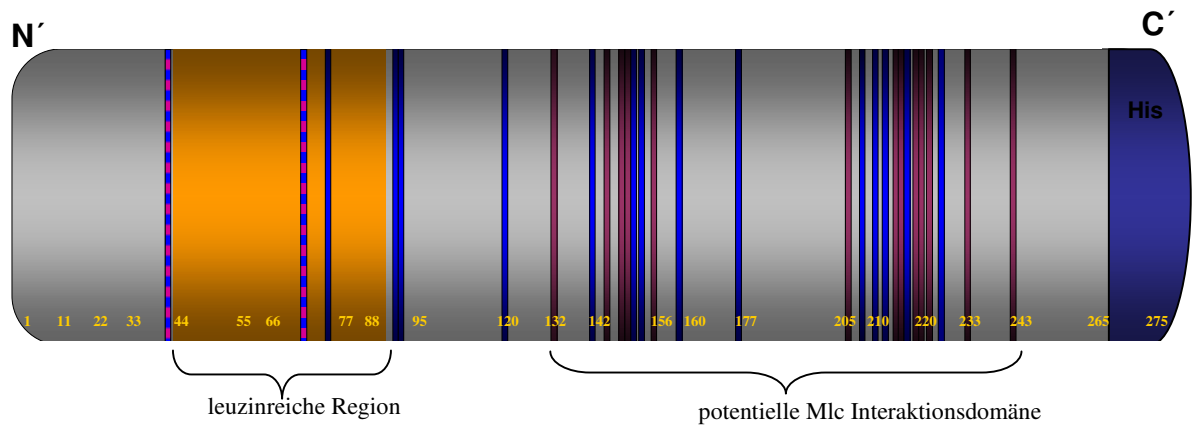
Im aminoterminalen Bereich des Proteins MtfA zeigten zwei ausgetauschte AS eine verminderte Wechselwirkung zum Repressor Mlc (L40E und A70D). Diese wurden aufgrund dieser Ergebnisse gegen neutrale AS ausgetauscht (L40A und A70S) und zeigten in dieser Konstellation wieder die wildtypähnliche Titration von Mlc. Somit hatte eine Substitution dieser AS nur dann eine Auswirkung auf die Mlc Interaktion, wenn an dieser Position eine geladene Aminosäure eingefügt wurde. Im carboxyterminalen Bereich gibt es eine auffällige Häufung von scheinbar essen-

tiell wichtigen AS in zwei Bereichen (AS 132-149) und (AS 214-243). Diese beiden Bereiche sind generell reich an hoch konservierten AS. Hier zeigten die meisten Mutanten trotz sehr konservativen Substitutionen einen veränderten Phänotyp in Bezug auf die Mlc-Interaktion im Vergleich zum Wildtyp-MtfA. Im Fall der Doppelmutante D156N/ D161E ist eine zufällige Suppressormutation aufgetreten. Die Einzelmutante D156N verursachte eine stark verminderte Wechselwirkung in Bezug auf die Mlc Interaktion. D161E als Einzelmutation hingegen zeigt eine wildtypähnliche Mlc Interaktion. In der Kombination von beiden Mutationen (pTBY27), die im Rahmen der Mutagenese zufällig entstand, zeigten die  $\beta$ -Galaktosidase Ergebnisse einen wildtypähnlichen Phänotyp. Diese Ergebnisse zeigten somit, dass die D161E Mutation die D156N Mutation supprimiert. Im Falle der Doppelmutante V216L/L217I (pTBY44) scheint die zusätzliche, ursprünglich nicht erwünschte Mutation L217I für die verminderte Wechselwirkung zum Mlc verantwortlich zu sein. Alternativ dazu könnte auch die Kombination beider Mutationen die eingeschränkte Wechselwirkung zum Repressor Mlc verursacht haben, da die V216L Mutante alleine keinen auffälligen Phänotyp zeigte. Die Mutation L217I wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht als Einzelmutation hergestellt, so dass hierüber keine genaueren Aussagen getroffen werden können. Die drei Proteine MtfA18, 40 und 52 wiesen aufgrund des jeweils eingeführten AS-Austausches eine geringere Stabilität auf, die sich auch durch eine dem Basalniveau entsprechende  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität zeigte (in grün markiert). Daher wurden diese Proteine nicht in die Gesamtauswertung einbezogen.

Anhand dieser Ergebnisse ließen sich in Bezug auf die MtfA-Mlc Interaktion zwei deutlich essentielle Bereiche im carboxyterminalen Teil des Proteins eingrenzen. Zusätzlich konnten zwei AS im aminoterminalen Bereich identifiziert werden, die bei einer eingeführten Ladungsänderung ebenfalls für die Interaktion mit Mlc von entscheidender Bedeutung sind. Diese Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.1.7 in einem Domänen-Modell von MtfA zusammengestellt.

### **3.1.1.7 Domänen-Modell von MtfA**

Aufgrund der aus 3.1.1.6 erhaltenen Ergebnisse konnte folgendes Modell des Proteins MtfA erstellt werden:



### Abb.3.1.6 Domänen-Modell von MtfA

Diese Abbildung zeigt das aus den Ergebnissen abgeleitet MtfA-Modell. Dargestellt ist MtfA in seiner rekombinanten Form. Es besteht insgesamt aus 275 AS inklusive einem carboxyterminalen „His-Tag“, der aus fünf Histidinen besteht. Die gelb unterlegte Region zeigt die auffallend leuzinreiche Region im aminoterminalen Bereich von AS40-91 des Proteins. Die im Rahmen dieser Arbeit ausgetauschten AS sind an den entsprechenden Stellen als Balken gekennzeichnet. In blau dargestellt sind die AS, die nahezu keine veränderte Wechselwirkung (>80%) mit Mlc zeigten. Die in violett dargestellten AS zeigten eine verminderte (<80%) Interaktion mit Mlc an. Eine karierte Mischung dieser beiden Farben deutet darauf hin, dass die zwei MtfA-Mutanten L40E und A70D, vermutlich aufgrund ihrer Ladungsänderung, einen veränderten Phänotyp in Bezug auf die Mlc Interaktion zeigten, neutralere Austausche (L40A und A70S) hingegen verhielten sich wie der Wildtyp.

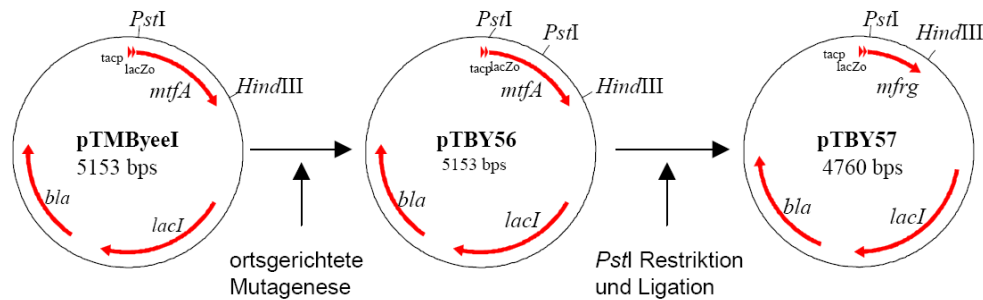
Das hier gezeigte MtfA-Modell zeigt die potentielle Mlc-Binderegion im carboxyterminalen Bereich von MtfA beginnend bei AS132. Dieses Modell wurde aus den vorangegangenen Versuchen postuliert. Wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, wurde dieses Modell näher untersucht und auf seine Beständigkeit hin überprüft. Hierzu wurde sowohl der aminoterminal- (siehe Kapitel 3.1.3) als auch der carboxyterminale Bereich (siehe Kapitel 3.1.2) des Proteins separat mit verschiedenen Methoden näher untersucht.

### 3.1.2 Untersuchungen zur Funktion des carboxyterminalen Bereiches von MtfA

Aufgrund der im vorangegangenen Kapitel 3.1.1 gezeigten Ergebnisse scheint die carboxyterminale Domäne des MtfAs bestehend aus mindestens 140AS (AS 132-271), für die Wechselwirkung mit dem Repressor Mlc verantwortlich zu sein. Die folgenden Versuche sollten Aufschluss darüber geben, ob ein carboxyterminales MtfA-Fragment in der Lage ist mit dem Repressor Mlc zu interagieren.

### 3.1.2.1 Klonierung des carboxyterminalen MtfA $\Delta$ 1-131 in den Expressionsvektor pTM30

Für die Klonierung des carboxyterminalen MtfA-Fragmentes wurde ausgehend vom MtfA-Expressionsvektor pTMByeeI mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese eine zusätzliche *Pst*I Schnittstelle eingefügt. Hierdurch wurden die AS 1-131 deletiert. Der so entstandene Vektor mit dem MtfA $\Delta$ 1-131 trägt das *mfrg* Gen.



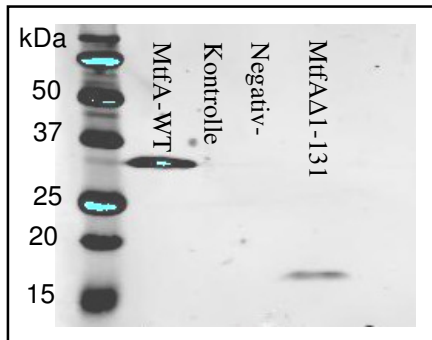
**Abb.3.1.7 Klonierungsstrategie des Vektors pTBY57**

Für die Klonierung des carboxyterminalen MtfA-Fragmentes wurde ausgehend von dem Vektor pTMByeeI eine ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer YeeI<sub>fragment+</sub> und YeeI<sub>frg-PstI-</sub> durchgeführt. Hierdurch wurden insgesamt drei Nukleotide ausgetauscht (T397C, G400C, T402G), so dass innerhalb des *mtfA* Gens auf dem Vektor pTMByeeI eine weitere *Pst*I (pTBY56) Schnittstelle entstand. Anschließend wurde das Plasmid einer *Pst*I Restriktion unterzogen. Hierdurch wurde der 5'-Bereich des *mtfA* Gens ausgeschnitten und über ein präparatives Agarosegel von dem Restvektor getrennt. Der verbleibende Vektor wurde ligiert und zunächst in den *E.coli* Stamm JM109 transformiert. Hierdurch entstand der Vektor pTBY57. Das zugehörige Genprodukt des *mfrg* Gens wird im Folgenden als MtfA $\Delta$ 1-131 (MtfA57) bezeichnet. Nach erfolgter Plasmidisolierung und Kontrollrestriktion (*Pst*I, *Hind*III) wurde das für die carboxyterminale (419bp) Region kodierende *mfrg*-Gen mittels Sequenzanalyse auf mögliche Abweichungen zur Ursprungssequenz überprüft. Die Sequenzierung ergab keinerlei Sequenzabweichungen zur Wildtypsequenz.

Das carboxyterminale MtfA-Fragment besteht aus 434 Basenpaaren und 140AS, beginnend an der Position 132 der ursprünglichen Aminosäuresequenz. Aufgrund der Klonierung und der Einführung der *Pst*I-Erkennungsstelle wurde die ursprüngliche Proteinsequenz an zwei Positionen verändert. Die Aminosäure W132 wurde gegen das Startcodon ATG und damit gegen ein Methionin ersetzt. Des weiteren wurde die Aminosäure Asparaginsäure 134 gegen ein Glutamin ersetzt. Wie in Kapitel 3.1.1.6 beschrieben, zeigte die W132Y Mutation eine Verringerung der Mlc Wechselwirkung auf 65%. Diese Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit zeitlich erst nach der Klonierung des MtfA $\Delta$ 1-131 erzielt, so dass diese hierbei keine Berücksichtigung fanden. Da es sich bei der W132Y Mutation nicht um eine Nullmutanten handelt, die keinerlei Wechselwirkung mit Mlc zeigen würde, waren die im Folgenden gezeigten Versuche dennoch als sinnvoll zu erachten.

### 3.1.2.2 Wechselwirkung zwischen Mlc und dem carboxyterminalen MtfA $\Delta$ 1-131

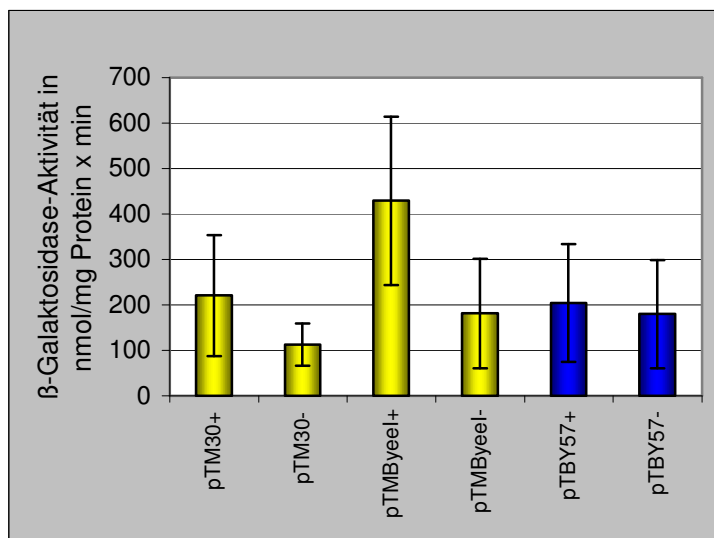
Nach erfolgter Klonierung wurde zunächst ein Western-Blot zum Nachweis des MtfA $\Delta$ 1-131 durchgeführt. Die Größe des Proteins wurde mit Hilfe des Programms „Clone Manager Version 8.01“ vorhergesagt und beträgt 16323 Dalton (Da).



**Abb.3.1.8 Western-Blot Analyse von MtfA $\Delta$ 1-131**

Hierzu wurden die Plasmide (pTMByeel (MtfA-WT), pTM30 (Leervektor) und pTBY57) in den *E.coli* Stamm JM109 transformiert und anschließend wie bereits in Abb. 3.1.4 beschrieben angezogen und detektiert.

Die Western-Blot Analyse ergab den Nachweis des MtfA $\Delta$ 1-131 Proteins, jedoch in einer deutlich geringeren Menge als das WT-MtfA. Zur Charakterisierung der Wechselwirkung mit Mlc wurde das Plasmid pTBY57 in den Teststamm LZ150/F $\Delta$ :: $\emptyset$ (*ptsG*<sub>op</sub>-*lacZ*) transformiert, angezogen und  $\beta$ -Galaktosidase Tests durchgeführt. Das Ergebnis der  $\beta$ -Galaktosidase Tests in Abbildung 3.1.9 zeigte, dass die Ergebnisse der Vektoren pTBY57 mit dem uninduzierten Aktivitätsniveau der Positivkontrolle vergleichbar waren. Daher ist aufgrund dieser Daten davon auszugehen, dass das MtfA $\Delta$ 1-131 nicht in der Lage ist, Mlc von der *ptsG* Promotorregion weg zu titrieren. Ob es dennoch in der Lage ist Mlc zu binden konnte anhand dieser Ergebnisse nicht nachgewiesen werden. Aufgrund dieses recht deutlichen Ergebnisses wurde dieser Test nur zweimal wiederholt, wodurch die relativ großen Standardabweichungen zu erklären sind.



**Abb.3.1.9 Ergebnisse des  $\beta$ -Galaktosidase Tests.**

Die gezeigten Vektoren wurden in den Teststamm LZ150/F $\Delta$ :: $\emptyset$ (*ptsG*<sub>op</sub>-*lacZ*) transformiert und wie in 3.1.1.6 angegeben angezogen und analysiert.

Ausgehend von diesen Ergebnissen, wurden mit dem MtfA $\Delta$ 1-131 zwei weiterführende Experimente durchgeführt. Zum einen wurde mittels unspezifischer Mutagenese (Kapitel 3.1.2.3) versucht, Suppressormutationen zu identifizieren. Zum anderen wurde versucht, das Fragment mit Hilfe der ersten beiden Transmembranregionen des EIIC<sup>Glc</sup> (TMI,II) an die Plasmamembran zu koppeln, um auf diese Weise Mlc, ähnlich der EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne des Glukosetransporters, in der Membran zu verankern und so gegebenenfalls eine Titration zu erzielen (Kapitel 3.1.2.4).

### 3.1.2.3 Unspezifische Mutagenese des Proteins MtfA $\Delta$ 1-131

Es wurde versucht, mit Hilfe des Stammes XL1-Red, Suppressormutationen im *mfrg* Gen zu isolieren, die eine verbesserte Wechselwirkung mit Mlc aufweisen sollten. Es wurden jedoch keine erhalten, so dass auf das detaillierte Verfahren hier nicht näher eingegangen wird.

### 3.1.2.4 Kopplung des Proteins MtfA $\Delta$ 1-131 an die Plasmamembran

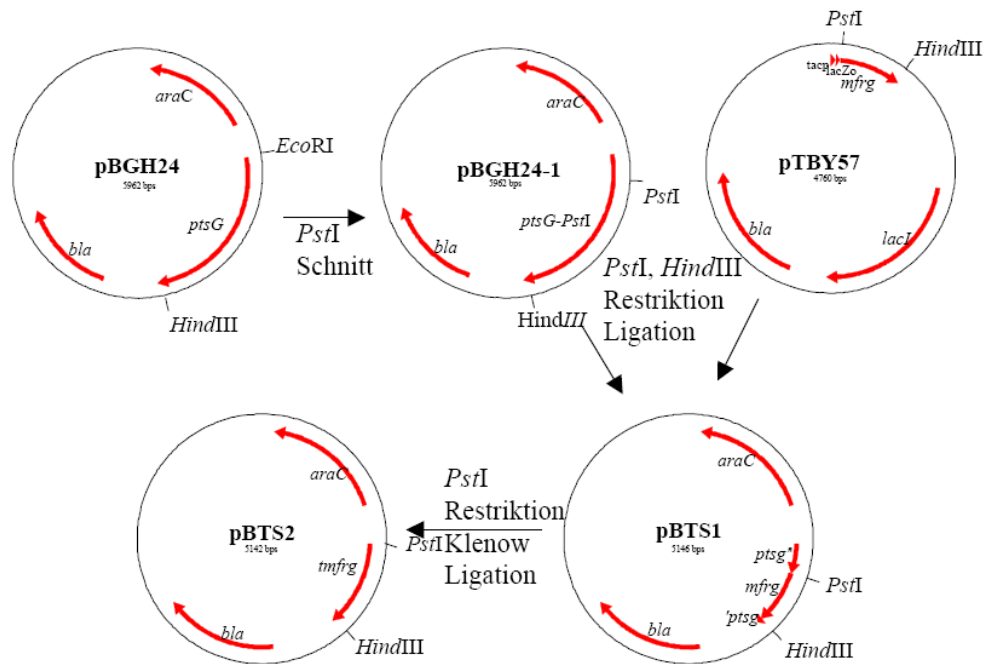
Die Struktur von MtfA zeigt keinerlei Hinweise darauf, dass das Protein hydrophobe Bereiche besitzt, die für ein integrales Membranprotein oder für ein membranassoziiertes Protein notwendig wären (11). Ebenso konnte bereits in der vorangegangenen Dissertation gezeigt werden, dass MtfA aller Wahrscheinlichkeit nach cytoplasmatisch in der Zelle vorliegt (10). Über die cytoplasmatische EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne des Glukose Transporters ist bekannt, dass diese in unphosphorylierter, cytoplasmatischer Form in der Lage ist, den Repressor Mlc zu binden. Allerdings ist für die Titration des Repressors die Membranassoziation der EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne notwendig (65, 90). Aus dieser Tatsache ergab sich die Hypothese, dass MtfA $\Delta$ 1-131 ggf. in der Lage ist, Mlc zu binden, es aber nicht titrieren kann. Aufgrund dessen wird im Folgenden beschrieben, wie das Protein MtfA $\Delta$ 1-131 mit Hilfe der ersten zwei Transmembranhelices von PtsG an die Plasmamembran assoziiert wurde.

#### 3.1.2.4.1 Klonierung der entsprechenden Vektoren

Das MtfA $\Delta$ 1-131 Protein wurde mit den für die ersten zwei Transmembranhelices (TMI,II) des für EIICB<sup>Glc</sup> kodierenden *ptsG*-Gens fusioniert. Der so entstandene Vektor wurde **pBTS2** ge-



nannt und trägt das Gen *tmfrg*. Hierfür wurde abweichend von den bisherigen Versuchen das pBAD24 Expressionssystem verwendet, bei dem eine Überexpression der jeweiligen Gene mit Hilfe von Arabinose erreicht werden kann. Im Vergleich zum pTM30 Expressionssystem vermittelt dieses System ein geringeres Expressionsniveau. Dieses war notwendig, da die Zellen bei der hohen Expression eines Membranproteins (hier: PtsG) sehr schlecht wachsen würden.



**Abb.3.1.10 zeigt die Klonierung des Vektors pBTS2**

Ausgehend von dem Plasmid pBGH24, wurde der für die ersten zwei Transmembranhelices kodierenden Genabschnitt des *ptsG*-Gens (Basenpaar 1-213) mit dem Gen *mfrg* fusioniert. Hierzu wurde zunächst in den Vektor pBGH24 mittels ortsgerichteter Mutagenese mit Hilfe der Primer *ptsG*-*PstI*+ und *ptsG*-*PstI*- eine *PstI* Schnittstelle nach Basenpaar 223 des *ptsG*-Gens eingefügt. Anschließend wurde der so entstandene Vektor pBGH24-1, sowie der Vektor pTBY57 mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *HindIII* geschnitten. Beide Restriktionsansätze wurden anschließend über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt. Die Vektorbande des pBGH24-1 (4733Bp) wurde somit von der Insertbande (1229Bp) getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Ebenso wurde das Gen *mfrg* (413Bp) von dem Vektorrückgrad (4347Bp) getrennt und ebenfalls gereinigt. Durch die anschließende Ligation wurde der Vektor pBGH24-1 mit dem 413Bp Fragment aus dem Vektor pTBY57 ligiert. Der so entstandene neue Fusionsgenvektor wurde pBTS1 genannt. Bei einer anschließenden Sequenzierung wurde festgestellt, dass bei der Klonierung eine Base zu viel an der Fusionsstelle vorlag, so dass daraus eine Leserasterverschiebung im Fusionsprotein resultierte. Daher wurde der Vektor pBTS1 erneut mit dem Restriktionsenzym *PstI* geöffnet und anschließend einer Klenow-Behandlung unterzogen. Durch diese 3'-5' Exonukleasebehandlung wurden insgesamt vier Basenpaare entfernt, wodurch ein für eine Aminosäure kodierendes Triplet, sowie die überschüssige Base entfernt wurde. Durch anschließende Religation entstand der Vektor pBTS2. Die erneute Sequenzierung des Vektors ergab, dass keine weiteren Sequenzfehler vorlagen.

Des Weiteren war für die folgenden Versuche die Klonierung verschiedener Kontrollvektoren notwendig. So wurde beispielsweise das vollständige *mtfA* Gen in den pBAD24 Vektor kloniert (pBSM1). Weiterhin wurde mit Hilfe von TMI,II-GFP Fusionen getestet, ob durch diese Fusion eine Membranlokalisierung gewährleistet werden konnte. Alle relevanten Gene auf den verwend-

ten Vektoren wurden sequenziert. Hierdurch konnte in allen Fällen ausgeschlossen werden, dass im Rahmen der Klonierung unerwünschte Sequenzfehler aufgetreten sind. Eine Übersicht über alle für diese Experimente hergestellten Vektoren gibt die folgende Tabelle 3.1.2.

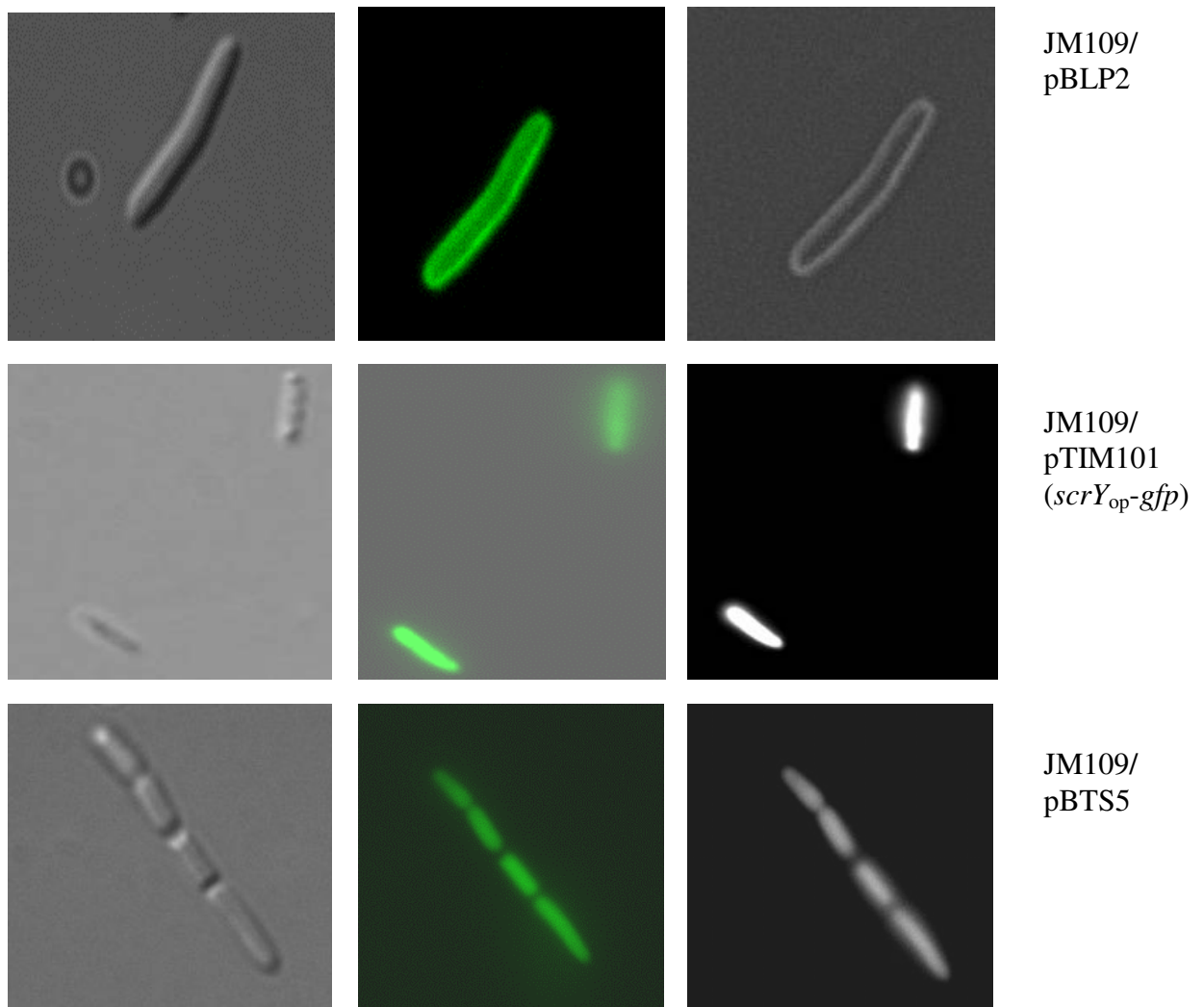
**Tab.3.1.2 Zusammenstellung der verwendeten Plasmide**

Vektorbezeichnung	Ausgangsvektor	Gen	Referenz
nBGH24	nBAD24	<i>ntsG</i>	(95)
pBGH24-1	pBAD24	<i>ptsG</i> mit PstI Schnitt nach TM II	diese Arbeit
pBLP2	pBAD24	<i>ptsG-gfp</i>	(95)
pBLP3	pBAD24	<i>ptsG-gfp-XbaI</i>	diese Arbeit
pBSM1	pBAD24	<i>mtfA</i>	diese Arbeit
pBTS1	pBAD24	<i>tmfrg</i>	diese Arbeit
pBTS2	pBAD24	<i>tmfrg</i>	diese Arbeit
pBTS3	pBAD24	<i>ptsGΔ223-1498</i>	diese Arbeit
pBTS4	pBAD24	<i>tmfrg</i> mit PstI Schnitt	diese Arbeit
pBTS5	pBAD24	<i>ptsGΔ223-1498-gfp</i>	diese Arbeit
pTIM101Ø( <i>scrY<sub>po</sub>-gfp</i> )	pTM30	<i>gfp</i>	(95)
pTMF1	pTM30	<i>tmfrg</i>	diese Arbeit

### 3.1.2.5 Nachweis des membranständigen GFPs mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um die Lokalisation des membranständigen GFPs nach Fusion mit den ersten beiden Transmembranhelices von PtsG zu überprüfen, wurde das Plasmid pBTS5, sowie die Kontrollplasmide pBLP2 und pTIM101Ø(*scrY<sub>po</sub>-gfp*) in den *E.coli* Stamm JM109 transformiert. Das Plasmid pTIM101Ø(*scrY<sub>po</sub>-gfp*) exprimiert ein cytoplasmatisches GFP. Ausgehend von Übernachtskulturen in Vollmedium wurden die verschiedenen Ansätze zu einer OD<sub>650</sub>=0.05 angeimpft und nach 40 Minuten wurden die Stämme mit den Plasmiden pBTS5 und pBLP2 mit 0,2mM Arabinose induziert. Der Vektor pTIM101Ø(*scrY<sub>po</sub>-gfp*) wurde nicht induziert. Nach weiterem Wachstum von drei Stunden wurden ca. 2µl Zellen auf einen Objektträger gegeben und mit Hilfe des FITC Filters des Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss) analysiert.

Die Abbildung 3.1.11 zeigt, dass das Genprodukt PtsG-GFP ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert ist. Im Falle der Kontrolle des cytoplasmatischen GFPs konnte das GFP gleichmäßig in der ganzen Zelle verteilt nachgewiesen werden. In Bezug auf die TMI,II-GFP Fusion konnten die GFP Signale ebenfalls in der gesamten Zellen verteilt nachgewiesen werden. Daher konnte ausgehend von diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass ein mit TMI,II fusioniertes GFP nicht an die Plasmamembran gekoppelt werden konnte. Eine mögliche Begründung hierfür wäre die Abspaltung des GFPs aufgrund seiner Größe während der Proteinexpression.



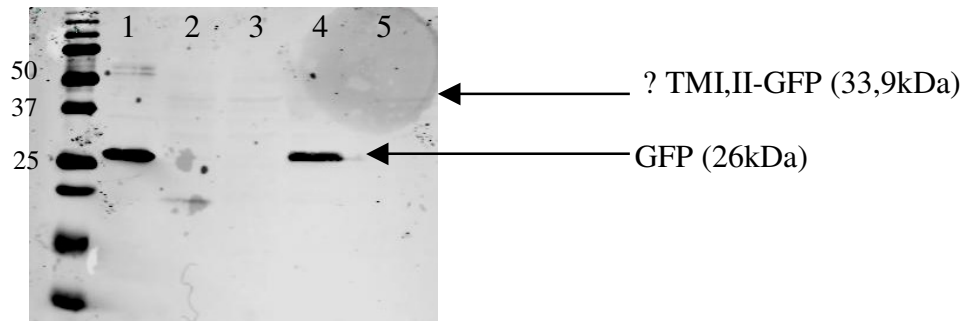
**Abb.3.1.11 zeigt die Analyse der verschiedenen GFP-Fusionen mittels Fluoreszenzmikroskopie.**

Das linke Bild gibt jeweils die Hellfeldaufnahme, das mittlere und rechte Bild jeweils die Fluoreszenzaufnahme wieder. Die oberen drei Bilder beziehen sich auf das Plasmid pBLP2. Die mittleren Bilder zeigen die Expression des GFPs ausgehend von dem Kontrollplasmid pTIM101Ø(*scrY<sub>po</sub>-gfp*), welches für ein cytoplasmatisches GFP kodiert. Die unteren Bilder zeigen die Aufnahmen der TMI,II-GFP Fusionen ausgehend vom Vektor pBTS5.

Alternativ hierzu wäre denkbar, dass zwei Transmembranhelices nicht zur Verankerung des Proteins in der Membran ausreichen. Jedoch konnte von Lee et al. (47) gezeigt werden, dass PtsG TMI,II und IX sowie die daran anschließende vollständige EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne in der Lage ist Mlc zu titrieren und somit eine 75%ige Induktion von *ptsG* zu erzielen (47).

Zur Überprüfung, ob das GFP von den ersten beiden Transmembranhelices abgespalten wurde, wurde ausgehend von den oben verwendeten Zellen eine Western-Blot Analyse durchgeführt. Wie in Abbildung 3.1.12 zu sehen ist, konnte das cytoplasmatische GFP mit einem berechneten Molekulargewicht von 26,8kDa aus dem Vektor pTIM101Ø(*scrY<sub>op</sub>-gfp*) nachgewiesen werden. Das PtsG-GFP Genprodukt hat ein berechnetes Molekulargewicht von 79,5kDa, konnte aber vermutlich aufgrund seiner Membranständigkeit nicht nachgewiesen werden. Da die Zellen auf-

grund der Überexpression des Membranproteins nicht gut gewachsen sind, lag die Menge an nachweisbarem Protein wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze. Weiterhin wurde das Standard Western-Blot Protokoll verwendet und kein spezielles Protokoll zum Nachweis von Membranproteinen.



#### Abb.3.1.12 Western-Blot Analyse der GFP-Proben

Hierzu wurden 1ml Zellen aus den oben verwendeten Kulturen abzentrifugiert, auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen und einem Western-Blot unterzogen. Hierbei wurden die Banden mit Hilfe des GFP-Antikörpers aus Maus detektiert und mit Hilfe des Odysseyscanners der Firma LI-COR sichtbar gemacht. Der Standard ist in kDa angegeben.

Nr.1 zeigt das GFP Genprodukt ausgehend von dem Vektor pTIM101Ø(*scrY<sub>op</sub>-gfp*)

Nr.2 und 3 zeigen jeweils das induzierte und nicht induzierte Genprodukt des Vektors pBLP2, die

Proben 4 und 5 zeigen das jeweils induzierte und uninduzierte Genprodukt des Vektors pBTS5.

Im Fall der TMI,II-GFP Fusion konnte eine Bande bei ca. 26kDa nachgewiesen werden. Diese korreliert mit der Größe des GFPs alleine. Das Fusionsprotein sollte eine Größe von 33,9kDa aufweisen. Bei der uninduzierten Probe Nr.5 ist in dieser Größenordnung eine schwache Bande erkennbar, bei der es sich um das Fusionsprotein handeln könnte. Da diese Bande jedoch auch in der Probe Nr.3 nachweisbar ist, ist dieses eher unwahrscheinlich. Daher handelt es sich hierbei wahrscheinlich um eine unspezifische Nebenbande. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass das GFP wirklich von den zwei Transmembranhelices abgespalten wurde und somit cytoplasmatisch in der Zelle vorlag.

#### 3.1.2.6 Analyse des TMI,II-MtfAΔ1-131

Aufgrund der in 3.1.2.5 gezeigten Experimente konnte nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob das carboxyterminale MtfAΔ1-131 nach der Genfusion mit den TMI,II des EIIC<sup>Glc</sup> wirklich an die Plasmamembran gekoppelt vorlag. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass das GFP aufgrund seiner Größe von den TMI,II abgespalten wurde. Da es sich bei dem MtfAΔ1-131 Protein um ein wesentlich kleineres Protein handelt, wurden die folgenden Versuche durchgeführt. Hierbei wurde der Effekt der Membranfusion auf die Mlc Interaktion getestet.

Zum Nachweis, ob das an die Plasmamembran gekoppelte MtfA $\Delta$ 1-131 in der Lage ist, Mlc zu titrieren, wurden wiederum im Stammhintergrund LZ150/F $\prime$ :: $\emptyset$ (*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*) mit dem Vektor pBTS2  $\beta$ -Galaktosidase Tests durchgeführt. Da die zu untersuchenden Vektoren bisher nicht in diesem Testsystem verwendet wurden, mussten zunächst einige Optimierungsversuche mit Hilfe des Vektors pBSM1 gemacht werden. Vorversuche ergaben, dass durch die Induktion mit Arabinose (0,2%) bereits eine Sättigung der Expression erreicht war. Diese ist jedoch mit einer wesentlich geringeren Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase im Vergleich zu der pTM30 Vektor basierten Expression mit IPTG einhergehend. Aufgrund dessen wurde durch die Zugabe von 5mM cAMP versucht, die durch die Arabinose verursachte Katabolitenrepression aufzuheben. Es zeigte sich, dass hierdurch tatsächlich eine Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität erreicht werden konnte. Somit konnten im Rahmen der Optimierungsversuche die Induktion mit 0,8% Arabinose und gleichzeitiger Gabe von 5mM cAMP als optimale Induktionsbedingung ermittelt werden. Die nicht induzierte Probe wurde zur besseren Vergleichbarkeit auch mit 5mM cAMP versetzt. Mit Hilfe dieser optimierten Bedingungen wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase Test mit den Plasmiden pBSM1, pBTS3 und pBTS2 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1.13 ausgehend von zwei unabhängigen Tests zusammengefasst.

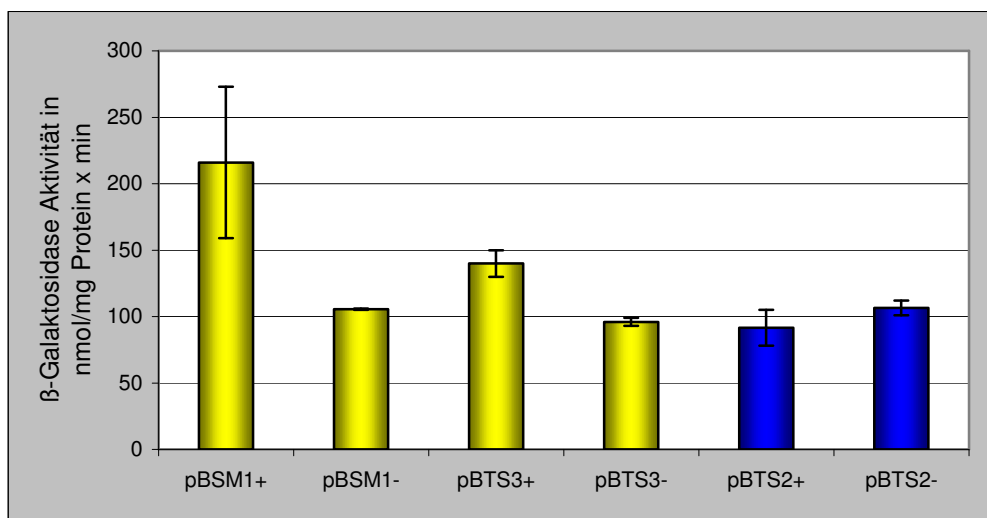


Abb.3.1.13 zeigt die Ergebnisse des  $\beta$ -Galaktosidase Tests des *tmfrg* Gens im Teststamm LZ150/F $\prime$ ::(*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*) unter den oben erläuterten Bedingungen

Die Kontrolle pBSM1 zeigte eine deutliche Titration des Proteins Mlc, welches anhand des Unterschiedes zwischen der induzierten und nicht induzierten Probe nachweisbar war. Die Kontrolle pBTS3, welche nur die beiden ersten Transmembranhelices des *ptsG*-Gens trägt zeigte, wenn auch einen geringen Unterschied zwischen der induzierten und der nicht induzierten Probe. Dieses ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass durch die Gabe von Arabinose als sehr gute Kohlenstoffquelle ein verbessertes Zellwachstum ermöglicht wurde. Die in blau gekennzeichneten

Proben des Plasmides pBTS2, welches das *tmfrg* Gen trägt, zeigte keinerlei Titration von Mlc. Hier war darüber hinaus bei der induzierten Probe eine leichte Verringerung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität zu verzeichnen. Da das MtfA-Fragment aufgrund der gezeigten Ergebnisse keinerlei Aktivität zeigte scheint dieses eher „schädlich“ für die Zellen zu sein, zumal es sich nach erfolgreicher Induktion in der Zelle anreichert. Somit könnte dieses eine Erklärung für den Rückgang der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität bei der induzierten Probe sein.

Diese Proben konnten, vermutlich aufgrund der durch das verwendete pBAD24 Expressionssystem und damit im Vergleich zu dem pTM30 System geringeren Proteinmengen, nicht im Western-Blot nachgewiesen werden. Daher konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob das Fragment durch die zwei Transmembranhelices von PtsG an die Membran gekoppelt oder ähnlich wie das GFP abgespalten wurde. Parallel zu dem oben gewählten Ansatz wurde das mit den ersten zwei Transmembranhelices fusionierte MtfA $\Delta$ 1-131 in das pTM30 Expressionssystem kloniert (**pTMF1**). Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass das geringere Expressionsniveau des pBAD24 Systems für die oben gezeigten Ergebnisse verantwortlich war. Die Analyse dieses Konstruktes in Bezug auf die Mlc Interaktion ergab jedoch tendenziell vergleichbare Ergebnisse, wie in Abbildung 3.1.13 gezeigt.

Bei beiden Konstrukten handelte es sich um aminoterminal deletierte MtfA-Derivate. Im Rahmen der physiologischen Charakterisierung von MtfA in Kapitel 3.3.3 konnte eine Dimerisierung des Proteins nachgewiesen werden. Wie im Folgenden beschrieben, wird dieser vermutlich durch eine Reihe konservierter Leuzine im aminoterminalen Bereich von MtfA gebildet. Daher wäre zu vermuten, dass MtfA nur in der dimerisierten Form aktiv mit Mlc wechselwirken kann. Da diese potentielle Dimerisierungsdomäne in beiden hier getesteten Konstrukten deletiert war, wäre eine nicht vorhandene Wechselwirkung zu Mlc logisch. Durch die künstliche Verknüpfung von zwei carboxyterminalen MtfA-Fragmenten mit Hilfe eines Linkers könnte die Notwendigkeit der Dimerisierung für die MtfA-Mlc Interaktion näher untersucht werden.

### 3.1.3 Untersuchungen zur Funktion des aminoterminalen Bereiches von MtfA

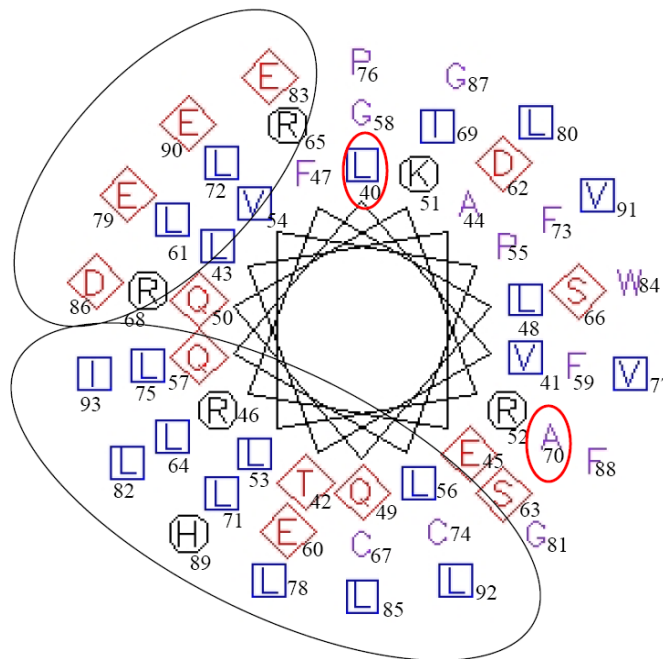
A.-K. Becker konnte im Rahmen ihrer Dissertation ein MtfA-Dimer im SDS-Gel nachweisen (10). Ein weiterer Nachweis erfolgte mit Hilfe von Gelfiltrationsexperimenten im Rahmen der Dissertation von S. Seitz in Konstanz (89).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Aussagen mit Hilfe von nativen Polyacrylamid-Gelen, SDS-Gelen, mit Hilfe des Electrospray-Massenspektrometers (ESI) und ebenfalls mit Gelfiltrati-

onschromatographie-Experimenten bestätigt werden (vgl. Kapitel 3.3.3). A.-K. Becker postuliert bereits, dass eine leuzinreiche Region im aminoterminalen (AS 55-91; Bp165-275) Bereich von MtfA für die Dimerisierung verantwortlich sein könnte. Diese könnte möglicherweise eine Art „Leuzinreißverschluss“ bilden. Das Programm „Clonemanger“ sowie das Programm SOP-MA postulieren für die Region einen  $\alpha$ -helikalen Bereich. Das „Helix-Wheel“-Modell der leuzinreichen Region von MtfA, die für diese Analyse bis zur Aminosäure 40 ausgeweitet wurde (AS40-91), postuliert ebenfalls eine  $\alpha$ -Helix, bei der auf der unteren Seite eine Häufung von exponierten Leuzinen zu sehen ist. Dieses unterstützt die Hypothese eines solchen Leuzinreißverschlusses, da eine Voraussetzung hierzu ebenfalls die exponierte Stellung der Leuzine ist.

KLVTLAERFLQKRLVPLQGFELDSLRSRALLFCLPVLELGLEWLDGPFHEVLI

40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90



**Abb.3.1.14 „Helix-Wheel“ Modell der leuzinreichen MtfA-Region.**

Zum direkten Vergleich ist die MtfA-Primärstruktur von AS39-93 gezeigt. Die entsprechenden Reste sind im Helix-Modell an Anlehnung an die Nummerierung im Aminosäuresequenzvergleich (vgl. Kapitel 3.1.1.1) nummeriert. Aliphatische Reste sind mit blauen Quadraten und positiv geladene AS mit roten Rauten gekennzeichnet. Die exponierten Leuzine, sowie eine ebenfalls exponierte Stellung von geladenen AS sind durch einen Kreis markiert. Die in rot markierten AS wurde im Rahmen der im Folgenden beschriebenen Mutagenesen gegen die geladenen AS (E bzw. D) ausgetauscht und zeigten dann eine stark eingeschränkte Wechselwirkung zu Mlc.

Die Annahme, dass diese aminoterminalen Region für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich sein könnte, wurde im Folgenden mit Hilfe des Hefe- und des bakteriellen Di-Hybrid Systems näher untersucht. Darüber hinaus ist auf der linken Seite eine exponierte Stellung von vier geladenen AS zu sehen. Dieses könnte ebenfalls auf eine Wechselwirkungsregion beispielsweise mit anderen Proteinen hindeuten.

### 3.1.3.1 Untersuchung der Dimerisierung mit Hilfe des Hefe Di-Hybrid Systems

Mit Hilfe des Hefe Di-Hybrid Systems können Wechselwirkungen zwischen einzelnen Proteinen untersucht werden. Dieses System basiert auf der Aktivierung eines Reportergenes durch den Transkriptionsfaktor Gal4. Die funktionellen Domänen von Gal4 (DNA-Bindedomäne (BD) und Aktivierungsdomäne (AD)) wurden hierzu mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert. Anhand der Expression der verwendeten Reportergene (*lacZ*, *his*, *ade*) kann die Wechselwirkung der Proteine untersucht und quantifiziert werden. Um das Dimerisierungsverhalten von MtfA zu untersuchen, wurden Fusionsproteine der beiden Domänen mit dem vollständigen MtfA und einem 255 Basenpaar großen aminoterminalen Fragment hergestellt. Mit Hilfe von Plattentests zur Analyse der Expression der Reportergene sowie mit einem quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase Test wurde die Wechselwirkung dieser Konstrukte getestet.

#### 3.1.3.1.1 Konstruktion der verwendeten Vektoren

Für die Konstruktion der in Tabelle 3.1.3 aufgeführten Vektoren wurde zunächst jeweils eine PCR durchgeführt. Als Ausgangs-DNA für die PCR wurde das Plasmid pTMByeeI verwendet. Die PCR-Produkte wurden gereinigt und anschließend mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Eco*RI geschnitten. Nach erfolgter Hitzeinaktivierung wurden diese mit den ebenfalls *Pst*I, *Eco*RI geschnittenen Vektoren pGAD424A, bzw. pGBD-C2 ligiert. Die dabei entstandenen Plasmide wurden pGAM1 und pGAM2, sowie pGBM1 und pGBM2 genannt.

Die verwendeten Primer sowie die daraus resultierenden MtfA-Fragmente sind in Tabelle 3.1.3 zusammenstellt.

**Tab.3.1.3 Informationen zu der Klonierung der Hefe Di-Hybrid Vektoren**

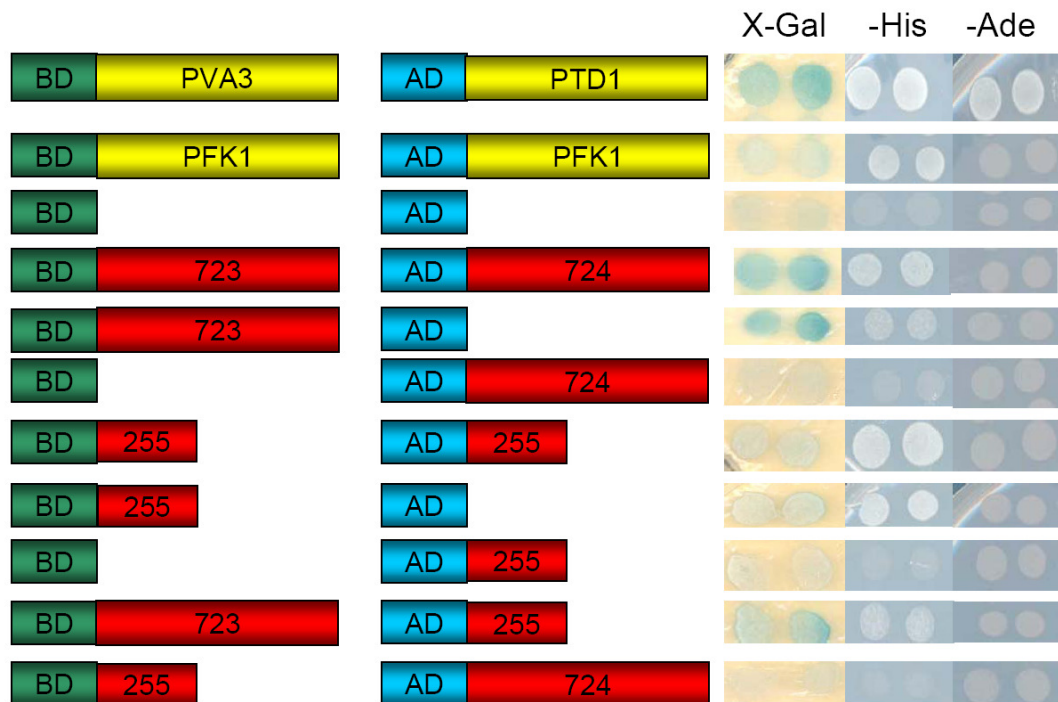
Konstrukt	pGAM1	pGAM2	pGBM1	pGBM2
PCR – Primer	yeest+/ yeest-	yeest+/yeest4	yeest3 /yeest-	yeest3/yeest4
klonierter <i>mtfA</i> Abschnitt	Bp32-287 → 255 Bp	Bp32-756 → 724Bp	Bp32-287 → 255	Bp32-755 →723 Bp

#### 3.1.3.1.2 Analyse der Hefe Di-Hybrid Konstrukte

Die klonierten Konstrukte wurden in den *E.coli* Stamm JM109 transformiert und per Restriktion überprüft. Anschließend wurden die Konstrukte mit den entsprechenden Kontrollen in verschie-



denen Kombinationen in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm PJ69-4 $\alpha$  transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden danach mit Hilfe der Plattentests auf die Expression der verschiedenen Reporter gene überprüft. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung gezeigt.



**Abb.3.1.15 Ergebnisse der Plattentests des Hefe Di-Hybrid Systems.**

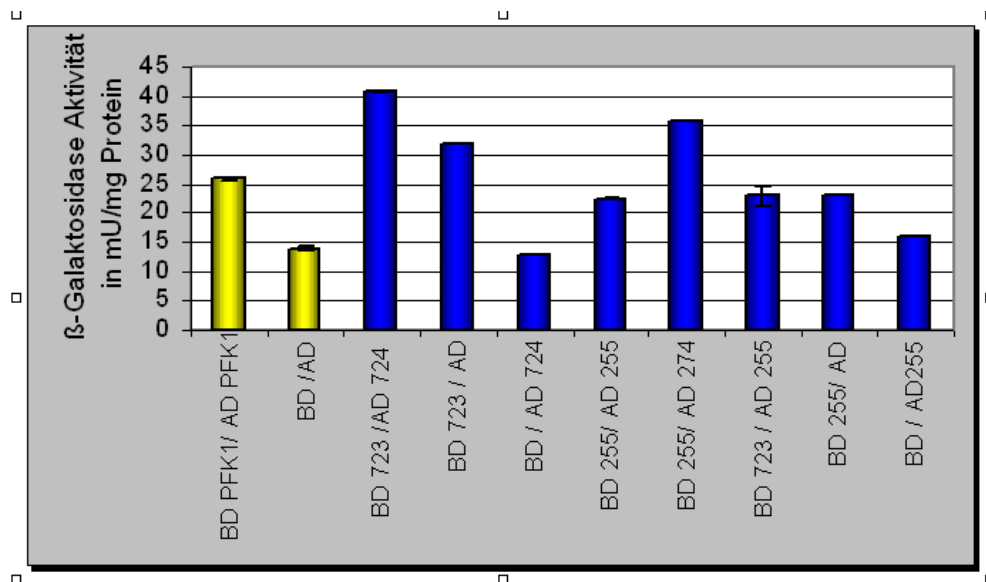
Die Bindedomäne ist jeweils in grün, die Fusionsproteine in rot dargestellt. Die Aktivierungsdomäne ist in blau dargestellt. Als Positivkontrolle dienen die Proteine PVA3 und PTD1 sowie der Nachweis der Dimerisierung der PFK1 Proteine. Als Negativkontrollen wurden die beiden Leervektoren verwendet. Die Verwendung der Selektionsplatten sowie die Durchführung dieser Tests sind im Material- und Methodenteil Kapitel 2.6.8 beschrieben.

Die Positivkontrolle (Proteine PVA3 und PTD1) zeigte auf allen drei Selektionsplatten eine Proteininteraktion an, was durch eine Blaufärbung auf den X-Gal Platten und Wachstum auf Medien ohne Histidin bzw. Adenin nachgewiesen werden konnte. Bei der zweiten Positivkontrolle, die generell eine schwächere Interaktion bei der Dimerisierungsreaktion der PFK1 Proteine zeigte, ist bereits eine schwächere Blaufärbung auf den X-Gal Platten und kein Wachstum auf den Medien ohne Adenin zu verzeichnen. Die drei Reportergene signalisieren in der angegebenen Reihenfolge (LacZ, His, Ade) gleichzeitig die Stärke der Proteinwechselwirkung. Dieses konnte durch die zwei verschiedenen Positivkontrollen bestätigt werden. Die Negativkontrolle bestehend aus den beiden Leervektoren zeigte, wie erwartet, keine Blaufärbung und auch kein Wachstum auf den zwei Wachstumsindikatorplatten. Die Proben mit beiden „langen“ MtfA-Konstrukten pGAM2 und pGBM2, zeigten eine Blaufärbung sowie Wachstum auf den Platten ohne Histidin. Dieses deutete auf eine Wechselwirkung hin, die hiernach etwas stärker als die Wechselwirkung der PFK1 Proteine zu sein scheint. Somit könnte dieses Ergebnis auf einen Nachweis der Dimerisierung von MtfA hinweisen. Als weitere Kontrolle wurde das MtfA-723

(pGBM2) Konstrukt mit der fusionieren Bindedomäne mit dem pGAD424A Leervektor kotransformiert. Diese Probe zeigte ein ähnliches Ergebnis, wie die oben beschriebene Probe mit beiden „langen“ MtfA-Konstrukten. Hier konnte ebenfalls eine deutliche Blaufärbung auf den X-Gal Platten, wenn auch kein Wachstum auf den Platten ohne Histidin nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte darauf geschlossen werden, dass das mit der Bindedomäne fusionierte MtfA alleine eine, wenngleich auch geringere, Aktivierung der Reportergene auslöst. Des Weiteren wurde die potentielle Dimerisierungsdomäne des MtfAs im Expressionstest analysiert. Hierzu wurden die Konstrukte pGAM1 und pGBM1 in den Teststamm kotransformiert und auf den entsprechenden Platten analysiert. Hierbei konnte eine geringe Blaufärbung und Wachstum auf Platten ohne Histidin beobachtet werden. Auch dieses Ergebnis könnte auf eine geringe Wechselwirkung dieser aminoterminalen MtfA-Fragmente hinweisen. Da aber auch hier die entsprechende Kontrolle (pGBM1 mit pGAD424A) Wachstum auf Histidin-Indikatorplatten zeigte, scheinen diese Ergebnisse nicht wirklich aussagenkräftig zu sein. Die Kontrollen in der anderen Kombination (pGBD-C2 und pGAM1) zeigten keine nachweisbare Wechselwirkung. Die Kombination aus einem Volllängen-MtfA-Konstrukt und einem MtfA-Fragment zeigte ebenfalls nur dann eine Blaufärbung sowie Wachstum auf Medium ohne Histidin, wenn die Bindedomäne mit dem Volllängenkonstrukt des MtfA-Proteins (pGBM2 und pGAM1) fusioniert war. Da diese Fusion alleine auch eine Blaufärbung zeigte, konnten anhand dieser Ergebnisse keine Aussagen über die Wechselwirkung dieser Konstrukte gemacht werden.

Alle oben gezeigten Ergebnisse ließen sich in zwei unabhängigen weiteren Tests bestätigen. Generell lässt sich sagen, dass mit Hilfe der durchgeführten Versuche mit dem Hefe Di-Hybrid System keine eindeutigen Aussagen über die Dimerisierung von MtfA gemacht werden konnten. Die Ergebnisse deuten zwar auf eine Wechselwirkung, sowohl des Volllängenkonstruktes, als auch des aminoterminalen Fragmentes hin, da jedoch die Kontrollen ebenfalls eine Aktivierung der Reportergene zeigten, kann diesen Ergebnissen keine hohe Aussagekraft zugesprochen werden. Auch ein quantitativer  $\beta$ -Galaktosidase Test konnte keine weitere Klärung dieser Problematik bewirken.

Auch der quantitative  $\beta$ -Galaktosidase Test zeigte die gleichen Ergebnisse wie der oben beschriebene Plattentest. Der Wert der Positivkontrolle betrug 250mU/mg Protein und war somit deutlich höher als alle anderen Proben. Die Negativkontrolle zeigte die geringste  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität. Alle anderen Proben zeigten eine höhere Aktivität, wodurch die Ergebnisse der Plattentests bestätigt wurden.



**Abb.3.1.16 quantitativer β-Galaktosidase Test mit den Rohextrakten der oben getesteten Proben.**

Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Positivkontrolle (BD-PTD1 und AD-PVA3) ist aus Darstellungsgründen weggelassen worden. Ihre Aktivität betrug 250mU/mg Protein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das Hefe Di-Hybrid System nicht für die Dimerisierungsstudien von MtfA eignete, da die verschiedenen Kontrollen keine eindeutigen Ergebnisse zeigten und die eigentlichen Proben so nicht eindeutig ausgewertet werden konnten. Daher wurde alternativ hierzu, wie im Folgenden beschrieben, ein bakterielles Di-Hybrid System verwendet.

### 3.1.3.2 Analyse der MtfA-Dimerisierung mit Hilfe des bakteriellen LexA Di-Hybrid Systems

Das bakterielle Di-Hybrid System basiert auf dem bakteriellen LexA Repressor. Dieser besitzt in diesem System zwei Bindestellen im Bereich des Operators eines *lacZ*-Reportergens. Nur nach erfolgter Dimerisierung des LexA-Repressors erfolgt eine Repression des Reportergens. Die auf eine Wechselwirkung oder wie in diesem Fall auf eine Dimerisierung zu untersuchenden Proteine werden an „Helix-Turn-Helix“-Motive des LexA Repressors fusioniert und nur bei einer erfolgten Wechselwirkung kann die Repression des Reportergens *lacZ* anhand von quantitativen β-Galaktosidase Tests ermittelt und quantifiziert werden. Zur Untersuchung der Dimerisierung von MtfA wurden im Rahmen der Versuche mit dem bakteriellen Di-Hybrid System MtfA-Volllängenkonstrukte und ähnlich, wie im Hefe Di-Hybrid System, aminoterminal MtfA-Fragmente hergestellt. Bei den im bakteriellen System verwendeten Vektoren handelt es sich zum einen um pMS604, ein auf einem ColE1 Replikationsursprung basierenden Vektor, der

in ca. 50 Kopien in der Zelle vorliegt. Zum anderen handelt es sich um den Vektor pDL804. Dieser Vektor basiert auf einem pACYC Replikationsursprung und liegt demnach in ca. 15 Kopien in der Zelle vor. Der erstgenannte Vektor trägt eine Tetrazyklinresistenz, der pDL804 Vektor eine Ampicillinresistenz. Somit können beide Vektoren gemeinsam, aufgrund ihrer kompatiblen Replikationsursprünge stabil in einer Zelle vorkommen. Eine Kotransformation ließ sich aufgrund der unterschiedlich vermittelten Antibiotikaresistenzen nachweisen. Die Vektoren tragen die jeweilige LexA-Domäne fusioniert mit einem „Fos“- (pMS604) bzw. „Junzippermotiv“ (pDL804). Hierbei handelt es sich um eukaryotische Transkriptions-Regulatoren, die einen Leuzinreißverschluss bilden. Daher sind mit den oben beschriebenen Vektoren die Positivkontrollen gegeben. Die verschiedenen im Folgenden beschriebenen MtfA- und Mlc-Konstrukte wurden jeweils gegen diese beiden Motive ausgetauscht.

### 3.1.3.2.1 Konstruktion der Vektoren für das bakterielle Di-Hybrid System

Im Rahmen der bakteriellen Di-Hybrid Analyse bezüglich der Dimerisierung von MtfA wurden ähnlich wie im Hefe Di-Hybrid System ein MtfA-Volllängenkonstrukt, sowie ein aminoterminales Fragment kloniert. Die genauen Größen der Klone sind der Tabelle 3.1.4 zu entnehmen. Für die Klonierung wurden ausgehend von dem Plasmid pTMB<sub>yeel</sub> die entsprechenden Genbereiche mittels PCR amplifiziert. Hier durch wurden die entsprechenden Restriktionserkennungsschnittstellen in die PCR-Produkte eingebaut. Anschließend wurden die PCR-Produkte gereinigt und in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T (Promega) kloniert. Ausgehend hiervon wurden die Konstrukte sequenziert und anschließend mittels entsprechender Restriktion (siehe Tabelle 3.1.4) in die Vektoren pMS604 bzw. pDL804 kloniert. Die Sequenzierung der Vektoren ergab keinerlei unerwünschte Nukleotidaustausche.

**Tab.3.1.4 Übersicht der Konstrukte des bakteriellen Di-Hybrid Systems**

Konstrukt	pMM1	pMM2	pDM1	pDM2
Vektor	pMS604	pMS604	pDL804	pDL804
Restriktionsschnittstellen	<i>BstEII</i> , <i>XhoI</i>	<i>BstEII</i> , <i>XhoI</i>	<i>XhoI</i> , <i>BglIII</i>	<i>XhoI</i> , <i>BglIII</i>
Primer	BTH7/ BTH5	BTH7/ BTH8	BTH1/ BTH9	BTH1/BTH3
klonierter <i>mtfA</i> Bereich	Bp 12-283 → 271	Bp 12-817 → 805	Bp 5-268 → 263	Bp 5-770 → 765

Aus Übersichtsgründen werden hier alle im Folgenden verwendeten Klone schematisch dargestellt:

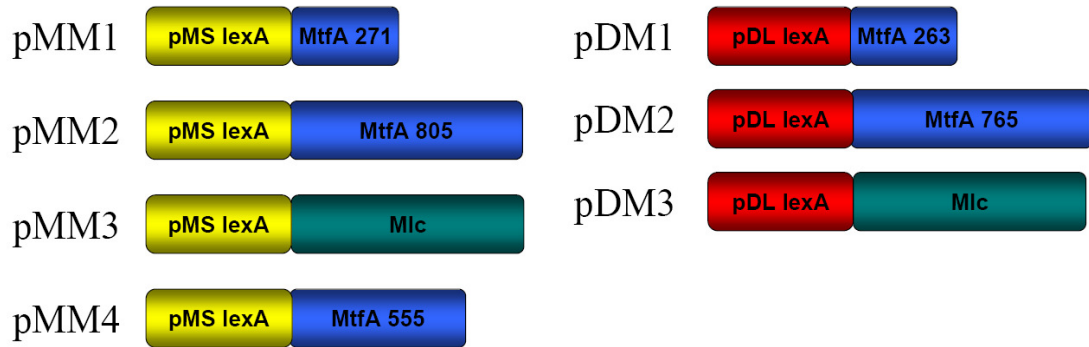


Abb.3.1.17 Darstellung der verwendeten bakteriellen Di-Hybrid Klone

### 3.1.3.2.2 Analyse der MtfA-Dimerisierung mit Hilfe des bakteriellen Di-Hybrid Systems

Nach erfolgreicher Klonierung wurden die Plasmide in verschiedenen Kombinationen in den Teststamm SU202 transformiert und mit Hilfe der entsprechenden Antibiotika selektioniert. Der Teststamm trägt eine chromosomale *lexA<sub>OP</sub>-lacZ* Fusion, mit deren Hilfe die Interaktion der Proteine analysiert werden konnte.

Die entsprechenden Transformanten wurden angezogen und anschließend wurde ausgehend von 1ml Kultur ein quantitativer  $\beta$ -Galaktosidase Test durchgeführt. Dieser wurde dreimal unabhängig voneinander mit verschiedenen Einzelkolonien reproduziert. Die Mittelwerte sind in Abbildung 3.1.18 zusammengefasst.

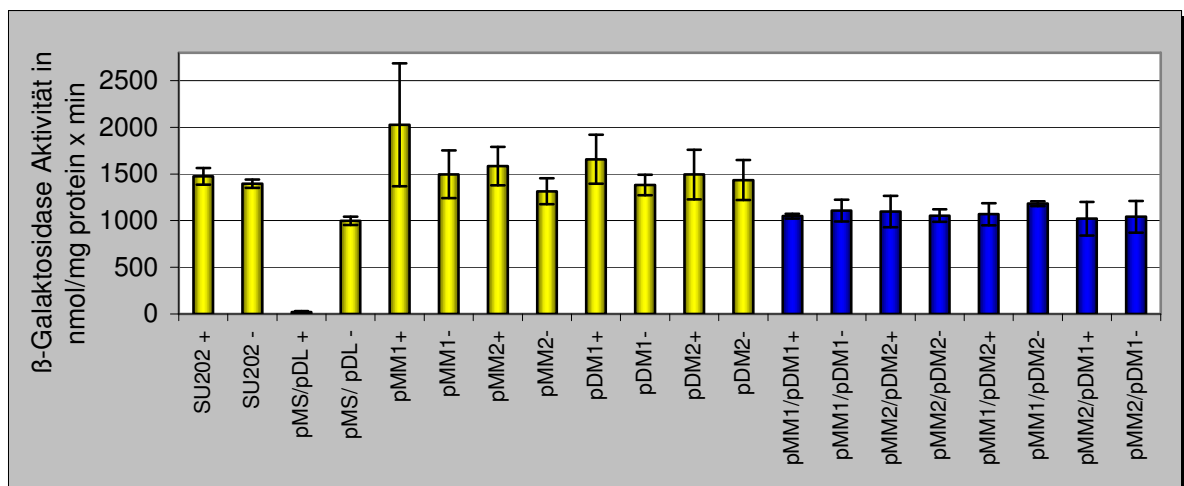


Abb.3.1.18 Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase Tests.

Sämtliche Kontrollen sind in gelb, die eigentlichen Proben in blau dargestellt. Die + Proben wurden jeweils wie mit 1mM IPTG induziert.

Im Rahmen der  $\beta$ -Galaktosidase Tests wurden, neben dem Stamm SU202 als Negativkontrolle, sämtliche Einzelkonstrukte auf ihre mögliche Repressionsfähigkeit hin überprüft. Die Kontrollen zeigten alle, sowohl im induzierten, als auch nicht induzierten Zustand eine hohe  $\beta$ -

Galaktosidase Aktivität. Die Positivkontrolle wies nach erfolgter IPTG-Induktion eine fast vollständige Repression des *lacZ*-Reportergenes und damit eine sehr niedrige  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität auf. Somit zeigten alle Kontrollen die erwarteten Ergebnisse. Die eigentlich zu untersuchenden Proben (in blau dargestellt) zeigten jedoch keine eindeutige Repression, womit durch dieses Systems keine Dimerisierung von MtfA nachgewiesen werden konnte. Die im Gesamten erniedrigte Aktivität bei den in blau dargestellten Proben ist auf die Anzucht mit zwei Antibiotika zurückzuführen, was die Generationszeit der Zellen erhöht hat. Da, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, spezifische MtfA-Antikörper zur Verfügung standen, wurde von den oben verwendeten Kulturen Western-Blots zum Nachweis der Proteine durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.6 dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe der beiden Di-Hybrid Systeme keine eindeutigen Aussagen über die Funktion des leuzinreichen Aminoterminus von MtfA und seiner generellen Dimerisierung gemacht werden konnten.

### **3.1.4 Genetischer Nachweis der Interaktion zwischen Mlc und MtfA**

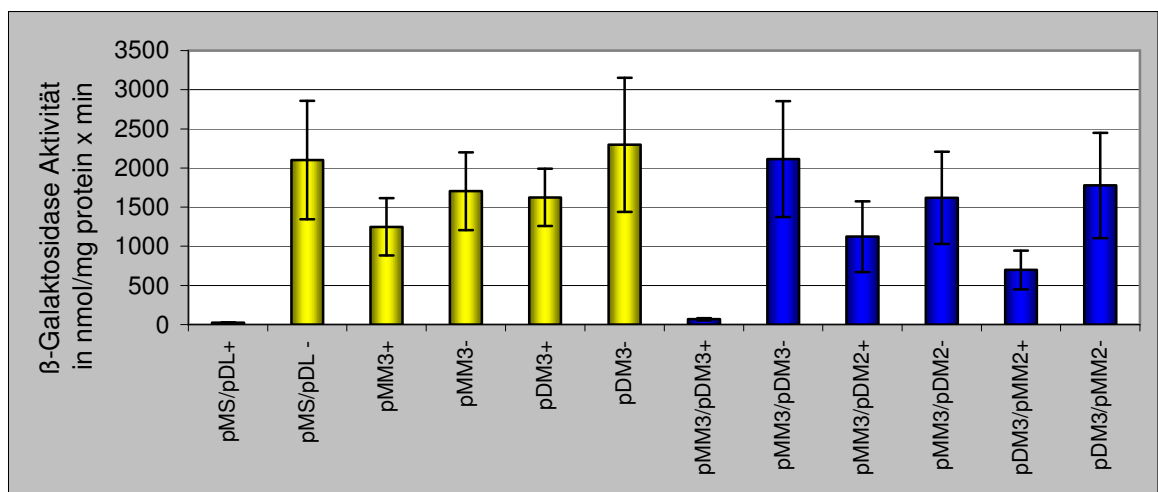
Da, wie im Kapitel 3.1.3 beschrieben, das bakterielle Di-Hybrid System von der Durchführung und Auswertung her eindeutige Ergebnisse lieferte und alle Kontrollen das postulierte Ergebnis zeigten, wurde dieses System erneut verwendet, um die Interaktion des Proteins MtfA und dem Repressor Mlc, sowie verschiedener MtfA-Mutanten zu zeigen. Diese Interaktion konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits mit Hilfe der in Kapitel 3.1.1.3 dargestellten *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion nachgewiesen werden. Als weiterer, direkter in vivo Nachweis sollte dieses ebenfalls mit Hilfe des bakteriellen Di-Hybrid Systems durchgeführt werden.

#### **3.1.4.1 Klonierung und Analyse der Vektoren pMM3 und pDM3**

Hierzu wurden der Repressor Mlc in beide Di-Hybrid Vektoren kloniert. Hierbei entstanden die Vektoren pMM3 und pDM3. Für die Klonierung des Vektors pMM3 wurde ausgehend von dem Plasmid pTM30mlchis eine PCR mit dem Primerpaar MlcPX+/- (eingefügte Schnittstellen *Pst*I, *Xho*I) durchgeführt. Die Konstruktion des Vektors pTM30mlchis wurde in Kooperation mit K. Homann im Rahmen ihrer Masterarbeit vorgenommen (siehe Kapitel 3.3.1.2). Für die Klonie-

Die Konstrukte in verschiedenen Kombinationen mit den MtfA-Konstrukten pMM2 und pDM2 in den Teststamm SU202 transformiert und anhand eines quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase Tests analysiert. Die Tests wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Die Mittelwerte sind in Abbildung 3.1.19 zusammengefasst.

Die gezeigten Ergebnisse bestätigten, dass alle Kontrollen bestehend aus der Positivkontrolle sowie den einzelnen Mlc-Vektoren die erwarteten Ergebnisse zeigten. Lediglich der pMM3 Vektor alleine zeigte eine leichte Repression des *lacZ*-Reportergens. Dieses Phänomen kann aber auch auf die Ungenauigkeit der  $\beta$ -Galaktosidase Tests zurückzuführen sein, wie anhand der Standardabweichung in Form der Fehlerbalken zu erkennen ist.



**Abb.3.1.19 Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase Tests für den Nachweis der Mlc-MtfA-Interaktion im bakteriellen Di-Hybrid System.**

Die + Proben symbolisieren die mit 1mM IPTG induzierten Proben.

Die Probe mit beiden Mlc Konstrukten zeigte, vergleichbar mit der Positivkontrolle, eine fast vollständige Repression des Reporter gens an. Dieses Ergebnis bestätigte die bereits veröffentlichten Ergebnisse die ein Tetramer für Mlc postulieren (89). Die Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA konnte vor allem in der Kombination (pDM3 und pMM2) anhand der Repression nachgewiesen werden. Dieses Phänomen kann mit der Tatsache erklärt werden, dass aufgrund der Vektorkonstellation MtfA in einer ca. 3,5fach höheren Kopienanzahl in der Zelle vorlag. Daher entsprach diese Kombination am ehesten den in vivo vorliegenden Mengenverhältnissen von Mlc und MtfA. Hinweise auf einen notwendigen MtfA-Überschuss für die Mlc-

Wechselwirkung erbrachten auch „Electrophoretic Mobility Shift Assays“, auf die in Kapitel 3.3.6 näher eingegangen wird.

Aufgrund dieser Ergebnisse schien das bakterielle Di-Hybrid System sich gut zu eignen, um weitere Untersuchungen zu dem in Kapitel 3.1.1.7 postulierten MtfA-Modell durchzuführen.

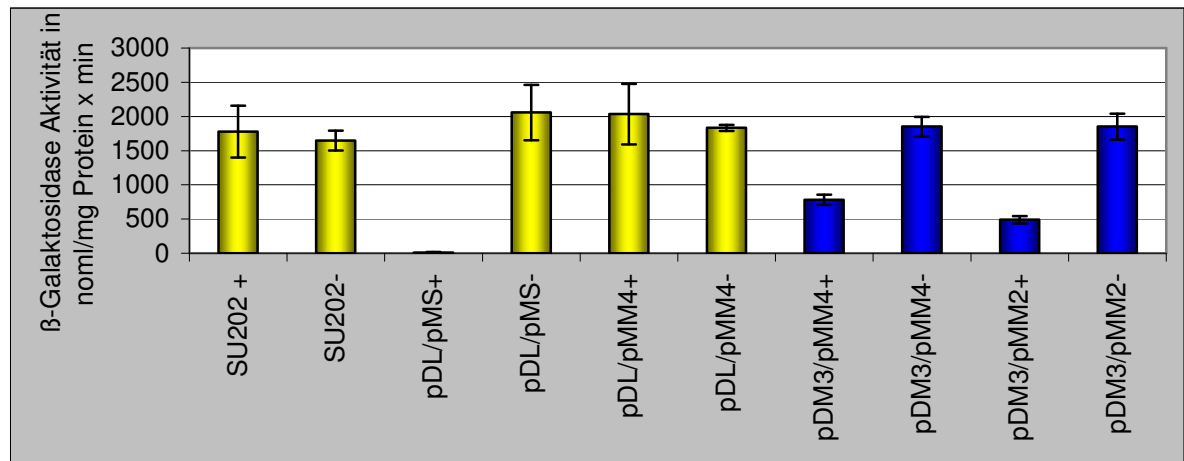
### **3.1.5 Überprüfung des MtfA-Modells mit Hilfe des bakteriellen Di-Hybrid Systems**

Aufgrund des erfolgreichen Nachweises der Mlc-MtfA-Interaktion in den oben gezeigten Experimenten wurden zwei weitere Versuchsansätze mit Hilfe des bakteriellen Di-Hybrid Systems durchgeführt. Zum einen wurde ein carboxyterminales MtfA-Fragment untersucht, welches nach dem in Kapitel 3.1.1.7 gezeigten Modell die Mlc-Interaktionsdomäne darstellt, zum anderen wurden fünf der in Kapitel 3.1.1.6 beschriebenen Mutanten für das bakterielle Di-Hybrid System ausgewählt, um die auf diese Weise veränderte Wechselwirkung zu dem Repressor Mlc mit Hilfe dieses Systems zu verifizieren.

#### **3.1.5.1 Klonierung und Analyse des carboxyterminalen MtfA-Fragmentes**

Für die Klonierung des carboxyterminalen MtfA-Fragmentes wurde ausgehend vom Plasmid pTMByeeI eine PCR mit den Primern Ymlcpms+/- durchgeführt. Hierdurch wurde die Region von Basenpaar 257-812 des *mtfA*-Gens amplifiziert und mit den Restriktionserkennungsschnittstellen *PstI* und *XhoI* versehen. Diese Region entspricht dem carboxyterminalen MtfA-Fragment ab Aminosäure 84. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Vektor (Promega) kloniert. Anschließend wurde das Fragment mit Hilfe der Restriktionsenzyme *PstI* und *XhoI* in den pMS604 Vektor transferiert. Im Folgenden wurde der so entstandene Vektor pMM4 neben den Kontrollen mit dem Vektor pDM3 in den Teststamm SU202 kotransformiert. Der quantitative  $\beta$ -Galaktosidase Test zeigte das in Abbildung 3.1.20 dargestellte Ergebnis:





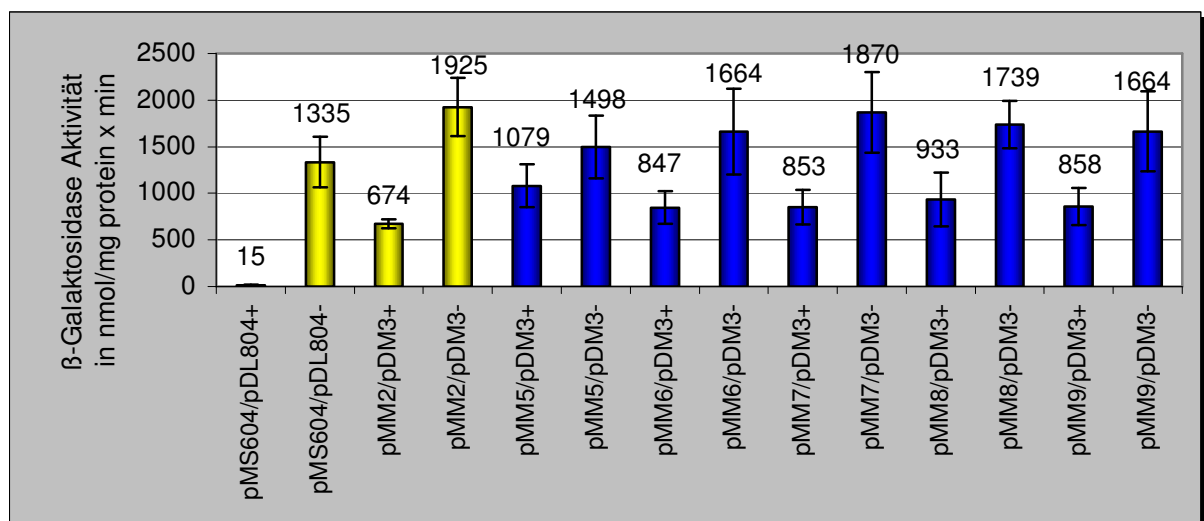
**Abb.3.1.20 zeigt die  $\beta$ -Galaktosidase Test Ergebnisse des carboxyterminalen MtfA-Fragments (pMM4).** Kontrollen sind in gelb, die zu analysierenden Proben in blau dargestellt. Die mit + gekennzeichneten Proben zeigen die mit 1mM IPTG induzierten Proben an.

Bei dem gezeigten  $\beta$ -Galaktosidase Test wurden drei Tests unabhängig voneinander und mit verschiedenen Einzelkolonien durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen wiederum in gelb die Kontrollen, welche wie bei den vorherig gezeigten Ergebnissen des bakteriellen Di-Hybrid Systems den Erwartungen entsprachen. Des weiteren ist hier nochmals als zweite Kontrolle die Wechselwirkung zwischen dem MtfA-Volllängenkonstrukt und Mlc gezeigt (pDM3 /pMM2). Ebenso konnte die Wechselwirkung zwischen dem carboxyterminalen MtfA-Fragment und Mlc aufgrund der Repression des Reportergenes *lacZ* unter induzierten Bedingungen nachgewiesen werden. Hieraus ließ sich das in Kapitel 3.1.1.7 postulierte MtfA-Modell in Bezug auf die Mlc-Interaktionsdomäne bestätigen und bis auf die Aminosäure 84 von MtfA ausweiten.

### 3.1.5.2 Nachweis der Wechselwirkung zwischen Mlc und verschiedenen MtfA-Mutanten im bakteriellen Di-Hybrid System

Aufgrund des erfolgreichen Nachweises der Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA bzw. der carboxyterminalen Mlc-Interaktionsdomäne von MtfA wurden weitere Versuche mit Hilfe dieses Systems durchgeführt. Wie in Kapitel 3.1.1.2-3.1.1.7 beschrieben wurden verschiedene MtfA-Mutanten hergestellt, die eine verminderte Wechselwirkung mit Mlc zeigten. Eine Auswahl dieser Mutanten sollte daher auch im bakteriellen Di-Hybrid System auf die Wechselwirkung mit Mlc hin getestet werden. Hierzu wurden von dem Vektor pMM2 mittels ortsgerechter Mutagenese und den entsprechenden Primerpaaren die verschiedenen Mutationen im entsprechenden Teil des *mtfA*-Gens erzeugt. Der Erfolg der Mutagenese wurde mittels Sequenzierung kontrol-

liert und zeigte in allen Fällen keine weiteren Mutationen. Bei der Auswahl der im Di-Hybrid System zu testenden Mutanten wurden die Mutationen so gewählt, dass eine Mutation ohne nachweisbare Wechselwirkung (Y243S=pMM9), sowie mehrere Mutanten mit eingeschränkter Wechselwirkung (S142F (pMM5), N145Q (pMM6), D156N (pMM7)) und eine Mutante mit nahezu gleicher Wechselwirkung wie das Wildtypprotein (W177Y (pMM8)) getestet werden konnten. Die hergestellten Mutanten wurden wiederum mit dem Vektor pDM3 (Mlc) in den Teststamm SU202 kotransformiert, und anhand von drei unabhängigen quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase Tests wurde die Wechselwirkung, wie in Abbildung 3.1.21 dargestellt ist, quantifiziert. Der quantitative  $\beta$ -Galaktosidase Test zeigt die Wechselwirkung der MtfA-Mutanten mit dem Repressor Mlc im bakteriellen Di-Hybrid System. Um eine vergleichbare prozentuale Quantifizierung der Wechselwirkung der Mutanten mit Mlc zu erreichen, wurde eine entsprechende Auswertung nach folgendem Prinzip durchgeführt.



**Abb.3.1.21  $\beta$ -Galaktosidase Test der MtfA-Mutanten im bakteriellen Di-Hybrid System.**

In gelb sind die beiden Positivkontrollen gezeigt. Zum einen ist hier die Wechselwirkung zwischen dem „Fos“- und „Junzipper“-Motiv zum anderen die Wechselwirkung zwischen Mlc und dem Wildtyp MtfA (pMM2/ pDM3) aufgeführt. Die in blau dargestellten Proben symbolisieren die  $\beta$ -Galaktosidase Test Ergebnisse der jeweiligen MtfA-Mutanten pMM5-9. Bei den mit einem Plus versehenen Proben handelt es sich um die mit IPTG induzierten Proben, bei einem Minus um die uninduzierten Proben.

Die Stärke der Wechselwirkung ist vor allem durch den Unterschied zwischen den jeweils induzierten und nicht induzierten Probe zu sehen. Die nicht induzierte Positivkontrolle (pMM2 (MtfA-Volllängenkonstrukt)/pDM3 (Mlc)) zeigte aufgrund der geringen Kopienzahlen der Vektoren keine Repression des Reportergens und damit eine hohe  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität. Die induzierte Probe hingegen zeigte, aufgrund der reprimierten Expression, eine verminderte  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität. Daher gibt das Verhältnis dieser beiden Werte Aufschluss über die Stärke der Wechselwirkung. So wurde die Differenz dieser Werte für die Quantifizierung der Wech-

selwirkung der Mutanten mit Mlc gleich 100% gesetzt ( $1925-674=1251=100\%$ ). Hierdurch wurde bei den in blau dargestellten Proben jeweils die Differenz aus der induzierten und nicht induzierten Probe genommen und in prozentuale Relation zu der Positivkontrolle gesetzt. Die so ermittelten Werte der jeweiligen MtfA-Mutante, die die Wechselwirkung mit Mlc beschreiben sind der Tabelle 3.1.5 zu entnehmen.

**Tab.3.1.5 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Mlc-Wechselwirkung mit verschiedenen MtfA-Mutanten** aus Kapitel 3.1.1.2 und aus dem bakteriellen Di-Hybrid System.

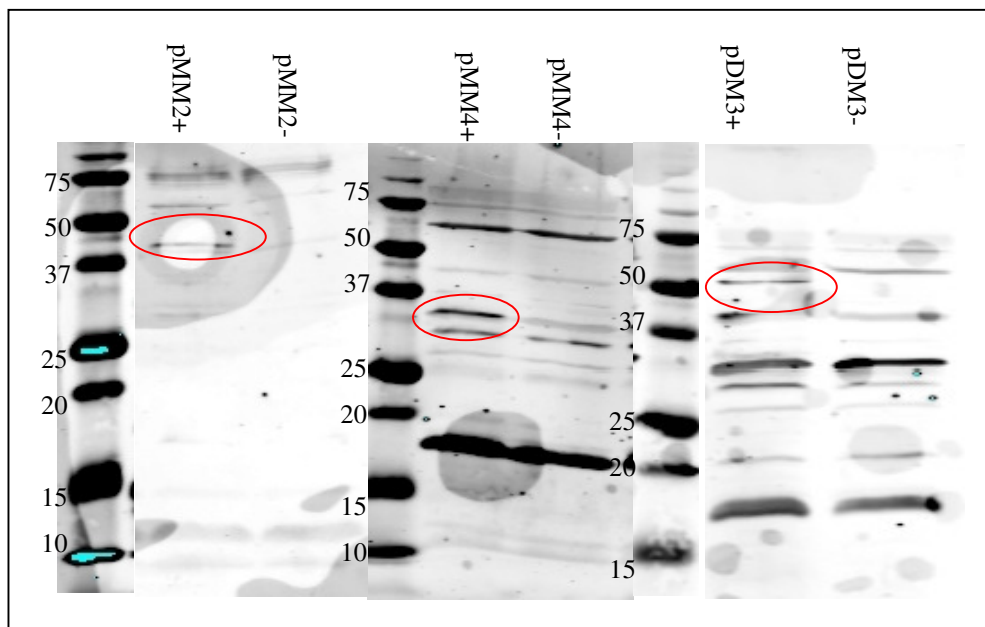
Vektorname	Mutation	Wechselwirkung nach Kapitel 3.1.1.2	Wechselwirkung nach dem bakteriellen Di-Hybrid System
PMM2	MtfA WT/ Positivkontrolle	100%	100%
pMM5	S142F	26 %	33%
pMM6	N145Q	32%	65%
pMM7	D156N	24%	81%
pMM8	W177Y	94%	64%
pMM9	Y243S	11%	64%

Die Tabelle zeigt die durchgeführten Mutationen sowie die in Kapitel 3.1.1.6 ermittelte prozentuale Wechselwirkung mit Mlc im Vergleich zum MtfA-Wildtyp. Alle Mutanten zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Wechselwirkung zu Mlc. Die hier im Rahmen der Versuche des bakteriellen Di-Hybrid Systems erhaltenen Ergebnisse lassen sich nicht mit den in Kapitel 3.1.1.2 ermittelten Werten vollständig in Einklang bringen. Bis auf den erste Wert (S142F) sind die anderen Ergebnisse sehr weit von den vorher ermittelten Werten entfernt. Daher scheint das hier verwendete Di-Hybrid System zwar für einen generellen Nachweis der Wechselwirkung der Proteine Mlc und MtfA geeignet zu sein, eine genaue Quantifizierung der Mutanten konnte hiermit aber nicht vorgenommen werden. Die Abweichung der Werte ist wahrscheinlich vor allem auf die unterschiedlichen Mengenverhältnisse von MtfA und Mlc in der Zelle zurückzuführen. Unter nativen Bedingungen liegt der Repressor Mlc nur in sehr wenigen Kopien in der Zelle vor. Über die Menge von MtfA sind keine genauen Zahlen bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die spezifische Antikörperoptimierung allerdings gezeigt werden, dass das chromosomale Expressionsniveau von MtfA im Gegensatz zu dem von Mlc im Western-Blot zum Nachweis von MtfA aus einem Gesamtproteinextrakt ausreichend ist (vgl. Kapitel 3.3.2.2.). Daher ist zu vermuten, dass eine wesentlich höhere Menge MtfA als Mlc unter nativen Bedingungen in der Zelle vorliegt. Im hier verwendeten bakteriellen Di-Hybrid System hingegen lagen im induzierten Fall relativ hohe Mengen an Mlc und MtfA vor, da diese ausgehend von „multicopy“-Vektoren exprimiert wurden. Somit lag in diesen Versuchen im Vergleich zu den in Kapitel 3.1.1.6 durchgeführten Versuchen ein ganz anderes Mengenverhältnis der Proteine vor, wodurch auch die veränderte Wechselwirkung zu erklären ist. Darüber hinaus handelt es sich bei den hier

verwendeten Konstrukten um Fusionsproteine, bei denen die Effekte einzelner Aminosäuresubstitutionen sich ganz anders auswirken können, als bei der Expression des Proteins alleine.

### 3.1.6 Western-Blot Analyse der in Kapitel 3.1.3-3.1.6 verwendeten Proteine

Mit den Proben der gezeigten bakteriellen Di-Hybrid Tests wurden ausgehend von den Testkulturen Western-Blot Analysen durchgeführt, um die verwendeten Fusionsproteine nachzuweisen und damit eine Bestätigung über deren Expression und die Proteinestabilität zu erhalten. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe von spezifischen Mlc- und MtfA-Antikörpern, deren Herstellung ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit war (siehe Kapitel 3.3.2). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.1.22 gezeigt.



**Abb.3.1.22** Western-Blot Analyse der verschiedenen Fusionsproteine des bakteriellen Di-Hybrid Systems aus den Kapitel 3.1.3 –3.1.6. Die berechneten Größen der entsprechenden Fusionsproteine sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Abbildungen zu den Proteinen, die nicht mit Hilfe des Western-Blots nachgewiesen werden konnten, sind nicht gezeigt.

Die Western-Blot Analyse der verwendeten Fusionsproteine zeigte, dass das Volllängen-MtfA (pMM2) nur nach erfolgter Überexpression ausgehend vom pMS604 Vektor nachgewiesen werden konnte, nicht aber ausgehend vom pDL804 Vektor. Dieses ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der pMS604 Vektor in einer höheren Kopienzahl in der Zelle vorlag und daraus auch eine größere Menge an Protein resultierte. Das Mlc-bindende carboxyterminale MtfA-Fragment konnte ausgehend vom Vektor pMM4 in der induzierten Probe mit einer Größe von 32281Da nachgewiesen werden.

**Tab.3.1.6 Zusammenfassung der Größen der Fusionsproteine des bakteriellen Di-Hybrid Systems**

Vektor	Fusionsgen	Größe LexA Protein	Größe Testprotein	berechnete Gesamtgröße	Proteinnachweis
pMM1	<i>lexA-mtfA226</i>	9531Da	10392Da	19923Da	-
pMM2	<i>lexA-mtfA805</i>	9531Da	30636Da	40167Da	+
pMM3	<i>lexA-dgsA</i>	10061Da	45780Da	55841Da	-
pMM4	<i>lexA-mtfA555</i>	10061Da	22220Da	32281Da	+
pDM1	<i>lexA<sub>408</sub>-mtfA263</i>	9874Da	10114Da	19988Da	-
pDM2	<i>lexA<sub>408</sub>-mtfA 765</i>	9874Da	29204Da	39078Da	-
pDM3	<i>lexA<sub>408</sub>-dgsA</i>	9874Da	45780Da	55654Da	+

Das Mlc Protein konnte ausgehend von dem Vektor pDM3 in der induzierten Probe mit einer Größe von 55654Da im Western-Blot nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass es ebenfalls von dem Vektor pMM3 nachgewiesen werden könnte. Da aber die Wechselwirkung der beiden Mlc Proteine und damit die Funktionalität im  $\beta$ -Galaktosidase Test nachgewiesen werden konnte, wurden hierzu keine weiteren Versuche durchgeführt. Die beiden kleineren Fusionsproteine (pMM1 und pDM1) (potentielle Dimerisierungsdomänen) konnten, vermutlich aufgrund ihrer geringeren Größe und damit verbundenen geringeren Signalstärke, nicht im Western-Blot nachgewiesen werden.

### 3.1.7 Einfluss von EIIB<sup>Glc</sup> und EIIB\*<sup>Glc</sup> auf die Wechselwirkung von MtfA mit dem Repressor Mlc

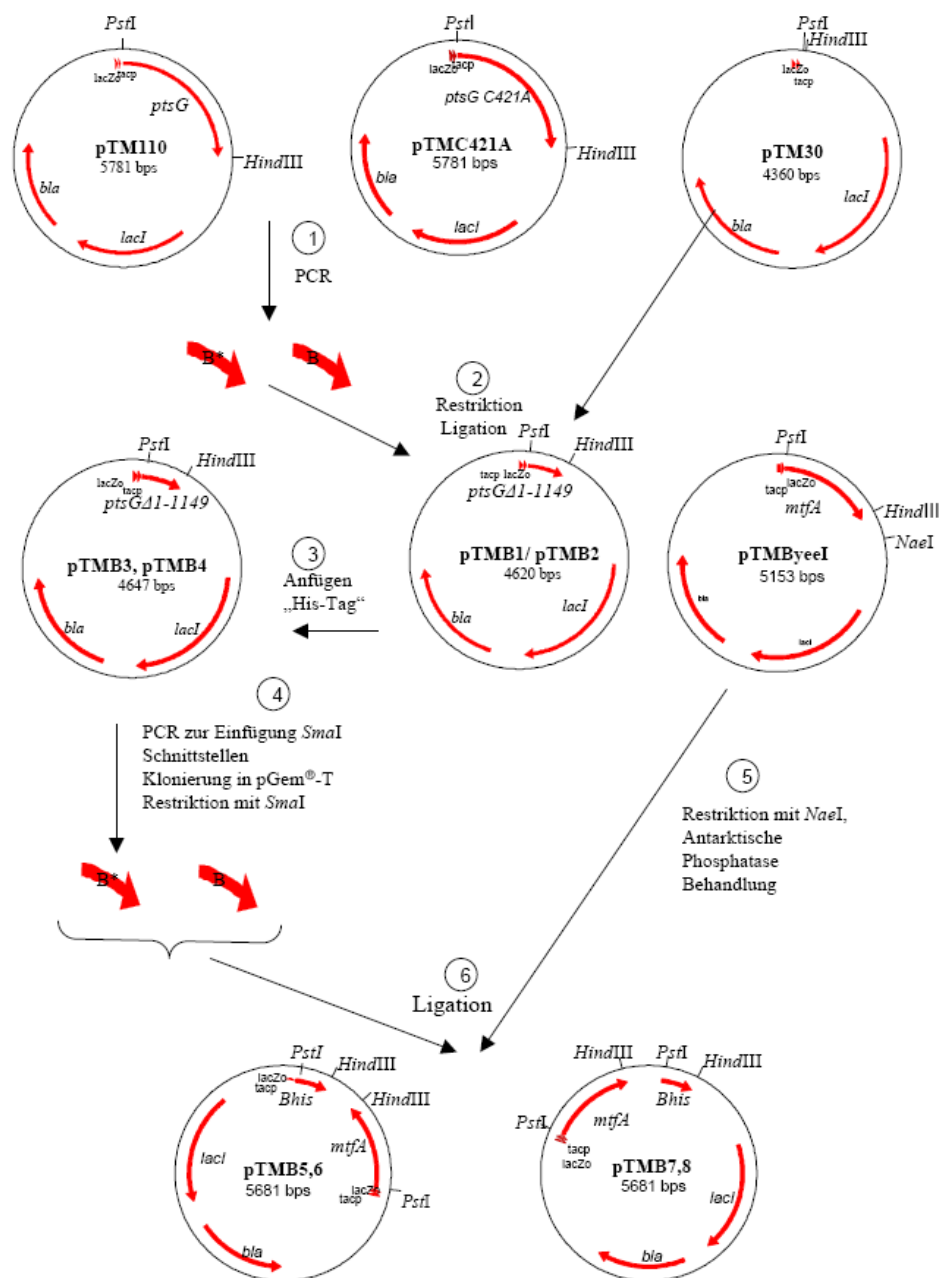
Mit Hilfe der folgenden Versuche sollte generell gezeigt werden, ob sich die Wechselwirkungen von Mlc-EIIB<sup>Glc</sup> und Mlc-MtfA gegenseitig beeinflussen. Dabei sollte auch untersucht werden, ob die Bindestellen von MtfA und der EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne an dem Repressor Mlc überlappen oder unterschiedlich sind. Experimente von Seitz et al. und Schiefner et al. (86, 90) zeigten, dass eine Deletion von 18 carboxyterminalen AS in Mlc die amphipatische Helix auflöst, welche für die Tetramerisierung des Repressors erforderlich ist. Diese ist ebenfalls für die DNA-Bindung des Repressors Mlc erforderlich und wirkt stabilisierend auf das HTH-Motiv des Aminoterminus. Die daraus resultierende Folge für Mlc ist eine potentielle Dimerisierung anstatt einer Tetramerisierung. Dieses ist vermutlich dafür verantwortlich, dass die carboxyterminale Deletion von Mlc nicht mehr in der Lage ist an die DNA zu binden. Im Rahmen der Dissertation von A.-K. Becker konnte mit Hilfe von Oberflächen-Plasmon-Resonanz Versuchen gezeigt werden, dass diese Deletion im Mlc Protein ebenfalls einen Einfluss auf die Interaktion mit MtfA zeigte (11). Bei einer Deletion von neun carboxyterminalen AS ist eine eingeschränkte Wechselwirkung von Mlc und MtfA zu sehen, bei einer Deletion von 18 carboxyterminalen AS ist die Wechselwirkung voll-

ständig eliminiert (11). Diese Ergebnisse deuten auf eine Wechselwirkung von MtfA mit dem carboxyterminalen Bereich des Repressors Mlc hin. Für das Protein EIIB<sup>Glc</sup> konnten Tanaka et al. zeigen, dass Aminosäuresubstitutionen in der aminoterminalen Region von Mlc dazu führen, dass die Interaktion zwischen Mlc und EIIB<sup>Glc</sup> verhindert wird (101). Daher scheinen die Bindestellen von EIIB<sup>Glc</sup> im aminoterminalen Bereich und die für MtfA im carboxyterminalen Bereich von Mlc zu liegen. Somit lassen diese Untersuchungen darauf schließen, dass die Bindestellen getrennt vorliegen und nicht überlappen. Dennoch könnte es sein, dass EIIB<sup>Glc</sup> nach erfolgter Bindung an den Repressor Mlc in diesem eine Konformationsänderung hervorruft, wodurch die Bindestelle für MtfA nicht mehr frei zugänglich ist und somit die Bindung von MtfA verhindert wird. Erste Versuche zur Unterstützung dieser Theorie wurden bereits von J.-E. Muus im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (64). Hierbei wurde neben dem Expressionsvektor pTMByeel ein kompatibler Expressionsvektor für EIIB<sup>Glc</sup> (pJEM1) bzw. EIIB\*<sup>Glc</sup> (pJEM1\*) hergestellt. Somit konnte eine gleichzeitige Expression der Proteine MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> bzw. EIIB\*<sup>Glc</sup> im gleichen Stamm erreicht werden. Das Gen *mtfA* wurde hierbei ausgehend vom pTM30 Expressionssystem mit Hilfe von IPTG überexprimiert. Die Überexpression von der EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne, bzw. der EIIB\*<sup>Glc</sup>-Domäne hingegen wurde vom pBAD24 Expressionssystem zur Induktion mit Arabinose exprimiert. Die EIIB\*<sup>Glc</sup>-Domäne trägt eine C421A Aminosäuresubstitution. Diese AS wird innerhalb der EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne phosphoryliert. Somit kann aufgrund der C421A Substitution keine Phosphorylierung der EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne stattfinden. Bei der Durchführung der Wettbewerbsversuche im Teststamm LZ150/F<sup>+</sup>:: $\emptyset$ (*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*) im Rahmen der Diplomarbeit von J.-E. Muus ergaben sich jedoch verschiedene Probleme mit den unterschiedlichen Expressionssystemen der Proteine. Hierbei war es v.a. schwierig, äquivalente Mengen von MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> herzustellen. Das hauptsächliche Problem stellte dabei die durch Arabinose erzeugte Katabolitenrepression dar. Hierbei konnte auch zusätzlich zugeführtes cAMP nicht die Abnahme der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität verhindern. Generell gestalteten sich die durchgeführten Experimente zum Einfluss der EIIB<sup>Glc</sup> bzw. EIIB\*<sup>Glc</sup> auf die Wechselwirkung zwischen den Proteinen Mlc und MtfA als sehr aufwendig und störanfällig (64).

Zusammenfassend ergaben die Versuche aus der Diplomarbeit von J.-E. Muus, dass bei einer Induktion von *mtfA* mit 500  $\mu$ M IPTG und einer gleichzeitigen Überexpression der EIIB\*<sup>Glc</sup>-Domäne mit 0,2% Arabinose die Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA durch die EIIB\*<sup>Glc</sup>-Domäne reduziert ist. Daher deuteten diese Daten darauf hin, dass MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> um die gleiche Bindestelle konkurrieren. Wahrscheinlicher ist es jedoch, dass durch die Bindung der EIIB\*<sup>Glc</sup>-Domäne an Mlc eine Konformationsänderung an Mlc ausgelöst wird, die die Bindung

von MtfA hemmt oder verhindert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit K. Homann im Rahmen ihrer Masterarbeit ein Vektor hergestellt, auf dem sowohl das Gen *mtfA*, als auch das Gen, welches für EIIB<sup>Glc</sup> bzw. EIIB\*<sup>Glc</sup> kodiert, auf einem Vektor vereinigt vorlagen. Die beiden Gene standen jeweils unter der Kontrolle des *tac*-Promotors und *lacZ*-Operators.. Diese Vektoren wurde je nach Orientierung der Gene zueinander pTMB5 und pTMB6, sowie pTMB7 und pTMB8 genannt.

### 3.1.7.1 Klonierung der Vektoren pTMB5-8



**Abb.3.1.23 Klonierung der Vektoren pTMB5-8.**

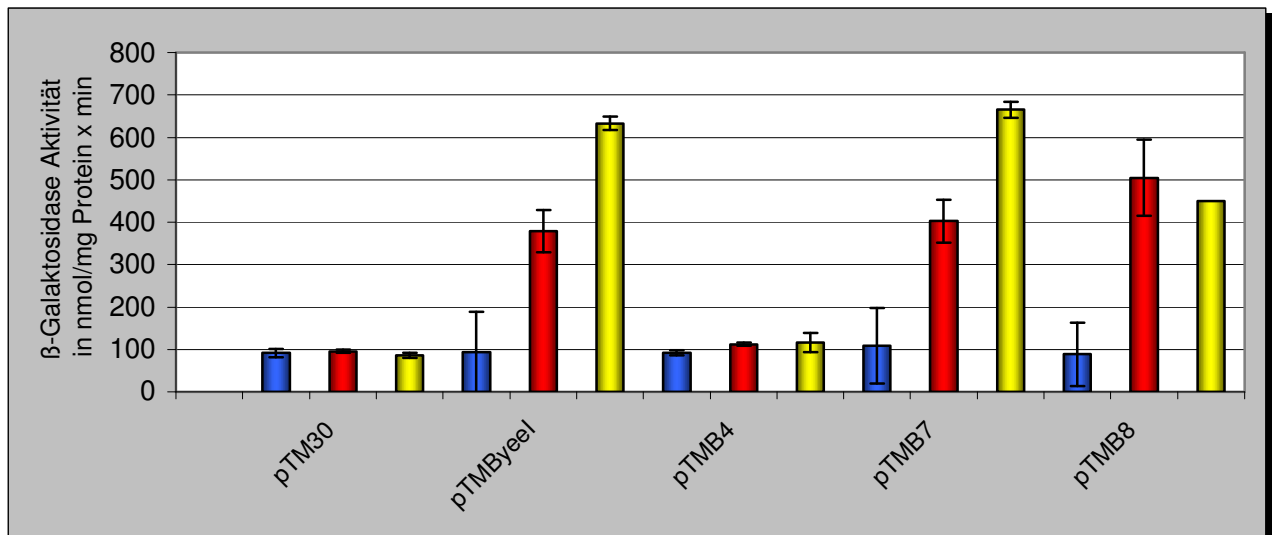
Ausgehend von den Vektoren pTM110 und pTMC421A wurde mit Hilfe der Primer BpstI und pTM30- eine PCR zur Amplifikation der jeweiligen EIIB<sup>Glc</sup>- bzw. EIIB<sup>\*Glc</sup>-Domäne durchgeführt. Hierbei wurde der Bereich zwischen Basenpaar 1149-1440 des *ptsG*-Gens amplifiziert. Durch diese PCR wurde in das 291 Basenpaar große PCR-Produkt ein *PstI*-Schnitt eingebaut. Somit konnte das PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *HindIII* geschnitten und anschließend in den ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pTM30 ligiert werden. Hierdurch entstanden die Vektoren **pTMB1** und **pTMB2**. Diese Vektoren wurden anschließend wiederum mit *PstI* geöffnet und mit einem vorher „annealten“ „His-Tag“ aus den Primern Bhis+ und Bhis- ligiert. Somit wurde ein „His-Tag“ in den aminoterminalen Bereich der EIIB<sup>(\*)Glc</sup>-Domäne fusioniert. Ausgehend von den so entstandenen Vektoren **pTMB3** und **pTMB4** wurde die mit dem „His-Tag“ versehene EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne in den Vektor pTMB<sub>yeel</sub> inklusive des *tac* Promotors und *lacZ* Operators kloniert. Da für diese Klonierung jedoch nur die „blunt-end“ Restriktionsschnittstelle *NaeI* zur Verfügung stand, wurden durch eine erneute PCR flankierende *SmaI* Schnittstellen an die EIIB<sup>\*Glc</sup>-Domänen gesetzt. Hierfür wurden die Primer BSmaI+ und BSmaI- verwendet. Diese Primer wurden so gewählt, dass der Promotor- und Operatorbereich mit amplifiziert wurde, so dass die EIIB<sup>Glc</sup> bzw. die EIIB<sup>\*Glc</sup>-Domäne unter diesem Promotor exprimiert werden konnten. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Vektor (Promega) kloniert. Danach konnten die Domänen mit Hilfe einer *SmaI*-Restriktion aus diesem Vektor ausgeschnitten werden. Der Vektor pTMB<sub>yeel</sub> wurde mit *NaeI* geöffnet und mit antarktischer Phosphatase zur Verhinderung der Religation behandelt. Aus der anschließenden Religation resultierten die Vektoren **pTMB5-pTMB8**. Bei den Vektoren **pTMB5** und **pTMB6** lagen die EIIB<sup>(\*)Glc</sup>-Domänen in der gegensätzlichen Orientierung zu *mtfA* vor. Bei den Vektoren **pTMB7** und **8** in der entsprechend gleichen Orientierung.

In der oben gezeigten Abbildung 3.1.23 ist das Klonierungsschema der Vektoren pTMB5-pTMB8 gezeigt. Die Klonierungsschritte 1-3 wurden von K. Homann im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt (28). Die genaue Vorgehensweise bei der Klonierung ist in der Abbildungslgende erläutert.

**3.1.7.2 Analyse der Auswirkung der gemeinsamen Expression von EIIB<sup>\*Glc</sup> und MtfA auf die Wechselwirkung mit Mlc**

Mit dem folgenden Versuch sollte getestet werden, in wie fern die parallele Expression von EIIB<sup>Glc</sup> bzw. EIIB<sup>\*Glc</sup> die Wechselwirkung von MtfA und Mlc beeinflusst. Hierzu wurden die Vektoren pTMB7 und pTMB8 in den Teststamm LZ150/F<sup>+</sup>:: $\emptyset$ (*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*) transformiert. Die Proteinexpression wurden anschließend mit 0,100 und 500 $\mu$ M IPTG induziert. Anschließend wurde mit diesen Proben ein quantitativer  $\beta$ -Galaktosidase Test durchgeführt. Als Kontrollen dienten die Vektoren pTM30, pTMB<sub>yeel</sub> und pTMB4. Die Mittelwerte von drei unabhängigen  $\beta$ -Galaktosidase Tests sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst. Der Vektor pTM30 als Negativkontrolle zeigte eine sehr geringe und unter den verschiedenen Induktionsbedingungen konstante  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität. Der Vektor pTMB<sub>yeel</sub> zeigte eine zunehmende  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität in Abhängigkeit zu der steigenden IPTG-Menge. Der Vektor pTMB4, der die EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne alleine trägt, zeigte eine  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität, die mit der Negativkontrolle vergleichbar war und somit dem basalen Expressionsniveau der  $\beta$ -Galaktosidase in dem Teststamm entsprach.





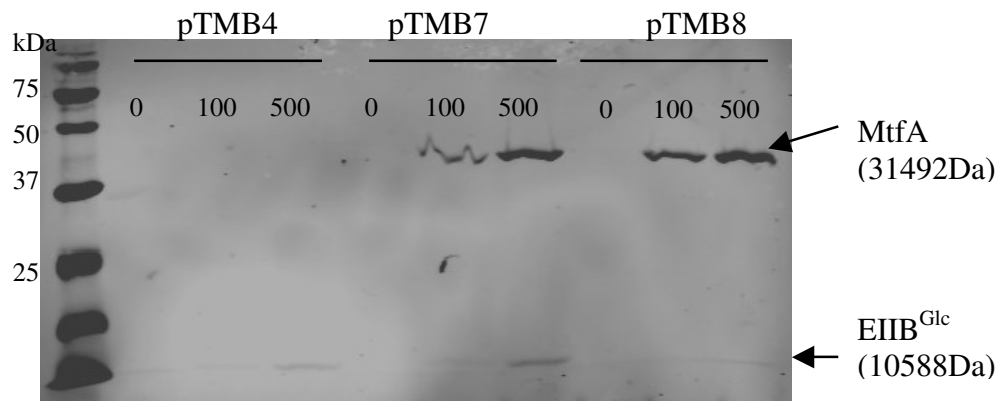
**Abb.3.1.24 Mittelwerte aus drei unabhängigen  $\beta$ -Galaktosidase Tests.**

Die blauen Balken symbolisieren keine Induktion, die roten Induktion mit 100 $\mu$ M IPTG und die gelben mit 500 $\mu$ M IPTG für die jeweiligen getesteten Vektoren pTM30, pTMByeeI, pTMB4, pTMB7 und pTMB8.

An dieser Stelle sei noch einmal daran erinnert, dass die lösliche EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne zwar in der Lage ist Mlc zu binden, es jedoch nicht titrieren kann (101). Der Vektor pTMB7 zeigt vergleichbar mit den Ergebnissen des Vektors pTMByeeI eine Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität in Abhängigkeit zur IPTG-Induktion. Daher lässt sich anhand dieses Ergebnisses postulieren, dass die Wildtyp EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne keinerlei Auswirkungen auf die Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA zeigte. Die EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne mit der C421A Mutation hingegen zeigte eine starke Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität bei einer Induktion mit 100 $\mu$ M IPTG, jedoch eine im Gegensatz dazu nicht mehr steigerungsfähige, bzw. rückläufige  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität bei der Induktion mit 500 $\mu$ M IPTG. Daher scheint die Überexpression von EIIB<sup>\*Glc</sup> mit 500 $\mu$ M IPTG einen Einfluss auf die Wechselwirkung von Mlc und MtfA zu haben.

### 3.1.7.3 Nachweis der Proteine EIIB<sup>Glc</sup>, EIIB<sup>\*Glc</sup> und MtfA im Western-Blot

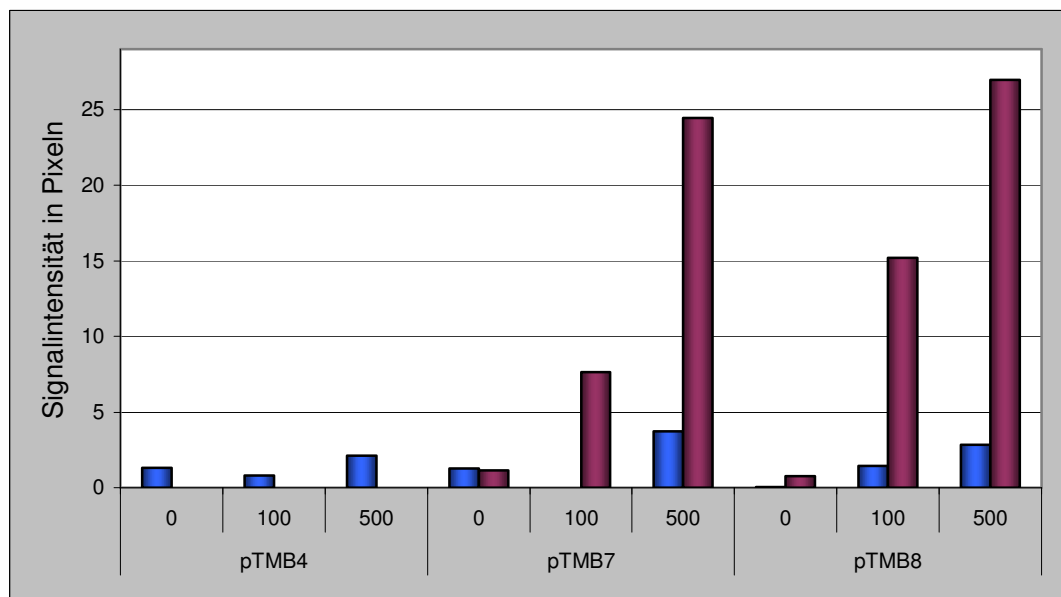
Um einen Eindruck über die tatsächlichen Mengenverhältnisse von MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> bzw. EIIB<sup>\*Glc</sup> zu bekommen, wurden ausgehend von den  $\beta$ -Galaktosidase Test Proben Western-Blot Analysen durchgeführt. Im gezeigten Western-Blot konnte sowohl MtfA mit einem Molekulargewicht von 31492Da als auch EIIB<sup>Glc</sup> bzw. EIIB<sup>\*Glc</sup> (10588Da) im Western-Blot nachgewiesen werden. Ausgehend von diesem Bild wurden die jeweiligen Signale mit Hilfe der Software des Odyssey Scanners der Firma LI-COR quantifiziert und anschließend graphisch ausgewertet. Die Auswertung ist in Abbildung 3.1.26 dargestellt.



**Abb.3.1.25 Western-Blot Analyse der gleichzeitigen Expression von EIIB<sup>Glc</sup> bzw. EIIB\*<sup>Glc</sup> und MtfA.**

Die Western-Blot Analysen sind ausgehend von den geernteten Proben aus der Anzucht für den in Abb.3.1.24 gezeigten  $\beta$ -Galaktosidase Test gemacht worden. Als Kontrolle ist hier der Vektor pTMB4 gezeigt, der kein MtfA enthält. Gezeigt sind jeweils die uninduzierten (0), mit 100  $\mu$ M und 500  $\mu$ M IPTG induzierten Proben.

Wie bereits bei den Signalen in Abb.3.1.25 zu sehen war, waren alle mit 500  $\mu$ M IPTG induzierten Proteine am deutlichsten sichtbar. Generell zeigte auch MtfA ein stärkeres Signal als EIIB<sup>Glc</sup>. Diese Beobachtungen konnten mit Hilfe der Quantifizierung bestätigt werden. Die Proteinmenge stieg bei beiden Proteinen proportional zu der Induktionsmenge.



**Abb.3.1.26 Quantifizierung des Western-Blots.**

Aufgetragen wurden äquivalente Mengen der jeweiligen Zellpräparationen. Die roten Balken stellen die jeweilige Menge MtfA, die blauen die Menge EIIB<sup>Glc</sup> dar.

Generell konnte anhand der gezeigten Ergebnisse ein Verhältnis zwischen der MtfA und der EIIB<sup>Glc</sup> Menge von 8:1 berechnet werden. Das Mengenverhältnis zwischen MtfA und EIIB\*<sup>Glc</sup> betrug anhand der oben erhaltenen Werte 1:9,5. Aufgrund der nur einmalig durchgeführten Quantifizierung und der unterschiedlichen Molekulargewichte der Proteine ist es jedoch gewagt, das Mengenverhältnis in genauen Zahlenwerten anzugeben. Dennoch kann anhand dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass es einen deutlichen Mengenunterschied zwischen

EIIB<sup>Glc</sup> und MtfA im verwendeten Expressionssystem gab und EIIB<sup>Glc</sup> in einer deutlich geringeren Menge vorlag.

Die Mutante EIIB\*<sup>Glc</sup> kann im Gegensatz zu der EIIB<sup>Glc</sup>-Wildtypdomäne nicht mehr phosphoryliert werden. Eine Wechselwirkung zwischen EIIB<sup>Glc</sup> und Mlc konnte nur im nicht-phosphorylierten Zustand der EIIB\*<sup>Glc</sup>-Domäne beobachtet werden (65). Diese Ergebnisse konnten mit den hier gezeigten Experimenten bestätigt werden. Hier scheint die unphosphorylierte EIIB\*<sup>Glc</sup>-Domäne mit dem Repressor Mlc zu interagieren, wodurch die Bindung und damit verbundene Titration des Repressors durch MtfA behindert bzw. verändert wird. Die Bindung von EIIB\*<sup>Glc</sup> könnte die gleiche Bindestelle wie MtfA an Mlc besitzen, so dass eine Konkurrenzreaktion zwischen EIIB\*<sup>Glc</sup> und MtfA entsteht. Alternativ dazu könnte die Bindung von EIIB\*<sup>Glc</sup> an Mlc eine Konformationsänderung im Bereich der carboxyterminalen amphiphatischen Helix auslösen, die die Bindestelle von MtfA an Mlc verändert. Zur Klärung dieser Hypothese wurden in dieser Arbeit keine weiteren Versuche durchgeführt. Des weiteren wäre mit Folgeexperimenten zu klären, bei welcher Konzentration an IPTG – also bei welchem Verhältnis von MtfA zu EIIB\*<sup>Glc</sup> die Auswirkung von EIIB\*<sup>Glc</sup> auf die Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA stattfindet.

Zusammenfassend konnten diese Versuche die von J.-E. Muus erhaltenen Ergebnisse im Rahmen ihrer Diplomarbeit bestätigen. Darüber hinaus konnte aufgrund des an das Protein EIIB\*<sup>Glc</sup> angefügten „His-Tags“ eine Quantifizierung der Mengenverhältnisse von MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> durchgeführt werden. Hierbei ergab sich, dass MtfA in wesentlich höheren Mengen als EIIB<sup>Glc</sup> ausgehend von dem gleichen Expressionssystem vorlag. Dennoch konnte ein inhibierender Effekt von EIIB<sup>Glc</sup> bei der Induktion mit mehr als 100µM IPTG auf die Mlc-MtfA Wechselwirkung beobachtet werden.

### 3.2 Physiologische Charakterisierung des Proteins MtfA – wie wird der Regulator MtfA reguliert ?

Erste Ergebnisse in Bezug auf die physiologische Charakterisierung von MtfA konnten von A.-K. Becker im Rahmen ihrer Dissertation erzielt werden. Im Western-Blot Nachweis von MtfA traten in verschiedenen Experimenten Doppelbanden auf, die auf eine Modifikation des Proteins hinweisen könnten. Diese konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduziert werden, so dass ein anderer Einstieg in die Physiologie von MtfA gefunden werden musste.

Im folgenden Kapitel werden verschiedene Versuche dargestellt, die die physiologische Bedeutung von MtfA aus unterschiedlichen Blickpunkten heraus beleuchten und somit im Gesamten einen Eindruck über die Regulation von MtfA ergeben.

Ausgehend von einem ausführlichen Aminosäuresequenzvergleich konnte eine Ähnlichkeit zu einem MCP aus *Bacillus cereus* nachgewiesen werden. Daher wurde überprüft, ob MtfA eine Auswirkung auf die allgemeine, bzw. PTS vermittelte Chemotaxis hat. Hierbei konnte eine geringe Auswirkung von MtfA auf die Chemotaxis nachgewiesen werden.

Darüber hinaus konnte für das *mtfA*-Gen ein schwacher Promotor nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Wachstumscompetitionsversuchen mit einem MtfA-Wildtypstamm in Konkurrenz zu einer isogenen MtfA-Mutante konnte ein Wachstumsvorteil für den Wildtyp beim Wachstum auf Glukose und unter Hitzeschockbedingungen nachgewiesen werden. Das Wachstum auf weiteren Kohlenstoffquellen sowie unter semianaeroben Bedingungen zeigte keinerlei Selektionstendenz. Ein weiterer Bestandteil der in diesem Kapitel beschriebenen physiologischen Charakterisierung war der Nachweis der Regulation der im Rahmen dieser Arbeit vielfältig verwendeten *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion zum Nachweis der *ptsG* Expression. Nach erfolgreicher Optimierung der RT-RT PCR konnte mit deren Hilfe sowohl für das *ptsG*-, als auch für das *lacZ*-Transkript die von Tanaka et al. (101) für das chromosomal kodierte *ptsG* postulierte Regulation durch *SgrS/SgrR* nachgewiesen werden.

Ebenfalls mit Hilfe der RT-RT PCR sowie mittels Western-Blot Analysen konnte ein kontroverser Unterschied in der *mtfA*-mRNA Menge beim Wachstum auf Glukose und Glycerin in den *E.coli* Stämmen K-12 und LJ110 identifiziert werden. Der übereinstimmende Nachweis der daraus resultierenden Proteinmengen wiesen in diesem Zusammenhang auf eine posttranskriptionelle Regulation des Regulators MtfA im Stamnhintergrund LJ110 hin.

### 3.2.1 Hat MtfA eine Auswirkung auf die Chemotaxis ?

Als Alternative zum experimentellen Nachweis einer potentiellen Modifikation im Western-Blot wurde ein ausführlicher Aminosäuresequenzvergleich des Proteins MtfA mit Hilfe der „ncbi“ Datenbank durchgeführt. Hierbei ergab sich aufgrund der Ähnlichkeit des MtfAs mit einem MCP aus *Bacillus cereus* ATCC 14579 der Hinweis auf eine potentielle Verbindung zur Chemotaxis.

```

MtfA: 126 Q R I V Q S G Q S W Q Q G P I V L N W L D I Q D S F D A S G F N L I I H E V A H K L D T R N G D R A S G V P F I - P L R 184
      + + Q Q S + N L Q + D A N ++ ++ ++DT SGV + ++
MCP: 324 E R L T Q G M Q S I V N T S S S V N E L S A Q S A L D A E S G N K L M K Q M I Q Q M D T I Q N S V H S G V K Q V E T M K 383

MtfA: 185 E V A G W E H D L H A A M N N I Q E E I E L V G E N A A S I D A Y A A S D P A E C F A V L S E 231
      E + + M I + I L + N A A I + A A + F A + + + +
MCP : 384 E Q S E E I V K I I D V M Q G I T S Q I N L L A L N A A - I E A A R A G E S G R G F A I V A D 429

```

#### Abb.3.2.1 Vergleich der MtfA-Sequenz mit der Sequenz des MCP aus *Bacillus cereus* ATCC 14579.

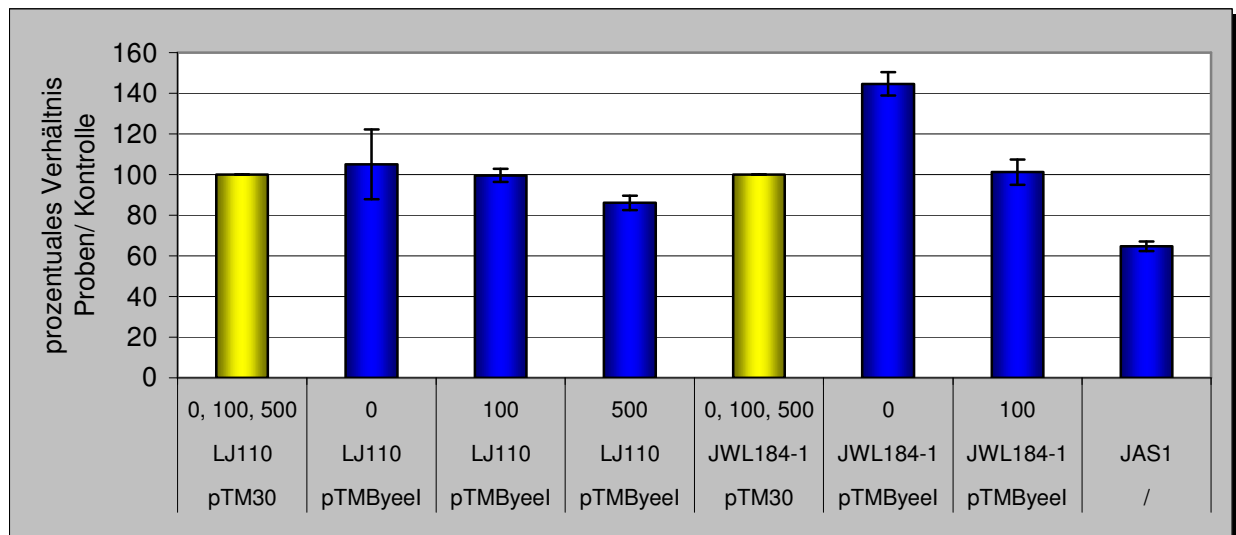
Die mit einem Plus gekennzeichneten AS bezeichnen hochkonservierte Aminosäuresubstitutionen zwischen diesen beiden Proteinen. Es konnten 50 von 107 verglichenen AS als hochkonserviert (46%) bezeichnet werden. Die Identität liegt bei 25%. Die Bedeutung der in gelb und rot gekennzeichneten AS wird im Text näher erläutert.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von MtfA aus *E.coli* K-12 und dem MCP aus *B.cereus* zeigte auf einer Länge von 107 AS zeigt 27 identische und 23 weitere konservierte AS. In Bezug auf diesen Proteinabschnitt bedeutet das eine Identität von 25% und eine 46%ige Übereinstimmung der AS.

MCPs sind die transmembranen Sensoren für Schreck- oder Lockstoffe, auf die Bakterien in der Lage sind mit Chemotaxis zu antworten. Die Regulation der MCPs erfolgt über die Methylierung an konservierten Glutamat-, bzw. Glutaminresten. Die Übereinstimmung (AS324-429) zwischen dem MCP aus *B.cereus* und dem MtfA aus *E.coli* K-12 liegt im Bereich der ersten Methylierungs- und der Signaldomäne des MCPs. (AS126-231 von MtfA). Innerhalb dieser Region gibt es nur ein Glutamat, welches bei einem Aminosäuresequenzvergleich verschiedener MCPs als hochkonserviert beschrieben werden konnte (AS325) (Daten nicht gezeigt). Bei MtfA liegt an dieser Position ein Arginin (rot markiert). Daher scheint diese Aminosäure für eine potentielle Methylierung nicht in Frage zu kommen. Dennoch ist auffällig, dass in dem oben gezeigten Aminosäuresequenzvergleich sieben Glutamat bzw. Glutaminreste übereinstimmen. Daher könnte dieser dennoch einen Hinweis darauf geben, dass verschiedene Glutamat- oder Glutaminreste des MtfAs ebenfalls methyliert werden könnten. Aufgrund dieser Hinweise sollten die folgenden Experimente klären, ob ein Einfluss von MtfA auf die Chemotaxis in *E.coli* besteht.

### 3.2.1.1 Versuche zum Einfluss des Proteins MtfA auf das PTS und MCP Chemotaxisverhalten von *E.coli* K-12

Um einen möglichen Eindruck über den Einfluss von MtfA auf die Chemotaxis zu bekommen, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Versuche zur PTS- und MCP-Chemotaxis durchgeführt. Zunächst wurde getestet, ob eine Überexpression von MtfA einen Einfluss auf die MCP- bzw. die PTS-vermittelte Chemotaxis hat. Hierzu wurde das Plasmid pTMByeeI und der Kontrollvektor pTM30 in die Stämme LJ110 (MCP-Chemotaxis) und JWL184-1 (PTS-Chemotaxis) transformiert. Der Stamm JWL184-1 wurde ursprünglich in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Lengeler selektioniert und zeichnet sich durch eine besonders gute positive PTS-Chemotaxis aus. Welcher Faktor zu dieser Veränderung geführt hat, ist unklar. Hierbei könnte es sich im Vergleich zum Stamm LJ110 um eine andere Expression von HPr, EI oder CheA handeln. Dadurch wären die stöchiometrischen Verhältnisse dieser Proteine zueinander verändert. Die Stämme wurden anschließend in selektiven Vollmedium-Flüssigkulturen angeimpft und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10µl punktuell auf Che-LT Platten mit Ampicillin gegeben. Bei diesen Platten handelt es sich um Vollmediumplatten, die eine geringere Konzentration an Agar aufweisen als herkömmliche Vollmediumplatten und somit das Schwärmen der Bakterien erlauben. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Morgen wurde jeweils der Durchmesser des Schwärmkreises ermittelt. Diese Versuche wurden sowohl auf Platten ohne, also auch mit IPTG durchgeführt. Durch IPTG wurden die plasmidkodierten Proteine überproduziert. Wenn MtfA einen Einfluss auf die MCP- oder PTS- Chemotaxis hat, so sollte ein Unterschied zwischen den induzierten und uninduzierten Verhältnissen erkennbar sein. Diese Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt und die Schwärmdurchmesser der Proben mit den pTMByeeI Plasmiden wurden jeweils in eine prozentuale Relation zu den Größen der Proben mit dem pTM30 Plasmid gesetzt. Hierzu wurde bei jedem Versuch der Durchmesser der Kontrollprobe auf 100% gesetzt und der sich daraus ergebende Anteil von der pTMByeeI Probe berechnet. Aus der Summe der Versuche wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung errechnet. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.2 dargestellt. Des weiteren wurde mittels P1 Transduktion der Stamm JAS1 hergestellt. Hierbei handelt es sich um den *E.coli* Stamm LJ110 mit einer Transposoninsertion im *mtfA*-Gen. Diese wurde ebenfalls im Vergleich zum LJ110 Wildtyp auf Che-LT Platten getestet und das Verhältnis wie oben beschrieben berechnet. Die Ergebnisse sind ebenfalls in dem unten gezeigten Diagramm dargestellt.



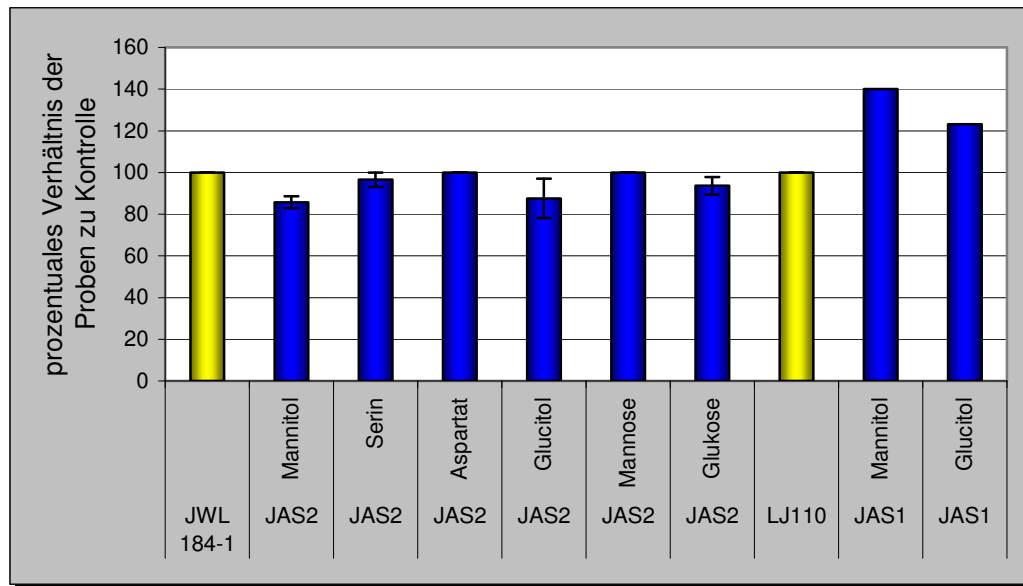
**Abb.3.2.2 Auswertung der Vollmedium Chemotaxisversuche.**

Die Stämme LJ110 oder JWL184-1 wurden jeweils mit den Plasmiden pTM30 (Kontrolle) oder pTMByeel transformiert. Anschließend wurden ca. 10μl einer Flüssigkulturprobe punktförmig auf den Agar gegeben. Nach einer ca. 12 stündigen Inkubation bei 37°C wurden die jeweiligen Schwärmdurchmesser gemessen. Der Durchmesser der pTMByeel Proben wurde jeweils in prozentuale Relation zu den Kontrollproben (pTM30) gesetzt. Die Zahlen bezeichnen die jeweilige IPTG Konzentration in den Platten. Der Stamm JAS1 ist ein *MtfA*<sup>-</sup> Stamm und wurde ebenfalls in Relation zur Wildtypkontrolle gesetzt.

Wie in der Abbildung 3.2.2 zu sehen ist, zeigt das *MtfA* unter nicht induzierten Bedingungen keinen Einfluss auf das Schwärmverhalten im Stammhintergrund LJ110. Erst bei einer maximalen Überproduktion mit 500μM IPTG war eine Reduktion des Schwärmdurchmessers um ca. 10% zu verzeichnen. Die Ergebnisse der *MtfA* Deletion zeigten, dass hier ein um ca. 30% vermindertes Schwärmverhalten zu sehen war. Daher scheint die *mtfA*-Deletion den gleichen Effekt wie eine Überproduktion zu haben.

In Bezug auf die Chemotaxis im Stammhintergrund JWL184-1 sahen die Ergebnisse etwas anders aus. Hier lag ein effektiveres Schwärmverhalten vor, wenn das Protein nicht überexprimiert wurde. Bei einer Überproduktion entsprach das Schwärmverhalten der Kontrolle. Daher deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass *MtfA* eine Auswirkung auf die MCP Chemotaxis von *E.coli* hat.

Des Weiteren wurden Versuche zur PTS Chemotaxis durchgeführt. Hierzu wurde auch in den Stamm JWL184-1 mittels P1 Transduktion eine Transposoninsertion in das Gen *mtfA* eingeführt. Der so entstandene Stamm wurde JAS2 genannt. Die hier verwendeten Deletionsstämme JAS1 und JAS2 sowie die entsprechenden Wildtypstämme wurden in flüssigem Minimalmedium mit B1, Arginin, Methionin und Histidin mit 0,2% CAA angezogen, anschließend in Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen. Danach wurden wiederum jeweils 10μl auf MM Chemotaxisplatten (Chemotaxis-Schwärmplatten) mit verschiedenen Kohlenstoffquellen gegeben. Anschließend wurden diese über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen die Schwärmdurchmesser ausgemessen.



**Abb.3.2.3 zeigt das Schwärmverhalten der Deletionsstämme JAS2 und JAS1 im Verhältnis zu der entsprechenden Wildtypkontrolle (in gelb) JWL184-1 und LJ110.**

Der Schwärmdurchmesser des Wildtyps wurde jeweils auf 100% gesetzt und die Proben dazu in Relation gebracht. Die gezeigten Balken zeigen Mittelwerte aus mindestens zwei Messungen (für alle Proben JAS2), fünf Messungen für Glucitol und Mannitol und die Ergebnisse für JAS1 aus einer Messung.

Der Deletionsstamm JAS2 zeigte beim Wachstum auf den PTS Substraten Glucitol, Mannitol und Glukose eine leicht verminderte Schwärmweite. Diese war in Bezug auf Mannitol und Glucitol signifikant um 10% im Gegensatz zum Wildtyp reduziert, was darauf hindeutet, dass MtfA einen Einfluss auf das PTS Chemotaxisverhalten haben könnte. Im Fall der Glukose als Kohlenstoffquelle ließ sich ein um ca. 5% vermindertes Schwärmverhalten feststellen. Glukose ist jedoch sowohl ein Substrat für die MCP- also auch für die PTS- Chemotaxis.

Beim Wachstum auf den anderen gezeigten Kohlenstoffquellen zeigten sich keinerlei Abweichungen zum Schwärmverhalten des Wildtyps.

In Bezug auf die Chemotaxis von LJ110 und JAS1 zeigte sich, dass eine MtfA-Deletion eine erhöhte Schwärbereitschaft auf MM Serin bzw. MM Aspartat hervorruft. Diese Ergebnisse stehen konträr zu denen aus den Vollmediumversuchen. Um an dieser Stelle genauere Aussagen zu dieser Problematik zu machen, wären weitere Versuche diesbezüglich notwendig gewesen, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

Generell lässt sich ausgehend von den oben gezeigten Versuchen eine geringe Auswirkung von MtfA auf das MCP- und PTS-Chemotaxisverhalten postulieren. Da es sich jedoch um schwache Auswirkungen handelte, wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weiterführenden Experimente durchgeführt. In diesem Zusammenhang wäre es z.B. interessant gewesen, die „Doppelbandenproblematik“ zu untersuchen. Da die Doppelbande von MtfA im Western-Blot jedoch nicht stabil reproduzierbar war, konnten keinerlei Versuche bezüglich der potentiellen Methylierung von



MtfA durchgeführt werden. Ein möglicher Versuchsansatz wäre beispielsweise zu testen, ob die Doppelbande in einem CheR/CheB negativen Stammhintergrund nicht mehr vorhanden wäre. Generell könnten die unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die verwendeten Stämme LJ110 und JWL184-1 auf der für den Stamm JWL184-1 postulierten veränderten Stöchiometrie zurückzuführen sein. MtfA hat über die Regulation des Repressors Mlc einen Einfluss auf das Expressionsniveau von *ptsG*. Die Menge an PtsG wiederum hat einen erheblichen Einfluss auf den Phosphorylierungszustand der allgemeinen PTS Komponenten, wie EI. Dieses wiederum hat abhängig vom Phosphorylierungszustand einen Einfluss auf CheA. Sind die stöchiometrischen Verhältnisse der einzelnen PTS Komponenten verändert, so ist demnach auch ein verändertes Chemotaxisverhalten in einer MtfA-Mutante zu erwarten, was die oben gezeigten Ergebnisse erklären könnte. Darüber hinaus liegt der übereinstimmende Bereich von MtfA und dem MCP an der Spitze des MCPs. Dieser ist v.a. für die Wechselwirkung mit CheA und CheW verantwortlich. Außerdem konnte für diesen Bereich gezeigt werden, dass er für die Trimerisierung der MCP-Dimere verantwortlich ist. Einige der hierfür verantwortlichen AS sind auch in MtfA vorhanden (z.B. I214; V228) andere wiederum fehlen (3). Daher könnte es sich hierbei um einen Bereich handeln, der neben dem in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Leuzinreißverschluss für die Dimerisierung verantwortlich ist. Nähere Untersuchungen hierzu wurden jedoch nicht durchgeführt.

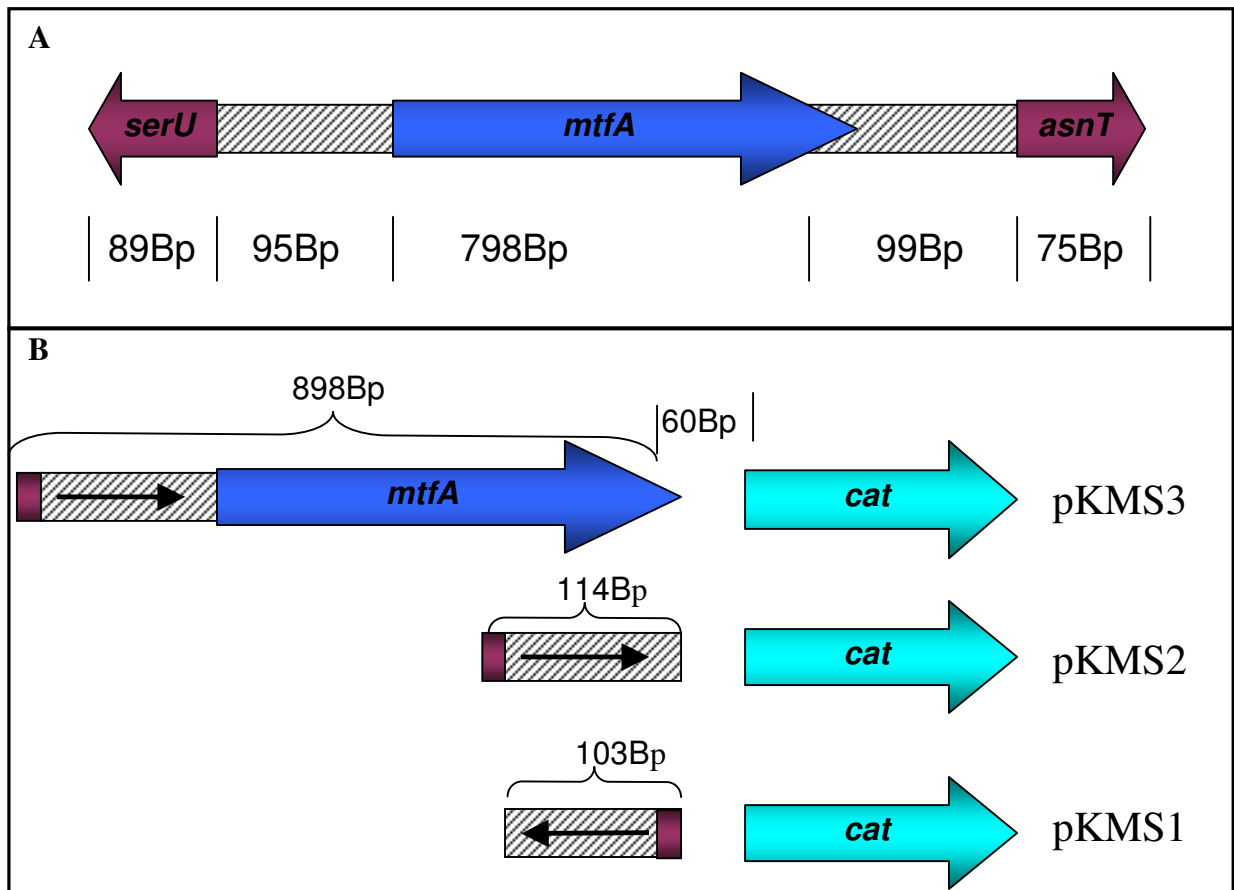
### 3.2.2 Untersuchungen zu den Promotoreigenschaften des Gens *mtfA*

Im Rahmen der Frage „Wie wird der Regulator MtfA reguliert“ wurde mit Hilfe der folgenden Experimente versucht, nähere Erkenntnisse über die Lokalisation sowie die Stärke des *mtfA* Promotors zu gewinnen. Das *mtfA*-Gen ist stromaufwärts durch eine 95 Basenpaar lange intergenische Region von dem Gen *serU* getrennt. *SerU* kodiert für eine Serin-tRNA und liegt in der entgegengesetzten Leserichtung zu *mtfA*. Daher ist es recht wahrscheinlich, dass der Promotor für *mtfA* in dem 95 Basenpaar intergenischen Bereich zwischen *serU* und *mtfA* zu finden ist. Stromabwärts von *mtfA* liegt in einem Abstand von 99 Basenpaaren das Gen *asnT*. Dieses liegt in gleicher Orientierung wie *mtfA* und kodiert für eine Asparagin-tRNA (vgl. Abbildung 3.2.4 A). Mit Hilfe der Datenbank „fruitfly“ können sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Promotorsequenzanalysen durchgeführt werden. Eine Promotoranalyse mit Hilfe dieser Datenbank ergab sowohl für den intergenischen Bereich als auch für das gesamte *mtfA* Gen keine signifikanten Übereinstimmungen mit bekannten prokaryotischen Promotorsequenzen für die 5'-

3' Leserichtung. Um einen experimentellen Eindruck über die Promotorstärke des *mtfA* Gens zu bekommen, wurden mit Hilfe des Plasmides pKK232-8 *mtfA* Promotoranalysen durchgeführt. Das Plasmid pKK232-8 trägt neben der zur Selektion verwendeten Ampicillinresistenz eine promotorloses *cat* Gen (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase). Dieses ermöglicht das Einfügen eines unbekannt Promotors vor das *cat* Gen und anhand der Toleranz gegenüber verschiedenen Mengen an Chloramphenicol kann man einen Eindruck über die Promotorstärke bekommen.

### 3.2.2.1 Klonierung der Vektoren

Stromaufwärts vom *mtfA* Gen liegt im *E.coli* Genom das Gen *serU* in gegensätzlicher Orientierung. Stromabwärts liegt das ebenfalls für eine tRNA kodierenden *asnT* in der gleichen Orientierung wie *mtfA*. Die Gene werden jeweils durch eine intergenische Region voneinander getrennt (vgl. Abbildung 3.2.4 A). Für die folgenden Experimente wurden drei verschiedene Vektoren ausgehend vom pKK232-8 Vektor hergestellt. Dieser Vektor trägt neben seiner zur Selektion verwendeten Ampicillinresistenz ein promotorloses *cat*-Gen. Durch Klonierung verschiedener Nukleotidsequenzen vor dieses Gen können über Chloramphenicolresistenzversuche Aussagen über potentielle Promotoren und deren Stärke gemacht werden. Die Klonierung ist in der Abbildung 3.2.4 B zusammenfassend dargestellt. Zum einen wurde das vollständige *mtfA* inklusive der stromaufwärts liegenden intergenischen Region vor das *cat* Gen kloniert (pKMS3). Außerdem wurde die stromaufwärts liegende intergenische Region allein vor das Reporter gen kloniert (pKMS2). Als Negativkontrolle wurde die intergenische Sequenz zwischen *serU* und *mtfA* umgekehrt zur Leserichtung des *mtfA*-Gens vor das *cat*-Gen kloniert (pKMS1).



**Abb.3.2.4 A** Darstellung des *mtfA*-Gens sowie seiner benachbarten Gene im *E. coli* K-12 Genom.

Die Gene *serU*, *mtfA* und *asnT* sind jeweils durch eine intergenische Region (gestrichelt) voneinander getrennt. Das Gen *serU* liegt in gegensätzlicher Orientierung zu *mtfA* und *asnT*.

**B: Klonierung der Vektoren pKMS1-3**

Der Vektor **pKMS3** trägt die vollständige *mtfA*-Sequenz inklusive des intergenischen Bereiches, sowie die ersten sechs Basenpaare des *serU*-Gens. Hierzu wurde mit Hilfe der Primer YeeIprom+/- und mit genomischer DNA aus *E. coli* K-12 eine PCR durchgeführt. So wurden die Restriktionserkennungsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III eingefügt. Anschließend wurden die PCR-Produkte gereinigt und mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III geschnitten. Der Vektor pKK232-8 wurde ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten und beide Restriktionsansätze wurden über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Gel extrahiert, ligiert und in den Stamm JM109 transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels Restriktionsanalyse überprüft. Die Klonierung des Vektors **pKMS1** wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Hierbei wurden die Primer YeeIpromhind+ und YeeIbam- verwendet. Der Vektor **pKMS2** wurde ausgehend von dem Vektor pKMS3 hergestellt. Hierzu wurde mit Hilfe der Primer YeeIpromkurz+/- eine ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt, um einen *Hind*III Schnitt vor dem *mtfA*-Gen einzufügen. Anschließend wurde das Plasmid mit *Hind*III geschnitten und danach über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt. Das ausgeschnittene MtfA-Fragment wurde von dem übrigen Vektor getrennt und der Vektor anschließend religiert.

### 3.2.2.2. Charakterisierung der Promotoren aus pKMS1-3

Nach erfolgreicher Klonierung der Vektoren pKMS1-3 wurden diese in den *E. coli* Stamm JM109 transformiert und die erhaltenen Transformanten wurden selektiv auf LBo Amp Platten gereinigt. Anschließend wurden jeweils mehrere Einzelkolonien auf LBo Amp Platten mit verschiedenen Konzentrationen an Chloramphenicol ausgestrichen. Zunächst wurde das Chlo-

ramphenicol auf die Platten gespatelt. Da dieses jedoch zu ungleichmässig auf den Platten verteilt war, wurden für weitere Experimente die verschiedenen Chloramphenicolkonzentrationen einzeln in die Platten eingegossen. Es wurden LBo Amp Platten mit Konzentrationen von 2,5µg; 5µg; 10µg; 15µg; 20µg; 25µg und 30µg/ml Chloramphenicol hergestellt. Es wurden jeweils drei Platten pro Konzentration getestet. Die Platten wurden jeweils in acht Sektoren eingeteilt. Als Negativkontrolle wurde der Stamm JM109 mit dem Leervektor pKK232-8, und als Positivkontrolle JM109 mit dem chloramphenicol-resistenten Vektor pSU19 ausgestrichen. In den restlichen sechs Sektoren wurden je sechs verschiedene Einzelkolonien der entsprechenden Vektoren ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen ausgewertet. Hierbei wurde zwischen

1. Wachstum im Patch und als Einzelkolonien → +
2. Wachstum nur im Patch → (+)
3. kein Wachstum → -

unterschieden. Eine Auswertung der Ergebnisse ist in Tabelle 3.2.1 gezeigt:

**Tab.3.2.1 Chloramphenicol Resistenzen der Klone pKMS1-3 sowie der Kontrollen pSU19 und pKK232-8.**

Plasmid im Stamm JM109	Wachstum						
	2,5µg/ml	5µg/ml	10µg/ml	15µg/ml	20µg/ml	25µg/ml	30µg/ml
pKK232-8	+	-	-	-	-	-	-
pSU19	+	+	+	+	+	+	+
pKMS1	+	+	+	+	+	+	+
pKMS2	+	+	(+)	-	-	-	-
pKMS3	+	+	+	(+)	(+)	-	-

Die Ergebnisse zeigten, dass die Positivkontrolle pSU19 bis zur maximal getesteten Chloramphenicolkonzentration von 30µg/ml Resistenz aufwies. Dieses ist ebenso für den Vektor pKMS1 der Fall, welcher die intergenische Region in der 3´-5´Richtung trägt.

Die Negativkontrolle pKK232-8 war in der Lage, nur bei der geringsten Konzentration von 2,5µg/ml Chloramphenicol zu wachsen. Der getestete Vektor pKMS2 mit der intergenischen Region in 5´-3´-Richtung konnte bis zu einer Konzentration von 5µg/ml vollständig und bis zu einer Konzentration von 10µg/ml Chloramphenicol im Patch wachsen. Der Vektor pKMS3, der zusätzlich zu dieser Region das vollständige *mtfA*-Gen trägt, war in der Lage, bis zu einer Konzentration von 10µg/ml vollständig und bis zu einer Konzentration von 20µg/ml im Patch zu wachsen. Somit geben die oben gezeigten Ergebnisse Aufschluss über die Promotorstärke des *mtfA*-Gens. Der Vektor pKMS2 zeigte im Gegensatz zur Negativkontrolle eine dreifach stärkere Toleranz gegenüber Chloramphenicol. Das entsprechend längere Konstrukt pKMS3 zeigte eine höhere Resistenz. Der dritte Vektor pKMS1 zeigte im Rahmen der getesteten Konzentrationen

eine ebenso große Resistenz wie die Positivkontrolle. Daraus lässt sich ableiten, dass der *mtfA*-Promotor in der intergenischen Region zwischen dem *mtfA* und dem *serU* Gen liegt und es sich eher um einen schwachen Promotor handelt. Die erhöhte Resistenz des pKMS3 Vektors ist gegebenenfalls darauf zurückzuführen, dass innerhalb dieses Genes eventuell Teile des Promotors für das folgende *asnT* Gen liegen könnten. Die erhöhte Resistenz des Klons pKMS1 könnte darauf zurückzuführen sein, dass in der invertierten Sequenz des Promotors für das *serU* Gen zu finden ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gezeigten Versuche darauf hinweisen, dass das *mtfA*-Gen unter der Kontrolle eines relativ schwachen Promotors steht. Hierbei wurde die potentielle Promotorregion im Bereich der 95 Basenpaar großen intergenischen Region zwischen *mtfA* und *serU* untersucht. Über die genaue Lokalisation des Promotors innerhalb dieser Region sowie den Aufbau des Promotors konnten ausgehend von diesen Versuchen, sowie mit Hilfe der Datenbankanalyse keine weiteren Aussagen gemacht werden. Ein schwacher Promotor korreliert mit einer schwachen Konsensusregion der Promotorsequenz.

### **3.2.3 Wachstumskompetitionsversuche zum Vergleich des MtfA-Wildtypstammes LJ200 mit einer isogenen MtfA-Mutante**

Um weiterführende Aussagen über die physiologische Bedeutung von MtfA in Bezug auf verschiedene Wachstumsbedingungen zu erhalten, wurden Wachstumskompetitionsversuche durchgeführt. Mit Hilfe dieser Versuche sollte herausgefunden werden, ob eine MtfA Mutante im Gegensatz zu dem Wildtyp einen Wachstumsvor- oder Nachteil bei der Anzucht mit verschiedenen Wachstumsbedingungen hat. Hierbei wäre somit ein Unterschied beim Wachstum auf Glukose, oder anderen PTS Kohlenhydraten zu vermuten. Des weiteren wäre ein Unterschied beim Wachstum unter Hitzeschockbedingungen oder unter Sauerstofflimitierung denkbar. Diese Hypothesen sollten im Folgenden untersucht werden.

Für die folgenden Versuche wurde der *E.coli* Stamm LJ200 mit einem isogenen *mtfA* Mutationsstamm (LJ110:: $\Delta$ *mtfATn10Kan<sup>R</sup>*=JAS1) wie im Material- und Methodenteil beschrieben (Kapitel 2.4.4.) 1:1 gemischt. Der Stamm LJ200 verfügt im Gegensatz zu dem *E.coli* Wildtypstamm LJ110 über die Sucrose Gene (*csc*) (32) und konnte daher aufgrund seiner Möglichkeit zur Verstoffwechslung von Sucrose auf MacConkey Sucroseplatten (rote Kolonien) von dem Stamm LJM1(weiße Kolonien) unterschieden werden. Anschließend wurden diese Stämme 10 Tage lang

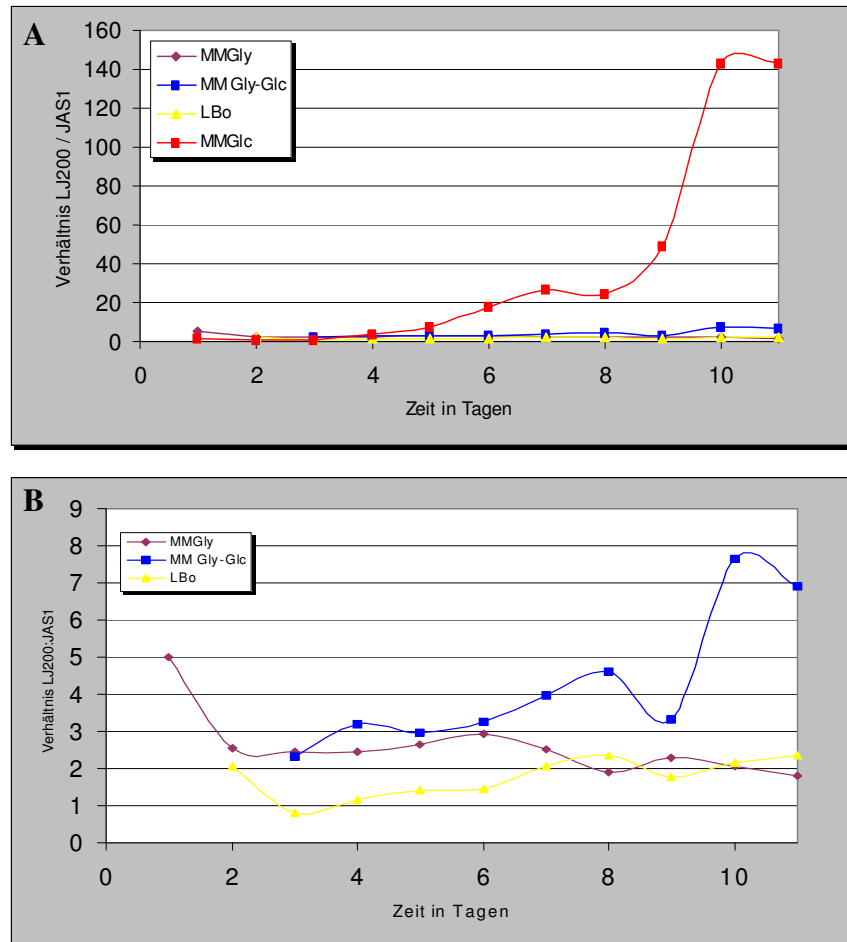
in verschiedenen Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen inkubiert. Die Kulturen wurden jeden Tag frisch in das jeweilige Medium überimpft. Des Weiteren wurde jeden Tag eine Probe entnommen und auf Indikatorplatten zur Unterscheidung zwischen dem Wildtyp und der Mutante ausgestrichen. Die jeweiligen Kolonien wurden ausgezählt und in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Für die reversen Versuche, also die Kopplung der *csc* Gene an die *mtfA*-Deletion wurde zusätzlich der Stamm LJM1 hergestellt. Bei diesem wurde wiederum mittels P1 Transduktion die *mtfA*-Transposoninsertion aus LJB43 in den Stamm LJ200 transduziert. Als Gegenpart hierzu wurde der Stamm LJ110 verwendet.

### 3.2.3.1 Anzucht in unterschiedlichen Medien

Die entsprechenden Stämme wurden 1:1 gemischt und nach erfolgter Anzucht über Nacht jeden Tag in frisches Medium überführt. Zunächst wurde mit der Anzucht in folgenden Medien begonnen:

1. LBo
2. MM Glukose (Glc)
3. MM Glyzerin (Gly)
4. täglicher Wechsel zwischen MM Glukose und MM Glyzerin (Gly-Glc)

Von den entnommenen Proben wurden jeden Tag Verdünnungen hergestellt und auf MacConkey Sucrose Platten ausplattiert. Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurden jeden Tag die roten und weißen Kolonien gezählt und in Relation zueinander gesetzt. Die Auswertung dieses Versuches ist in Abbildung 3.2.5 A/B gezeigt. Der gezeigte Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Da die Anfangsrelationen und Verläufe jedoch aufgrund der experimentellen Vorgehensweise zu unterschiedlich waren, ließen sich diese Werte nicht in einem Diagramm vereinen. Die Tendenzen sahen jedoch in beiden Versuchen gleich aus. Wie das Diagramm zeigt, scheint bei dieser Darstellung nach sechs Tagen bei der Anzucht der Stämme in Minimal Glukose Medium ein deutlicher Wachstumsvorteil für den MtfA Wildtypstamm LJ200 vorzuliegen. Dieser stieg dann nahezu exponentiell an, so dass am Ende fast keine weißen Kolonien mehr auf der MacConkey Sucrose Platte nachzuweisen waren. Um die Kurvenverläufe der anderen drei Proben besser verfolgen zu können, sind diese in Abbildung 3.2.5B noch einmal mit einer anderen Ordinatenkalierung gezeigt, so dass die aufgetretenen Unterschiede besser ersichtlich sind.

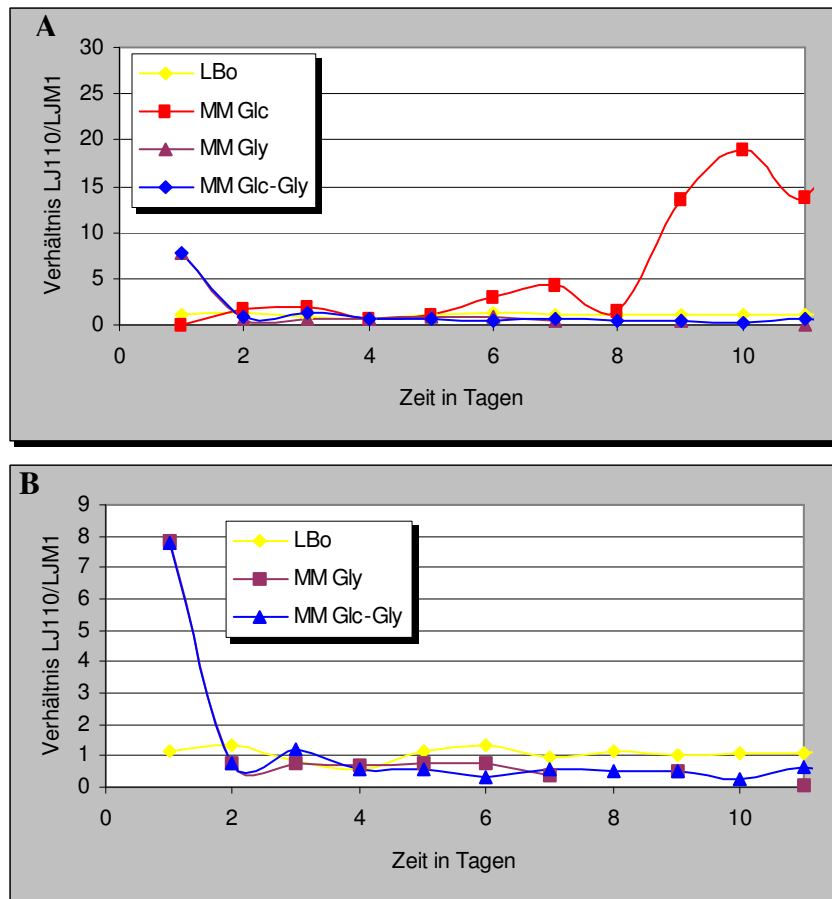


**Abb.3.2.5 zeigt den Wachstumskompetitionsversuch des MtfA-WT Stammes LJ200 im Verhältnis zu JAS1 in Bezug auf verschiedene Anzuchtmedien.**

Die Farben symbolisieren folgende Medien: MM Glycerin (violett), der Wechsel zwischen Glycerin und Glukose (blau), MM Glukose und dem Vollmedium LBo (gelb). Abbildung **A** zeigt alle Ergebnisse, Abbildung **B** zeigt nur die Ergebnisse ohne die MM Glukose Proben mit einer veränderten Ordinaten-Skalierung.

Die Detaildarstellung der anderen Medien zeigt, dass hier ebenfalls kleinere Unterschiede zu verzeichnen waren. Die LBo Kurve steigt etwas, wohingegen die MM Glycerinkurve von einem Ausgangsverhältnis von 5 auf ca. 1,8 fällt. Dieses bedeutet einen, wenn auch geringen, Wachstumsvorteil für den MtfA-Mutationsstamm JAS1. Die blaue Kurve zeigt die Verhältnisse der Stämme an, wenn das Medium jeden Tag zwischen MM Glycerin und MM Glukose gewechselt wurde. Hierbei war zu beobachten, dass das Verhältnis an den Tagen, an denen die Anzucht in Glukose erfolgte (Tage:2,4,6,8,10) sich etwas zugunsten des MtfA-Wildtyps verschiebt. Durch die Zugabe von Glycerin nahm die positive Selektion für den Wildtyp wieder ab. Hier deutet sich ein Selektionsvorteil für die MtfA-Mutante an. Die Tage eins und zwei fehlen in der Darstellung für die blaue Kurve. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass an diesen Tagen nur sehr wenige Kolonien auf der Platte zu sehen waren. Daher waren an diesen Tagen keine statistisch relevanten Auswertungen möglich und die Werte wurden daher nicht aufgeführt. Zur Kontrolle wurde der gleiche Versuch mit den Stämmen LJ110 und LJM1 durchgeführt. Hierbei ist die

MtfA-Mutation an den Sucrosemarker (*csc*) gekoppelt. Somit sollte ausgeschlossen werden, dass die *csc* Gene einen Einfluss auf die Wettbewerbsversuche haben. Diese Versuche wurden wiederum zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und ergaben tendenziell die gleichen Ergebnisse wie in Abbildung 3.2.5 gezeigt.



**Abb.3.2.6** Konkurrenz des WT MtfA Stammes LJ110 mit dem MtfA-Deletionsstamm LJM1.

Gezeigt sind jeweils die Verhältnisse des Stammes LJ110 zu LJM1. Abbildung A zeigt alle Ergebnisse und Abbildung B zeigt die Ergebnisse ohne die MM Glukose Ergebnisse mit veränderter Ordinaten Skalierung.

Auch hier war nach sechs Tagen beginnend eine deutliche Selektion für den MtfA-Wildtypstamm LJ110 zu sehen. Diese stieg ebenfalls exponentiell an, jedoch nicht so hoch wie in der oben gezeigten Abbildung 3.2.5A. Diese Schwankungen sind aber auf die Anzahl der ausgezählten Kolonien zurückzuführen. Bei den ersten Versuchen konnten am Ende nur noch ein oder zwei weiße Kolonien nachgewiesen werden, weshalb das Verhältnis hier sehr hoch ist. Die Ergebnisse der anderen Anzuchtbedingungen sahen sehr ähnlich aus. In Bezug auf den Mediumwechsel zwischen Glycerin und Glukose war hier allerdings nicht so ein klarer Anstieg (an geraden Tagen) und Abfall der Kurve (an ungeraden Tagen) zu sehen. Da es sich bei den oben gezeigten Ergebnissen auch nur um geringe Schwankungen handelte, sind diese vielleicht rein zufällig an den Tagen entstanden. Da durch diese reversen Versuche gezeigt werden konnte, dass es keine Kopplung der Ergebnisse an die *csc* Gene gibt, konnte davon ausgegangen werden, dass

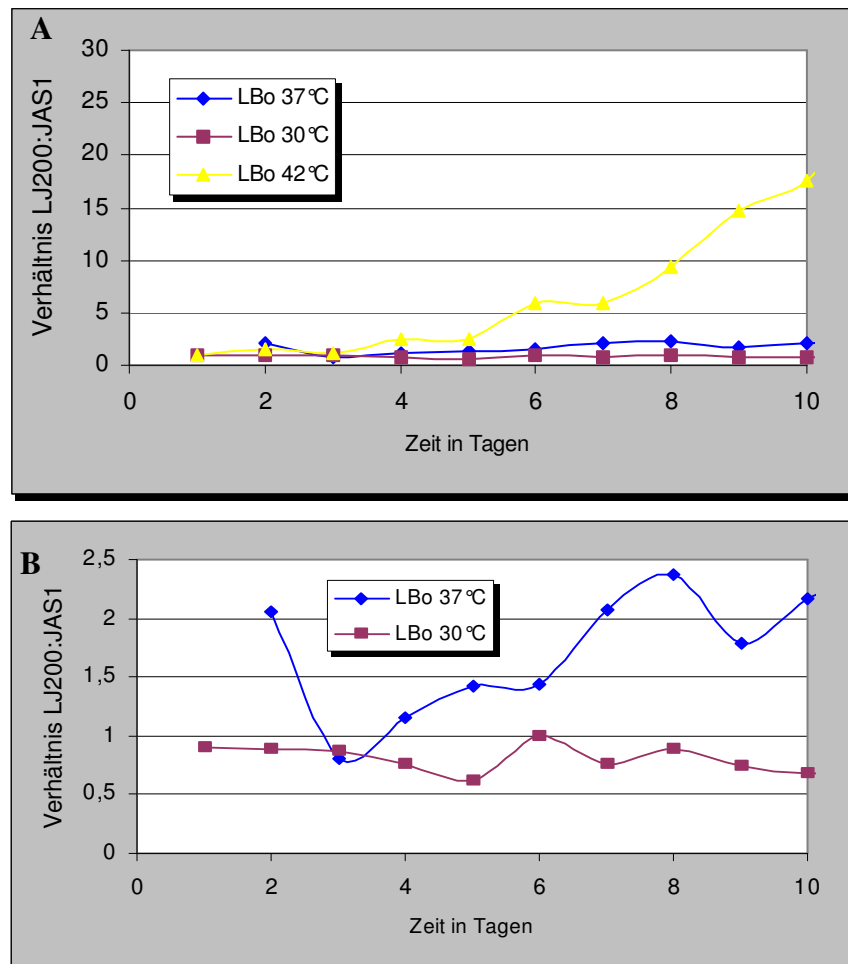


die Versuche mit den Stämmen LJ200 und JAS1 aussagekräftig sind und die erhaltenen Ergebnisse auf den einzigen weiteren Unterschied, das MtfA, in den ansonsten isogenen Stämmen zurückzuführen sind.

### 3.2.3.2 Anzucht unter verschiedenen Temperaturbedingungen

#### 3.2.3.2.1 Vollmedium

Des weiteren wurde die Auswirkung der Temperatur auf das Verhältnis des MtfA-Wildtypstammes in Relation zu der Deletionsmutante untersucht. Hierzu wurde ausgehend von jeweils einer Einzelkolonie der beiden Stämme Übernachtskulturen in Vollmedium hergestellt. Diese wurden am nächsten Morgen 1:1 gemischt und in diesem Fall wurden die Kulturen bei 30°C und 37°C im Brutraum und bei 42°C im Wasserbad über einen Zeitraum von 10 Tagen kultiviert. Die Kulturen wurden wiederum jeden Tag in frisches Medium überimpft. Es wurden jeden Tag Proben entnommen, Verdünnungen hergestellt und auf MacConkey Sucrose Platten ausplattiert. Die Ergebnisse der Versuche sind in den folgenden Diagrammen gezeigt.



**Abb.3.2.7 zeigt Wachstumskompetitionsversuche in Bezug auf die Temperatur.**

Alle Kulturen wurden im Vollmedium LBo bei 30°C (violett), 37°C (blau) oder 42°C (gelb) angezogen. **A** zeigt alle drei Temperaturen in einem Diagramm. Damit die Ergebnisse bei 30°C und 37°C besser zu sehen sind wurde in **B** wiederum die Skalierung der Y-Achse verändert.

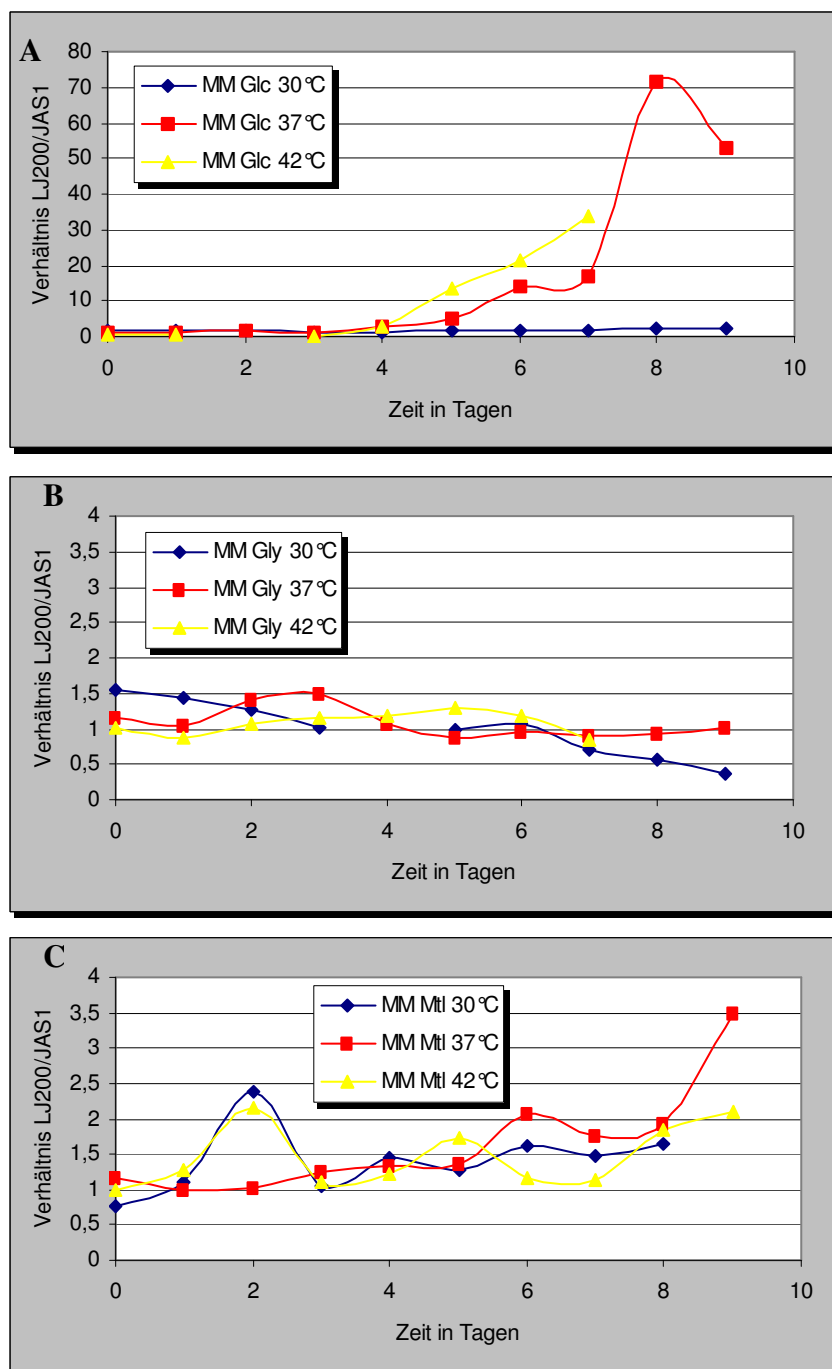
Abbildung 3.2.7A zeigt alle drei Ergebnisse in einem Diagramm. Es ist auffällig, dass sich das Verhältnis vom MtfA-WT Stamm zu dem MtfA-Mutationsstamm bei einer Anzucht bei 42°C deutlich zugunsten des Wildtypes veränderte. Bei den beiden anderen Temperaturen konnte keine Selektion in die eine oder andere Richtung beobachtet werden. Daher sind diese Ergebnisse zur genaueren Analyse in Abbildung B erneut dargestellt. Hierzu wurde wiederum die Skalierung der Ordinate verändert. Die Kurve der Proben, die bei 37°C kultiviert wurden, zeigte, dass zu Beginn des Versuches ein Verhältnis von 2:1 vorlag und daher mit einer entsprechend erhöhten Menge des Wildtyp-MtfA Stammes LJ200 gestartet wurde. Diese sank zunächst ab, stieg dann aber wieder auf diesen Wert an. Hierbei handelt es sich sicherlich um Schwankungen, die vermutlich auf die Verdünnung der Zellen zurückzuführen sind. In Bezug auf die Kultivierung bei 30°C ist eine geringe, kontinuierliche Abnahme der roten MtfA Wildtypkolonien zu beobachten. Dieses könnte auf einen minimalen Selektionsvorteil für den MtfA-Mutationsstamm JAS1 oder aber ebenfalls auf die Schwankungen in Bezug auf die Menge der ausgezählten Kolonien zurückgeführt werden.

**3.2.3.2.2 Minimalmedien**

Ausgehend von den oben gezeigten Versuchen wurde im Folgenden untersucht, ob es beim Wachstum auf verschiedenen Kohlenhydraten und bei gleichzeitiger Temperaturveränderung zu einer generellen Selektion für den MtfA Wildtyp kommt. Wenn dieses der Fall wäre, so hätte das Protein MtfA vermutlich eine generelle Bedeutung in Bezug auf die Physiologie der Temperaturerhöhung. Wenn es jedoch kohlenhydratspezifisch ist, so gibt es gegebenenfalls eine Kopplung zwischen der Kohlenhydratquelle und der Temperatur. Die Temperaturversuche wurden wie oben angegeben in diesem Fall jedoch mit Minimalmedium mit folgenden Kohlenhydratquellen durchgeführt:

1. Glukose (Glc)
2. Glyzerin (Gly)
3. Mannitol (Mtl)

Mannitol stellt neben der Glukose ein weiteres PTS Kohlenhydrat dar. Glyzerin hingegen ist ein Nicht-PTS Kohlenhydrat und konnte daher in diesem Zusammenhang als neutrale C-Quelle bezeichnet werden. Die Ergebnisse in Bezug auf das Verhalten auf MM Glukose zeigte einen deutlichen Selektionsvorteil für den WT Stamm bei 37°C. Dieser konnte bereits in Abbildung 3.2.5 und 3.2.6 gezeigt werden. Der Anstieg bei 42°C konnte auch im Vollmedium (vgl. Abb.3.2.7) beobachtet werden. Da die Zellen nach dem siebten Tag nicht mehr weiter gewachsen sind, bricht die 42°C Kurve an dieser Stelle ab. Da jedoch bis hierher schon eine deutlich Tendenz für den Selektionsvorteil des WT Stammes gezeigt werden konnte, wurden die Versuche nicht wiederholt.



**Abb.3.2.8 zeigt die Ergebnisse der Temperatur Wettbewerbsversuche mit Minimalmedium an.**

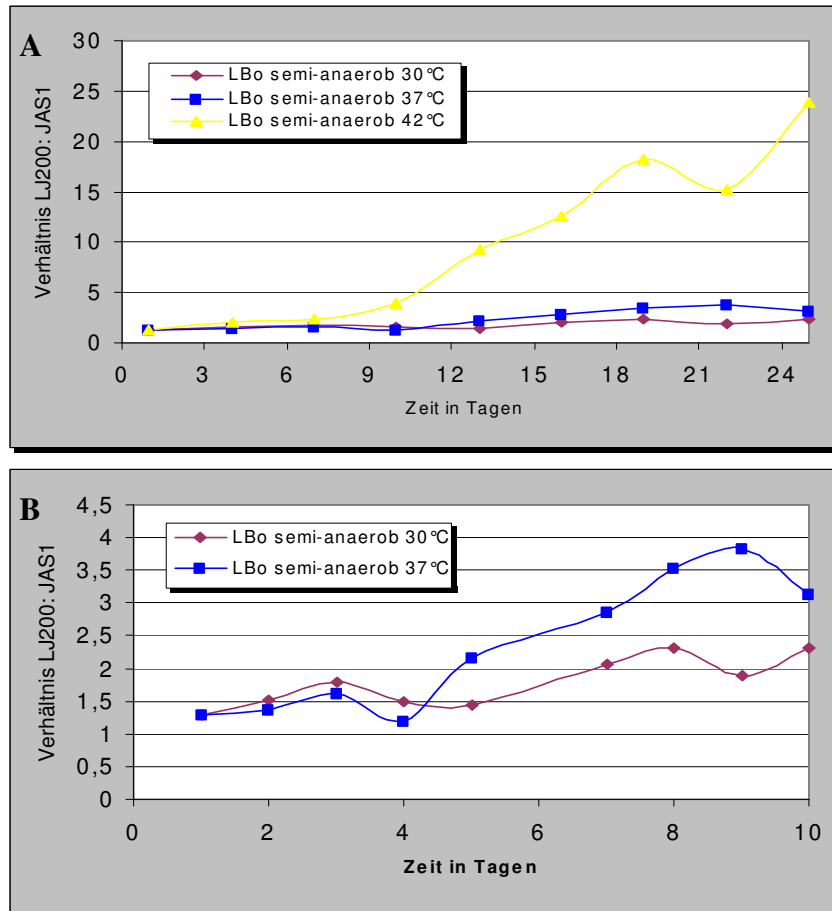
A zeigt MM Glukose (Glc) Ergebnisse. B zeigt MM Glycerin (Gly) Ergebnisse und C zeigt die MM Mannitol (Mtl) Ergebnisse an. Bei allen drei Versuchen wurden die Zellen neun Tage lang kultiviert.

Die MM Glycerinkurve in Abb.3.2.8 B zeigt bei den Temperaturen 37°C und 42°C neben der normalen Schwankungen keine großen Auffälligkeiten. Die 30°C Probe hingegen fällt innerhalb der neun Testtage von einem 1,5fachen Verhältnis kontinuierlich auf ein 0,3faches Verhältnis ab. Daher könnte es sich hierbei um einen geringen Selektionsvorteil für die MtfA Deletionsmutante handeln. Bei der Versuchsreihe mit MM Mannitol Medium sind ebenfalls Schwankungen in Bezug auf die 30°C und 42°C Proben zu beobachten. In Bezug auf die 37°C Probe ist hier ein kontinuierlicher Anstieg von einem Verhältnis von 1 auf 3,5 innerhalb der neun Versuchstage zu verzeichnen. Hierbei könnte es sich ebenfalls um eine geringe Selektion für einen MtfA Wildtyp handeln. Da diese Schwankungen jedoch auch auf Messungenauigkeiten bzw. die Anzahl der ausgezählten Kolonien zurückzuführen sein könnten, ist es schwierig hier genaue Aussagen zu treffen.

### 3.2.3.3 Anzucht unter Sauerstofflimitierung

Als weiterer physiologischer Faktor wurde der Entzug von Sauerstoff getestet. Hierbei wurden die Stämme wiederum 1:1 in Vollmedium bei verschiedenen Temperaturen angezogen. Zusätzlich wurden die Kulturen nun nicht mehr geschüttelt und mit Paraffinöl überschichtet. Da diese Versuche aber nicht unter absolut luftundurchlässigen Bedingungen, wie sie z.B. in einem Anaerobtopf vorliegen würden, angezogen wurden, wurden diese Bedingungen als „semi-anaerob“ bezeichnet.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.2.9 zeigen ähnliche Ergebnisse wie die vorher beschriebenen Temperaturergebnisse. Auch hier konnte ein Anstieg, also eine Selektion für den MtfA-Wildtypstamm bei 42°C beobachtet werden. Die beiden anderen Werte zeigten wiederum nur geringe Schwankungen, die auf Messungenauigkeiten zurückzuführen sind. Daher zeigte dieser Versuch, dass der Faktor Sauerstofflimitierung keinerlei Wachstumsvorteile für den MtfA Wildtyp oder den Deletionsstamm zeigte. Daher ist aufgrund dieser Ergebnisse davon auszugehen, dass MtfA keine Rolle in Bezug auf die Physiologie der Sauerstofflimitation spielt.



**Abb.3.2.9 zeigt die Wachstumskompetitionsversuche unter „semi-anaeroben“ Bedingungen.**

Im Gegensatz zu den anderen Kultivierungsbedingungen wiesen diese Kulturen aufgrund der Sauerstofflimitierung eine geringe Generationszeit auf. Daher wurden hier nur alle drei Tage Proben genommen und das Medium gewechselt. Abbildung A zeigt alle drei Proben und Abbildung B zeigt nur die 30°C und 37°C Proben mit einer veränderten Y-Achsen Skalierung.

Zusammenfassend zeigten die hier aufgeführten Wachstumskompetitionsversuche, dass es eine Selektion für einen MtfA-Wildtypstamm bei dem Wachstum auf MM Glukose Medium, sowie bei Wachstum unter erhöhten Temperaturbedingungen bei 42°C gibt. Die Selektion bei einer erhöhten Temperatur scheint ebenfalls kohlenhydratspezifisch und nicht universell zu sein. Dieses deutet auf die physiologische Funktionalität von MtfA in Bezug auf einen Temperaturanstieg auf 42°C hin. Eine Funktion beim Wachstums auf MM Glycerin Medium, unter Sauerstofflimitierung oder bei erniedrigten Temperaturen von 30°C konnte hier nicht eindeutig beobachtet werden. Ebenso konnte kein Effekt auf das PTS Kohlenhydrat Mannitol festgestellt werden.

### 3.2.4 Nachweis der Genexpression sowie der Proteinmenge von MtfA unter verschiedenen Wachstumsbedingungen in den Stammhintergründen K-12 und LJ110

Im Folgenden ergab sich die Fragestellung, ob *mtfA* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen unterschiedlich stark exprimiert wird und ob die *mtfA*-mRNA einer posttranskriptionellen Regulation unterliegt. Hierzu wurden zunächst in Vorversuchen im Rahmen des Großpraktikums von A. Göhler die MtfA-Mengen ausgehend vom Stammhintergrund K-12 bei der Anzucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen mittels Western-Blot analysiert.

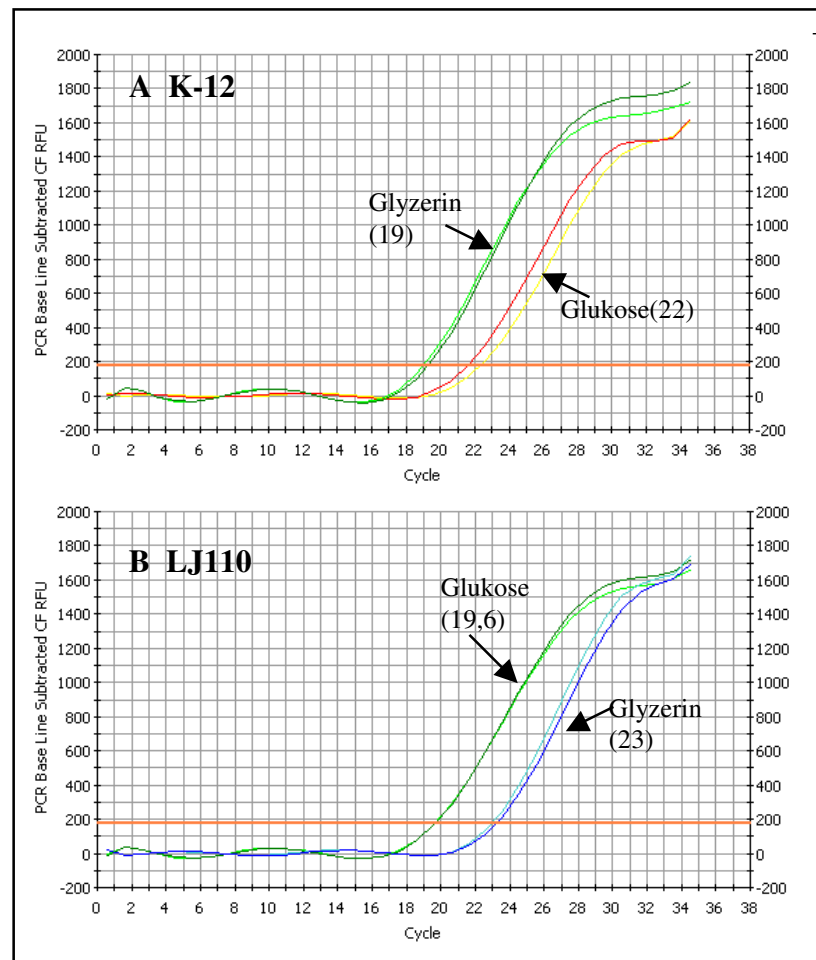
Hierbei wurden die Kohlenstoffquellen Glukose und Mannitol als PTS Substrate, sowie Glycerin, Laktose, Succinat und Arabinose als nicht PTS Kohlenstoffquellen jeweils in Minimalmedium als einzige Kohlenstoffquelle getestet. Die Ergebnisse zeigten für die beiden PTS Substrate Glukose und Mannitol keinen Unterschied in der nachgewiesenen MtfA-Menge an. Bei den getesteten Kohlenstoffquellen Laktose, Arabinose und Succinat hingegen konnte eine zunehmende MtfA-Menge im Western-Blot nachgewiesen werden. Succinat stellt eine sehr schlechte Kohlenstoffquelle dar und zeigte die höchste MtfA-Menge im Western-Blot. Generell ließ sich eine stetig zunehmende Menge an MtfA nachweisen, je „schlechter“ die zur Verfügung stehende Kohlenstoffquelle war (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche zeigten auf Proteinebene einen deutlichen Unterschied und daher bereits einen vielversprechenden Ansatz zur Klärung der Frage „Wie wird der Regulator MtfA reguliert?“. Aufgrund der erfolgreichen Optimierung der RT-RT PCR im folgenden Kapitel 3.2.5 wurden weiterführende Studien mit Hilfe dieser Methode zur Klärung der transkriptionellen Expression von *mtfA* durchgeführt. Mit Hilfe von Western-Blots wurden anschließend Studien zum Nachweis der potentiellen Regulation auf der posttranskriptionellen Ebene durchgeführt. Darüber hinaus sollte mit den folgenden Versuchen geklärt werden, ob es einen Unterschied in der Expression bzw. Regulation von MtfA in den *E.coli* Wildtypstämmen K-12 und LJ110 gibt.

Da in den folgenden RT-RT PCR und Western-Blot Versuchen mit vergleichbaren Zellzahlen gearbeitet werden sollte, wurden für diese die Kohlenstoffquellen Glukose und Glycerin ausgewählt. Bei diesen ließ sich in den oben erwähnten Versuchen ebenfalls ein deutlicher Unterschied in Bezug auf die MtfA-Mengen im Western-Blot erkennen (größere Menge an MtfA beim Wachstum auf Glycerin). Im Folgenden wurden die Stämme K-12 und LJ110 jeweils in Minimalmedium mit Glukose und Glycerin angezogen und bei einer  $OD_{420}=1$  geerntet. Hierbei fiel auf, dass die Kulturen des Stammes LJ110 eine im Gegensatz zu K-12 verlängerte Generationszeit aufwiesen. Hierbei wurden jeweils 1ml Zellen für einen Western-Blot und 1ml der Zellen für

die RT-RT PCR eingesetzt. Somit war gewährleistet, dass die Expressionsnachweise auf mRNA- und Proteinlevel auf die gleiche Kultur zurückzuführen und damit direkt vergleichbar waren.

### 3.2.4.1 Analyse der *mtfA* Expression mittels RT-RT PCR

Die RT-RT PCR zur Analyse der Expression von *mtfA* wurde mit Hilfe der Primer YeeIRT+ und YeeI- durchgeführt. Die PCR Bedingungen mit diesen Primern wurden im Rahmen der Diplomarbeit von E. Klang (41) optimiert und die ermittelten Bedingungen wurden für diese Arbeit übernommen. Daher wurde eine „Annealing“-Temperatur von 65°C und 35 Zyklen verwendet. Die Ergebnisse der vergleichenden RT-RT PCR zwischen den Stämmen LJ110 und K-12 sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.



**Abb.3.2.10 Ergebnisse der RT-RT PCR der *mtfA* Expression.**

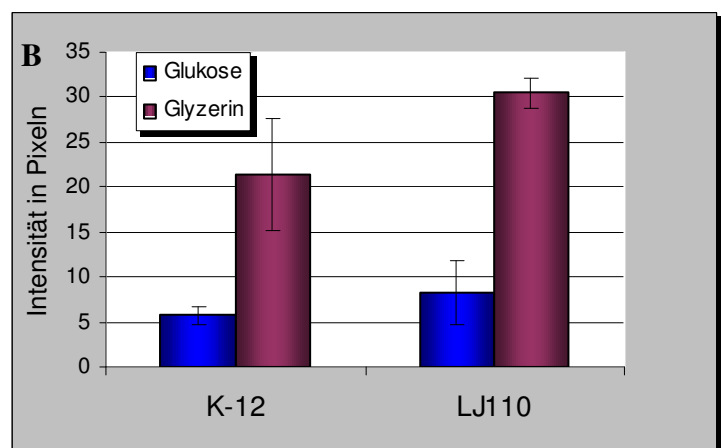
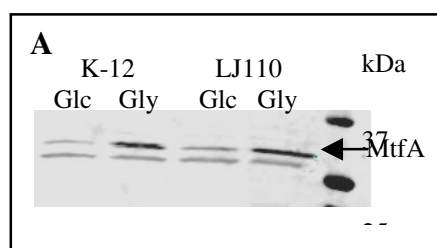
**A** zeigt die vergleichende Expression von *mtfA* beim Wachstum auf Glukose und Glycerin im *E.coli* K-12.

**B** zeigt die *mtfA* Expression beim Wachstum auf Glukose und Glycerin im *E.coli* Stamm LJ110. Es sind jeweils Doppelbestimmungen angegeben und die Schwellenwerte sind in Klammern aufgeführt.

Die Auswertung der RT-RT PCR zeigte im Stammhintergrund K-12 eine um den Faktor  $2^3=8$  erhöhte Expression des *mtfA*-Gens beim Wachstum auf Glycerin im Gegensatz zum Wachstum auf Glukose an. Dieses Verhältnis ist im Stammhintergrund LJ110 genau umgekehrt. Hier ist eine um den Faktor  $2^{3.4}=10,5$  erhöhte Menge an MtfA beim Wachstum auf Glukose zu verzeichnen. Diese Analyse der *mtfA*-Expression wurde genau wie die im Folgenden beschriebenen Western-Blot Analyse zweimal unabhängig voneinander und mit verschiedenen Einzelkolonien durchgeführt und führte jeweils in Bezug auf die generellen Verhältnisse zu dem gezeigten Ergebnis. Die Unterschiede in den aufgezeigten Faktoren waren jedoch im zweiten Versuch geringer und unterschieden sich bei beiden Stämmen nur um den Faktor  $2^2=4$ . Daher können anhand dieser Versuche nur die relative Unterscheidungen in der Expression des *mtfA*-Gens in Bezug auf die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen Glukose und Glycerin in den Stämmen K-12 und LJ110 gemacht werden. Aufgrund der unterschiedlichen Verhältnisse in Bezug auf die absoluten Mengen konnten ausgehend von den hier gezeigten Versuchen keine Aussagen gemacht werden. Daher bleibt zusammenfassend zu sagen, dass es einen entscheidenden Unterschied der *mtfA*-Expression in den beiden *E.coli* Stämmen K-12 und LJ110 unter den hier getesteten Anzuchtbedingungen gibt.

### 3.2.4.2 Analyse der MtfA-Mengen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen in den Stämmen K-12 und LJ110

Ausgehend von den für die RT-RT PCR verwendeten Kulturen wurden parallel zur mRNA-Mengen-Bestimmung Proteinmengenbestimmungen mittels Western-Blot durchgeführt. Hierbei ergaben sich die in Abbildung 3.2.11 dargestellten Ergebnisse.



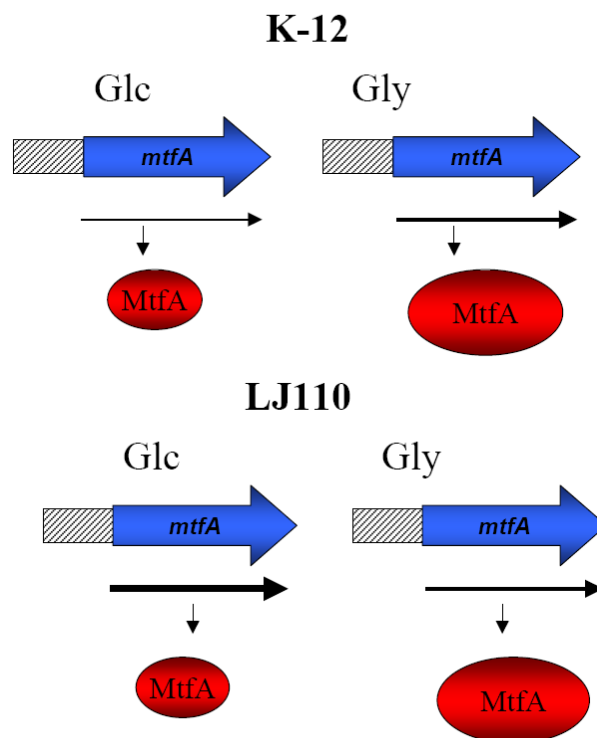


**Abb.3.2.11 MtfA Proteinmengen nach Anzucht der Stämme K-12 und LJ110 in Glukose (Glc) und Glycerin (Gly).**

A zeigt den Western-Blot. Neben der spezifischen Bande für MtfA ist eine unspezifische Nebenbande zu sehen, die bei allen Proben die gleiche Intensität zeigt. B zeigt die Quantifizierung der Proteinmengen, die mit Hilfe der Software der Firma LI-COR durchgeführt wurde. Hierbei sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen zu sehen.

Bereits in dem Western-Blot lassen sich deutliche Unterschiede in den Proteinmengen beim Wachstum auf Glukose und Glycerin erkennen. Im Gegensatz zu den nachgewiesenen mRNA-Mengen lässt sich hier kein kontroverser Unterschied zwischen den Stämmen LJ110 und K-12 erkennen. In der in Abbildung 3.2.11B gezeigten Quantifizierungsauswertung ist der Unterschied in Pixeln zwischen dem Wachstum auf Glukose und Glycerin zu erkennen. Auch hier wird deutlich, dass die MtfA-Menge beim Wachstum auf Glukose im Gegensatz zu Glycerin in beiden Stämmen deutlich verringert war. Im Fall von K-12 lag der berechnete Unterschied bei einem Faktor von 3,5, im Fall von LJ110 bei 3,8.

Zusammenfassend zeigten die Expressionsstudien von MtfA kontroverse Ergebnisse in Bezug auf die *mtfA*-mRNA und MtfA-Proteinmengen in den getesteten Stämmen an, die in Abbildung 3.2.12 zusammenfassend dargestellt sind.



**Abb.3.2.12 Unterschiedliche *mtfA*- mRNA- und MtfA-Proteinmengen in den Stämmen *E.coli* K-12 und LJ110.**

Daher scheint es einen essentiellen Unterschied in Bezug auf die Regulation von MtfA oder eines anderen Faktors, der indirekt die Expression von MtfA beeinflusst, zu geben.

### 3.2.5 Charakterisierung der mRNA Stabilität der *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion mittels „Reverser Transkriptase-Real Time PCR“ (RT-RT PCR)

Die Expression des *ptsG*-Gens unterliegt der posttranskriptionellen Regulation durch SgrS/SrgR. Hierbei führt eine Akkumulation von Glukose-6-Phosphat zu einem Abbau der *ptsG*-mRNA durch den RNaseE Degradosomkomplex (37, 62). Im Rahmen dieser Arbeit wurde für verschiedene Versuche eine *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion zum Nachweis der *ptsG* Expression verwendet. Daher ergab sich die Notwendigkeit, dieses gut etablierte und vielfältig verwendete Konstrukt auf seine posttranskriptionelle Regulation hin zu überprüfen. Für die Diskussion vieler vorangegangener Fragestellungen war es notwendig zu wissen, ob dieses Konstrukt, welches nur aus der Promotor/Operatorregion sowie den ersten 84 Basenpaaren des *ptsG*-Gens bestand, vergleichbar mit dem Wildtyp *ptsG* in Bezug auf den posttranskriptionellen Abbau reguliert wird. Des weiteren wäre denkbar, dass das *lacZ*-Gen in dieser Operonfusion nicht einer solchen Regulation unterliegen könnte.

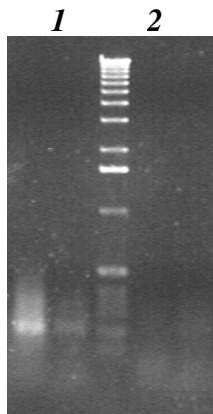
Um die von Morita und Kaamoto angeführten Aussagen zu überprüfen und um zu klären, ob die *lacZ*-mRNA in der *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion ebenfalls einer solchen Regulation unterliegt, wurden RT-RT PCR Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen angezogen und die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde die RNA einem DNase Verdau unterzogen und in cDNA umgeschrieben. Danach wurde eine RT-RT PCR Optimierung und Analyse mit *ptsG* und *lacZ* spezifischen Primern durchgeführt.

Die RT-RT PCR wurde im Rahmen dieser Versuche für diese Arbeit optimiert. Hierbei waren verschiedene Optimierungsparameter zu beachten. Daher ist im Folgenden beschrieben, welche Dinge bei der Isolierung der RNA besonders zu beachten waren. Auch die Primerauswahl sowie das PCR Profil selber unterlagen dem im Folgenden beschriebenen Optimierungsverfahren.

#### 3.2.5.1 Optimierung der RNA Isolierung

Im Vorfeld der eigentlichen RT-RT PCR Versuche wurde die RNA Isolierung mit Hilfe des Qiagen Kits „RNeasy® Mini Kits“ optimiert. Im Rahmen von Vorversuchen stellte sich heraus, dass sich bei der Isolierung nach dem ursprünglichen Protokoll eine große Menge an chromosomaler DNA in der RNA Präparation befand. Daher wurde zunächst versucht, über einen vom Hersteller angebotenen optionalen DNase Verdau auf der Säule diese DNA zu entfernen. Eine Überprüfung mittels PCR und der isolierten RNA als „Template“ zeigte jedoch weiterhin die

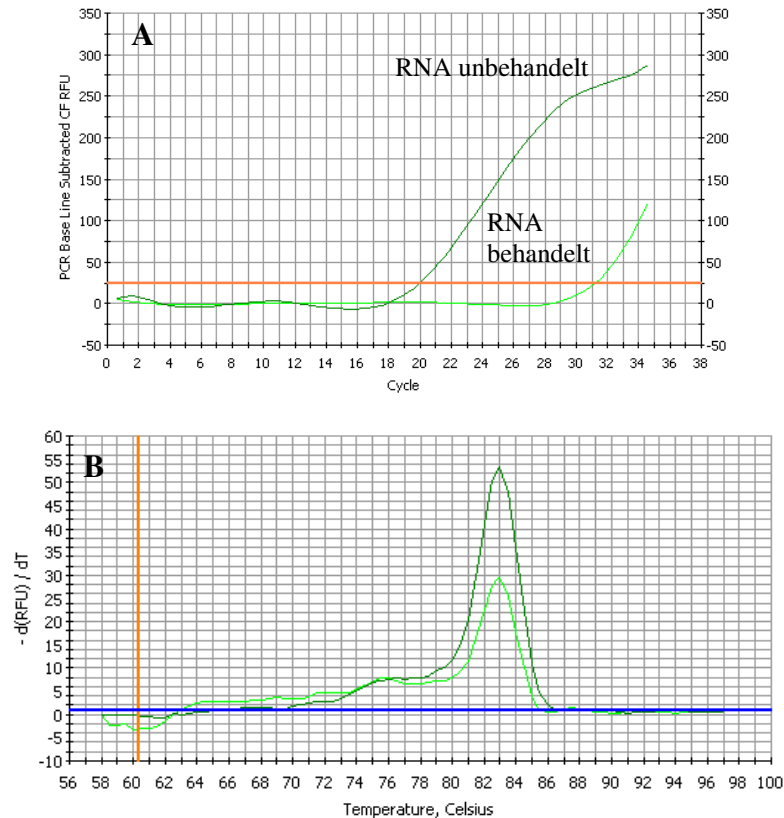
zuvor beobachtete Verunreinigung. Daher wurden verschiedene, alternative Kits für einen DNase Verdau ausprobiert. Nach verschiedenen Versuchen zeigte sich, dass das „Turbo DNA free“ Kit der Firma Ambion den größten Erfolg zeigte. Mit Hilfe der Anwendung dieses Kits konnte die genomische DNA fast vollständig aus der RNA Präparation entfernt werden. Abbildung 3.2.13 zeigt die PCR-Produkte vor (1) und nach (2) der DNase Behandlung.



**Abb.3.2.13 zeigt PCR-Produkte mit der isolierten RNA und den im Folgenden verwendeten RTptsG+/- Primern.**

Die Proben 1 zeigen die PCR-Produkte vor der DNase Behandlung, die Proben 2 zeigen die PCR-Produkte nach der DNase Behandlung

Auch in einer RT-RT PCR Analyse mit Hilfe der im Folgenden vorgestellten RTptsG+/- Primer konnte der Unterschied zwischen behandelter und unbehaltener RNA sichtbar gemacht werden (Abbildung 3.2.13A und B). Der Schwellenwertzyklus der unbehandelten RNA lag bei 20, der der behandelten RNA bei 31 Zyklen. Daher deuten beide Kurven auf eine Verunreinigung mit genomischer DNA hin. Allerdings ist bei der behandelten RNA  $2^{11} = 2048$  mal weniger davon vorhanden. Daher war die DNase Behandlung sehr effektiv. Die Menge der verbleibenden genomischen DNA war relativ gering und konnte daher in den nachfolgenden Versuchen vernachlässigt werden.



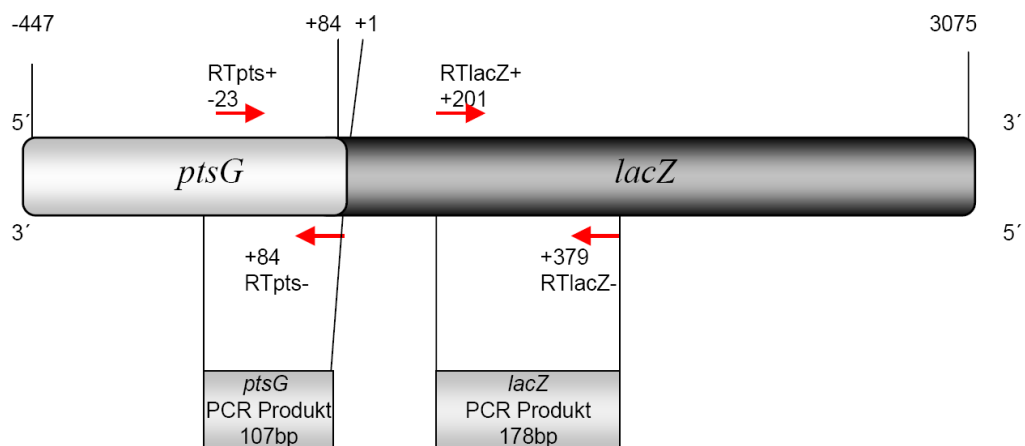
**Abb.3.2.14 RT-RT PCR Analyse mit der isolierten RNA**

A zeigt die Kurven und die entsprechenden Schwellenwert-Zyklen an

B zeigt die Schmelzkurve der PCR-Produkte an

### 3.2.5.2 Die *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion

Die bereits erwähnte *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion ist in Abbildung 3.2.15 schematisch dargestellt.



**Abb.3.2.15 Darstellung der *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion.**

Die *ptsG<sub>op</sub>* Fusion beginnt ab Basenpaar -447 und endet bei Basenpaar +84 des *ptsG*-Gens. Die *lacZ*-Fusion beginnt daher mit Basenpaar 1 und endet mit Basenpaar 3075. Die Größenverhältnisse sind hier nur schematisch und nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Die roten Pfeile markieren die jeweiligen Primer und deren Startpunkte. Das *ptsG*-PCR-Produkt ist 107 Basenpaare, das *lacZ*-PCR-Produkt 178 Basenpaare groß.

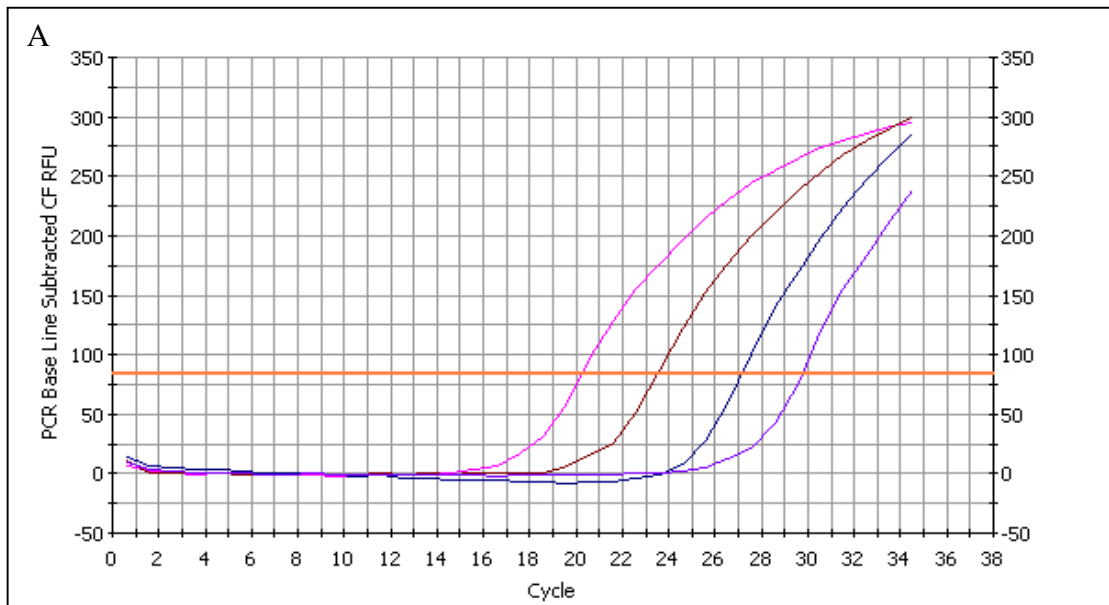
Für die Optimierung der RT-RT PCR Reaktionen wurden zunächst Primer ausgewählt, die zum einen spezifisch für den *ptsG* Teil der Fusion waren, zum anderen wurden Primer gewählt, die für den *lacZ* Teil der Fusion spezifisch waren. Bei der Primerauswahl wurde darauf geachtet, dass die beiden entstehenden PCR Fragmente relativ klein waren, da dieses für die Detektion mit „Sybr-Green“ während des RT-RT PCR Laufes wichtig ist. Die Primer für die *ptsG*-PCR wurden RTpts+/-, die für die *lacZ*-PCR RtlacZ+/- genannt. Anschließend wurden zunächst Optimierungen der jeweiligen PCRs durchgeführt. Hierzu wurde der Stamm LJ110 in MM Glukose angezogen und bei  $OD_{420}=1$  geerntet. Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert, vollständig in cDNA umgeschrieben (vgl. Kapitel 2.5.3; 2.5.4 und 2.5.11 im Material- und Methodenteil), und anschließend einem DNase Verdau unterzogen. Für die Optimierung der *ptsG* und *lacZ*-PCR wurden jeweils  $10^0$ - $10^3$  Verdünnungen der cDNA in die jeweilige PCR Reaktion eingesetzt.

95°C 3′  
 95°C 30″ }  
 58°C 20″ } 35 Zyklen  
 72°C 20″ }

Die Ergebnisse der Optimierung der beiden PCRs sind im Folgenden dargestellt:

### 3.2.5.3 Optimierung der *ptsG*-PCR

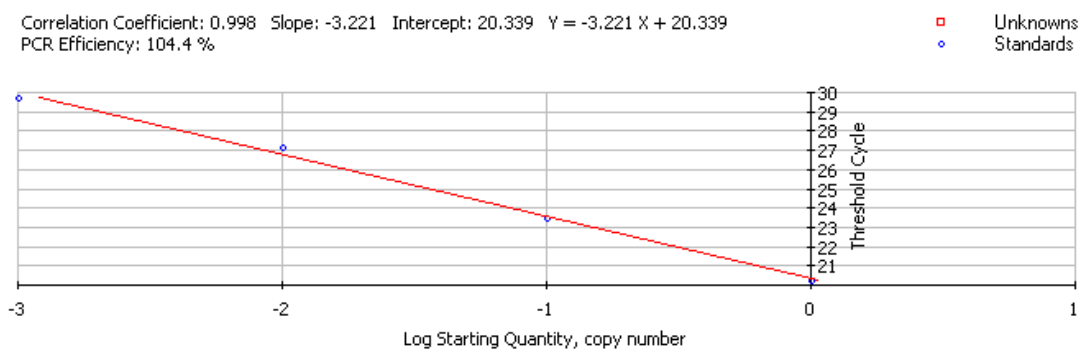
Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die Ergebnisse der Optimierung der *ptsG*-PCR. In Abbildung 3.2.16A sind die verschiedenen Verdünnungsstufen der cDNA von links nach rechts von  $10^0$ - $10^3$  gezeigt. Für die PCR wurden die Primer RTpts+/- verwendet. Der Verdünnungsfaktor zwischen den einzelnen Kurven beträgt jeweils  $10^{-1}$ . Daher sollten die Zyklen, bei denen der Schwellenwert überschritten wurde, ebenfalls einen gleichmässigen Abstand aufweisen. Die Schwellenwerte betragen von links nach rechts 20; 23, 25; 27 und 30 Zyklen. Daher lässt sich hier fast diese Regelmässigkeit erkennen.



**Abb.3.2.16A** zeigt die PCR Ergebnisse der verschiedenen Verdünnungsstufen der cDNA aus LJ110. Der Schwellenwert ist durch den roten Balken gekennzeichnet.

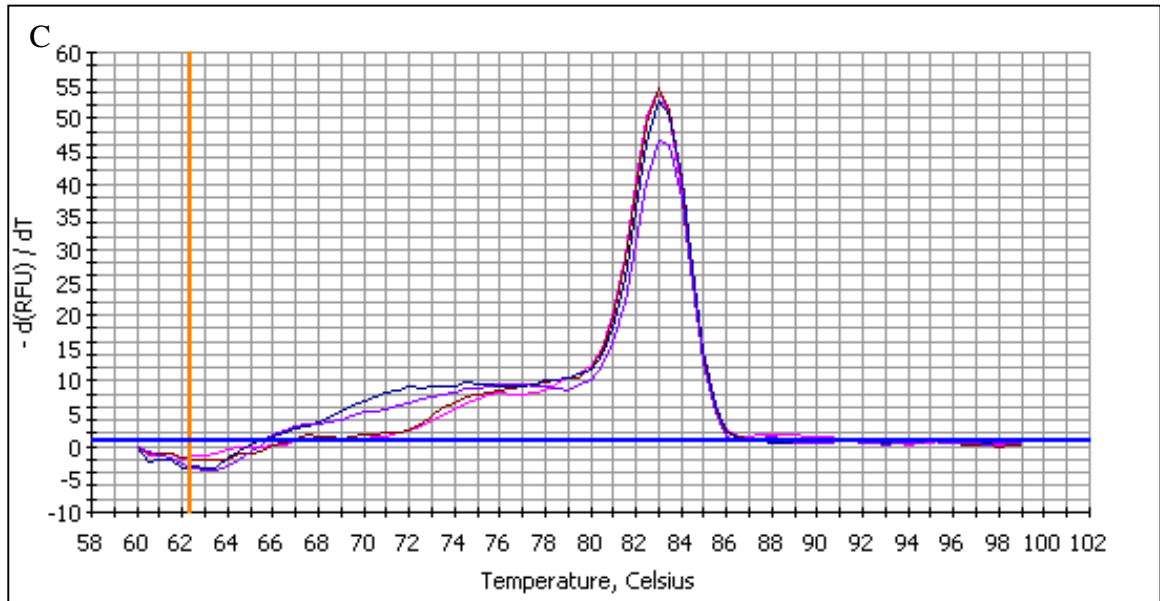
Die zugehörige Berechnung der PCR Effizienz ist in Abbildung 3.2.16B gezeigt.

Hier ist der Korrelationskoeffizient mit 0,998 angegeben, was ebenfalls die richtige Wiedergabe der Verdünnungsstufen zeigte. Die PCR Effizienz ist ein Maß für die Optimierung der PCR. Hierbei ist ein Wert von 100% als optimal zu bewerten. Werte darüber deuten auf potentielle Nebenprodukte in der PCR-Reaktion hin. Hier wurde ein Wert von 104,4% angegeben, der noch als relativ gut bewertet werden kann.



**Abb.3.2.16 B** zeigt die Standardkurve der Verdünnungsreihe für die *ptsG*-PCR. Gezeigt sind wie in Abbildung A die Verdünnungen  $10^0 - 10^{-3}$ .

Die zugehörige Schmelzkurve ist in Abbildung 3.2.16C gezeigt. Hier wurden die verwendeten PCR-Proben im Anschluss an die PCR-Reaktion erhitzt und der Schmelzpunkt der PCR-Produkte bestimmt. Ein einzelner Peak deutet hier für alle Proben auf das gleiche PCR-Produkt hin. Mehrere Peaks würden auf verschiedene PCR-Produkte mit unterschiedlichen Schmelzpunkten hindeuten, aber auch dieses war hier nicht der Fall.



**Abb.3.2.16 C** zeigt die Schmelzkurven der verschiedenen Verdünnungsstufen an. Der Peak der entstandenen PCR-Produkte konnte bei 83°C bestimmt werden.

Generell zeigten diese Ergebnisse, dass die *ptsG*-PCR unter diesen Bedingungen optimal verläuft und die folgenden Versuche unter diesen Bedingungen durchgeführt werden konnten.

### 3.2.5.4 Optimierung der *lacZ*-PCR

Zunächst wurde bei der Optimierung der *lacZ*-PCR ebenfalls versucht, die PCR mit den selben PCR Bedingungen wie für *ptsG* beschrieben durchzuführen. Bei der verwendeten „Annealing“-Temperatur“ von 58°C zeigte sich jedoch, dass neben dem erwarteten PCR-Produkt von 178 Basenpaaren ein etwas kleineres Nebenprodukt entstand. Daher wurde hier die „Annealing“-Temperatur“ auf 68°C angehoben. Somit konnte die Bildung des Nebenproduktes verhindert werden. Die PCR Standardkurve ergab vergleichbar mit der *ptsG*-Optimierung eine Aussage zu optimierten PCR Bedingungen.

Ausgehend von den hier optimierten Bedingungen der beiden PCRs konnten nun *ptsG*-Expressionsstudien in verschiedenen Stämmen sowie vergleichende Expressionsstudien von *ptsG* und *lacZ* jeweils unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durchgeführt werden.

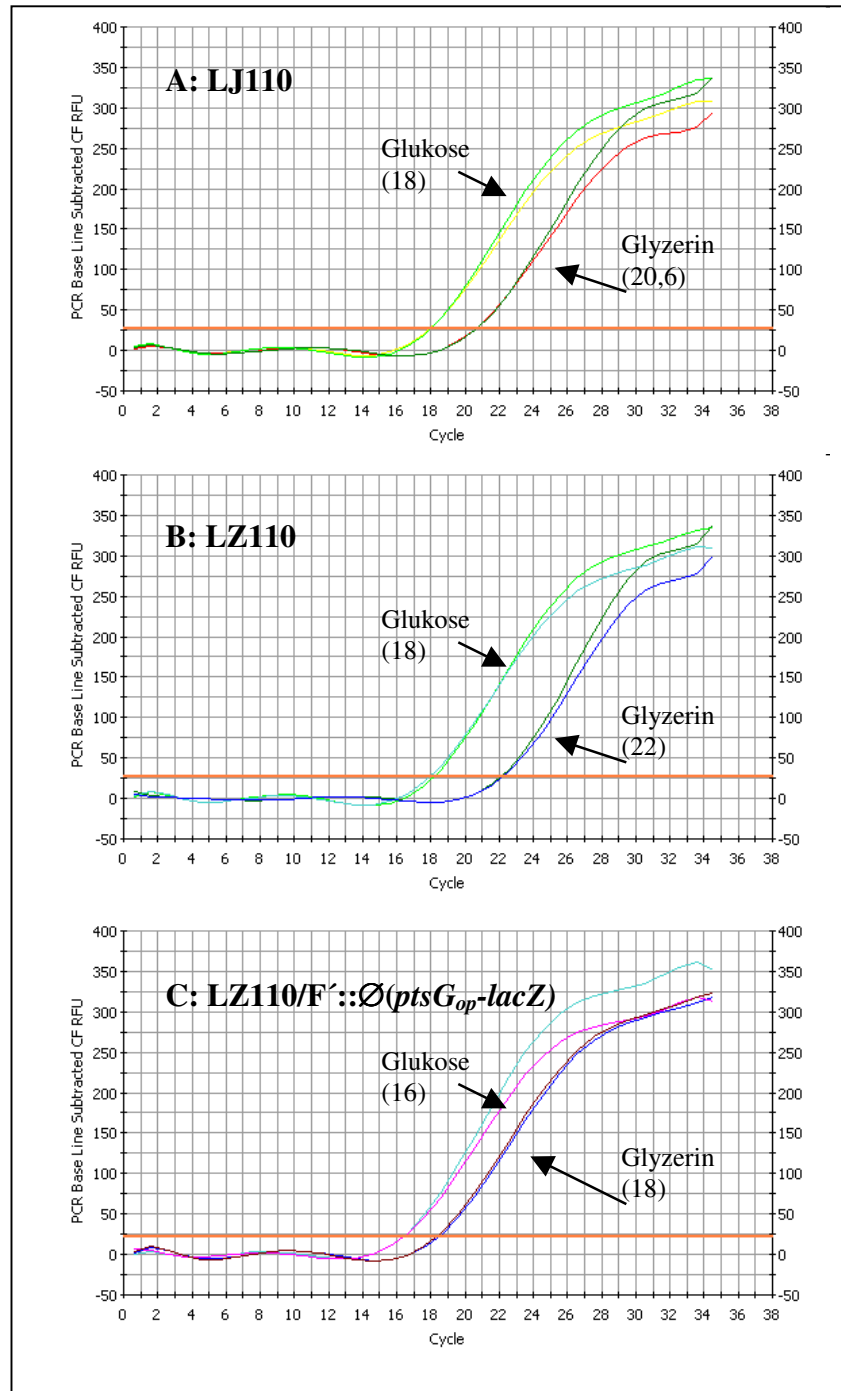
### 3.2.5.5 Vergleich der *ptsG* Expressionsniveaus in den Stämmen LJ110, LZ110 und LZ110/F' unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Zunächst wurde mit den optimierten Bedingungen für die *ptsG* Expressionsstudien versucht, die verschiedenen Expressionsniveaus des *ptsG*-Gens zu untersuchen. Hierzu wurden die Stämme LJ110 (*ptsG* WT), LZ110 (*ptsG* WT) und LZ110/F':: $\emptyset$ (*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*) (*ptsG* WT und *ptsG<sub>op</sub>-lacZ*) verwendet. Zum einen wurden die Stämme in MM Glycerin, zum anderen in MM Glukose angezogen. Hierbei war zu erwarten, dass beim Wachstum auf Glukose ein höheres Expressionsniveau von *ptsG* aufgrund der bekannten Regulation vorliegt. Darüber hinaus ist zu vermuten, dass der Stamm LZ110/F':: $\emptyset$ (*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*) das höchste Expressionsniveau von *ptsG* zeigt, da er neben der chromosomalen Kopie eine weitere *ptsG* Kopie auf dem F' Plasmid trägt. Zunächst wurden von allen Stämmen Übernachtskulturen in MM Glycerin angezogen und davon ausgehend am nächsten Morgen in MM Glycerin und Glukose überimpft und bei einer OD<sub>420</sub>=0,8 geerntet. Hierbei zeigte sich bei der Anzucht in Minimal Glukosemedium eine übereinstimmende Generationszeit der Stämme von 60 Minuten. Bei der Anzucht auf Glycerin hingegen wies der Stamm LJ110 eine verlängerte Generationszeit von 90 Minuten auf. Die entstandenen Kurven der PCR sind in Abbildung 3.2.17 dargestellt.

Bei allen drei Stämmen ist jeweils eine erhöhte *ptsG* Expression beim Wachstum auf Glukose zu verzeichnen. Dieses ist durch die jeweils kleineren Schwellenwertzyklen gekennzeichnet.

Die Stämme LJ110 und LZ110 zeigten jeweils einen Schwellenwertzyklus beim Wachstum auf Glukose nach 18 Zyklen. Daher scheint die Expression des *ptsG*-Gens unter induzierten Bedingungen bei diesen Stämmen die gleiche Stärke zu haben. Beim Wachstum auf Glycerin hingegen ist die Expression des *ptsG*-Gens im Stamm LZ110 um den Faktor  $2^2=4$  im Vergleich zum Stamm LJ110 reduziert. Der Stamm LZ110/F':: $\emptyset$ (*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*) zeigte im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen ein um den Faktor vier erhöhtes Expressionsniveau unter induzierten Bedingungen. Auch unter uninduzierten Bedingungen ist ein Unterschied um den Faktor vier in Bezug auf den Stamm LJ110 und Faktor 16 in Bezug auf den Stamm LZ110 zu verzeichnen.





**Abb.3.2.17 RT-RT PCR Ergebnisse der Stämme LJ110, LZ110 und LZ110/F'::Ø(*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*).**

Die Kurven zeigen jeweils in der Doppelbestimmung die *ptsG* Expression auf Wachstum auf Glukose und Glyzerin an. Die Glukosekurven sind jeweils links, die Glyzerinkurven jeweils rechts zu sehen. Die Zahlenwerte rechts neben den Abbildungen geben die jeweiligen Schwellenwertzyklen der Proben an.

Dieses erhöhte Expressionsniveau des *ptsG*-Gens ist somit vermutlich auf die zusätzliche Kopie des *ptsG*-Gens auf dem F' Plasmid zurückzuführen.

Die Schmelzkurven der hier gezeigten Proben zeigten alle übereinstimmend das *ptsG* PCR-Produkt mit einer Schmelztemperatur von 83°C (Daten nicht gezeigt).

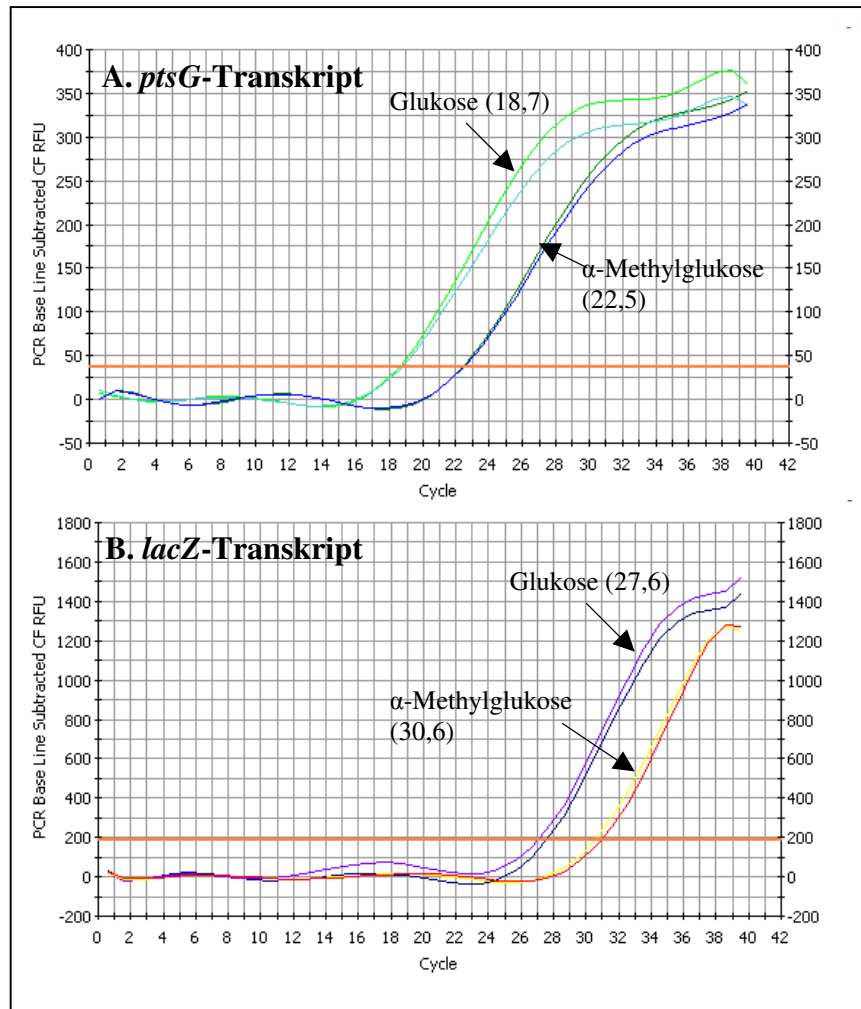
Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass sich das Prinzip der RT-RT PCR auf diese Problematik anwenden ließ und aussagekräftige Ergebnisse in Bezug auf die unterschiedliche Expression des *ptsG*-Gens gewonnen werden konnten. Die Ergebnisse in Bezug auf die unterschiedlichen Expressionsniveaus unter verschiedenen Anzuchtbedingungen in verschiedenen Stammhintergründen entsprachen den Erwartungen.

### 3.2.5.6 Vergleich der *ptsG*- und *lacZ*-Transkriptstabilität beim Wachstum auf Glukose und $\alpha$ -Methylglukose

Mit Hilfe der optimierten RT-RT PCR Bedingungen konnte nun die mRNA Stabilität der *ptsG*- und *lacZ*-mRNA vergleichend analysiert werden. Beim Wachstum auf Glukose wäre zu erwarten, dass die Expression beider Konstrukte hoch ist und die Transkripte aufgrund einer guten Translation durch die Ribosomen vor dem Abbau geschützt sind. Das Substrat  $\alpha$ -Methylglukose wird zwar in die Zelle transportiert und phosphoryliert, kann jedoch nicht weiter verstoffwechselt werden. Aufgrund dessen entsteht in der Zelle eine Glukose-Phosphat-Akkumulation welche, wie von Morita 2003 und 2004 gezeigt, einen Abbau der *ptsG*-mRNA durch den RNaseE Degradosomkomplex bewirkt (61, 62). Diese Aussagen sollten mit Hilfe der folgenden Versuche überprüft und auf die Expression bzw. Stabilität von *lacZ* ausgehend von der F' Plasmid kodierten *ptsG*<sub>op</sub>-*lacZ* Fusion ausgeweitet werden.

Hierzu wurde jeweils eine Übernachtskultur des Stammes LJ110 in Minimal-Glukose Medium bis zu einer OD<sub>420</sub> = 0,8 angezogen. Nach dem Teilen der Kultur wurde eine Hälfte zweimal in Minimalmedium ohne Kohlenstoff-Quelle gewaschen und anschließend in Minimalmedium mit 10mM  $\alpha$ -Methylglukose resuspendiert. Beide Kulturen wurden anschließend für weitere 30 Minuten inkubiert und anschließend wurde 1ml der Kulturen für die RNA Isolierung abzentrifugiert. Nach erfolgter RNA Isolierung, dem genomischen DNase Verdau sowie der cDNA Synthese wurde eine RT-RT PCR für *ptsG* und *lacZ* nach den oben gezeigten optimierten Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Die Kurven der RT-RT PCR zeigen, dass sowohl bei dem *ptsG*-, als auch bei dem *lacZ*-Transkript ein Abbau der mRNA unter dem Einfluss von  $\alpha$ -Methylglukose nachzuweisen war. Die jeweiligen Differenzen der Schwellenwertzyklen sind bei *ptsG* = 3,8 und bei *lacZ* = 3. Somit entspricht der Unterschied zwischen Glukose und  $\alpha$ -Methylglukose einem Faktor von  $2^{3,8} = 13,9$  bzw.  $2^3 = 8$ . Demnach ist ein höherer Abbau bei der *ptsG*-mRNA im Vergleich zur *lacZ*-mRNA zu verzeichnen. Es ist jedoch auffällig, dass die Gesamtmenge der *ptsG*-Transkripte im Vergleich zu den *lacZ*-Transkripten wesentlich höher ist, was an dem niedrigeren Schwellenwertzyklus erkennbar ist.

Da es sich bei den Nachweisen der *ptsG*- und *lacZ*-Transkripte jedoch um unterschiedliche PCR Reaktionen handelt, könnten diese Unterschiede auf die unterschiedlichen Primer, bzw. PCR Effizienz zurückzuführen sein.



**Abb.3.2.18 Ergebnisse der RT-RT PCR.**

Gezeigt sind jeweils die Nachweise der *ptsG*- (A) und *lacZ*- (B) Transkripte. Die in Klammern angegebenen Werte bezeichnen die jeweiligen Schwellenwertzyklen.

Mit Hilfe der RT-RT PCR Analyse der *ptsG* und *lacZ* Transkripte der auf dem F'Plasmid kodierten *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion konnte gezeigt werden, dass beide mRNAs einem Abbau beim Wachstum auf  $\alpha$ -Methylglukose unterliegen. Für die *ptsG*-mRNA konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um den Abbau mit Hilfe des RNase-Degradosomkomplex handelt (37, 61). Daher ist zu vermuten, dass auch die *lacZ*-mRNA in der *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Operonfusion einem derartigen Abbau unterliegt. Somit konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit zum Nachweis der Expression von *ptsG* verwendete *ptsG<sub>op</sub>-lacZ* Fusion der gleichen posttranskriptionellen Regulation entspricht wie die Wildtyp *ptsG*-mRNA.

Des weiteren ergab die erfolgreiche Durchführung und Optimierung der RT-RT PCR eine vielversprechende Grundlage für *mtfA*-Expressionsstudien unter verschiedenen Wachstums- und Temperaturbedingungen, die im vorangegangenen Kapitel vorgestellt wurde.

### 3.3 Biochemische Charakterisierung von MtfA

Wie in dem folgenden Kapitel beschrieben, konnte MtfA sowie sein Wechselwirkungspartner Mlc mit Hilfe der ÄKTA-FPLC erfolgreich gereinigt werden. Die gereinigten Proteine bildeten die Grundlage für eine Reihe von Versuchen.

Durch die ausgehend von den gereinigten Proteinen ermöglichte Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen MtfA und Mlc konnten beide Proteine wie bereits in Kapitel 3.1.6 beschrieben im bakteriellen Di-Hybrid System nachgewiesen und die jeweiligen Mengen in Relation zueinander gesetzt werden. Darüber hinaus ergab der spezifische Nachweis unterschiedlicher Mengen des MtfAs unter verschiedenen Wachstumsbedingungen Aufschluss über physiologisch wichtige Parameter in Bezug auf die *mtfA*-Expression und Regulation.

Neben der Herstellung spezifischer Antikörper konnte die MtfA-Dimerisierung mit Hilfe von verschiedenen biochemischen Methoden (SDS- und native Gelelektrophorese, Electrospray-Ionisation (ESI), Gelfiltration) nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte in Kooperation mit E. Klang und K. Homann mit Hilfe von „Electrophoretic mobility shift assays“ die Wechselwirkung von gereinigtem Mlc mit dem *ptsG*-Operator, sowie die Auflösung dieses Komplexes nach Zugabe von gereinigtem MtfA nachgewiesen werden.

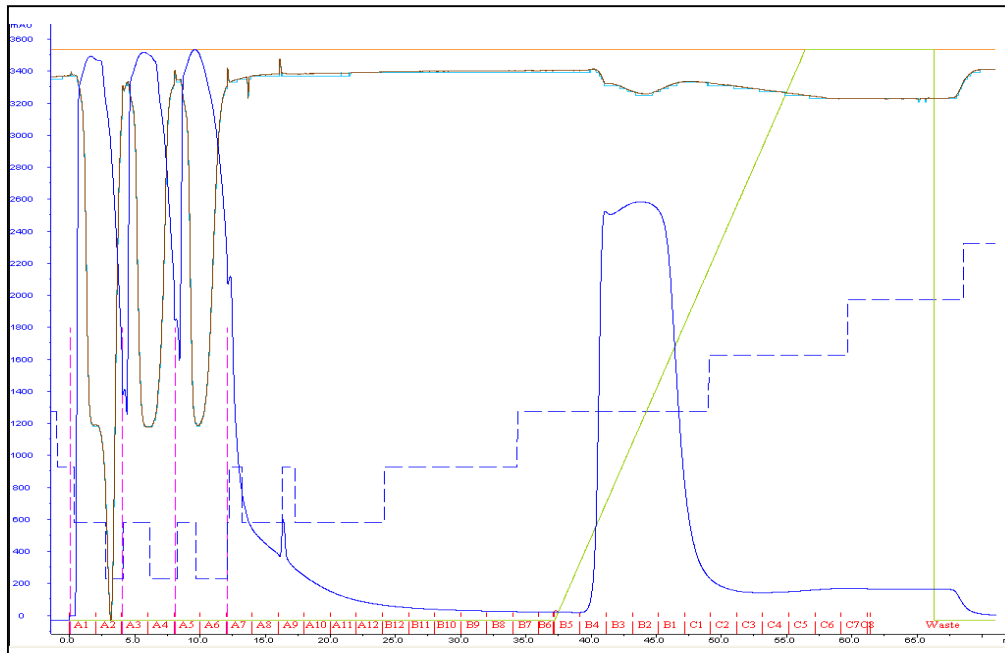
Schließlich wurden aufgrund der Verfügbarkeit der gereinigten Proteine erste Versuche zum Nachweis der Mlc-MtfA Interaktion mittels Gelfiltration durchgeführt. Hierbei ergab sich, dass für den Nachweis eine aufwendige Optimierung der Bedingungen notwendig ist. Denkbare Folgeversuche wären hierbei die Herstellung und Reinigung von Mlc- und MtfA-Mutanten und eine dadurch mögliche Quantifizierung der jeweiligen Wechselwirkung. Außerdem könnte die in Kapitel 3.1.7.1 klonierte und mit einem „His-Tag“ versehene EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne gereinigt und die Auswirkung auf die Mlc-MtfA Wechselwirkung ebenfalls mittels Gelfiltration getestet werden.

### 3.3.1 Reinigung der Proteine MtfA und Mlc

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MtfA und Mlc gereinigt. Die Klonierung des Mlcs wurde während des Großpraktikums sowie der Masterarbeit von K. Homann durchgeführt. Die Reinigung von Mlc wurde in Kooperation mit K. Homann im Rahmen ihrer Masterarbeit (28) und E. Klang während ihrer Diplomarbeit durchgeführt (41). Die Reinigung von MtfA wurde in dieser Arbeit basierend auf den bereits vorhandenen Ergebnissen der Dissertation von A.-K. Becker fortgeführt (10).

#### 3.3.1.1 Reinigung des Proteins MtfA

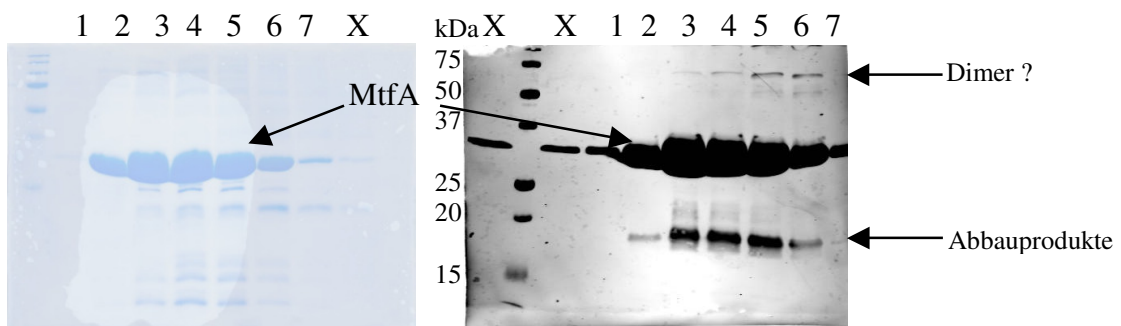
Für die MtfA-Reinigung wurde der Vektor pTMByeel im Stammhintergrund JM109 angezogen. Das in dieser Arbeit optimierte Reinigungsprotokoll von MtfA bestand aus einer Zwei-Schritt-Reinigung. Für beide Reinigungsschritte wurde jeweils die ÄKTA-FPLC der Firma GE Healthcare verwendet. Zunächst wurde das Protein über eine Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA Agarose als Absorptionsmaterial in Form der „HisTrap<sup>TM</sup> FF“ Säulen der Firma GE-Healthcare gereinigt. Hierbei wurde das Protein mit Hilfe von Imidazol eluiert. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 3.3.1 dargestellt. In den Fraktionen A1-A7 sind drei große Peaks zu sehen. Diese zeigen den Durchlauf von den drei Auftragungseinheiten. Anschließend wurde so lange mit Puffer A gespült, bis die Absorption wieder gegen 0 ging. Somit sollte gewährleistet werden, dass alle Proteine, die nicht an die Ni-NTA Matrix gebunden hatten, aus dem System ausgespült wurden. Die Elution erfolgte mit einem Imidazol-Gradienten von 0-500mM Imidazol. Der Elutionspeak des MtfAs ist in den Fraktionen B4 bis C2 zu sehen. Das Ablösen des Proteins von der Matrix beginnt daher bei 12-32% Puffer B, was einer Imidazolkonzentration von ca. 60-160mM entspricht. Die entsprechenden Fraktionen wurden jeweils auf ein SDS-Gel aufgetragen und es erfolgte die Anfärbung der Proteine mit Coomassie, sowie durch eine sensitivere Silberfärbung (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis von MtfA in den jeweiligen Fraktionen erfolgte mittels Western-Blot Analyse. Anschließend wurden die relevanten Proben vereinigt, gegen Tris-Puffer (pH8,0) über Nacht dialysiert oder mittels „HiTrap<sup>TM</sup> Desalting“ Säulen entsalzt (vgl. Abbildung 3.3.3).



**Abb.3.3.1 Elutionsprofil MtfA Affinitätschromatographie mittels „HisTrap™ FF“ Säulen**

Die durch das Photometer gemessene Absorption ist in blau, die Leitfähigkeit in braun und der Gradient in grün gezeigt. Die einzelnen Fraktionen sind in rot aufgeführt. Die Skalierung der Y-Achse gibt die Absorption an.

Die relevanten Fraktionen wurden jeweils auf zwei SDS-Gele aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde eine Coomassiefärbung sowie ein Western-Blot durchgeführt. Abbildung 3.3.2 zeigt exemplarisch eine solche Coomassie- und Western-Blot Analyse nach der Affinitätschromatographie.

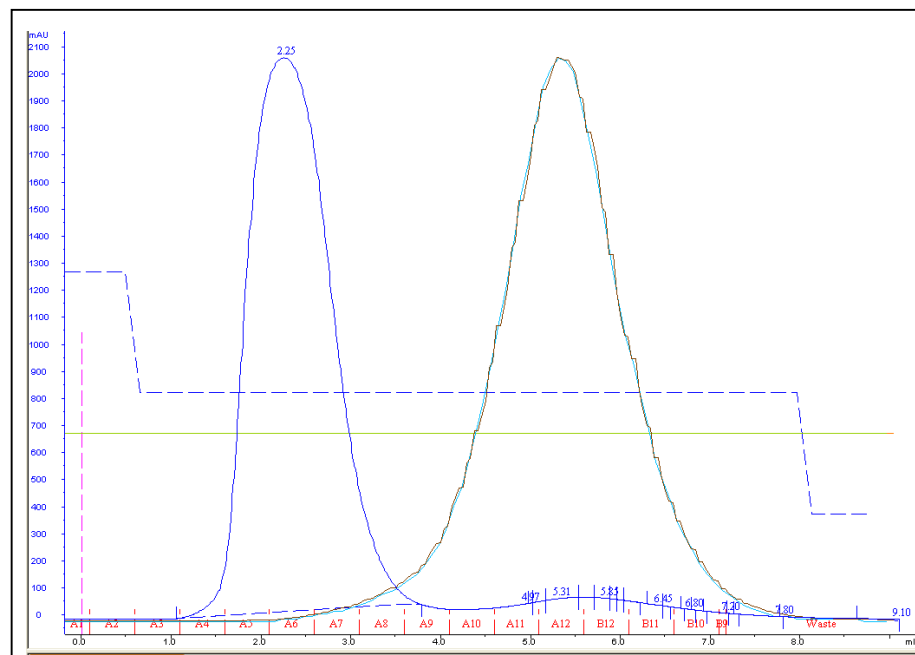


**Abb.3.3.2 Coomassiefärbung und Western-Blot Analyse nach Affinitätschromatographie.**

Es wurden jeweils 7,5µl der jeweiligen Proben aufgetragen.

Die Proben sind von 1-7 durchnummeriert. Die zusätzlichen mit X gekennzeichneten Proben auf diesen Abbildungen sind weitere Fraktionen, die nicht auf beiden Bildern übereinstimmen und daher nicht näher erläutert werden. Bei den Fraktionen 1-7 sind deutlich die großen Mengen des MtfAs zu sehen. Des weiteren sind in der Coomassiefärbung verschiedene Nebenprodukte sichtbar. Einige Nebenprodukte konnten anhand des Western-Blots als Abbauprodukte des Proteins identifiziert werden. Die deutlichen Banden im oberen Bereich könnten auf das in Kapitel 3.3.3

nachgewiesene Dimer von MtfA hindeuten, oder aber einfach auf die großen Mengen an aufgetragenem Protein zurückzuführen sein.

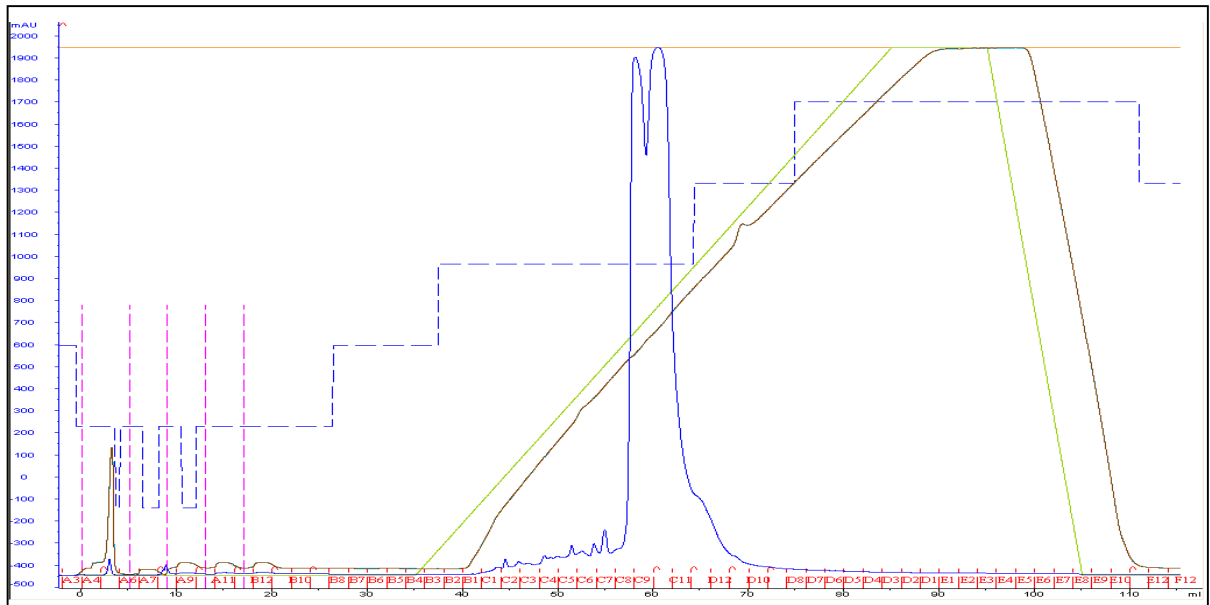


**Abb.3.3.3 zeigt exemplarisch ein Entsalzungsprofil von MtfA.**

Die blaue Kurve zeigt die Elution des Proteins mit der Signalstärke in mAU an. Die grüne Kurve zeigt die Leitfähigkeitsänderung und hier gleichzeitig die Elution des Imidazols.

Nach dem ersten Reinigungsschritt waren sowohl im mit Silbernitrat gefärbten Gel (siehe Abb. 3.3.5), als auch im Coomassie gefärbten Gel noch recht viele Nebenbanden zu beobachten (siehe Abb. 3.3.2). Daher folgte diesem Reinigungsschritt eine zweite Reinigung in Form einer Anionenaustauschchromatographie. Hierzu wurden die oben gezeigten Proteine vereinigt und auf eine Anionenaustauschsäule (Mono-Q) aufgetragen. Hierbei wurde das Protein mit Hilfe von NaCl eluiert (siehe Material- und Methoden Kapitel 2.6.4) Das Elutionsprofil ist in Abbildung 3.3.4 dargestellt. Während des Auftrags konnte hier kein Anstieg der Absorption beobachtet werden. Daher schienen hier alle aufgetragenen Proteine an die Matrix gebunden zu haben. Die Elution des MtfAs mit Hilfe eines ansteigenden NaCl (100% = 1M) Gradienten konnte in den Fraktionen C8-D12 beobachtet werden. Daher wurde das Protein bei einer Konzentration von ca. 400mM NaCl eluiert. Der Elutionspeak erscheint als Doppelpeak. Dieser deutet, wie bereits die nicht reproduzierbare Doppelbande im Western-Blot, auf eine Modifikation des Proteins hin.



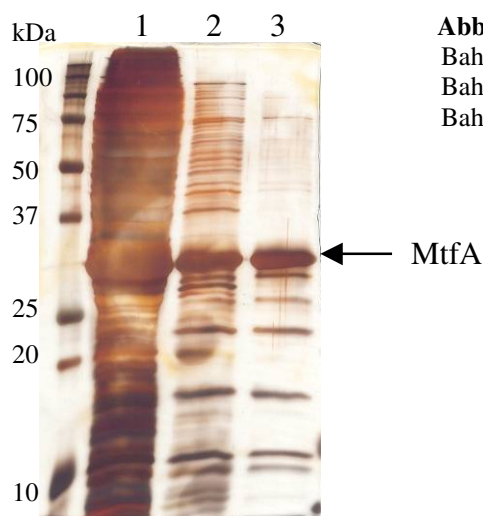


**Abb.3.3.4 MtfA Elutionsprofil nach Anionenaustauschchromatographie.**

Die Absorption in mAU ist in blau, die gemessene Leitfähigkeit in braun und der Gradient ist in grün gezeigt. Die Skalierung der Y-Achse gibt die Absorption an.

Nach der Anionenaustauschchromatographie war im Coomassiegel nur noch die MtfA Bande sichtbar. Im Western-Blot konnten ebenfalls keine Nebenbanden außer der MtfA Bande detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Ein Vergleich über den Erfolg der einzelnen Reinigungsschritte ist in Abbildung 3.3.5 zu sehen. Hier wurden die Proteinbanden im SDS-Gel mittels Silbernitrat angefärbt. Silbernitrat ermöglicht im Gegensatz zu einer Coomassiefärbung einen noch sensitiveren, jedoch nicht stöchiometrischen Nachweis von Proteinen. Mit Hilfe von Coomassie können ca. 0,1 $\mu$ g Protein sichtbar gemacht werden, mit Hilfe der Silberfärbung ca. 0,02 $\mu$ g (98). Daher ermöglichte die hier verwendete Silberfärbung einen tatsächlichen Überblick über den Reinheitsgrad des MtfAs.



**Abb.3.3.5 Silberfärbung der verschiedenen Proteinreinigungsstufen**

Bahn1: Gesamtzellprotein

Bahn2: Proteine nach Affinitätschromatographie

Bahn3: Proteine nach Anionenaustauschchromatographie

Der Vergleich der einzelnen Reinigungsstufen zeigte eine deutliche Abnahme der Nebenproteine nach erfolgter Anionenaustauschchromatographie im Gegensatz zur Affinitätschromatographie. MtfA ist in allen drei Fraktionen deutlich zu erkennen und nimmt jeweils ca. 50% des Gesamtproteins ein. Das Protein wurde ebenfalls durch eine Western-Blot Analyse (Daten nicht gezeigt) in diesen drei Fraktionen mit Hilfe von „Anti-His“ Antikörpern nachgewiesen. Bei allen anderen Banden handelt es sich um andere Proteine, die nicht im Western-Blot nachgewiesen werden konnten. Daher handelt es sich hierbei nicht um MtfA-Abbauprodukte. Das Protein wurde nach dem oben angegebenen Schema mehrere Male für die verschiedenen Versuche frisch gereinigt. Somit waren auch die Protein-Konzentrationen der verschiedenen Reinigungsstufen unterschiedlich. Die Tabelle 3.3.1 zeigt beispielhaft die Gesamtproteinkonzentration nach den verschiedenen Reinigungsstufen an.

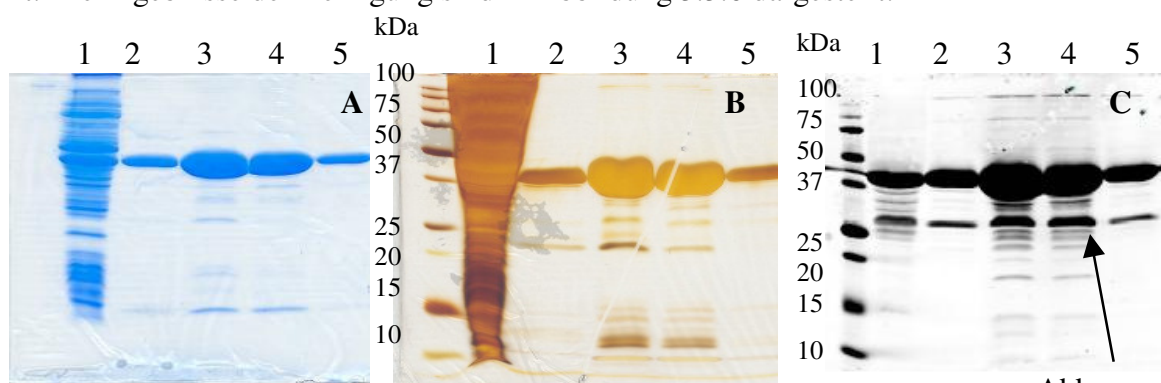
**Tab.3.3.1 Proteinausbeute nach den verschiedenen Reinigungsschritten**

Reinigungsschritt	Menge	Proteinkonzentration	Gesamtmenge	Anteil im Verhältnis zur Ausgangsmenge
Ausgangszellmaterial (11 OD <sub>650</sub> = 4,4)	8ml	23,75mg/ml	190mg	100%
Nach Affinitätschromatographie	16ml	1,55mg/ml	24,8mg	13,05%
Nach Anionenaustauschchromatographie	8ml	0,22mg/ml	2,7mg	1,4%

Die Ausgangsproteinkonzentration nach erfolgtem Ultraschallaufschluss betrug 190mg. Nach der Affinitätschromatographie wurden die Proben mit dem enthaltenen MtfA vereinigt und die Gesamtproteinkonzentration bestimmt. Hierbei konnte eine Abnahme von ca. 87% beobachtet werden. Nach der Dialyse wurde in diesem Fall keine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt. In vergleichbaren Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die Dialyse ein Verlust von 2-5mg bzw. ca.15% des Proteins auftrat. Dieses ist zum einen durch Verluste beim Be- und Entladen des Dialyseschlauches, zum anderen durch das Ausfallen des Proteins zu begründen. Nach der Dialyse konnte meistens ein weißer Proteinniederschlag im Dialyseschlauch beobachtet werden. Generell konnte MtfA mit Hilfe dieser Zwei-Stufen-Reinigung für die folgenden Versuche ausreichend gereinigt werden. Ein Aktivitätsnachweis des Proteins konnte nur in Form der „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSA) durchgeführt werden. Diese wurden in Kooperation mit K. Homann im Rahmen ihrer Masterarbeit (28) und E. Klang im Rahmen ihrer Diplomarbeit (41) durchgeführt. Für einige Präparationen von gereinigtem MtfA konnte mit Hilfe der EMSAs gezeigt werden, dass Mlc und MtfA wechselwirkten. Somit war ein physiologischer Aktivitätsnachweis des Proteins erbracht. Da die Etablierung der EMSAs und die Reinigung der Proteine zeitlich parallel verliefen und verschiedene Probleme mit den EMSAs auftraten, konnte dies nicht für alle gereinigten MtfA-Proben gezeigt werden (vgl. Kapitel 3.3.6).

### 3.3.1.2 Reinigung des Proteins Mlc

Die Mlc-Reinigung mittels Affinitätschromatographie wurde zunächst in Kooperation mit K. Homann im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Das *dgsA*-Gen wurde in den Überexpressionsvektor pTM30 kloniert und anschließend mit einem aminoterminalen "His-Tag" versehen. Der so entstandene Vektor pTM30mlchis wurde ebenfalls in den Stamm JM109 transformiert und mit 500µM IPTG überexprimiert. Da es sich bei Mlc um einen globalen Repressor handelt, stört eine erhebliche Überexpression dieses Gens die Zellen beim Wachstum. Daher wurden die Zellen nach einer Verdopplung mit IPTG induziert und nach ca. sieben Stunden geerntet. Eine anschließende Plasmidisolierung zeigte, dass ein großer Teil der Zellen aus den oben genannten Gründen kein Plasmid mehr trugen. Dennoch konnte in späteren Gelen gezeigt werden, dass Mlc in großen Mengen in den Zellen vorlag. Die Reinigung des Proteins wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit K. Homann (28) und E. Klang (41) durchgeführt. Die Durchführung ist in der Masterarbeit von K. Homann bzw. der Diplomarbeit von E. Klang beschrieben, daher werden hier nur zusammenfassend die Ergebnisse dargestellt. Das Protein Mlc wurde ebenfalls mit Hilfe der Ni-NTA Affinitätschromatographie mit der ÄKTA-FPLC (GE Healthcare) gereinigt. Als Puffer wurde Natriumphosphatpuffer pH 8,0 verwendet (50mM Natrium Phosphat Puffer pH8, 300 mM Natriumchlorid). Für die Mlc Reinigung reichte dieser Reinigungsschritt zur Entfernung der meisten Nebenproteine aus. Die Elution erfolgte bei 170mM Imidazol. Anschließend wurde das Protein gegen HEPES Puffer pH8,0 (100mM HEPES, 25mM Na-Glutamat, pH 8,0) über Nacht dialysiert oder alternativ mit Hilfe der „HiTrap<sup>TM</sup> Desalting“ Gelfiltrationssäule entsalzt. Die Ergebnisse der Reinigung sind in Abbildung 3.3.6 dargestellt:



**Abb.3.3.6 (verändert nach E. Klang 2007(41))**

A zeigt eine Coomassiefärbung

Abbildung B zeigt die entsprechende Silberfärbung verschiedener Proben im Rahmen der Reinigung des Proteins Mlc. Abbildung C zeigt den entsprechenden Western-Blot. Probe 1 gibt die Gesamtzellproteine wieder. Die Proben 2-5 sind jeweils verschiedene Elutionsfraktionen des Proteins welche mittels der ÄKTA-FPLC gewonnen wurden.

Wie in den Abbildungen 3.3.6 A-C zu sehen ist, konnte das Protein Mlc mit Hilfe dieser Methode sehr gut und effektiv gereinigt werden. Der Western-Blot, in dem die Proteine mit Hilfe des

„Anti-His“ Antikörper detektiert wurden, zeigte jedoch eine ganze Reihe Abbauprodukte, welche auch durch einen Proteaseinhibitor nicht verhindert werden konnten. In der Coomassie-, und in der Silberfärbung sind nahezu die gleiche Anzahl an Nebenproteinen vorhanden, die fast alle ein geringeres Molekulargewicht als Mlc aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Proteine MtfA und Mlc erfolgreich gereinigt werden konnten. Die Verfügbarkeit der Proteine ermöglichte die im folgenden Kapitel beschriebene Herstellung von spezifischen Antikörpern, welche zum Nachweis der jeweiligen Proteinmengen im bakteriellen Di-Hybrid System, sowie zur physiologischen Charakterisierung des Proteins MtfA dienten. Hierdurch konnten die erzielten Ergebnisse aussagekräftiger ausgewertet und eingeordnet werden. Außerdem konnte mit Hilfe der gereinigten Proteine mit verschiedenen im Folgenden gezeigten Versuchen die Dimerisierung von MtfA nachgewiesen werden. Mit Hilfe von „Electrophoretic mobility shift assays“, sowie mittels Gelfiltration wurde versucht, die Wechselwirkung von MtfA und Mlc nachzuweisen und zu charakterisieren.

### **3.3.2 Herstellung spezifischer Antikörper gegen MtfA und Mlc in Kaninchen**

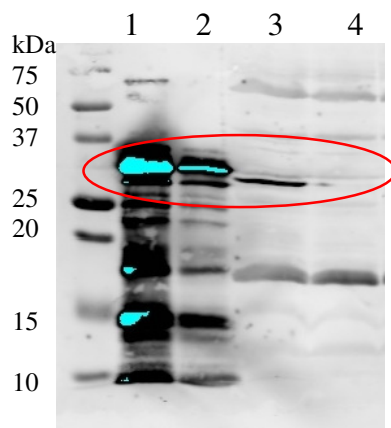
#### **3.3.2.1 Generelle Vorgehensweise**

Für die Durchführung von spezifischen Immunoblots mit Mlc und MtfA Proteinen wurden ausgehend von den gereinigten Proteinen spezifische Antikörper in Kaninchen produziert. Diese wurden in Kooperation mit der Firma Pineda Antikörperservice (Berlin) hergestellt. Dazu wurden zunächst neun verschiedene Präimmunsereen verschiedener Tiere auf mögliche Reaktionen mit Mlc oder MtfA getestet. Dieser Test war wichtig, da Kaninchen häufig bereits Kontakt mit Bakterien wie *E.coli* hatten und somit teilweise auch schon Antikörper gegen verschiedene Proteine aus diesen Bakterien hergestellt haben. Daher wurden zwei Kaninchen ausgewählt, bei denen vor der Immunisierung keinerlei Antikörper gegen Mlc sowie MtfA im Western-Blot nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Diese Tiere wurden dann mit gereinigten Proteinpräparationen der Proteine Mlc (0,2µg/µl //2ml) und MtfA (0,65µl/µl //1,5ml) mehrere Male immunisiert. Die Antikörperproduktion wurde nach 60 und 90 Tagen mittels Western-Blot überprüft. Nach 60 Tagen konnten sehr gute Signale für die gereinigten Proteine Mlc und MtfA nachgewiesen werden. Die chromosomale Expression der Proteine konnte jedoch erst nach 90 Tagen nachgewiesen werden. Daher wurden die finalen Antikörper gegen Mlc und MtfA nach 100 Tagen von beiden Kaninchen gewonnen.

### 3.3.2.2. Optimierung der Antikörper im Western-Blot

#### 3.3.2.2.1 Optimierung der MtfA-Antikörper für die Western-Blot Analyse

Nach Erhalt der Antikörper mussten die optimalen Bedingungen für den Nachweis der chromosomalen Expression der Proteine Mlc und MtfA ermittelt werden. Hierzu wurden die gereinigten Proteine in verschiedenen Verdünnungen, ein Gesamtproteinextrakt aus *E.coli* K-12 sowie der Gesamtproteinextrakt der  $\Delta dgsA \Delta mtfA$  Doppeldeletionsmutante LJB61 auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Antikörper wurde dann in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Der sekundäre Antikörper war demnach wiederum ein Antikörper gegen Kaninchen, der ein Infrarotlabel (IR-Dye 700) enthielt. Daher konnten die Banden mit Hilfe des Scanners der Firma LI-COR detektiert werden. Für die spezifischen MtfA-Antikörper konnte die optimale Antikörperkonzentration auf 1:2000 bestimmt werden (siehe Abbildung 3.3.7)



**Abb.3.3.7 Optimierung der spezifischen MtfA-Antikörper**

Bahn1: gereinigtes MtfA 45µg

Bahn2: gereinigtes MtfA 23µg

Bahn3: *E.coli* K-12 Gesamtproteinextrakt

Bahn4: LJB61 Gesamtproteinextrakt

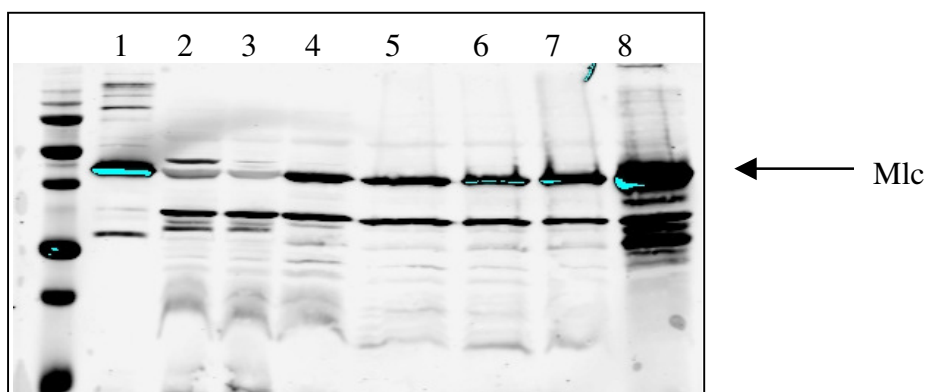
Der spezifische MtfA Antikörper wurde hier 1:2000 eingesetzt.

Die Abbildung zeigt deutliche Signale für das gereinigte Protein sowie ein spezifisches Signal für das vom Chromosom exprimierte MtfA aus *E.coli* K-12. Der Deletionsstamm zeigte kein Signal an der entsprechenden Stelle. Das gereinigte Protein ist etwas größer als das chromosomal exprimierte, da es über einen zusätzlichen „His-Tag“ verfügt. Damit ist die etwas höher laufende Bande in den Bahnen 1 und 2 zu erklären. Die Nebenbanden gehen auf die Proteine zurück, die bei der Reinigung nicht entfernt werden konnten. Höhere Konzentrationen dieses Antikörpers zeigten ebenfalls deutliche Banden, jedoch eine höhere Anzahl an Nebenbanden, weshalb die Konzentration 1:2000 als optimal für weitere Versuche angenommen wurde.

### 3.3.2.2 Optimierung der Mlc-Antikörper für die Western-Blot Analyse

Die Optimierung für die Mlc-Antikörper gestaltete sich etwas schwieriger. Da es sich bei dem Protein Mlc um einen globalen Repressor handelt, ist das chromosomale Expressionsniveau sehr gering und das Protein liegt nur in wenigen Kopien in der Zelle vor. Aus diesem Grund ließ es sich nicht unter den für MtfA getesteten Bedingungen nachweisen. Somit wurde hier eine Optimierung mit Hilfe des plasmidkodierten Mlcs ausgehend von pTM30mlchis durchgeführt. Der Vektor wurde in den *E.coli* Stamm JM109 transformiert und mit verschiedenen Mengen an IPTG induziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.8 zu sehen.

Die mit dem spezifischen Mlc-Antikörper detektierten Banden zeigten bei einer Antikörperverdünnung von 1:500 bereits in der uninduzierten Probe ein gutes Mlc Signal. In dem K-12 Gesamtzellextrakt sowie in der Negativkontrolle LJB61 konnte kein Mlc nachgewiesen werden. Bei den übrigen induzierten Proben konnte eine Zunahme des Signals in Korrelation zu der erhöhten Induktion nachgewiesen werden. Vergleichbare Versuche wurden auch mit Antikörperverdünnungen von 1:1000 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die optimale Konzentration für verschiedene Mlc Nachweise auf 1:1000 gesetzt.



**Abb.3.3.8 Induktionsversuch für die Mlc-Antikörperoptimierung Antikörperverdünnung 1:500**

1: gereinigtes Mlc 2: K-12 Gesamtzellextrakt 3: LJB61 Gesamtzellextrakt 4: 0 $\mu$ M IPTG 5: 2 $\mu$ M IPTG  
6: 6 $\mu$ M IPTG 7: 10 $\mu$ M IPTG 8: 100 $\mu$ M IPTG

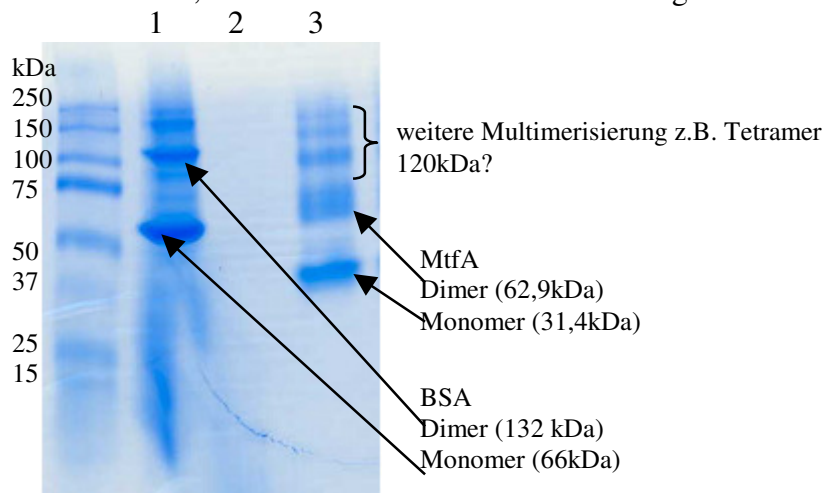
Die spezifischen Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit für verschiedene Nachweise der Proteine eingesetzt. Somit konnten beispielsweise die Fusionsproteine der Versuche zum bakteriellen Di-Hybrid System (vgl. Kapitel 3.1.6) nachgewiesen werden. Eine weitere Anwendung fanden die spezifischen Antikörper im Rahmen der physiologischen Charakterisierung des MtfAs (vgl. Kapitel 3.2.4.2).

### 3.3.3 Nachweis der Dimerisierung von MtfA

Im Rahmen der Dissertationen von A.-K Becker (10) und S. Seitz (89) konnte mit Hilfe von Gelfiltrationsexperimenten die Dimerisierung von MtfA gezeigt werden (10, 89). A.-K. Becker konnte darüber hinaus mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese zeigen, dass MtfA nach einer Reinigung unter nativen Bedingungen sogar im SDS-Gel als Dimer vorlag und die Dimerisierung durch eine Erhitzung des Proteins auf 100°C aufgehoben werden konnte (10). Diese Beobachtungen sollten im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden. Dazu wurden hier verschiedene in-vitro Versuche wie native Gelelektrophorese, SDS-Gelelektrophorese, Gelfiltrationsanalysen, sowie massenspektrometrische Versuche mit Hilfe des ESI (Electrospray-Ionisation) durchgeführt. In-vivo Versuche zur Dimerisierung von MtfA wurden bereits in Kapitel 3.1.3.1 gezeigt.

#### 3.3.3.1 Native Gelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese wurde wie im Material- und Methodenteil beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle wurde neben dem Größenstandard BSA (Monomer: 66kDa, Dimer 132kDa, Trimer 198kDa) als weitere Größenreferenz aufgetragen. Gereinigtes MtfA wurde zum einen gekocht (10min 95°C) und zum anderen ungekocht aufgetragen. Die Abbildung zeigt das Coomassie gefärbte native Gel mit der zusätzlichen Größenreferenz BSA. Das BSA Monomer und Dimer ist deutlich zu erkennen. Bei der ungekochten MtfA Probe konnten keine Banden nachgewiesen werden vermutlich, weil das Protein nicht in das Gel eingewandert ist.



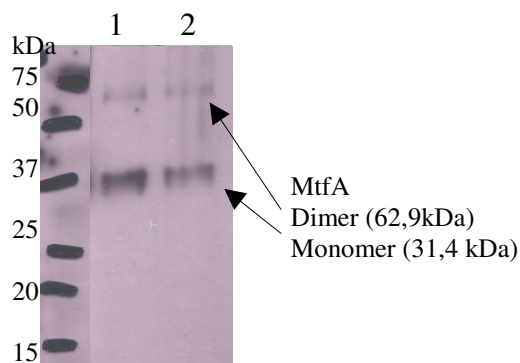
**Abb.3.3.9 natives Gel zur Identifikation eines MtfA-Dimers**

Bahn1: BSA 22,5µg

Bahn2: gekochtes MtfA

Bahn3: ungekochtes MtfA

Die Präparation des gereinigten MtfAs zeigte mehrere Banden. Die untere Bande wurde dem Monomer zugeordnet, obwohl die aufgrund des Standards abgelesene Größe nicht der vorhergesagten Größe von 31,4kDa entsprach. Auch die Dimerbande (62,9kDa) läuft deutlich oberhalb der BSA (66kDa) Monomerbande. Daher konnten anhand dieser Gele keine Größenabschätzungen vorgenommen werden. Da das Gel sowie die Proteinpräparation unter nativen Bedingungen abliefen, sollte das Protein in seiner nativ gefalteten Form vorliegen und läuft daher unter nicht denaturierenden Bedingungen nicht seinem Molekulargewicht entsprechend. Daher können anhand eines solchen Geles nur Aussagen anhand der Bandenanzahl gemacht werden. Die verschiedenen weiteren Banden könnten auf weitere Oligomerisierungszustände oder auf die ebenfalls in der Proteinpräparation vorhandenen Nebenproteine zurückzuführen sein. Da es sich bei den in den Färbungen nachgewiesenen Proteinen jedoch hauptsächlich um kleinere Proteine als MtfA gehandelt hat, ist Letzteres eher als unwahrscheinlich zu betrachten. Mit einer alternativen gereinigten MtfA-Präparation wurde das native Gel geblottet und die Banden mit Hilfe von chemischer Lumineszenz auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Diese Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abb.3.3.10 zeigt einen Western-Blot eines nativen Geles mit MtfA Proben.**

Hier ist neben der recht starken Monomerbanden eine zusätzliche Dimerbande zu sehen.

Die Western-Blot Analyse zeigt, dass hier ebenfalls ein MtfA Monomer und ein Dimer in beiden Reinigungsfraktionen zu sehen war. Die entsprechenden MtfA Banden liefen wiederum etwas höher als ihrem eigentlichen Molekulargewicht entsprechen würde. Diese Ergebnisse konnten weitere zwei Male auf einem 10-20% und einem 8-16% Tris-HCl Polyacrylamid Gradientengel reproduziert werden.



### 3.3.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Auch mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und anschließender Western-Blot Analyse konnte ein MtfA-Dimer nachgewiesen werden. Die MtfA-Dimerisierung konnte jedoch nur nachgewiesen werden, wenn die entsprechende Probe mehrere Mal eingefroren und wieder aufgetaut wurde. Dieses Verfahren schien die Dimerbildung sogar unter denaturierenden Bedingungen zu begünstigen (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.3.3 Electrospray-Ionisation (ESI)

Mit Hilfe des ESI Massenspektrometers lassen sich die Molekulargewichte geringerer Proteine herausfinden. Diese Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Stefan Walter aus der Arbeitsgruppe AGM (Angewandte Genetik der Mikroorganismen) der Universität Osnabrück durchgeführt. Die Massenspektrometer-Analysen wurden zum einen für das gereinigte Wildtyp Protein MtfA durchgeführt, zum anderen mit einer in Kapitel 3.1.1.6 gezeigten Mutante. Die Analyse des Wildtypproteins ergab einen Monomerpeak mit einem Molekulargewicht von 31502Da mit einer Intensität von  $1,8 \cdot 10^6$ , sowie einen Dimerpeak mit einer geringeren Intensität von  $0,5 \cdot 10^6$  und einem Molekulargewicht von 59735Da.

Die Intensität gibt Aufschluss über die vorhandenen und verschiedenen Mengen der Proteine. Somit lässt sich aufgrund dieser Ergebnisse sagen, dass eine 3,6 fache Menge an Monomer im Vergleich zum Dimer in der Proteinpräparation vorhanden war. Die gleichen Versuche wurden mit der zu der Zeit zur Verfügung stehenden Präparation der Mutante A207D/Y205H durchgeführt. Hierbei ergab sich ebenfalls ein Monomer Peak von 31593Da mit einer Intensität von  $5 \cdot 10^5$  und ein Dimerpeak von 63053Da mit einer Intensität von  $2,2 \cdot 10^5$ . Daher liegt hier aufgrund der zwei Aminosäureaustausche ein leicht verändertes Molekulargewicht im Vergleich zum Wildtyp-MtfA vor. Die Mengen der verschiedenen Oligomerisierungszustände des Proteins standen hier im Verhältnis 1:2,3 (Dimer : Monomer).

### 3.3.4 Kalibrierung der Gelfiltrationschromatographiesäule Superdex™ 200 10/300 GL

Für die folgenden Gelfiltrationsversuche zur Bestimmung von Proteingrößen und Proteinkomplexen wurde eine Kalibrierung der Gelfiltrationssäule durchgeführt. Hierzu wurde mit Hilfe des Kalibrierungskits „Molecular Weight Standard for Gelfiltration Chromatography (Sigma) und HMW Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia)“ eine Kalibrierungsgerade erstellt. Anschließend wurden die Proteine mit definierter Größe auf die Säule gegeben und das Elutionsvolumen gegen das Molekulargewicht (vgl. Tabelle 3.3.2) in halblogarithmischer Skalierung aufgetragen. Die so entstandene Kalibrierungsgerade ist in Abbildung 3.3.11 gezeigt:

Tab.3.3.2 Proteine zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule

Protein	Molekulargewicht in Dalton	Elutionsvolumen in ml
Aprotinin	6500	19,25
Cytochrom C	12400	18
Carbonic Anhydrase	29000	17
Albumin	66000	14,5
Aldolase	158000	13,25
Catalase	232000	13
Ferritin	440000	11
Thyroglobulin	669000	9

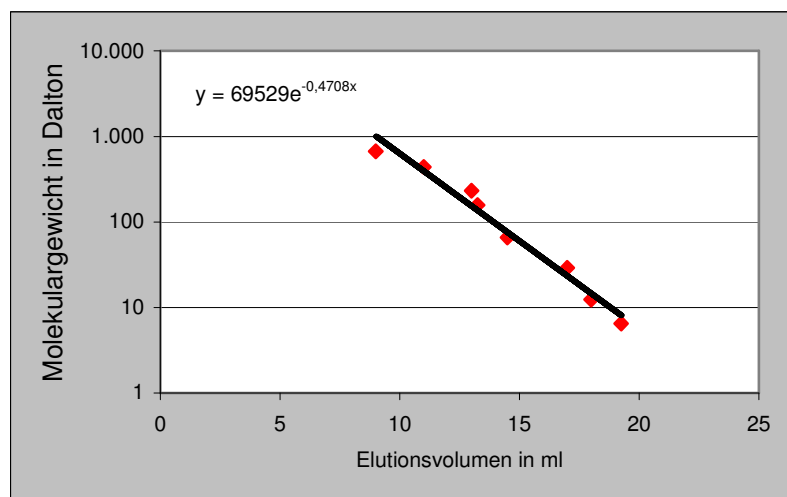


Abb.3.3.11 Kalibrierungskurve der Gelfiltrationssäule

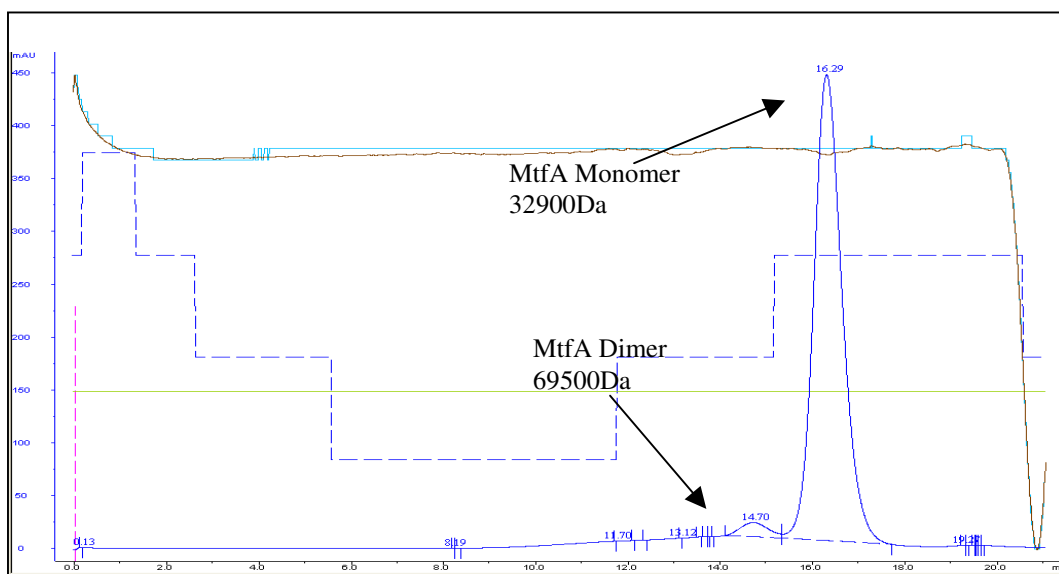
Das Molekulargewicht der jeweiligen Proteine ist hier halblogarithmisch gegen das Elutionsvolumen in Millilitern aufgetragen.

Ausgehend von dieser Ausgleichsgerade konnte mit Hilfe des Microsoft Office Programmes Excel eine Gleichung erstellt werden, mit deren Hilfe weitere Molekulargewichte anhand des ermittelten Elutionsvolumens berechnet werden konnten:  $y=69529e^{-0,4708x}$ . Da diese Gleichung nur eine Näherung der wirklichen Werte angibt, wurde sie für alle Berechnungen der Molekulargewichte im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Somit zeigten alle Berechnungen den gleichen „Fehler“, der aus dieser Berechnung resultiert. Die Unbekannte Y ist hiermit das zu

„Fehler“, der aus dieser Berechnung resultiert. Die Unbekannte Y ist hiermit das zu ermittelnde Molekulargewicht, die Unbekannte X gibt das jeweilig ermittelte Elutionsvolumen an. Die Anwendung dieser Kalibrierung ist in den folgenden Kapiteln 3.3.4.1 und 3.3.5 beschrieben.

### 3.3.4.1 Nachweis des MtfA-Dimers mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie

Zum Nachweis des MtfA-Dimers wurden ebenfalls Gelfiltrationsanalysen durchgeführt. Wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben wurde für die hier verwendete Gelfiltrationssäule Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare) eine Kalibrierung mit verschiedenen Proteinen durchgeführt. Daher konnte durch das Auftragen der MtfA Proteinpräparation erneut die Größe sowie der Oligomerisierungszustand nachgewiesen werden. Die Abbildung 3.3.12 zeigt, dass ein MtfA-Monomerpeak mit einer Intensität von ca. 450mAU zu sehen war. Des Weiteren konnte ein Dimerpeak mit einer Intensität von ca. 4mAU nachgewiesen werden. Die Mengendifferenz dieser beiden Zustände stand bei dieser Präparation daher in einem Verhältnis von 1:112 (Dimer : Monomer). Die Molekulargewichte konnten aufgrund der in 3.3.4 erstellten Kalibrierungsgerade auf 32900Da für das Monomer und 69500Da für das Dimer ermittelt werden. Da für diese Versuche und für die in Kapitel 3.3.3.3 beschriebenen Versuche unterschiedliche Proteinpräparationen verwendet wurden, konnten die ermittelten Verhältniswerte hier nicht direkt miteinander verglichen werden.



**Abb.3.3.12 zeigt die Gelfiltrationsexperimente zum Nachweis des MtfA-Monomers und Dimers.** Die blaue Kurve gibt die Absorption in mAU an. Die braune Kurve die Leitfähigkeit.

Daher lässt sich generell und zusammenfassend anhand der in den Kapiteln 3.3.3.1-3.3.3.4 gezeigten Ergebnissen sagen, dass das MtfA sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegt. In

welchem Mengenverhältnis das Dimer im Vergleich zum Monomer steht scheint stark von den physiologischen Bedingungen abhängig zu sein und konnte daher im Rahmen der hier aufgeführten Versuche nicht näher bestimmt werden. Diese Ergebnisse stehen konträr zu den von S. Seitz in ihrer Dissertation beschriebenen Ergebnissen. Sie konnte ebenfalls mit Hilfe von Gelfiltrationsversuchen zeigen, dass MtfA in ihrer Präparation hauptsächlich als Dimer vorlag. Über ihr verwendetes Reinigungsverfahren von MtfA standen keinerlei Informationen zur Verfügung. Für die Gelfiltration wurden in beiden Versuchen die gleichen Puffer verwendet. Daher ist es naheliegend, dass die Unterschiede in der Präparation von MtfA liegen müssen. Somit scheint der Dimerisierungszustand beispielsweise von dem für die Anzucht verwendeten Medium oder dem verwendeten Puffer abhängig zu sein.

### 3.3.5 Nachweis der Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA mittels Gelfiltrationschromatographie

Um die Wechselwirkung zwischen MtfA und Mlc auch auf biochemischer Ebene zu zeigen, wurden auch für diesen Zweck Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden die gereinigten Proteine Mlc und MtfA einzeln mittels Gelfiltrationschromatographie analysiert. Anschließend wurde diese gemeinsam und nach verschiedenen Inkubationsbedingungen mit Hilfe der ÄKTA-FPLC und der Gelfiltrationssäule auf eine Wechselwirkung hin untersucht. Das Einzelprofil von MtfA ist bereits in Abb. 3.3.12 im Kapitel 3.3.4.1 dargestellt. Das Einzelprofil des Proteins Mlc ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

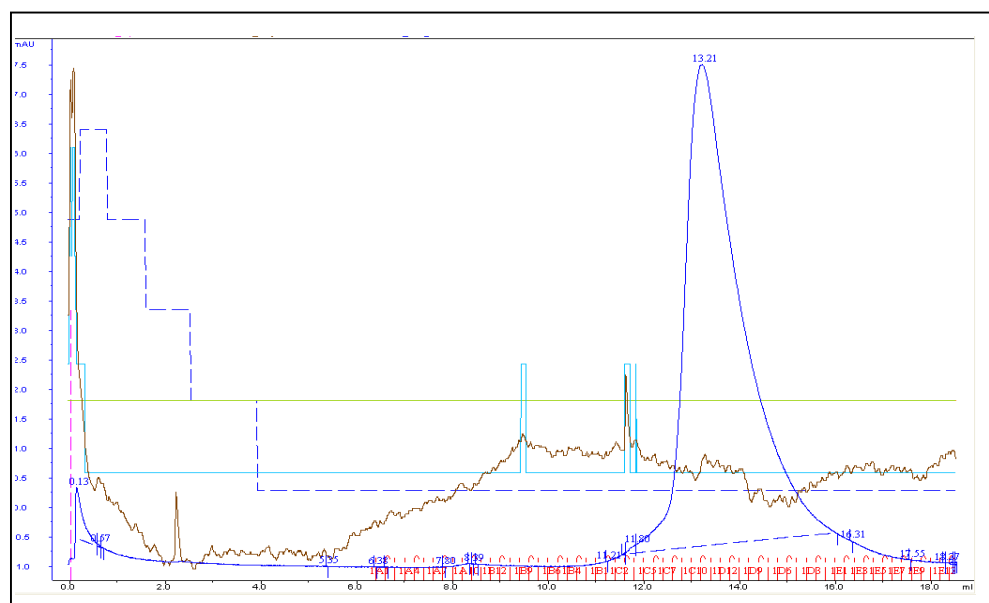
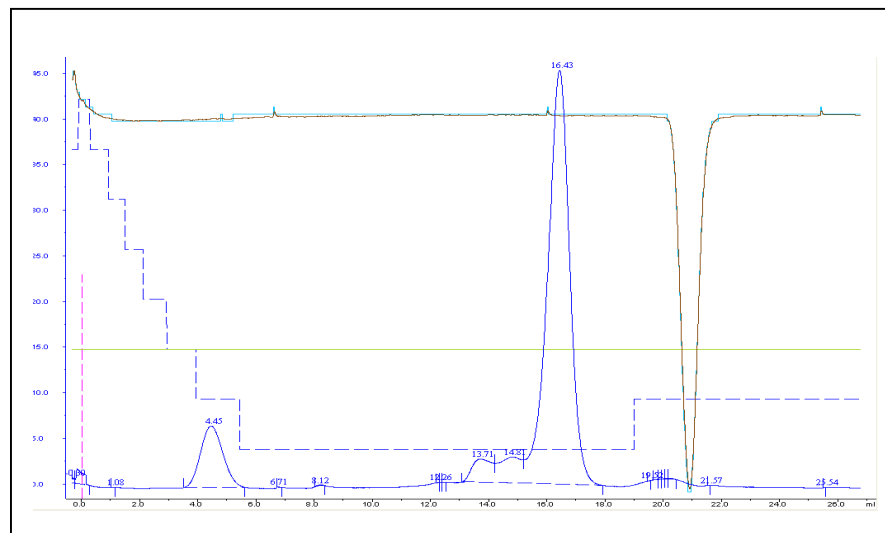


Abb.3.3.13 Mlc-Elutionsprofil nach der Gelfiltrationschromatographie

Das Profil von Mlc zeigt einen Elutionspeak bei 13,21 Millilitern. Dieser korreliert nach Berechnung mit der in Kapitel 3.3.4 ermittelten Formel mit einem Molekulargewicht von 139,97 kDa. Dieses deutet nach rein mathematischer Berechnung auf ein Trimer des Mlc Proteins hin (Monomer: 45869,9Da). Da jedoch mit Hilfe von EMSA's die Funktionalität von Mlc nachgewiesen wurde und frühere Studien besagen, dass Mlc nur als Tetramer aktiv ist (89) scheint die Abweichung des Tetramer Molekulargewichtes (berechnet: 183,479kDa) auf Rundungsfehler zurückführbar. Daher wird im Folgenden davon ausgegangen, dass es sich um ein Mlc-Tetramer handelt. Um die Wechselwirkung von Mlc und MtfA mit Hilfe von Gelfiltrationsexperimenten zu zeigen, wurden die beiden gereinigten Proteine im Verhältnis 1:20 (Mlc: MtfA) gemischt und unterschiedlich lang bei 37°C inkubiert. Dass ein Verhältnis von ca. 1:20 vorliegen muss, wurde mit Hilfe der EMSA's ermittelt. Ebenso ergaben die Versuche des bakteriellen Di-Hybrid Systems, dass ein Überschuss an MtfA vorhanden sein muss, um eine Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA nachweisen zu können. Nach der Inkubation wurde das Gemisch auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen, und die jeweiligen Elutionspeaks aufgenommen und ausgewertet. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch ein Elutionsprofil nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten.



**Abb.3.3.14 Elutionsprofil zum Nachweis der Mlc-MtfA Interaktion.**

Die Absorption in mAU ist in blau, die Leitfähigkeit in braun dargestellt. Die Y-Achse zeigt die Absorption in mAU und die X-Achse das Elutionsvolumen in ml an.

Das Elutionsprofil zeigte nach der gemeinsamen Auftragung von Mlc und MtfA mehrere Peaks. Zur Verdeutlichung sind die Peaks und deren Bedeutung in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab.3.3.3 gibt einen Überblick über die mittels Gelfiltration ermittelten Ergebnisse

Protein	berechnetes Molekulargewicht (Monomer)	Elutionsvolumen in ml	Molekulargewicht in Dalton	Bedeutung
MtfA	31492Da	14,7	69500	MtfA Dimer
		16,29	32900	MtfA Monomer
Mlc	45869Da	13,21	139970	Mlc Tetramer
MtfA und Mlc		13,71	111200	???
		14,8	66000	MtfA Dimer
		16,43	31200	MtfA Monomer

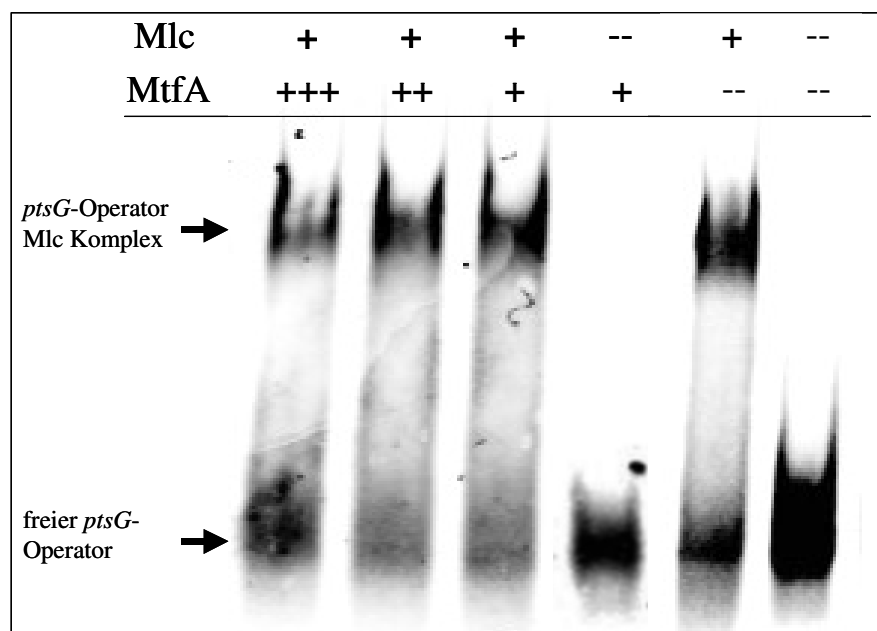
Alle Elutionsprofile mit verschiedenen Proteinpräparationen und verschiedenen Inkubationszeiten zeigten sehr ähnliche Profile, Abweichungen lagen im für dieses System üblichen Rahmen. Das Elutionsprofil und die Tabelle zeigen, dass bei der gemeinsamen Inkubation von Mlc und MtfA eindeutig ein MtfA-Monomer und Dimer nachweisbar ist. Ein weiterer Peak ließ sich bei 13,7ml und einem zugehörigen Molekulargewicht von 111,200kDa nachweisen. Dieser Peak könnte auf ein Mlc-Tetramer hindeuten. Da dieser Wert jedoch erheblich von dem vorher mit der gleichen Präparation bestimmten Tetramerwert des Mlcs (183,476kDa) abweicht, könnte es sich hierbei auch um ein Mlc-Dimer (91738Da) handeln. Alternativ dazu könnte es sich auch um ein Multimer aus zwei MtfA Proteinen und einem Mlc-Protein handeln (108,853 kDa). Ebenso wäre ein Heterodimer aus einem Mlc und einem MtfA (77361Da) denkbar. Daher ist dieser Wert in der Tabelle mit einem Fragezeichen versehen. Hierauf wird in der Diskussion (Kapitel 4.3) genauer Bezug genommen. Eine direkte Klärung der Frage hätte eine SDS-Gel-Analyse und ein Western-Blot mit den Proben aus der Gelfiltration erbringen können. Diese Versuche ergaben jedoch eine zu geringe Konzentration der eluierten Proteine bzw. Proteinkomplexe, so dass kein Nachweis im Western-Blot erbracht werden konnte.

Ausgehend von den in diesem Kapitel gezeigten Versuchen kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Wechselwirkung zwischen Mlc und MtfA mit Hilfe der getesteten Bedingungen nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Um aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen, wäre eine intensive Optimierung der Bedingungen beispielsweise in der Inkubationszeit vor dem Auftragen oder der Pufferwahl durchzuführen.

### 3.3.6 Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

In Kooperation mit E. Klang im Rahmen ihrer Diplomarbeit und mit K. Homann im Rahmen ihrer Masterarbeit wurden „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSAs) durchgeführt.

Hierzu wurden die gereinigten Proteine Mlc und MtfA verwendet. Da die Versuche von K. Ho-  
mann und E. Klang durchgeführt wurden, werden hier nur zusammenfassend die für diese Arbeit  
relevanten Ergebnisse dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage nach dem  
Nachweis der Wechselwirkung zwischen MtfA und Mlc in Hinsicht auf die Fähigkeit von MtfA,  
Mlc von dem *ptsG*-Operator zu entfernen. Daher wurden EMSAs durchgeführt, bei denen die  
Wechselwirkung des *ptsG* Operators mit dem Repressor Mlc und die Auswirkung von MtfA auf  
diese Wechselwirkung getestet wurde. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusam-  
mengefasst. Die Abbildung 3.3.15 zeigt das Operatorfragment alleine ohne Zugabe von Mlc und  
MtfA. Dieses ist aufgrund seiner geringen Größe (42Bp) am unteren Rand des Geles zu sehen.  
Bei Zugabe von Mlc entsteht ein „shift“ zum oberen Teil des Geles. Hierdurch wird die Bindung  
des Mlc Repressors an das Operatorfragment signalisiert. Unter Zugabe von MtfA zu dem Ope-  
ratorfragment konnte kein „shift“, also keine Bindung beobachtet werden. Wenn zu dem Mlc-  
Operatorfragment-Gemisch verschiedene Mengen an MtfA hinzugegeben wurden, so konnte bei  
zunehmender Menge von MtfA ein Loslösen des Mlc von dem *ptsG* Operatorfragment beobach-  
tet werden, was wiederum durch die Operatorbande am unteren Teil des Geles zu detektieren  
war.



**Abb.3.3.15** “Electrophoretic Mobility Shift Assay” mit dem *ptsG* Operatorfragment, dem Mlc Protein und verschiedenen Mengen an MtfA.

(Abbildung verändert nach Jahreis 2006)

Daher bestätigen diese Versuche die Wechselwirkung zwischen Mlc und dem *ptsG* Operator, sowie zwischen Mlc und MtfA. Da es während der Durchführung der EMSAs verschiedene Probleme gab, konnten diese Versuche nicht auf verschiedene in Kapitel 3.1.1.6 charakterisierte MtfA-Mutanten ausgeweitet werden.

## 4. Diskussion

Die Phosphotransferase Systeme aus *E.coli* sind sehr gut untersuchte Modellsysteme zur Veranschaulichung von komplexen Regulationskaskaden in Prokaryoten. Diese Arbeit beschäftigte sich hauptsächlich mit dem Glukose-PTS und hierbei im speziellen mit dem neuen, uncharakterisierten Faktor MtfA, der eine Rolle bei der *ptsG* Regulation spielt.

Ziel dieser Arbeit war es, ausgehend von den Arbeiten von T. Zeppenfeld (107) und A.-K. Becker (10), eine weitere Charakterisierung dieses Proteins auf genetischer, physiologischer und biochemischer Ebene durchzuführen. Hierbei wurden verschieden experimentelle Ansätze verfolgt, deren Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden.

- Mit Hilfe von gezielten AS-Austauschen und Di-Hybrid Studien konnte ein MtfA Domänen-Modell mit einer aminoterminalen Dimerisierungs- und einer carboxyterminalen Mlc-Wechselwirkungs-Domäne charakterisiert werden.
- Durch die parallele Expression von EIIB<sup>Glc</sup> und MtfA konnte eine Konkurrenzreaktion um Mlc nachgewiesen werden. Hierbei scheint EIIB<sup>Glc</sup> die Wechselwirkung von MtfA mit Mlc zu behindern. Ob es sich dabei um eine direkte Konkurrenz um die gleiche Bindestelle oder um eine durch EIIB<sup>Glc</sup> induzierte Konformationsänderung von Mlc in der Bindestelle von MtfA handelt, müssen weitere Experimente klären.
- Die physiologische Charakterisierung von MtfA und MtfA-Mutanten zeigte einen Einfluss des Proteins auf das Chemotaxisverhalten von *E.coli*. Promotorstudien wiesen darauf hin, dass MtfA unter der Kontrolle eines relativ schwachen Promotors steht. Im Rahmen von Wachstumskompitionsversuchen konnte ein Wachstumsvorteil des MtfA Wildtyps im Vergleich zur Mutante beim Wachstum auf Glukose und unter Hitzeschockbedingungen bei 42°C beobachtet werden. Des weiteren stellte sich bei diesen Versuchen ein Unterschied in der Regulation von MtfA in den Stämmen LJ110 und K-12 heraus.



## 4.1 Charakterisierung der funktionellen Domänen von MtfA

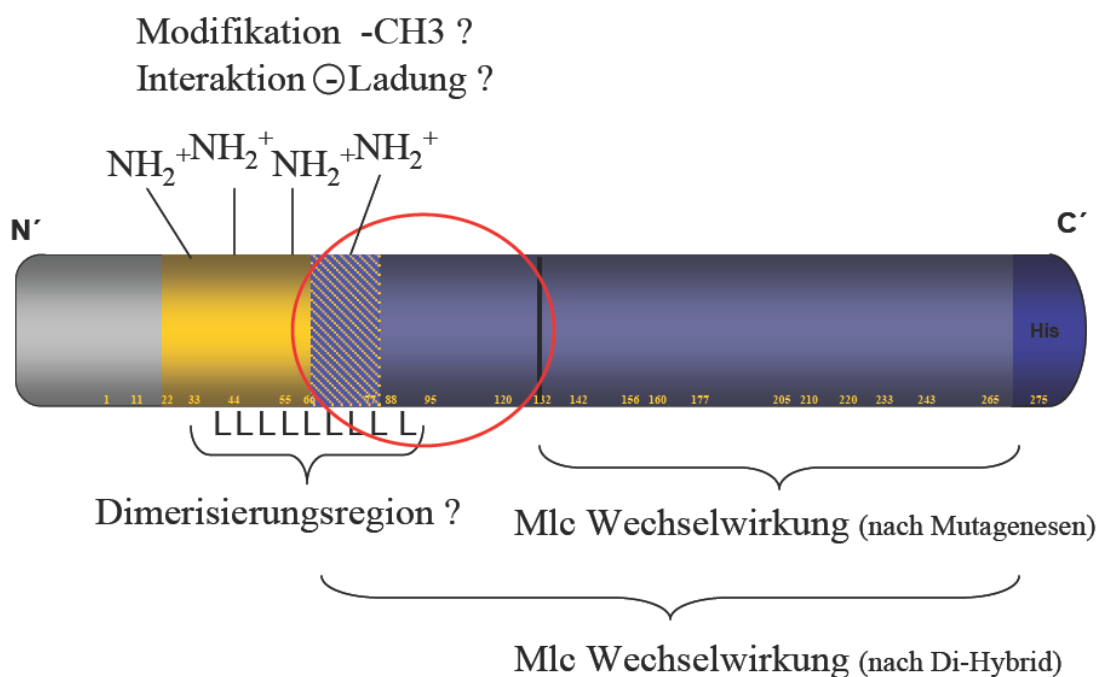
Im Rahmen der Dissertation von A.-K. Becker konnte MtfA als „Mlc titration factor A“ charakterisiert werden (10). Daher stellte sich in der vorliegenden Arbeit die Frage nach der Domänenstruktur des bisher strukturell vollkommen unbekanntem Proteins MtfA.

Mit Hilfe der Mutageneseversuche konnte die Mlc Interaktionsdomäne im carboxyterminalen Bereich ab AS132 lokalisiert werden. Die Versuche des bakteriellen Di-Hybrid Systems hingegen zeigten, dass ein carboxyterminales Fragment ab AS84 in der Lage ist, Mlc zu titrieren, wohingegen dieses für ein Fragment ab AS133 nicht gezeigt werden konnte. Daher ist zu vermuten, dass in der Region zwischen AS84 und 133 ebenfalls essentielle AS liegen, die mit der Mutagenese nicht erfasst wurden. Somit stellt sich die Frage, ob das Auswahlverfahren der ausgetauschten AS effizient und vollständig war. Generell stellte die Auswahl von hochkonservierten AS mittels des ausführlichen Aminosäuresequenzvergleiches einen guten Einstieg in die Charakterisierung relevanter AS dar. Für die Hälfte der als hochkonserviert bezeichneten AS (10 von 23) konnte eine essentielle Funktion für die Mlc Wechselwirkung nachgewiesen werden. Dennoch zeigte das aufgrund dieser Ergebnisse hergestellte MtfA $\Delta$ 1-131 Konstrukt keine Titration von Mlc, so dass die ausgewählten AS für die Wechselwirkung nicht ausreichend zu sein scheinen. Innerhalb der durch das Di-Hybrid System als essentiell charakterisierten Region zwischen den AS 84 und 133 liegen drei hochkonservierte AS, deren konservativer Austausch keinerlei Einschränkungen in Bezug auf die Mlc-Interaktion erbrachte. Innerhalb dieser Region gibt es jedoch einige AS die zwar nicht bei allen der im Aminosäuresequenzvergleich einbezogenen Organismen, jedoch bei einem Teil der näher verwandten Organismen übereinstimmen. Diese könnten ebenfalls mit der ortsgerichteten Mutagenese oder aber mit schrittweise verkürzten Konstrukten von AS84-133 im bakteriellen Di-Hybrid System auf ihren Phänotyp hin überprüft und charakterisiert werden. Darüber hinaus weist auch die im Rahmen der unspezifischen Mutagenese gefundene Doppelmutation darauf hin, dass es weitere essentielle AS für die Mlc-MtfA Interaktion geben muss, da es sich bei der gefundenen Mutation nicht um eine bereits als wichtig charakterisierte Aminosäure handelte. Daher wäre ein erneuter Ansatz mit Hilfe der unspezifischen Mutagenese im XL1-Red Stamm oder alternativ beispielsweise mit Hilfe der von Rice entwickelten „Random PCR“ Mutagenese denkbar, um weitere wichtige AS zu identifizieren (79). In Bezug auf die XL1-Red Mutagenese wäre dann eine längere Kultivierung der zu mutagenisierenden Plasmide sinnvoll, da sich im Rahmen der Diplomarbeit von E. Gabor gezeigt hat, dass sich eine gute Mutantenausbeute mit Hilfe dieses Systems erst nach ca. 15 Tagen ergibt (mündliche Mitteilung E. Gabor). Außerdem wäre denkbar, zufällig und über das gesamte MtfA verteilt nicht

konservierte AS, konservativ oder aber gegen AS, die bei anderen Organismen an dieser Stelle sind, auszutauschen und deren Phänotyp in Bezug auf die Mlc Interaktion zu bestimmen. Einen weiteren Aufschluss über potentiell wichtige AS könnte das erstellte „Helix-Wheel“-Modell geben. Hierbei wäre es sinnvoll, die exponierten und für die Dimerisierung potentiell verantwortlichen Leuzinreste im Bereich AS40-90 von MtfA systematisch auszutauschen und beispielsweise durch Gelfiltrationsexperimente zu ermitteln, ob weiterhin eine Dimerisierung stattfindet oder nicht. Darüber hinaus wäre es interessant, die vier exponierten geladenen AS D86, E79, E83 und E90 auszutauschen und somit einen Hinweis auf ihre Funktion zu bekommen. In Bezug auf die Glutamatreste wäre beispielsweise eine Modifikation mittels Methylierung wie bei den MCPs möglich (99). Daher könnten diese AS für die in der Anionenaustauschchromatographie und in den SDS-Gelen beobachtete Doppelbande, die auf eine Modifikation von MtfA hindeutet, verantwortlich sein. Die AS L40 und A70 führten bei dem Austausch gegen die geladenen AS E und D dazu, dass MtfA keine Titration mehr von Mlc verursachte. Diese AS wurden aufgrund ihrer hohen Konservierung ausgetauscht. Im „Helix-Wheel“-Modell zeigten sie keine besondere exponierte Stellung oder Lage im Protein. Jedoch scheint die Einführung von zusätzlichen Ladungen an dieser Stelle im Protein einen inhibierenden Effekt auf die Mlc Interaktion mit MtfA zu haben. Daher wäre denkbar, dass hierdurch die Quartärstruktur oder die Modifikation von MtfA gestört werden könnte. Innerhalb des leuzinreichen Bereiches gibt es neben diesen beiden AS noch die hochkonservierte Aminosäure K51. Ein Austausch gegen die ebenfalls positiv geladene Aminosäure Arginin zeigte einen Wildtyp-Phänotyp. Hierdurch wurde jedoch die Ladung der Aminosäure beibehalten und es wäre interessant, wie sich eine Mutante mit einer neutralen Aminosäure und mit einer negativen Ladung an dieser Position verhalten würde.

Eine alternative Möglichkeit, warum das MtfA $\Delta$ 1-83 Fragment in der Lage war, Mlc im Gegensatz zu MtfA $\Delta$ 1-131 zu titrieren, wäre, dass bei dem größeren Fragment die Möglichkeit zur Dimerisierung bestand. Eine Dimerisierung von MtfA konnte im Rahmen dieser Arbeit durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Im MtfA $\Delta$ 1-83 Protein liegen im Vergleich zum MtfA $\Delta$ 1-131 drei potentiell, für die Dimerisierung verantwortlichen Leuzine vor. Eine weitere, gegebenenfalls für die Dimerisierung verantwortliche Region konnte im Rahmen des Aminosäuresequenzvergleiches von MtfA mit einem MCP aus *B.cereus* in der Region AS126-231 lokalisiert werden. Dieses erbringt jedoch keinen weiteren Aufschluss darüber, warum das MtfA $\Delta$ 1-131 allein nicht in der Lage war, Mlc zu titrieren. Dennoch könnten weitere Versuche zum Nachweis des Dimers beispielsweise mittels Gelfiltration, ESI oder „Surface Plasmon Resonance“ mit verschiedenen langen MtfA Konstrukten oder mit den verschiedenen Mutanten Aufschluss

über die Dimerisierungsregion von MtfA geben. Die beiden zuletzt genannten Methoden wurden im Rahmen dieser Problematik ansatzweise verwendet. Jedoch ist es bei beiden Methoden notwendig, die zu untersuchenden Proteine zumindest zeitweise in einem sauren pH zu denaturieren (77, 87). Hierbei zeigte sich, dass MtfA bzw. seine Derivate denaturierten und sich scheinbar keine Rückfaltung in den nativen Zustand ergab, so dass diese Methoden nicht den erwünschten Erfolg erbrachten und für die nähere Erforschung in Bezug auf die MtfA Dimerisierung nicht geeignet scheinen. Daher wäre die Gelfiltration sicherlich die geeignetste Methode. Hierbei zeigen sich jedoch beim Nachweis des MtfA Dimers Diskrepanzen im Vergleich zu den Arbeiten von S. Seitz (89). Diese müssen aufgrund der Verwendung des gleichen Puffers, sowie der gleichen Säule auf die Anzucht- oder Aufschlussbedingungen der Zellen zurückzuführen sein. Daher wäre denkbar, dass eine Anzucht unter MtfA induzierenden Bedingungen (z.B. MM Glukose) ggf. eine erhöhte Menge an dimerisiertem MtfA erbringen könnte. Welche Bedingungen zu einer MtfA Induktion führen könnten und ob die Dimerisierung ein entscheidender Faktor in der Regulation von MtfA darstellt, wird im folgenden Kapitel näher erläutert. Abbildung 4.1.1 zeigt alle Erkenntnisse bezüglich des erstellten MtfA Modells:



#### Abb.4.1.1 MtfA-Modell und Ausblick

Das MtfA-Modell zeigt die Mlc Interaktionsdomäne nach den beiden Versuchsansätzen mit systematischen Mutagenesen und im Di-Hybrid System. Die Region, in der die Grenze der Mlc Interaktion zu suchen ist, ist rot eingekreist. Die Dimerisierung wird vermutlich durch neun exponierte Leuzine vermittelt. Über die positive Ladung von vier exponierten AS könnte eine Wechselwirkung zu anderen Proteinen oder eine Modifikation in Form einer Methylierung an den Glutamatresten erfolgen.

## 4.2 Die Mlc-MtfA Wechselwirkung – ein weit verbreiteter Mlc-Inaktivierungsmechanismus ?

Das Induktionssignal für Transkriptionsregulatoren wie die Repressoren LacI oder NagC wird durch kleine Signalmoleküle wie in diesem Fall Allolaktose oder GlcNac-6-P vermittelt (8, 22, 75). Diese Signalmoleküle sind in der Regel Metaboliten der durch die Repressoren regulierten Operone und deren Genprodukte. Im Fall von Mlc aus *E.coli* K-12 gibt es keinen solchen molekularen Induktor. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass Mlc durch die Membranassoziation an die unphosphorylierte EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne inaktiviert wird (18, 47, 71, 73). Diese Regulation ist recht ungewöhnlich und es konnte nur für wenige andere Regulatoren eine ähnliche funktionelle Membranassoziation gezeigt werden. Beispielsweise wird der Ammoniumtransporter AmtB in *E.coli* und *Azotobacter vinelandii* durch den gebundenen und damit membranassoziierten Regulator GlnK in seiner unuridinylierten Form aktiviert (16). Ein weiteres Beispiel stellt die membranassoziierte Flavin-Dehydrogenase PutA aus *Salmonella typhimurium* dar. Für dieses Protein konnte gezeigt werden, dass es redoxabhängig im Cytoplasma als Repressor des *put* Operons fungiert (66). Eine derartige Inaktivierung durch eine Membranassoziation konnte auch für den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^E$  gefunden werden. Dieser Stress-Antwort Sigmafaktor wird durch die Bindung von seinem membrangebundenen Anti-Sigma Faktor RseA inaktiviert. Durch ein Stresssignal wird dieser abgespalten und stimuliert so die Transkription seines Regulons (2). Neben der Regulation über die Membranlokalisation konnte für Mlc die Inaktivierung durch MtfA gezeigt werden. MtfA ist ein cytoplasmatisches Protein und daher muss der Inaktivierungsmechanismus anders als durch EIIB<sup>Glc</sup> ablaufen (11). Daher stellt sich die Frage, in welchem Verhältnis diese Mechanismen zueinander stehen: laufen beide parallel ab oder handelt es sich bei dem hochkonservierten Protein MtfA um den Hauptregulator, der auch in anderen Organismen aktiv ist ? Konkurrieren MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> um die gleiche Bindestelle an Mlc bzw. in wie fern beeinflusst die Bindung von EIIB<sup>Glc</sup> an Mlc die Bindung von MtfA an Mlc ?

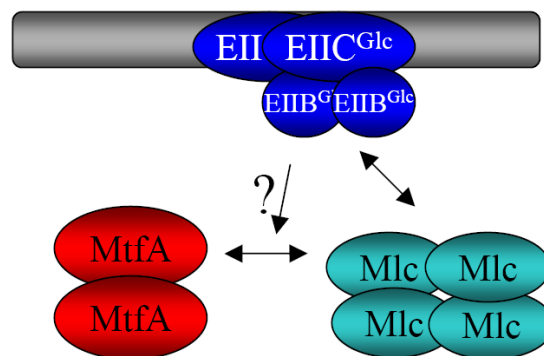


Abb.4.2.1 schematische Darstellung der Wechselwirkung von Mlc und EIIB<sup>Glc</sup> bzw. Mlc und MtfA.

In Bezug auf den Einfluss von EIIB<sup>Glc</sup> auf die Wechselwirkung zwischen MtfA und Mlc konnten Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass die unphosphorylierte EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne bei paralleler Expression von MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> bei einer Überexpression mit 500µM IPTG einen inhibierenden Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen MtfA und Mlc hat. Die Proteinmengen von MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> wiesen bei diesen Versuchen ein Verhältnis von 8:1 auf. Daher scheinen geringe Mengen von EIIB<sup>Glc</sup> im Verhältnis zu MtfA auszureichen, um die Wechselwirkung zwischen MtfA und Mlc zu vermindern. Da diese Versuche mit cytoplasmatischem EIIB<sup>Glc</sup> durchgeführt wurden, welches Mlc zwar binden, aber nicht inaktivieren kann (101), konnten keine Aussagen über den Umkehrschluss – also den Einfluss von MtfA auf die Bindung von Mlc und EIIB<sup>Glc</sup> - gemacht werden.

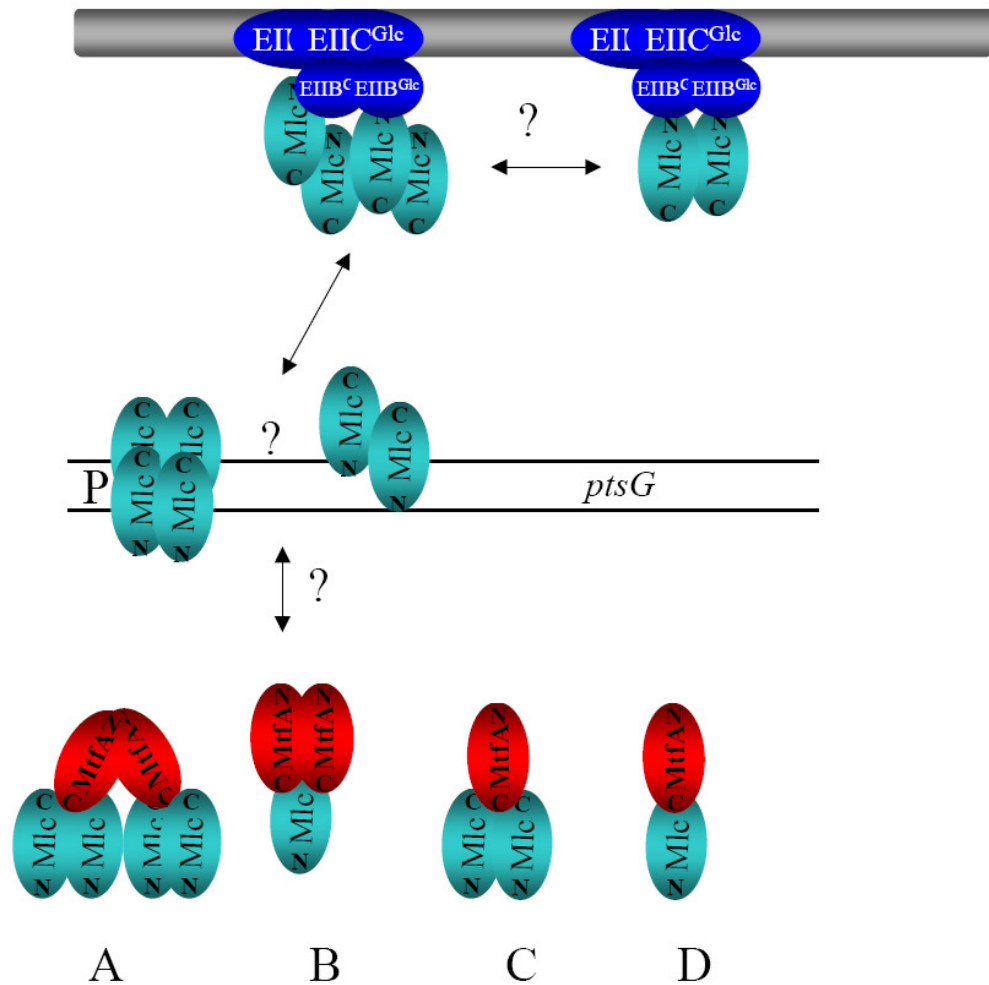
Der inhibitorische Einfluss von EIIB<sup>Glc</sup> auf die Wechselwirkung zwischen MtfA und Mlc könnte auf die gleichen Bindestellen von MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> an Mlc zurückzuführen sein, wodurch eine direkte Konkurrenz der beiden Proteine um die Bindung zu erwarten wäre. Diese Annahme würde die beobachtete Inhibierung der MtfA-Mlc Wechselwirkung durch EIIB<sup>Glc</sup> erklären, obwohl es aufgrund der Art des Versuches einen nachgewiesenen achtfachen Überschuss an MtfA gab. Hierbei stellt sich weiterhin die Frage, in wie fern ein ausgeglichenes Mengenverhältnis von MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> eine stärkere Inhibierung der MtfA-Mlc Wechselwirkung hervorrufen könnte oder nicht. Hierfür scheint das hier verwendete Testsystem jedoch nicht geeignet und daher könnten zur Klärung dieser Frage Gelfiltrationsanalysen mit verschiedenen Stöchiometrien der drei Proteine MtfA, Mlc und EIIB<sup>Glc</sup> in gereinigter Form durchgeführt werden.

Eine alternative Erklärung für den inhibierenden Effekt von EIIB<sup>Glc</sup> könnte auch eine durch die Bindung an Mlc hervorgerufene Konformationsänderung von Mlc darstellen. Arbeiten von Seitz et al. (90), Schiefner et al. (86) und Becker et al. (11) deuten darauf hin, dass die EIIB<sup>Glc</sup>-Binderegion im aminoterminalen Bereich von Mlc im HTH („Helix-Turn-Helix“) Motiv zu finden ist. Darüber hinaus scheint die carboxyterminale Region essentiell für die Mlc-Tetramerisierung, sowie für die Bindung an die DNA und an EIIB<sup>Glc</sup> zu sein. Von Schiefner et al. (86) konnte hier eine amphipatische Helix lokalisiert werden, die das HTH Motiv stabilisiert. Eine Deletion von 18 carboxyterminalen AS verhindert sowohl die EIIB<sup>Glc</sup>-Bindung von Mlc, als auch die durch Mlc vermittelte Repression von *ptsG*. Hierdurch ist jedoch nicht zu verstehen, warum das cytoplasmatisch exprimierte EIIB<sup>Glc</sup> in der Lage ist, Mlc zu binden, aber nicht zu inaktivieren. In der Dissertation von S. Seitz (89) konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese carboxyterminale Deletion die Bindung von MtfA an Mlc vollständig verhindert und eine Deletion von neun AS eine eingeschränkte Wechselwirkung zwischen MtfA und Mlc verursacht. Generell wurde bisher davon ausgegangen, dass Mlc als Tetramer an die beiden Operatoren im

*ptsG* Gen bindet. Darüber hinaus wurde von Schiefner et al. (86) aufgrund von Strukturdaten die Hypothese aufgestellt, dass Mlc als Dimer an die DNA bindet, wobei die beiden carboxyterminalen amphiphatischen Helices das aminoternale HTH Motiv stabilisieren. Durch die Bindung von EIIB<sup>Glc</sup> an das HTH Motiv könnte diese amphiphatische Helix frei werden und so in exponierter Stellung vorliegen, was die postulierte Voraussetzung für eine Tetramerisierung darstellen würde. Hierdurch wäre die Lokalisation der amphiphatischen Helix verändert, wodurch die Bindung von MtfA an Mlc verhindert werden könnte (86). Ob diese Hypothese stimmt müsste mit weiteren Versuchen geklärt werden. Versuche mit dem nativen Mlc im Rahmen der Dissertation von S. Seitz (89), sowie im Rahmen dieser Arbeit zeigten jedoch eindeutig eine Tetramerisierung von Mlc an, wodurch diese Möglichkeit nach wie vor wahrscheinlicher wäre, zumal die Versuche zur Strukturaufklärung mittels „X-Ray Kristallography“ methodenbedingt mit denaturiertem Mlc durchgeführt wurden.

Die Bindestelle von EIIB<sup>Glc</sup> scheint im aminoterminalen Bereich von Mlc zu liegen, wohingegen MtfA eher im carboxyterminalen Bereich bindet. Somit gibt es Hinweise dafür, dass die beiden Bindestellen nicht überlappen und daher ist die zweite Möglichkeit einer Konformationsänderung von EIIB<sup>Glc</sup> an Mlc wahrscheinlicher.

Des weiteren kann darüber spekuliert werden, wie MtfA in der Lage ist, Mlc zu inaktivieren. Für die Inaktivierung über EIIB<sup>Glc</sup> ist die Membranassoziation notwendig. Da es keine Hinweise darauf gibt, dass MtfA ein Membranprotein oder membranassoziiertes Protein ist (7, 11), muss bei der Inaktivierung von Mlc durch MtfA ein anderer Mechanismus vorliegen. Das von Becker et al. (11) postulierte Modell geht davon aus, dass MtfA durch die Bindung an den Carboxyterminus von Mlc eine Tetramerisierung- und damit die Bindung an die DNA verhindert. Auch wenn die Strukturdaten von Schiefner et al. (86) eine andere Möglichkeit aufzeigen, so scheint dieses Modell aufgrund der gezeigten Daten von Seitz et al. (90) sowie Becker et al. (11) weiterhin wahrscheinlich. Dennoch wären auch andere Stöchiometrien von MtfA und Mlc denkbar. Zur Verdeutlichung dieser sind drei weitere Modelle in der folgenden Abbildung gezeigt.



**Abb.4.2.2 zeigt die Möglichkeiten zur Mlc-Inaktivierung.**

Gezeigt ist die Inaktivierung von Mlc durch die Bindung und damit verbundene Membranassoziation von EIIB<sup>Glc</sup>. Für den Inaktivierungsmechanismus durch MtfA können vier mögliche Modelle (A-D) postuliert werden.

Von Becker et al. (11) und Seitz et al. (90) konnte gezeigt werden, dass die 18 carboxyterminalen AS von Mlc für die Wechselwirkung mit MtfA essentiell sind. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, liegt die Mlc-Binderegion von MtfA im carboxyterminalen Bereich von MtfA. Modell A zeigt das von Becker et al. (11) aufgestellte Modell zur Inaktivierung von Mlc durch die Inhibierung der Mlc-Tetramerisierung. Modell B postulierte die Bindung von jeweils einem MtfA-Dimer an ein Mlc-Molekül. Hierbei würden aus einem Mlc-Tetramer Monomere entstehen, es würden jedoch insgesamt acht Moleküle MtfA für die Inaktivierung gebraucht. Modell C geht davon aus, dass ein MtfA-Monomer ausreicht, um ein Mlc-Dimer zu inaktivieren. Durch die gezeigte Bindung von MtfA an den Carboxyterminus von Mlc könnte die carboxyterminale amphiphatische Helix für die Bindung an MtfA verwendet werden und somit nicht mehr für die Stabilisierung des für die DNA-Bindung notwendigen HTH Motives zur Verfügung stehen. Die Modelle B und C werden durch die mit Hilfe von Gelfiltrationsexperimenten erzielten

Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit unterstützt. Hierbei konnte bei der Koelution von Mlc und MtfA ein Peak bei 111200Da beobachtet werden. Dieser könnte mit einem MtfA-Dimer und einem Mlc-Monomer (Modell B) oder einem Mlc-Dimer und einem MtfA-Monomer (Modell C) korrelieren. Eine weitere Unterstützung des Modelles B konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die EMSAs erbracht werden. Hierbei konnte nur bei der Verwendung eines ca. 20fachen MtfA-Überschusses eine Titration von Mlc von seinem Operator nachgewiesen werden. Modell D zeigt die Möglichkeit einer Stöchiometrie von 1:1 der beiden Proteine. Dieses wäre ebenfalls denkbar. Hierfür spricht die nachgewiesene Wechselwirkung der beiden Moleküle im bakteriellen Di-Hybrid System. Beide Proteine lagen hier als Monomere in Fusionsproteinen vor. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass Fusionsproteine ggf. andere funktionelle stöchiometrische Eigenschaften aufweisen als die nativen Proteine. Durch die Fusion mit den LexA-Domänen ist darüber hinaus eine Bindung an die DNA und damit einhergehende räumliche Nähe der beiden Proteine korreliert, so dass hierdurch ggf. eine Wechselwirkung begünstigt wurden.

Für die Verifizierung eines der Modelle wären weitere Gelfiltrationsexperimente und anschließende Western-Blots notwendig. Darüber hinaus könnte die Kristallstruktur von MtfA, sowie Mlc-MtfA Ko-Kristalle Aufschluss über die Bindung und Stöchiometrie dieser Moleküle liefern. Bislang konnten auch keine klaren Aussagen darüber gemacht werden, ob Mlc als Dimer oder Tetramer an EIIB<sup>Glc</sup> bindet. EIICB<sup>Glc</sup> liegt als Dimer in der Membran vor, daher gibt es zwei Bindestellen für Mlc, wodurch sowohl die Bindung eines Dimers (jeweils ein Molekül pro Bindestelle) als auch die Bindung eines Tetramers (zwei Moleküle pro Bindestelle) ermöglicht werden. Aufgrund der Strukturdaten wird eine Begünstigung der Tetramerisierung durch die freie amphiphatische Helix postuliert. Dagegen spricht jedoch, dass ein durch die Laktose-Permease (LacY) verankertes EIIB<sup>Glc</sup> ebenfalls in der Lage ist zu titrieren. LacY liegt im Gegensatz zu EIIC<sup>Glc</sup> als Monomer vor (101). Daher scheint es unwahrscheinlich, dass eine verfügbare Bindestelle für Mlc in der Lage ist ein Mlc Tetramer zu binden. Nach dem postulierten Modell zeigen sich in Bezug auf die Inaktivierung von Mlc durch EIIB<sup>Glc</sup> und MtfA zwei unterschiedliche Mechanismen, die dennoch miteinander in Konkurrenz stehen. Unter welchen Umständen wird der eine oder andere Mechanismus aktiv oder laufen beide parallel ab und wie tragen sie jeweils ihren Teil zur Inaktivierung von Mlc bei ? Aufschluss über diese Fragestellung könnten Experimente mit den von Tanaka et al. (101) hergestellten Superrepressoren erbringen. Einer dieser insgesamt vier hergestellten Superrepressoren trägt eine Aminosäuresubstitution (H86R) und ist aufgrund dessen nicht mehr in der Lage EIIB<sup>Glc</sup> zu binden, wodurch eine erhöhte Repression von *ptsG* beim Wachstum auf Glukose zu beobachten war (101). Daher wäre es in diesem Zusammenhang interessant zu untersuchen, ob dieser noch durch MtfA inaktiviert werden kann. Im



Rahmen der Diplomarbeit von E. Klang wurde ein solcher Superrepressor hergestellt (41). Da die Fertigstellung jedoch zeitlich nach Abschluss des experimentellen Teiles dieser Arbeit lag, konnten diesbezüglich noch keine Versuche durchgeführt werden. Denkbar wäre der Austausch des Mlc Superrepressors gegen die Wildtypkopie im Genom des Teststammes LZ150F'(*ptsG<sub>op</sub>-lacZ*). Hierzu könnte die von Datsenko und Wanner entwickelte Genaustauschmethode über homologe Rekombination in das *E.coli* Genom verwendet werden (17). Im verwendeten Teststamm könnte dann wiederum mit Hilfe von quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase Tests geklärt werden, ob plasmidkodiertes MtfA Mlc titrieren kann. Eine alternative Methode zur Bestimmung der Wechselwirkung zwischen MtfA und MlcH86R könnten Versuche mittels Gelfiltrationschromatographie oder mittels bakteriellem Di-Hybrid System darstellen. Ebenso könnte der Superrepressor mittels EMSAs auf die Wechselwirkung mit MtfA hin untersucht werden.

Neben der Regulation über Mlc sind mittlerweile viele andere Faktoren bekannt, die die Expression von *ptsG* unter verschiedenen Bedingungen regulieren. Daher stellt sich die Frage, wieso der Repressor Mlc ebenfalls einer Regulation durch zwei verschiedene Faktoren unterliegt. In diesem Zusammenhang wäre zu vermuten, dass dieser Mechanismus so für *E.coli* K-12 funktioniert. Über die Regulation von Mlc in anderen Organismen ist bisher nicht viel bekannt, jedoch zeigt sich an verschiedenen Beispielen der Katabolitenrepression, dass gleiche Proteine in nah verwandten Organismen unterschiedliche Funktionen haben können. Während die Katabolitenrepression in *Salmonella typhimurium* und erstaunlicherweise auch in dem Gram positiven *Streptomyces coelicolor* ebenfalls über das EIIA<sup>Glc</sup> wie in *E.coli* vermittelt wird, gibt es bei anderen Organismen andere Umsetzungen (36, 81). In dem Gram positiven *Bacillus subtilis* gibt es ein funktionelles EIIA<sup>Glc</sup> Protein, welches ebenfalls eine Funktion im Glukose PTS, jedoch nicht in der Katabolitenrepression besitzt. Diese wird bei *B. subtilis* über die allgemeine PTS Komponente HPr und über den zu LacI aus *E.coli* homologen Repressor CcpA vermittelt (60, 78). Für den ebenfalls Gram positiven humanen Karieserreger *Streptococcus mutans* konnte gezeigt werden, dass der EIIAB<sup>Man</sup> Transporter hier die entscheidende Rolle in der Regulation der Katabolitenrepression sowie der Biofilmbildung und der genetischen Kompetenz übernimmt. Das in vielen anderen Bakterien als globaler Regulator dieser Funktionen bekannte EIICB<sup>Glc</sup> spielt in Bezug auf diese Funktionen in *Streptococcus mutans* nur eine nebensächliche Rolle (1). Diese Beispiele zeigen, dass ähnliche oder homologe Proteine in verschiedenen Organismen vollständig unterschiedliche Funktionen haben können. Daher wäre es interessant zu überprüfen, ob die Funktion von MtfA in anderen Organismen die Gleiche ist wie in *E.coli* und ob Mlc in anderen Organismen auch über zwei Mechanismen inaktiviert werden kann. Da es sich bei MtfA um ein hochkonserviertes Protein handelt, wäre die Vermutung naheliegend, dass es sich hierbei um den ge-

nerellen Inaktivierungsmechanismus von Mlc handeln könnte, wohingegen die durch EIIB<sup>Glc</sup> vermittelte Membranassoziation *E.coli* spezifisch sein könnte. Beispielsweise konnte für Mlc aus *Thermus thermophilus* gezeigt werden, dass die Inaktivierung hier nicht über die Bindung an EIIB<sup>Glc</sup>, sondern über eine allosterische Regulation über die Bindung von Glukose verläuft (15). Das hierbei identifizierte Glukosebindemotif besteht aus fünf AS, von denen vier mit denen von Mlc aus *E.coli* K-12 übereinstimmen. Lediglich eine Aminosäure in diesem Bereich ist im Mlc aus *E.coli* K-12 verändert (H194→N). Ein übereinstimmendes Konsensusmotiv konnte bei der Glukokinase aus *Mycobacterium smegmatis* identifiziert werden. Diese gehört wie Mlc und NagC zu den Proteinen der ROK Familie und kann Glukose als Substrat binden. Auch hier konnten die gleichen AS als relevant für die Glukosebindung identifiziert werden (70). Daher wäre es interessant, welche Auswirkungen eine H194N Substitution im Mlc von *E.coli* bewirken würde – könnte diese auch mit Hilfe von Glukose oder Glukose-6-P inaktiviert werden? Diese Beispiele unterstützen die Theorie, dass es sich bei der Inaktivierung von Mlc über EIIB<sup>Glc</sup> um einen für *E.coli* spezifischen Mechanismus handelt. Somit zeigt sich, dass es für den globalen Regulator Mlc in verschiedenen Organismen insgesamt drei verschiedene Inaktivierungsmechanismen gibt:

1. Titration über EIIB<sup>Glc</sup>
2. Bindung von MtfA
3. allosterische Inaktivierung durch die Bindung von Glukose

Zwei dieser Mechanismen sind in *E.coli* K-12 vertreten. Es wäre jedoch denkbar, dass in anderen Organismen nur einer dieser Mechanismen oder eine andere Kombination als in *E.coli* zu finden sein könnte. Spekulativ bleibt in diesem Zusammenhang die Rolle von MtfA in anderen Organismen in Bezug auf die Wechselwirkung mit orthologen Mlc Proteinen. Aufgrund der hohen Konservierung wäre denkbar, dass MtfA auch in nah verwandten Organismen zu *E.coli* einen Einfluss auf Mlc hat. Dieses könnte beispielsweise mit der Klonierung von Mlc aus anderen Organismen und deren Austausch gegen das *E.coli* Mlc (beispielsweise mit denen im Aminosäuresequenzvergleich dieser Arbeit verwendeten) im *E.coli* Genom analysiert, und auf ihren Phänotyp in Bezug auf MtfA untersucht werden.

### 4.3 MtfA: ein Mlc Regulationsfaktor unter Hitzeschockbedingungen und beim Wachstum auf Glukose ?

Unter welchen Bedingungen wird MtfA exprimiert und wie könnte ein Inaktivierungsmechanismus in Bezug auf die Mlc Wechselwirkung aussehen ? Promotoranalysen haben gezeigt, dass MtfA unter der Kontrolle eines schwachen Promotors steht. Die Tatsache, dass der entsprechende Konsensus nicht mit Hilfe einer spezifischen Datenbank ermittelt werden konnte, zeigt, dass es sich vermutlich um einen Promotor handelt, dessen Sequenz stark von dem Konsensus für Prokaryoten abweicht. Beobachtungen im Rahmen der Wachstumscompetition konnten zeigen, dass MtfA gegenüber einer entsprechenden Mutante einen Wachstumsvorteil beim Wachstum auf Glukose und unter Hitzeschockbedingungen zeigte. Somit konnte gezeigt werden, dass MtfA unter diesen Wachstumsbedingungen eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Daher ist es naheliegend, dass auch die Expression von MtfA unter diesen Wachstumsbedingungen erhöht sein könnte. Dieses konnte für das Wachstum auf Glukose im Gegensatz zum Wachstum auf Glyzerin im Rahmen von RT-RT PCR Studien gezeigt werden. Im Stammhintergrund LJ110 war hierbei eine erhöhte mRNA Menge von MtfA beim Wachstum auf Glukose sichtbar. Daher lassen diese Daten darauf schließen, dass MtfA unter diesen Wachstumsbedingungen aktiviert wird. Da MtfA über einen relativ schlechten Promotor verfügt, ist es naheliegend, dass die Aktivierung über einen Aktivator abläuft. Hierbei könnte es sich z.B. um die gleichen Aktivatoren handeln, die auch die Mlc Expression aktivieren. Somit wären z.B. cAMP-CRP, alternative Sigmafaktoren oder Fis zu nennen (92). Da die Promotorsequenz von *mtfA* bisher nicht identifiziert werden konnte, konnten auch keine Versuche zur Identifikation von möglichen Bindestellen von Fis oder cAMP-CRP durchgeführt werden. Zur Identifikation relevanter Nukleotide im Promotobereich könnten „Promotor-up“ Versuche durchgeführt werden. Hierzu könnten die verwendeten Konstrukte für die Experimente einer Chloramphenicol-Selektion ausgesetzt werden. Hierdurch könnten Mutationen im relevanten Promotorbereich identifiziert werden, die zu einem verbesserten Promotor und somit zu einer Identifizierung des Promotors führen. Für die Regulation über alternative Sigmafaktoren, wie z.B. den Hitzeschock Sigmafaktor  $\sigma_{32}$  könnte beispielsweise die Beobachtung sprechen, dass MtfA unter Hitzeschockbedingungen einen Wachstumsvorteil gegenüber einer MtfA Mutante zeigte. Ob dieses mit einer erhöhten Expression von MtfA einhergeht könnten weitere RT-RT PCR Experimente, sowie anschließende Western-Blot Analysen zeigen.

Im Rahmen der RT-RT PCR Versuche zeigten sich Abweichungen in der Regulation von MtfA in den Stammhintergründen K-12 und LJ110 aus denen verschiedene Regulationsmodelle postu-

liert werden konnten. In diesem Zusammenhang deutet die Regulation im Stammhintergrund K-12 auf eine potentielle Transkriptionskontrolle von *mtfA* hin, wohingegen die nicht korrelierenden Mengen von *mtfA*-mRNA und MtfA-Protein im Stamm LJ110 eher auf eine Translationskontrolle hinweisen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob es in diesem Zusammenhang einen direkten Unterschied zwischen K-12 und LJ110 in den involvierten Genen *mtfA*, *ptsG*, *dgsA*, *manXYZ* oder *ptsHicrr* gibt. Die Entstehung des Stammes W3110 (LJ110) aus K-12 ist schematisch in der folgenden Abbildung dargestellt.

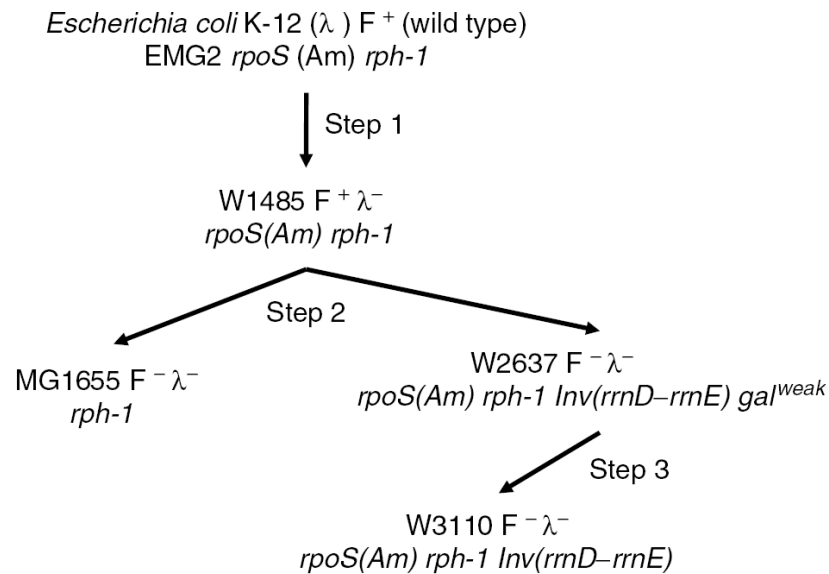


Abb.4.3.1 aus Hayashi et al. (26) zeigt die Entstehung und Unterschiede der K-12 Stämme W3110 und MG1655.

Für die hier durchgeführten Versuche wurden der ursprüngliche K-12 Stamm, sowie ein direktes Derivat des Stammes W3110 verwendet. Dieser unterscheidet sich durch die Eigenschaften des hier angegebenen W3110 dadurch, dass er unter anaeroben Bedingungen auf Glyzerin wächst und dabei KNO<sub>3</sub> als Elektronenakzeptor verwenden kann (108).

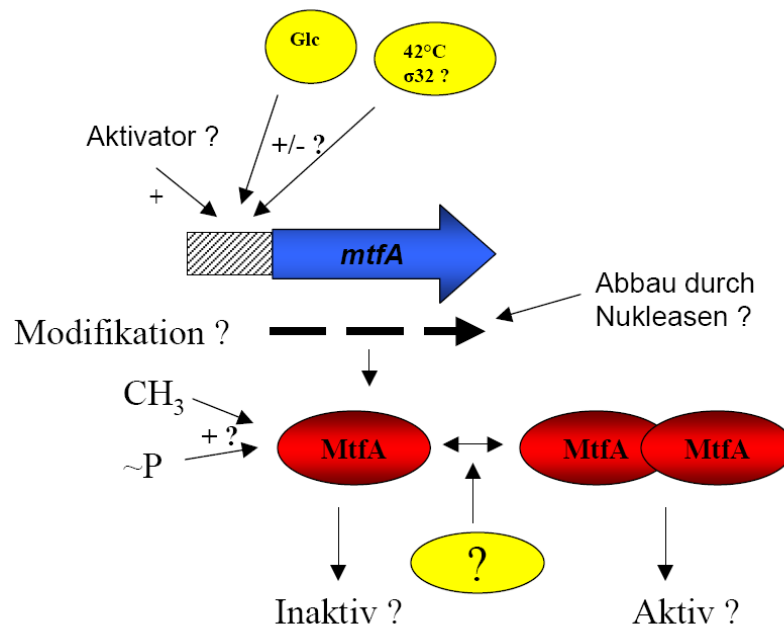
Durch verschiedene Mechanismen wurde im W3110 Stamm das F-Plasmid sowie der Bakteriophage λ aus dem Stamm deletiert. Darüber hinaus konnten an 282 Stellen im Genom Insertionen oder Sequenzveränderungen festgestellt werden (26). Ein direkter Vergleich der hier relevanten Gene *mtfA*, *ptsG*, *dgsA*, *manXYZ* und *ptsHicrr* mit Hilfe des BLAST Programms der ncbi Datenbank ergab jedoch keine Sequenzunterschiede. Dennoch ist es möglich, dass Sequenzveränderungen in anderen Genen Auswirkungen auf diese Gene haben. Interessanterweise konnte von Hayashi et al. (26) eine Mutation in dem Gen *crp* zwischen den Stämmen W3110 und MG1655 gefunden werden. Hierbei handelt es sich um die exponierte Aminosäure (K29T), die keinerlei Einfluss auf die Wechselwirkung mit cAMP oder der DNA-Bindung zu haben scheint

und daher als neutrale Mutation bezeichnet wurde (26). Dennoch könnte eine solche Mutation einen Einfluss auf die Expression von *ptsG* und somit indirekt auch auf Mlc und MtfA haben und die Unterschiede in Bezug auf die MtfA Expression in diesen beiden Stämmen erklären. Zu den unterschiedlichen Daten der beiden Stämme passen auch die von E. Klang im Rahmen ihrer Diplomarbeit erzielten Ergebnisse. Hier wurden die Wachstumskompetitionsversuche dieser Arbeit mit dem Stamm K-12 wiederholt. Es konnte jedoch in keinem Fall eine Selektion für den MtfA-Wildtyp oder die MtfA-Mutante beobachtet werden (41). Daher lassen auch diese Ergebnisse auf eine grundsätzlich unterschiedliche Bedeutung von MtfA in diesen beiden Stämmen schließen.

In Bezug auf die Funktion von MtfA als Mlc inaktivierendes Protein besteht die Frage, unter welchen physiologischen Umständen und in welcher Weise MtfA inaktiviert wird. Hierbei könnten zwei im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Faktoren von Bedeutung sein. Einerseits könnte die beobachtete und von physiologischen Bedingungen abhängig scheinende Dimerisierung zur Inaktivierung von MtfA führen. Hierbei wäre denkbar, dass MtfA in seiner Dimerform an Mlc bindet, durch einen unbekanntem Mechanismus monomerisiert und dadurch seine Bindung an Mlc verliert. Hierzu könnten weitere Versuche wie beispielsweise mittels Gelfiltration durch Koelution von Mlc und MtfA Aufschluss über die Dimerisierung von MtfA unter verschiedenen physiologischen Bedingungen geben. Ein weiterer Faktor, der zur Inaktivierung von MtfA in Bezug auf die Mlc Interaktion führen könnte, wäre eine mögliche Modifikation von MtfA. Hierbei wäre eine für PTS Komponenten typische Phosphorylierung oder eine Methylierung analog zu den MCPs im Rahmen der Chemotaxis zu nennen. Für das MCP Tsr konnte gezeigt werden, dass durch die Methylierung die Affinität für Serin um einen Faktor 10 herabgesetzt wird (99). Daher könnte eine potentielle Methylierung an MtfA eine Veränderung der Substratspezifität oder zu einer Art Adaptation führen. Da die auf eine potentielle Modifikation hindeutende Doppelbande im Western-Blot nicht stabil reproduziert werden konnte, müssen zur Klärung dieser Frage alternative Versuchsmethoden gefunden werden. Hierbei wären weitere Experimenten mit Hilfe des ESI Massenspektrometers denkbar. Es besteht jedoch wiederum das Problem des niedrigen pH Wertes, der für die Durchführung dieses Verfahrens verwendet werden muss. Daher könnten hier zunächst bioinformatische Analysen bei der Suche nach potentiellen Modifikationsstellen in MtfA hilfreich sein.

Darüber hinaus wäre es interessant, neue potentielle MtfA Wechselwirkungspartner zu identifizieren, die an dessen Regulation beteiligt sein könnten. Diese könnten z.B. mit Hilfe eines systematischen „Datenbankscreens“ im bakteriellen Di-Hybrid System oder mit Hilfe von Koeluti-

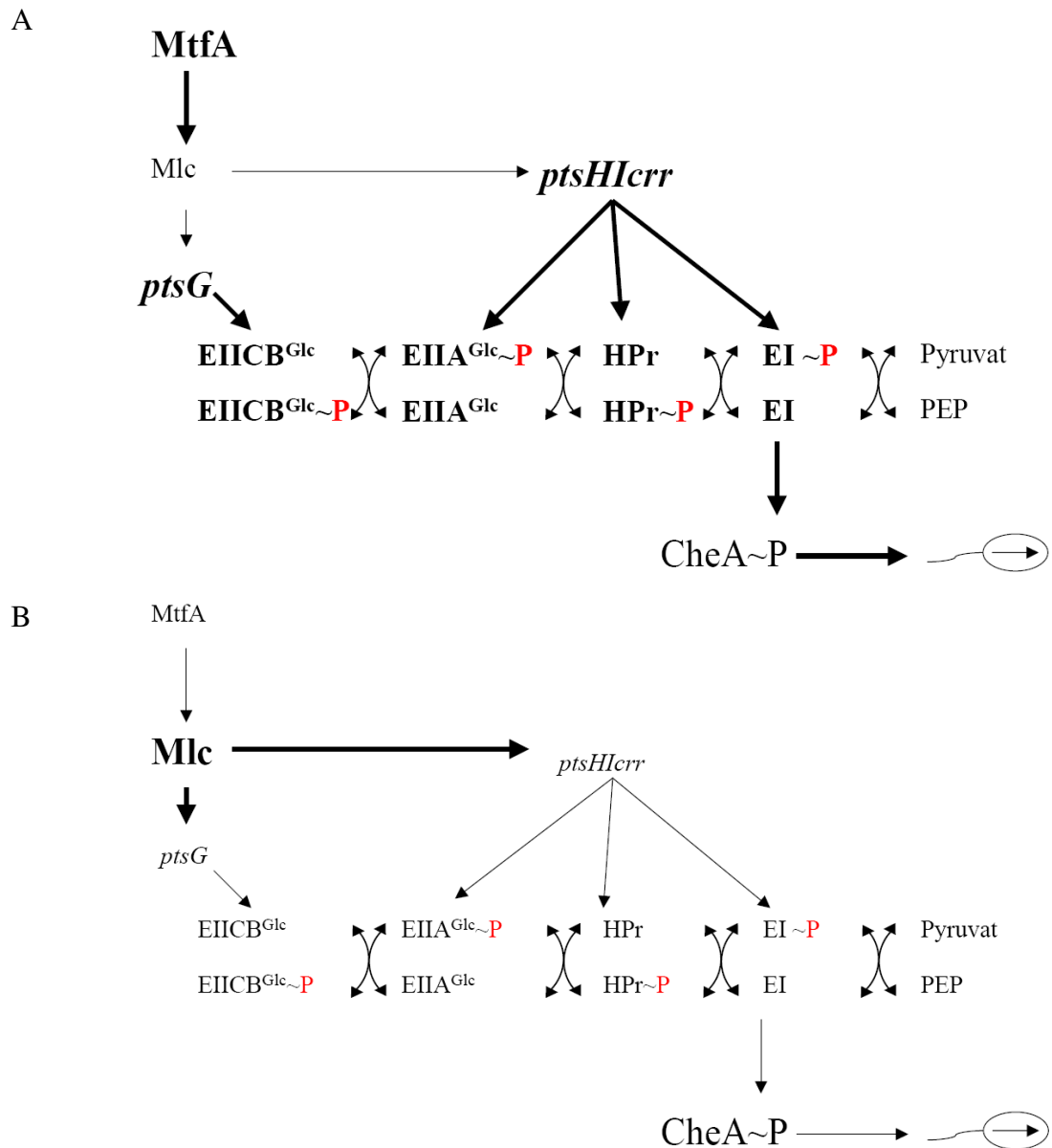
onsversuchen mittels Affinitätschromatographie identifiziert werden. Außerdem könnten „Microarray“-Versuche mit einem *MtfA*-Deletionsstamm im Vergleich zu einem *MtfA*-Überproduktionsstamm zur Identifikation von weiteren durch *MtfA* regulierten Genen führen. Generell ergibt sich durch diese Ergebnisse folgendes *MtfA* Regulationsmodell, was durch weitere Versuche verifiziert werden muss.



#### Abb.4.3.2 *MtfA*-Regulationsschema

Der schwache *mtfA*-Promotor könnte durch einen Aktivator reguliert werden. Bei diesem könnte es sich um einen alternativen Sigmafaktor, wie z.B.  $\sigma_{32}$  handeln, oder über einen indirekten Einfluß über Glukose. Die RT-RT PCR Versuche im Stamm LJ110 deuteten darauf hin, dass es eine posttranskriptionelle Regulation, beispielsweise über den Abbau durch Nukleasen, geben könnte. In Bezug auf die Quartärstruktur von *MtfA* müsste geklärt werden, ob die Dimer oder die Monomerform die Mlc-inaktivierende Form darstellt.

Neben der unterschiedlichen Expression von *MtfA* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen konnte eine Auswirkung auf das Chemotaxisverhalten von *E.coli* nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich Unterschiede in den beiden Stämmen JWL184-1 und LJ110. Der Stamm JWL184-1 zeigt eine ausgeprägtere PTS Chemotaxis als der Stamm LJ110. Der genaue Grund hierfür ist nicht bekannt. Dieses Phänomen könnte aber zum Beispiel durch eine höhere Expression der PTS Proteine hervorgerufen werden. Somit würden die Unterschiede zwischen diesen Stämmen auf die unterschiedlichen Stöchiometrien der einzelnen „Spieler“ zurückzuführen sein. Sicherlich sind auch die Expressionniveaus der Chemotaxisproteine von entscheidender Bedeutung. Die generelle Auswirkung von *MtfA* auf die Chemotaxis ist im folgenden Schema veranschaulicht:



**Abb.4.3.3 Einfluss von MtfA auf die Chemotaxis (vereinfachte, schematische Darstellung)**

A zeigt den Einfluss von MtfA auf die Chemotaxis bei geringer *mtfA*-Expression B bei erhöhter *mtfA*-Expression

Die Expression von *mtfA* sorgt für eine Inaktivierung von Mlc. Hierdurch werden u.a. das Gen *ptsG* sowie das *pts*-Operon reguliert. Bei der Annahme, dass viel MtfA vorhanden ist (A), wird Mlc inaktiviert und somit die Expression von *ptsG* und *ptsHlcr* erhöht. Hierdurch liegt eine erhöhte Menge an PTS Proteinen vor. Das unphosphorylierte EI hat einen inhibierenden Einfluss auf die Autophosphorylierung von CheA, wodurch das Taumeln verhindert wird (20, 99). Somit wäre die logische Konsequenz hiervon ein stärkerer inhibitorischer Einfluss von EI auf die Autophosphorylierung von CheA.

Ausgehend von der Annahme, dass nur geringe Mengen MtfA vorhanden sind (B), hat Mlc einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf *ptsG* und *ptsHlcr*, wodurch weniger dieser PTS Proteine

vorliegen würden und somit auch die Auswirkung von EI auf die CheA-Autophosphorylierung geringer ausfallen könnte.

Durch diese Modelle kann ein indirekter Einfluss von MtfA auf die Chemotaxis über die PTS Phosphorylierungskaskade erklärt werden. Ob MtfA darüber hinaus einen direkten Einfluss auf eine der Chemotaxiskomponenten besitzt, konnte hier nicht gezeigt werden. Hierzu könnten Versuche mit verschiedenen Deletionen in diesen Komponenten einen weiteren Aufschluss über diese Fragestellung bringen.

Generell zeigte nicht nur diese Arbeit, dass *E.coli* K-12 als Modellorganismus für die Untersuchung verschiedener Faktoren und Regulationsmechanismen aufgrund der Vielfältigkeit der verfügbaren Informationen nach wie vor einen sehr guten Modellorganismus darstellt. Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Struktur und Funktion des „Mlc titration factor A“ MtfA gewonnen werden. In *E.coli* scheint dieser Regulator eins von mehreren Puzzlestücken in der Regulation des globalen Regulators Mlc darzustellen. Untersuchungen in verschiedenen Organismen zeigen, dass homologe Proteine dort ganz andere Funktionen und Bedeutungen haben können. Somit wäre denkbar, dass MtfA über seine hier gezeigte Funktion hinaus eine weitläufigere physiologische Bedeutung haben könnte. Daher erscheint es vielversprechend die Funktion von MtfA in anderen Organismen vielleicht nicht nur in Bezug auf die Wechselwirkung zu orthologen Mlc Proteinen zu untersuchen.



## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Knut Jahreis identifizierte und als „Mlc titration factor A“ charakterisierte Protein MtfA auf genetischer, biochemischer und physiologischer Ebene näher charakterisiert.

Mit Hilfe von gezielten Austausch konservierter AS konnte im aminoterminalen Bereich eine leuzinreiche Dimerisierungsdomäne und im carboxyterminalen Bereich eine Mlc Wechselwirkungsdomäne identifiziert werden. Letzteres konnte mit Hilfe von Di-Hybrid Studien unabhängig bestätigt werden.

Die EIIB<sup>Glc</sup>-Domäne des Glukosetransporters vermag Mlc zu binden. Durch die Membranassoziation des Transporters kann Mlc von seiner Operatorsequenz durch Titration entfernt werden. Lösliches EIIB<sup>Glc</sup> bindet ebenfalls an Mlc. Es löst aber keine Inaktivierung des Repressors aus. MtfA dagegen liegt cytoplasmatisch vor und inaktiviert Mlc vermutlich über die Inhibierung seiner Tetramerisierung. Eine parallele Expression von MtfA und EIIB<sup>Glc</sup> zeigte einen inhibitorischen Einfluss von EIIB<sup>Glc</sup> auf die Wechselwirkung von MtfA und Mlc. Physiologische Untersuchungen von MtfA weisen auf einen Einfluss des Proteins auf das Chemotaxisverhalten von *E.coli* hin. Darüber hinaus konnte ein relativ schwacher *mtfA*-Promotor nachgewiesen werden. Im Rahmen von Wachstumscompetitionsversuchen wurde ein Wachstumsvorteil des MtfA Wildtyps im Vergleich zur Mutante beim Wachstum auf Glukose und unter Hitzeschockbedingungen bei 42°C beobachtet. Außerdem stellte sich bei diesen Versuchen ein Unterschied in der Regulation von MtfA in den Stämmen K-12 und LJ110 heraus. Dieser konnte im Rahmen von RT-RT PCR Studien sowie mittels Western-Blot Analysen bestätigt werden.

Die erfolgreiche Reinigung des Proteins ermöglichte den Nachweis der Dimerisierung in Gel-filtrationsanalysen, in nativen- und in SDS-Gelen, im ESI sowie die Durchführung von so genannten „Electrophoretic mobility shift assays“. Ausgehend von dem gereinigten Protein konnten spezifische Antikörper gegen MtfA hergestellt werden, die eine Quantifizierung des Proteins unter verschiedenen physiologischen Bedingungen mittels Western-Blot-Experimenten ermöglichen.

## 6. Summary

Within the framework of this study, the protein MtfA, which was characterised by the work-group of PD Dr. Knut Jahreis and identified as the “Mlc titration factor A”, has been more closely characterised at the genetical, biochemical and physiological level.

Aided by the selective exchange of “conserved” amino acids, a leucine rich dimerisation domain in the aminoterminal section and an Mlc interaction domain in the carboxyterminal section was identified. Two-hybrid studies facilitated verification of the latter.

EIIB<sup>Glc</sup> promotes Mlc-binding and, by means of membrane association from the promoter sequence, titration can be determined. MtfA exists cytoplasmically and presumably inactivates Mlc by inhibiting its tetramerisation. A simultaneous expression of MtfA and EIIB<sup>Glc</sup> exhibited an inhibitory influence of EIIB<sup>Glc</sup> upon the interaction of MtfA and Mlc. Physiological experiments for MtfA disclosed an influence of the protein upon chemotactical behaviour of *E. coli*. Furthermore, evidence of a relatively weak *mtfA* promoter was detected. By growth competition experiments, it was observed that growth on glucose and under heat-shock conditions, advantageously favoured the MtfA wild-type in comparison to the mutant. During these experiments, a disparity in the regulation of MtfA in the strain K-12 and the strain LJ110 was observed. This could be substantiated by RT-RT PCR studies and via Western-Blot analyses.

The successful purification of the protein enabled verification of MtfA-dimerisation in the gel filtration analyses, native and SDS-gels and in ESI-experiments. Furthermore, purified Mlc was used in electrophoretic mobility shift assays. Beginning with the purified protein, it was possible to construct specific antibodies against MtfA, which in turn enabled the quantification of this protein under various physiological conditions and through western-blot analyses.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Abranches, J., M. M. Candella, Z. T. Wen, H. V. Baker, and R. A. Burne.** 2006. Different roles of EIIABMan and EIIGlc in regulation of energy metabolism, biofilm development, and competence in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **188**:3748-56.
2. **Alba, B. M., J. A. Leeds, C. Onufryk, C. Z. Lu, and C. A. Gross.** 2002. DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev* **16**:2156-68.
3. **Alexander, R. P., and I. B. Zhulin.** 2007. Evolutionary genomics reveals conserved structural determinants of signaling and adaptation in microbial chemoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
4. **Appleman, J. A., and V. Stewart.** 2003. Mutational analysis of a conserved signal-transducing element: the HAMP linker of the *Escherichia coli* nitrate sensor NarX. *J Bacteriol* **185**:89-97.
5. **Arber, W.** 1960. Transduction of chromosomal genes and episomes in *Escherichia coli*. *Virology* **11**:273-88.
6. **Ausubel.** 2004. Current protocols in molecular biology. Green Publishing and Wiley Interscience, New York.
7. **Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**:2006 0008.
8. **Barnhart, M. M., J. Lynem, and M. R. Chapman.** 2006. GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:5212-9.
9. **Bartel, P., C. T. Chien, R. Sternglanz, and S. Fields.** 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**:920-4.
10. **Becker, A.-K.** 2003. Molekularbiologische Untersuchungen zur Wirkung des Proteins YeeI auf das Glukose-spezifische Phosphotransferasesystem in *Escherichia coli* K-12. Dissertation Universität Osnabrück.
11. **Becker, A. K., T. Zeppenfeld, A. Staab, S. Seitz, W. Boos, T. Morita, H. Aiba, K. Mahr, F. Titgemeyer, and K. Jahreis.** 2006. YeeI, a novel protein involved in modulation of the activity of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **188**:5439-49.
12. **Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-74.
13. **Brinkkötter, A.** 2000. Molekulargenetische Charakterisierung des N-Acetyl-Galaktosamin- und Galaktosamin-Stoffwechsels bei Enterobakterien und ihre Bedeutung für die Evolution. Dissertation Universität Osnabrück.

14. **Chauvin, F., L. Brand, and S. Roseman.** 1994. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Characterization of the *Escherichia coli* enzyme I monomer/dimer transition kinetics by fluorescence anisotropy. *J Biol Chem* **269**:20270-4.
15. **Chevance, F. F., M. Erhardt, C. Lengsfeld, S. J. Lee, and W. Boos.** 2006. Mlc of *Thermus thermophilus*: a glucose-specific regulator for a glucose/mannose ABC transporter in the absence of the phosphotransferase system. *J Bacteriol* **188**:6561-71.
16. **Coutts, G., G. Thomas, D. Blakey, and M. Merrick.** 2002. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *Embo J* **21**:536-45.
17. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-5.
18. **Decker, K., J. Plumbridge, and W. Boos.** 1998. Negative transcriptional regulation of a positive regulator: the expression of *maltT*, encoding the transcriptional activator of the maltose regulon of *Escherichia coli*, is negatively controlled by Mlc. *Mol Microbiol* **27**:381-90.
19. **Dmitrova, M., G. Younes-Cauet, P. Oertel-Buchheit, D. Porte, M. Schnarr, and M. Granger-Schnarr.** 1998. A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **257**:205-12.
20. **Falke, J. J., and G. L. Hazelbauer.** 2001. Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem Sci* **26**:257-65.
21. **Fox, D. K., N. D. Meadow, and S. Roseman.** 1986. Phosphate transfer between acetate kinase and enzyme I of the bacterial phosphotransferase system. *J Biol Chem* **261**:13498-503.
22. **Gilbert, W., and B. Muller-Hill.** 1966. Isolation Of The Lac Repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**:1891-1898.
23. **Gorke, B., and B. Rak.** 1999. Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *Embo J* **18**:3370-9.
24. **Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**:4121-30.
25. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-80.
26. **Hayashi, K., N. Morooka, Y. Yamamoto, K. Fujita, K. Isono, S. Choi, E. Ohtsubo, T. Baba, B. L. Wanner, H. Mori, and T. Horiuchi.** 2006. Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol* **2**:2006 0007.
27. **Hempelmann.** 2001. Molekularbiologische Analyse von Mutanten des Glukose-Transporters EIICB<sup>Glc</sup> aus *Escherichia coli* K-12. Diplomarbeit Universität Osnabrück.

28. **Homann, K.** 2007. Molekularbiologische Analyse der Wechselwirkung zwischen Mlc und EIIB<sup>Glc</sup> und MtfA in *E.coli* K-12. Masterarbeit Universität Osnabrück.
29. **Hosono, K., H. Kakuda, and S. Ichihara.** 1995. Decreasing accumulation of acetate in a rich medium by *Escherichia coli* on introduction of genes on a multicopy plasmid. *Bio-sci Biotechnol Biochem* **59**:256-61.
30. **Hulko, M., F. Berndt, M. Gruber, J. U. Linder, V. Truffault, A. Schultz, J. Martin, J. E. Schultz, A. N. Lupas, and M. Coles.** 2006. The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* **126**:929-40.
31. **Hurley, J. H., H. R. Faber, D. Worthylake, N. D. Meadow, S. Roseman, D. W. Pettigrew, and S. J. Remington.** 1993. Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* III<sup>Glc</sup> with glycerol kinase. *Science* **259**:673-7.
32. **Jahreis, K., T. B. Morrison, A. Garzon, and J. S. Parkinson.** 2004. Chemotactic signaling by an *Escherichia coli* CheA mutant that lacks the binding domain for phosphoacceptor partners. *J Bacteriol* **186**:2664-72.
33. **Jahreis, K., A. Stein, M. Seifert, R. Volkmer-Engert, J. Siepelmeyer, and E. Schneider.** 2002. Functional characterization of the maltose ATP-binding-cassette transporter of *Salmonella typhimurium* by means of monoclonal antibodies directed against the MalK subunit. *Eur J Biochem* **269**:4074-85.
34. **James, P., J. Halladay, and E. A. Craig.** 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**:1425-36.
35. **Jeong, J. Y., Y. J. Kim, N. Cho, D. Shin, T. W. Nam, S. Ryu, and Y. J. Seok.** 2004. Expression of *ptsG* encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**:38513-8.
36. **Kamionka, A., S. Parche, H. Nothhaft, J. Siepelmeyer, K. Jahreis, and F. Titgemeyer.** 2002. The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor*. *Eur J Biochem* **269**:2143-50.
37. **Kawamoto, H., T. Morita, A. Shimizu, T. Inada, and H. Aiba.** 2005. Implication of membrane localization of target mRNA in the action of a small RNA: mechanism of post-transcriptional regulation of glucose transporter in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **19**:328-38.
38. **Kerr, L. D.** 1995. Electrophoretic mobility shift assay. *Methods Enzymol* **254**:619-32.
39. **Kimata, K., T. Inada, H. Tagami, and H. Aiba.** 1998. A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the *ptsG* gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **29**:1509-19.
40. **Kimata, K., Y. Tanaka, T. Inada, and H. Aiba.** 2001. Expression of the glucose transporter gene, *ptsG*, is regulated at the mRNA degradation step in response to glycolytic flux in *Escherichia coli*. *Embo J* **20**:3587-95.
41. **Klang, E.** 2007. Molekulargenetische Charakterisierung des Mlc Modulons von *E.coli* K-12. Diplomarbeit Universität Osnabrück.

42. **Koo, B. M., M. J. Yoon, C. R. Lee, T. W. Nam, Y. J. Choe, H. Jaffe, A. Peterkofsky, and Y. J. Seok.** 2004. A novel fermentation/respiration switch protein regulated by enzyme IIAGlc in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**:31613-21.
43. **Kotrba, P., M. Inui, and H. Yukawa.** 2001. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J Biosci Bioeng* **92**:502-17.
44. **Kristich, C. J., and G. W. Ordal.** 2004. Analysis of chimeric chemoreceptors in *Bacillus subtilis* reveals a role for CheD in the function of the McpC HAMP domain. *J Bacteriol* **186**:5950-5.
45. **Kundig, W., S. Ghosh, and S. Roseman.** 1964. Phosphate Bound To Histidine In A Protein As An Intermediate In A Novel Phospho-Transferase System. *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**:1067-74.
46. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
47. **Lee, S. J., W. Boos, J. P. Bouche, and J. Plumbridge.** 2000. Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *Embo J* **19**:5353-61.
48. **Lengeler, J.** 1966. [Studies on the glucose effect in the synthesis of the galactose enzyme of *Escherichia coli*]. *Z Vererbungsl* **98**:203-29.
49. **Lengeler, J., A. M. Auburger, R. Mayer, and A. Pecher.** 1981. The phosphoenolpyruvate-dependent carbohydrate: phosphotransferase system enzymes II as chemoreceptors in chemotaxis of *Escherichia coli* K 12. *Mol Gen Genet* **183**:163-70.
50. **Lengeler, J. W.** 1993. Carbohydrate transport in bacteria under environmental conditions, a black box? *Antonie Van Leeuwenhoek* **63**:275-88.
51. **Lengeler, J. W.** 2000. Metabolic networks: a signal-oriented approach to cellular models. *Biol Chem* **381**:911-20.
52. **Lengeler, J. W., and K. Jahreis.** 1996. Phosphotransferase Systems or PTSs as Carbohydrate Transport and Signal Transduction Systems, vol. 2. Elsevier Science B.V.
53. **Lengeler, J. W., K. Jahreis, and U. F. Wehmeier.** 1994. Enzymes II of the phosphoenol pyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport. *Biochim Biophys Acta* **1188**:1-28.
54. **Lengeler, J. W., F. Titgemeyer, A. P. Vogler, and B. M. Wohrl.** 1990. Structures and homologies of carbohydrate: phosphotransferase system (PTS) proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **326**:489-504.
55. **Lennox, E. S.** 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**:190-206.
56. **Lux, R., K. Jahreis, K. Bettenbrock, J. S. Parkinson, and J. W. Lengeler.** 1995. Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:11583-7.

57. **MacConkey, A.** 1905. Lactose fermenting bacteria in faeces. *J.Hyg.***8:333-379.**
58. **Martinez, E., B. Bartolome, and F. de la Cruz.** 1988. pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and *lacZ* alpha reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene* **68:159-62.**
59. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
60. **Moreno, M. S., B. L. Schneider, R. R. Maile, W. Weyler, and M. H. Saier, Jr.** 2001. Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol Microbiol* **39:1366-81.**
61. **Morita, T., W. El-Kazzaz, Y. Tanaka, T. Inada, and H. Aiba.** 2003. Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278:15608-14.**
62. **Morita, T., H. Kawamoto, T. Mizota, T. Inada, and H. Aiba.** 2004. Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54:1063-75.**
63. **Morrison, T. B., and J. S. Parkinson.** 1994. Liberation of an interaction domain from the phosphotransfer region of CheA, a signaling kinase of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91:5485-9.**
64. **Muus, J.-E.** 2006. Molekularbiologische Untersuchungen der Funktionsweise des hochkonservierten bakteriellen Proteins YeeI aus verschiedenen Enterobakterien. Diplomarbeit Universität Osnabrück.
65. **Nam, T. W., S. H. Cho, D. Shin, J. H. Kim, J. Y. Jeong, J. H. Lee, J. H. Roe, A. Peterkofsky, S. O. Kang, S. Ryu, and Y. J. Seok.** 2001. The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB(Glc) recruits the global repressor Mlc. *Embo J* **20:491-8.**
66. **Ostrovsky de Spicer, P., and S. Maloy.** 1993. PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90:4295-8.**
67. **P.W. Postma, J. W. L., G.R. Jacobson.** 1996. Phosphoenolpyruvate phosphotransferase systems in F.C. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology **2nd edition:1149-1174.**
68. **P.W. Postma, J. W. L., G.R. Jacobson.** 1993. Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase Systems in Bacteria. *Microbiological Reviews* **57:543-594.**
69. **Peterkofsky, A.** 1981. *Escherichia coli* adenylate cyclase as a sensor of sugar transport function. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **14:215-28.**
70. **Pimentel-Schmitt, E. F., A. W. Thomae, J. Amon, M. A. Klieber, H. M. Roth, Y. A. Muller, K. Jahreis, A. Burkovski, and F. Titgemeyer.** 2007. A glucose kinase from *Mycobacterium smegmatis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12:75-81.**
71. **Plumbridge, J.** 1998. Control of the expression of the *manXYZ* operon in *Escherichia coli*: Mlc is a negative regulator of the mannose PTS. *Mol Microbiol* **27:369-80.**

72. **Plumbridge, J.** 2001. DNA binding sites for the Mlc and NagC proteins: regulation of *nagE*, encoding the N-acetylglucosamine-specific transporter in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **29**:506-14.
73. **Plumbridge, J.** 1999. Expression of the phosphotransferase system both mediates and is mediated by Mlc regulation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**:260-73.
74. **Plumbridge, J.** 2001. Regulation of PTS gene expression by the homologous transcriptional regulators, Mlc and NagC, in *Escherichia coli* (or how two similar repressors can behave differently). *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:371-80.
75. **Plumbridge, J., and A. Kolb.** 1991. CAP and Nag repressor binding to the regulatory regions of the *nagE-B* and *manX* genes of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **217**:661-79.
76. **Postma, and Lengeler.** 1985. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol Rev* **49**:232-69.
77. **Pramanik, B. N., P. L. Bartner, U. A. Mirza, Y. H. Liu, and A. K. Ganguly.** 1998. Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes: an emerging technology. *J Mass Spectrom* **33**:911-20.
78. **Reizer, J., S. Bachem, A. Reizer, M. Arnaud, M. H. Saier, Jr., and J. Stulke.** 1999. Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **145 (Pt 12)**:3419-29.
79. **Rice, G. C., D. V. Goeddel, G. Cachianes, J. Woronicz, E. Y. Chen, S. R. Williams, and D. W. Leung.** 1992. Random PCR mutagenesis screening of secreted proteins by direct expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5467-71.
80. **Riley, M., T. Abe, M. B. Arnaud, M. K. Berlyn, F. R. Blattner, R. R. Chaudhuri, J. D. Glasner, T. Horiuchi, I. M. Keseler, T. Kosuge, H. Mori, N. T. Perna, G. Plunkett, 3rd, K. E. Rudd, M. H. Serres, G. H. Thomas, N. R. Thomson, D. Wishart, and B. L. Wanner.** 2006. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005. *Nucleic Acids Res* **34**:1-9.
81. **Saier, M. H., Jr., S. Chauvaux, G. M. Cook, J. Deutscher, I. T. Paulsen, J. Reizer, and J. J. Ye.** 1996. Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology* **142 (Pt 2)**:217-30.
82. **Saier, M. H., and S. Roseman.** 1972. Inducer exclusion and repression of enzyme synthesis in mutants of *Salmonella typhimurium* defective in enzyme I of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J Biol Chem* **247**:972-5.
83. **Sambrook.** 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.*, vol. 2nd edition.
84. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**:104-8.
85. **Saydam, O., B. Vogt, M. Ackermann, and M. Schwyzer.** 2002. Search for physical interaction between BICP0 of bovine herpesvirus-1 and p53 tumor suppressor protein. *Vet Microbiol* **86**:95-102.



86. **Schiefner, A., K. Gerber, S. Seitz, W. Welte, K. Diederichs, and W. Boos.** 2005. The crystal structure of Mlc, a global regulator of sugar metabolism in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**:29073-9.
87. **Schuck, P.** 1997. Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **26**:541-66.
88. **Seeto, S., L. Notley-McRobb, and T. Ferenci.** 2004. The multifactorial influences of RpoS, Mlc and cAMP on *ptsG* expression under glucose-limited and anaerobic conditions. *Res Microbiol* **155**:211-5.
89. **Seitz, S.** 2005. Analyse der transportgesteuerten Genregulation anhand des Mlc-PtsG-Systems von *Escherichia coli*. Dissertation Universität Konstanz.
90. **Seitz, S., S. J. Lee, C. Penner, W. Boos, and J. Plumbridge.** 2003. Analysis of the interaction between the global regulator Mlc and EIIBGlc of the glucose-specific phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**:10744-51.
91. **Seok, Y. J., M. Sondej, P. Badawi, M. S. Lewis, M. C. Briggs, H. Jaffe, and A. Peterkofsky.** 1997. High affinity binding and allosteric regulation of *Escherichia coli* glycogen phosphorylase by the histidine phosphocarrier protein, HPr. *J Biol Chem* **272**:26511-21.
92. **Shin, D., N. Cho, S. Heu, and S. Ryu.** 2003. Selective regulation of *ptsG* expression by Fis. Formation of either activating or repressing nucleoprotein complex in response to glucose. *J Biol Chem* **278**:14776-81.
93. **Shin, D., S. Lim, Y. J. Seok, and S. Ryu.** 2001. Heat shock RNA polymerase (E sigma(32)) is involved in the transcription of *mlc* and crucial for induction of the Mlc regulon by glucose in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**:25871-5.
94. **Siebold, C., K. Flukiger, R. Beutler, and B. Erni.** 2001. Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Lett* **504**:104-11.
95. **Siepmeyer, J.** 2003. Entwicklung von Systemen zur quantitativen Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration und der in vivo Aktivität der Adenylatzyklase CyaA in einer isogenen Stammreihe von *E.coli* K-12. Dissertation.
96. **Soberon, X., L. Covarrubias, and F. Bolivar.** 1980. Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene* **9**:287-305.
97. **Sprenger, G. A., and J. W. Lengeler.** 1984. L-Sorbose metabolism in *Klebsiella pneumoniae* and Sor<sup>+</sup> derivatives of *Escherichia coli* K-12 and chemotaxis toward sorbose. *J Bacteriol* **157**:39-45.
98. **Stryer, L.** 1995. Biochemie, 4 ed, vol. 1. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
99. **Surette, S. a.** 1996. Chemotaxis. *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology **1**:1103-1129.

100. **Tanaka, S., S. A. Lerner, and E. C. Lin.** 1967. Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J Bacteriol* **93**:642-8.
101. **Tanaka, Y., F. Itoh, K. Kimata, and H. Aiba.** 2004. Membrane localization itself but not binding to IICB is directly responsible for the inactivation of the global repressor Mlc in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **53**:941-51.
102. **Tanaka, Y., K. Kimata, and H. Aiba.** 2000. A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *Embo J* **19**:5344-52.
103. **Tchieu, J. H., V. Norris, J. S. Edwards, and M. H. Saier, Jr.** 2001. The complete phosphotranferase system in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:329-46.
104. **Ulmke, C., J. W. Lengeler, and K. Schmid.** 1997. Identification of a new porin, RafY, encoded by raffinose plasmid pRSD2 of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:5783-8.
105. **Vanderpool, C. K., and S. Gottesman.** 2004. Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol* **54**:1076-89.
106. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-19.
107. **Zeppenfeld, T.** 2000. Molekularbiologische Untersuchungen des Glukosesensors (IICB<sup>Glc</sup>) und seines Genes *ptsG* in *Escherichia coli*. Dissertation Universität Osnabrück.
108. **Zeppenfeld, T., C. Larisch, J. W. Lengeler, and K. Jahreis.** 2000. Glucose transporter mutants of *Escherichia coli* K-12 with changes in substrate recognition of IICB(Glc) and induction behavior of the *ptsG* gene. *J Bacteriol* **182**:4443-52.
109. **Zimmermann, F. K.** 1975. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **31**:71-86.

## **Vielen Dank...**

möchte ich an dieser Stelle allen Personen sagen, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit im Labor oder im Privaten mit fachlichen Tips oder der nötigen Abwechslung begleitet haben - und somit einen Großteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

vor Allem natürlich an PD Dr. Knut Jahreis, der mir die Möglichkeit für diese Arbeit gegeben hat und mir in seiner Rolle als „Doktorvater“ immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für die stets neuen, inspirierenden Gedankenanstöße und Ideen, wie man MtfA doch noch einen Teil seiner Geheimnisse entlocken konnte. Nicht zu vergessen ist natürlich auch ein Dankeschön für die stets angenehme und unkomplizierte Arbeitsatmosphäre, die mich auf eine schöne „Doktorarbeitszeit“ zurückblicken lässt.

an Herrn Prof. Dr. K. Altendorf für die Übernahme des Zweitgutachtens.

an Herrn Prof. Dr. Jürgen Heinisch für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und für die Bereitstellung der Hefe-Vektoren und Stämme für die Di-Hybrid Analysen.

an Dr. Stefan Walter für die Durchführung der ESI-Versuche.

an Sabrina und Andrea für die Hilfe und das „Know-how“ in Sachen Hefe-Versuche.

an Anna, Elli, Frauke, Janna, Karina und Liese, die im Rahmen ihrer Großpraktika, Master- oder Diplomarbeiten ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

an die TA´s Diana und Katrin für die tatkräftige Unterstützung, nicht nur, wenn es mal eng wurde...

natürlich auch an alle anderen Labormitstreiter, die im Laufe meiner Laborzeit für die spaßige, spannende und unterhaltsame Abwechslung gesorgt haben – also neben den schon genannten Danke an: Britta, Dorte, Dr. Emili, Manu, Nadine und Yvonne für die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

natürlich auch an alle anderen Nord- und Südseiten-Mitarbeiter der AG-Genetik, und insbesondere an Angie für das unermüdliche Spülen und Kurt für den (fast) täglichen Segen...

an meine Eltern, für die stetige Unterstützung in jeglicher Hinsicht

an meine besten Freunde Anja&Tino, Bianca, Deike, Tanja und natürlich an Norbert für die vielen schönen gemeinsamen Stunden und Erlebnisse und dafür, dass ihr in allen Lebenslagen immer für mich da seid.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Des weiteren versichere ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche durchgeführt habe.

Osnabrück im März 2007

.....

(Ariane Staab)