



Molekularbiologische Untersuchungen verschiedener Komponenten des
Glukose-Phosphotransferasesystems in *Escherichia coli* K-12 mit Schwerpunkt
auf der Strukturanalyse des Transportproteins EIICB^{Glc}

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Fachbereich Biologie/ Chemie der Universität Osnabrück

vorgelegt von Elisabeth Gabor

Osnabrück, August 2011

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

I Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Einführung	11
1.2	Phosphotransferasesysteme	11
1.2.1	Das Glukose-PTS	13
1.2.2	Die Regulation des <i>ptsG</i> -Gens	16
1.2.3	Das Membranprotein EIICB ^{Glc}	18
1.2.4	Konformationszustände des Proteins EIICB ^{Glc} im WT und in Mutanten	23
1.3	EIICB ^{Glc} liegt als Homodimer vor	25
1.4	Regulatorischer Einfluss des Proteins EIIA ^{Cr} auf Proteine der „major facilitator superfamily“ beim Induktorausschluss	25
1.5	Hinweise auf einen möglichen cAMP-Transporter in <i>Escherichia coli</i>	27
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Chemikalien, Geräte und Puffer	29
2.1.1	Chemikalien	29
2.1.2	Geräte	29
2.1.3	Pufferlösungen	29
2.2	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	31
2.2.1	Bakterienstämme	31
2.2.2	Plasmide	31
2.2.3	Oligonukleotide	33
2.3	Medien und Wachstumsbedingungen	34
2.3.1	Nährmedien	34
2.3.2	Antibiotika-Stocklösungen	35
2.3.3	Aminosäuren	36
2.3.4	Anzuchtverfahren	36
2.3.5	Dauerkulturen	36
2.3.6	MacConkey-Indikatorplatten	37
2.4	Genetische und molekularbiologische Methoden	37
2.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA	37
2.4.2	Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit [®] Fluorimeter von Invitrogen	37
2.4.3	Restriktion von DNA	37
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	38
2.4.5	Präparative DNA-Behandlung	38
2.4.6	Antarktische Phosphatase-Behandlung	38
2.4.7	Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.4.8	Isolierung von chromosomaler DNA	39
2.4.9	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.4.10	Reinigen von PCR-Produkten	40
2.4.11	pGEM [®] -T Vektor-System	40
2.4.12	Ortsgerichtete Mutagenese (Agilent Technologies)	40
2.4.13	Ortsgerichtete Mutagenese (New England Biolabs)	41

2.4.14	Herstellung kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode.....	41
2.4.15	Transformation	42
2.4.16	P1-Transduktion	42
2.5	Biochemisch-analytische Methoden	43
2.5.1	β -Galaktosidase-Aktivitätstest.....	43
2.5.2	Reinigung von EIICB ^{Glc} (His) ₆ mit Ni-NTA Spin-Säulen von Qiagen.....	44
2.5.3	Reinigung von EIICB ^{Glc} (His) ₆ mit Ni-NTA Agarose von Qiagen.....	44
2.5.4	Cystein-Scanning-Methode nach Turgut.....	45
2.5.5	Cystein-Scanning-Methode (für EIICB ^{Glc} optimiert)	46
2.5.6	Bradford-Test.....	47
2.5.7	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.5.8	Zusammensetzung von SDS-Gelen	47
2.5.9	Western Blot.....	48
2.5.10	Chemolumineszenz mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	49
2.5.11	Silberfärbung.....	49
2.5.12	Blau-Weiß-Nachweis	49
2.5.13	Radioaktive Transporttests.....	50
2.5.14	Vernetzungs-Experimente mit Formaldehyd.....	51
2.5.15	Bakterielles „Two-Hybrid“-System zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Proteinen.....	51
2.5.16	Massenspektrometrie.....	52
2.5.16.1	Benötigte Puffer und Lösungen für die Massenspektrometrie	52
2.5.16.2	Entfärben von Coomassie-gefärbten SDS-Gelen.....	53
2.5.16.3	Reduktion und Alkylierung	53
2.5.16.4	Tryptischer Verdau hydrophiler Proteine	54
2.5.17	BiFC (Bimolekulare-Fluoreszenzkomplementation).....	54
2.5.18	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von GFP-Signalen in Bakterienzellen...	55
2.5.19	Durchflusscytometrie (FACS; Fluorescence activated cell sorting).....	55
2.6	Sonstiges	56
2.6.1	Alignments.....	56
2.6.2	Sequenzierungen.....	56
2.6.3	Software	56
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Optimierung der Methode zur Aufklärung der Lokalisation einzelner Aminosäuren von EIICB^{Glc} im Hinblick auf die Cytoplasmamembran mittels Cystein- Scanning.....	57
3.1.1	Konstruktion eines Überexpressionsvektors mit dem <i>ptsG</i> -Gen	58
3.1.2	Optimierung der Reinigung von EIICB ^{Glc} (His) ₆	60
3.1.3	Konstruktion einer cysteinfreien funktionellen Mutante von EIICB ^{Glc}	61
3.1.4	Konstruktion von Single-Cystein-Varianten von EIICB ^{Glc} für das Cystein-Scanning.	63
3.1.5	Funktionsüberprüfung der Einzel-Cystein Varianten von EIICB ^{Glc}	64
3.1.6	Optimierung des Cystein-Scannings für Einzel-Cystein-Mutanten von EIICB ^{Glc} ..	67

3.1.7	Ergebnisse des Cystein-Scannings mit verschiedenen Einzel-Cystein Mutanten von EIICB ^{Glc}	73
3.1.8	Zusammenfassung für das Cystein-Scanning	74
3.2	Mutantenselektion zur Identifizierung entkoppelter Mutanten des Proteins EIICB^{Glc}.....	75
3.2.1	EIICB ^{Glc} -Mutantenselektion im Stamm LJ141	75
3.2.2	Charakterisierung der Mutante EIICB ^{Glc} _{R203H} in Hinblick auf ihre Fähigkeit, Mlc zu titrieren	76
3.2.3	Fähigkeit der Mutante EIICB ^{Glc} _{R203H} zur Aufnahme von Ribitol und Arabinol ...	78
3.3	Dimerisierung der B-Domäne des Proteins EIICB^{Glc}.....	79
3.3.1	Dimer-Nachweis des WT.....	80
3.3.2	Dimer-Nachweis der B-Domäne.....	81
3.3.3	Nachweis der Dimerisierung der EIICB ^{Glc} -Domäne über das bakterielle „Two-Hybrid“-System	84
3.3.4	Untersuchung des Einflusses der PTS-Komponenten EI, HPr und EIICB ^{Glc} auf das Dimerisierungsverhalten der B-Domäne.....	87
3.3.5	Untersuchung der Fähigkeit zur Dimerisierung des Proteins EIICB ^{Glc} _{V63D(His)₆}	88
3.4	Interaktionsanalysen zwischen Komponenten des PTS und der „major facilitator superfamily“ mit Hilfe der BiFC-Methode.....	91
3.4.1	Klonierungen der erforderlichen Plasmide für das BiFC-Verfahren zur Detektion einer möglichen Wechselwirkung zwischen CscB-EIICB ^{Glc} und LacY-EIICB ^{Glc}	92
3.4.2	Untersuchung der Wechselwirkung der Proteine EIICB ^{Glc} und LacY, EIICB ^{Glc} und EIICB ^{Glc} sowie EIICB ^{Glc} und CscB mittels BiFC	93
3.4.3	Probleme bei den BiFC-Untersuchungen	96
3.5	Mutantenselektion eines potentiellen cAMP-Transporters mit Hilfe der Durchflusszytometrie	97
3.5.1	Transposonmutagenese mit den Minitransposons pNK2883 und pNK2859	97
3.5.2	Überprüfung eines Systems mit einem cAMP-abhängig exprimierten GFP.....	99
3.5.3	Detektion von Bakterienzellen mittels FACS.....	100
3.5.4	Konstruktion eines Plasmids mit einem Gen, das ein für FACS-Analysen optimiertes GFP kodiert	101
3.5.5	cAMP-abhängig metabolisierte Kohlenhydratquellen im Stamm LDN2	102
3.5.6	Mutantenselektion zur Identifizierung eines cAMP-Transporters.....	102
3.5.7	Phänotypische Untersuchung der gefundenen Mutanten und P1-Transduktion ..	104
4	Diskussion.....	106
4.1	Topologie der Membrandomäne des Glukose-Transporters EIICB^{Glc}	106
4.1.1	Strukturaufklärung mittels Cystein-Scanning.....	106
4.1.2	Hinweise auf einen Aufbau der Domäne EIICB ^{Glc} aus 10 transmembranen Helices	106
4.1.3	Cystein-Scanning-Daten in Bezug auf das neue Modell von EIICB ^{Glc}	111
4.1.4	Zuordnung der Fusionsprotein-Ergebnisse im neuen Modell von EIICB ^{Glc}	113
4.1.5	Bekannt funktionelle Mutanten von EIICB ^{Glc} und ihre Lage im neuen Modell..	113
4.1.6	Strukturell und funktionell wichtige Bereiche des EIICB ^{Glc}	114

4.1.7	Konformationsänderungen des Proteins EIICB ^{Glc} und Funktion des Linkerbereichs	115
4.1.8	Zusammenfassung der Ergebnisse für die Strukturaufklärung von EIIC ^{Glc}	115
4.2	Charakterisierung der entkoppelten Mutante EIICB^{Glc}_{R203H}.....	116
4.3	EIIB^{Glc} kann als Oligomer vorliegen.....	117
4.4	Untersuchung der möglichen Wechselwirkung der Proteine EIIC^{Cr} und CscB120	
4.5	System zur Identifikation eines möglichen cAMP-Transporters.....	121
5	Zusammenfassung.....	123
6	Summary	124
7	Literaturverzeichnis	125
8	Danksagung	138
9	Eidesstattliche Erklärung	139

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Genereller Aufbau verschiedener Phosphotransferasesysteme	13
Abbildung 1.2:	Regulatorische Eigenschaften des Glukose-Phosphotransferasesystems	15
Abbildung 1.3:	Regulation der Expression des <i>ptsG</i> -Gens unter Glukoseanwesenheit und unter Glukosemangel	17
Abbildung 1.4:	Modelle der Struktur des Membranproteins EIICB ^{Glc}	22
Abbildung 2.1:	Ortsgerichtete Mutagenese mit dem QuickChange TM Site-Directed Mutagenesis Kit.	40
Abbildung 2.2:	Prinzip der ortsgereichten Mutagenese.....	41
Abbildung 3.1:	Vergleich des Wachstums der Plasmide pRR48GH und pBGH24 im Stamm LR2-175	59
Abbildung 3.2:	Fraktionen der Reinigung des Proteins EIICB ^{Glc} mit Ni-NTA-Säulen	60
Abbildung 3.3:	Fraktionen der Reinigung von EIICB ^{Glc} mit der Ni-NTA-Agarose von Qiagen (Silberfärbung).....	61
Abbildung 3.4:	Spezifische Aktivitäten der Single-Cystein-Mutanten aus den radioaktiven Transporttests.....	65
Abbildung 3.5:	Spezifische Transportaktivität der WT-Variante und der cysteinfreien Mutante mit der B-Domäne in trans	66

Abbildung 3.6: Prinzip des Cystein-Scannings	68
Abbildung 3.7: Cysteinfreie Mutante von EIICB ^{Glc} im Stammhintergrund LJ120 ($\Delta ptsG$).	69
Abbildung 3.8: Vergleich der Signalintensität zwischen Fluoreszenzmarkierungen und Chemolumineszenz	70
Abbildung 3.9: Erste Ergebnisse des Cystein-Scannings	71
Abbildung 3.10: Vergleich verschiedener Puffer beim Cystein-Scanning	72
Abbildung 3.11: Cystein-Scanning mit den Kontrollpositionen Q180C und E472C.....	72
Abbildung 3.12: Ergebnisse der Cystein-Scanning-Untersuchung.....	73
Abbildung 3.13: Titration von Mlc durch EIICB ^{Glc} _{R203H} im Stamm LZ150/F ⁺ lac Φ (<i>ptsG</i> <i>po-</i> <i>lacZ</i>).....	77
Abbildung 3.14: Fähigkeit der Mutante EIICB ^{Glc} R203H, Mlc zu titrieren	78
Abbildung 3.15: Vernetzungsexperiment des WT von EIICB ^{Glc} im LR2-175- Stammhintergrund.....	80
Abbildung 3.16: Formaldehydvernetzung der B-Domäne im LR2-175-Stammhintergrund	81
Abbildung 3.17: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der potentiellen Dimerbanden von EIIB ^{Glc}	82
Abbildung 3.18: Vernetzung der B-Domäne im LJ120- Stammhintergrund.....	83
Abbildung 3.19: Ergebnis der Crosslinking-Versuche mit pTM30BHis im Stamm LJ120 mit und ohne Formaldehyd.....	84
Abbildung 3.20: Prinzip des bakteriellen "Two-Hybrid-Assays"	85
Abbildung 3.21: Spezifische β -Galaktosidase-Aktivität des bakteriellen "Two-Hybrid- Assays" zur Untersuchung der B-Domäne von EIICB ^{Glc}	86
Abbildung 3.22: Ergebnis der Crosslinking-Versuche mit pTM30BHis im Stamm LJ141	87
Abbildung 3.23: Ergebnis der Crosslinking-Versuche mit pTM30BHis im Stamm LJ139	88
Abbildung 3.24: Dreidimensionale Darstellung von EIIB ^{Glc}	89

Abbildung 3.25: Alignment der Aminosäuresequenz von EIIB ^{Glc}	89
Abbildung 3.26: Crosslinking Experiment mit LJ120/pTM30B _{V63D} (His) ₆	90
Abbildung 3.27: Prinzip des BiFC-Assays	91
Abbildung 3.28: Klonierungsstrategie für die BiFC Assay-Plasmide zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen EIIA ^{Crr} und CscB und Kontrollen	92
Abbildung 3.29: Ergebnis der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen EIIA ^{Crr} und LacY.....	94
Abbildung 3.30: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen EIIA ^{Crr} und EIICB ^{Glc} mittels BiFC-Analyse.....	95
Abbildung 3.31: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen EIIA ^{Crr} und CscB	96
Abbildung 3.32: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der BiFC-Konstrukte von CscB und EIIA ^{Crr} mit Kontrollen	96
Abbildung 3.33: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Stammes LDN2/pACYC184::Ø(<i>scrY</i> _{p,ø} - <i>gfp</i>) in Abhängigkeit von externem cAMP	100
Abbildung 3.34: FACS Ergebnis der <i>E. coli</i> -Färbung mit FM4-64.....	101
Abbildung 3.35: Fluoreszenzmikroskopische Überprüfung des Stammes LDN2/pHEXscrY _{p,ø} - <i>gfpmut2</i>	102
Abbildung 3.36: FACS-Analyse des Stammes LDN2/ pHexscrY _{p,ø} - <i>gfpmut2</i>	103
Abbildung 4.1: Vorhersage der Membrantopologie für EIICB ^{Glc} durch Hydrophobizitätsuntersuchungen nach Daley et al.....	107
Abbildung 4.2: Alignment der Proteine EIIC ^{Chb} (<i>B. cereus</i>), EIIC ^{Chb} (<i>E. coli</i>) und EIIC ^{Glc} (<i>E.-coli</i>)	108
Abbildung 4.3: Neues Modell des Proteins EIIC ^{Glc}	109
Abbildung 4.4: Abbildung der homodimeren C-Domäne des EIIC ^{Chb}	111
Abbildung 4.5: Konformationsänderung des EIIC ^{Chb} bei der Substrataufnahme	112
Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des EIICB ^{Glc} -Dimers (Querschnitt).....	120

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Häufig verwendete Geräte	29
Tabelle 2.2: Verwendete Pufferlösungen und Reagenzien	29
Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme	31
Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide.....	31
Tabelle 2.5: Verwendete Oligonukleotide	33
Tabelle 2.6: Anzuchtmedien.....	35
Tabelle 2.7: Antibiotika	36
Tabelle 2.8: Aminosäuren/Vitamin B1.....	36
Tabelle 2.9: Verschiedene Abstufungen der Koloniefarbe beim Markertest auf McConkey-Platten	37
Tabelle 2.10: Häufig verwendete Restriktionsenzyme.....	37
Tabelle 2.11: Zusammensetzung von 10% SDS-Gelen	47
Tabelle 2.12: Zusammensetzung von 15% SDS-Gelen	47
Tabelle 2.13: Lösungen für die Silberfärbung.....	49
Tabelle 2.14: Bioinformatische Software.....	56
Tabelle 3.1: Induktionskinetik mit LR2-175/pRR48GH und LR2-175/pBGH24.....	58
Tabelle 3.2: Funktionsnachweis des Glukosetransports einer cysteinfreien, entkoppelten Mutante von EIICB ^{Glc} in den Stämmen LJ141 und LR2-175 auf McCGlc-Platten mit und ohne Zugabe von IPTG	62
Tabelle 3.3: Konstruktion von Single-Cystein Varianten von EIICB ^{Glc}	64
Tabelle 3.4: Zuordnung der mittels Cystein-Scanning getesteten Mutanten hinsichtlich der Cytoplasmamembran.....	74
Tabelle 3.5: Konstruktion der Plasmide für das BiFC-Verfahren	93
Tabelle 3.6: Ergebnisse der P1-Transduktion der Transposonmutagenese mit pNK2859	99
Tabelle 3.7: Untersuchung der Verstoffwechslung verschiedener Kohlenhydrate in Abhängigkeit von cAMP im Stamm LDN2	102

Tabelle 3.8: Untersuchung der FACS-Mutanten, die keine Maltose mehr verstoffwechseln konnten	104
--	-----

IV. Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden gemäß des Einbuchstabencodes abgekürzt

AEBSF:	4-1-Benzensulfonylfluorid
AK:	Antikörper
Amp:	Ampicillin
AS:	Aminosäure
Atl:	Arabinitol
BiFC:	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BM:	Biotinmaleimid
BSA:	Rinderserumalbumin
BTH:	Bakterielles Two-Hybrid-System
C-Quelle:	Kohlenstoffquelle
CAA:	Casaminoacids
Cam:	Chloramphenicol
cAMP:	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD:	Circulardichroismus
CP:	Cytoplasma
cpm:	counts per minute, Zerfälle pro Minute
DMF:	Dimethylformamid
DMSO:	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EI:	EnzymI
EII:	EnzymII
EPR:	Elektronenspinresonanz
EtOH:	Ethanol
FACS:	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FM4-64:	N-(3-Triethyl-ammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethyl-amino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium-dibromid
GFP:	Grün-fluoreszierendes Protein
GLB:	Gel-Ladepuffer
Glc:	Glukose
His-„Tag“:	Aminosäuresequenz aus 6 Histidinen
HPr:	Histidin-Protein
HRP:	Meerrettich-Peroxidase
ISO:	inside-out, die Innenseite nach außen gekehrt
Kan:	Kanamycin
kb:	Kilobasen
kDa:	Kilodalton
Lak:	Laktose
LDAO:	Lauryldimethylamin-N-oxid
LKS:	Laborkultursammlung
Man:	Mannose
McC:	MacConkey-Agar
MeOH:	Methanol

MM:	Minimalmedium
MOPS:	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Mtl:	Mannitol
MTSET:	(Trimethylammonium)ethyl-methanthiosulfonat-bromid
N-Terminus:	Aminoterminus eines Proteins
Nag:	N-Acetylglucosamin
Ni-NTA:	Nickel ²⁺ -Nitrilotriessigsäure
NMR:	Kernspinresonanzspektroskopie
Octyl-POE:	Poly(ethylenglycol)-Octyl-Ether
OD _x :	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAA:	Polyacrylamid
PAGE:	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS:	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR:	Polymerasekettenreaktion
PEP:	Phosphoenolpyruvat
PMID:	PubMed-Zulassungsnummer
PP:	Periplasma
PP1:	Phosphatpuffer 1
PTS:	PEP-abhängiges Phosphotransferasesystem
RbCl:	Rubidiumchlorid
rpm:	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RSO:	right-side out, die Außenseite nach außen gekehrt
Rtl:	Ribitol
SDS:	Natriumdodecylsulfat
β-ME:	β-Mercaptoethanol
β-ONPG:	o-Nitrophenyl-β-D-Galactosid
TBE:	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS:	Tris-gepufferte Salzlösung
TE:	Tris-EDTA-Puffer
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet:	Tetracyclin
TNT:	Tris-HCl-NaCl-Tween-Puffer
Tris:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜNK:	Übernachtkultur
X-Gal:	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

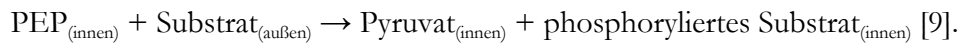
Das Bakterium *Escherichia coli* ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives und fakultativ anaerobes Bakterium, welches als natürlicher Bewohner des Darms in Säugern und Vögeln vorkommt. Es gilt als eines der molekularbiologisch am besten untersuchten Organismen, von einem vollständigen Verständnis dieses Modellorganismus ist man aber nach wie vor weit entfernt.

Escherichia coli-Bakterien müssen sich an ständig wechselnde Umweltbedingungen anpassen. Sowohl beim Überleben in der Umwelt als auch im Wirtsdarm müssen sie beispielsweise sowohl auf die unterschiedliche Verfügbarkeit von Nährstoffen oder Sauerstoff als auch auf die Anwesenheit toxischer Substanzen reagieren können.

Die Abgrenzung gegenüber der Umwelt erfolgt in den gramnegativen Organismen in Form der äußeren Membran sowie der Cytoplasmamembran. Die äußere Membran stellt dabei eine Diffusionsbarriere dar, die den Eintritt von großen Molekülen, aber auch das Entweichen zelleigener Substanzen, nur selektiv zulässt. Während an der äußeren Membran kein aktiver Transport stattfinden kann, da hier die nötige Energetisierung fehlt, ist die innere Membran, die das Periplasma und das Cytoplasma voneinander trennt, eine Barriere, über die hinweg Substanzen auch gegen ein Konzentrationsgefälle transportiert werden können. Dieser sogenannte aktive, da energieverbrauchende, Transport wird in mehrere verschiedene Arten unterteilt. Beim primären aktiven Transport stammt die Energie aus der Hydrolyse von ATP und wird genutzt, um Protonen, Ionen oder Kohlenhydrate über die Membran zu befördern [1]. Beim sekundären aktiven Transport wird die Energie eines Moleküls entlang seines Konzentrationsgradienten genutzt, um ein anderes Molekül zu transportieren [2, 3]. Dabei unterscheidet man zwischen Symport und Antiport. Eine weitere Form des aktiven Transports liegt ausschließlich in Bakterien vor. Bei diesem als Gruppentranslokation beschriebenen Transport wird das Substrat während der Translokation modifiziert. Auf diese Weise entsteht kein Konzentrationsgefälle, da sich das externe Substrat vom internalisierten Substrat unterscheidet. Das am besten untersuchte Beispiel für diese Transportform stellen die sogenannten phosphoenolpyruvatabhängigen-Kohlenhydrat-Phosphotransferasesysteme (PTS) dar [4-6].

1.2 Phosphotransferasesysteme

Bei den Phosphotransferasesystemen handelt es sich um Kohlenhydrataufnahmesysteme für u.a. Hexosen, Hexitole und Disaccharide [7]. Sie wurden erstmals im Jahr 1964 beschrieben [8]. In *Escherichia coli* sind mehr als 20 verschiedene Phosphotransferasesysteme bekannt [6], die jeweils nach den von ihnen transportierten Hauptsubstraten benannt werden (z.B. das Glukose-PTS). Die allgemeine Reaktion eines PTS kann folgendermaßen beschrieben werden:



In Abhängigkeit von internem PEP, einem Produkt der Glykolyse, und der Verfügbarkeit von externen Substraten wird also ein Substratmolekül transportiert, welches eine gleichzeitige Phosphorylierung erfährt. Die PT-Systeme bestehen generell aus zwei allgemeinen, substratunspezifischen Komponenten, dem Enzym I (EI, Gen *ptsI*), und dem Histidin-Protein (auch Heat-stable-Protein, HPr, Gen *ptsH*). Diese Proteine liegen cytoplasmatisch vor und kommen, mit Ausnahme des Fruktose-PTS [10], in allen Phosphotransferasesystemen vor. Darüber hinaus enthält jedes PTS ein substratspezifisches Enzym II (EII), das nach dem Hauptkohlenhydrat benannt wird, für welches es spezifisch ist (z.B. EII^{Glc} für den Glukose-Transporter) (für Reviews siehe [9], [11]).

Das EII ist für die Aufnahme und Phosphorylierung des jeweiligen Substrats zuständig und aus mehreren funktionellen Domänen aufgebaut (im Allgemeinen die Domänen EIIA, EIIB und EIIC, beim EII^{Man} auch EIID). Diese Domänen des EII können bei jedem EII unterschiedlich angeordnet sein. Im EII^{Mtl} liegen beispielsweise alle drei Domänen fusioniert vor, während im EII^{Glc} nur die Domänen C und B fusioniert sind. Die Domänen EIIC und EIID^{Man} sind membranständig, wohingegen EIIA entweder cytosolisch oder, wie EIIB^{Glc}, durch die Bindung an die membranständige Domäne peripher an die Membran gebunden vorliegt. Durch Vergleiche ihrer Domänenaufteilung und Konsensussequenzen können diese verschiedenen Proteine Homologie-Familien und Unterfamilien zugeordnet werden. Die meisten Vertreter hat dabei die Glukosefamilie, der neben dem Glukosetransporter auch die Aufnahmeproteine für N-Acetylglukosamin, Sucrose und β -Glukoside [12] angehören und nach neueren Erkenntnissen möglicherweise auch die Vertreter für die Fruktose-/Mannitol-, und Laktose-/Diacetylchitobiosetransporter zuzurechnen sind [6, 13, 14].

Die allgemeinen Proteine EI und HPr dienen dem Transfer einer Phosphatgruppe, welche, aus der Hydrolyse des PEP stammend, letztlich an das jeweilige EII weitergegeben wird und von dort auf das zu translozierende Substrat übertragen wird [9, 11]. Dieses wird als phosphorylierte Form in die Zelle aufgenommen und kann somit direkt in Stoffwechselwege wie die Glykolyse eingehen. Abbildung 1.1 zeigt den allgemeinen Ablauf dieses Phosphorylgruppentransfers mit Beispielen für die Aufnahme von Glukose und Mannose. Das Protein Enzym I dient als Proteinkinase, die, als Dimer vorliegend, PEP als Phosphoryldonor nutzt und selber an einem hoch konservierten Histidinrest autophosphoryliert [12]. Daraufhin kommt es zu dem Zerfall der EI-Dimere in Monomere. Die Phosphatgruppe kann anschließend nacheinander an die weiteren Proteine des PTS weitergegeben werden, zunächst an einen Histidinrest des Proteins HPr, danach an die substratspezifische EIIA-Domäne (in diesem Fall wird ebenfalls ein Histidinrest phosphoryliert) und von dieser an die substratspezifische B-Domäne [12]. In den meisten Fällen liegt in der B-Domäne ein Cysteinrest vor, welcher phosphoryliert wird. Andernfalls

handelt es sich ebenfalls um eine Histidinrest [9, 11, 12, 15]. Die beteiligten Proteine zeichnen sich durch komplementäre Ladung und Struktur aus. So weisen beispielsweise EI und EIIA^{Crr} mehrere Aspartat- und Glutamatreste sowie eine konkave Oberfläche auf, während HPr und EIIB^{Glc} reich an Argininresten sind und sich durch eine konvexe Oberfläche auszeichnen [5]. Die B-Domäne überträgt den Phosphatrest an das jeweilige Substrat, während dieses durch die membranständige EII-Komponente in die Zelle transportiert wird. Die Phosphorylierung des Substrats ist dabei der einzige nicht-reversible Schritt der Phosphatgruppen-Transferreaktion [16]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in dieser Reaktion liegt dabei in der Dimerisierung des EI, die die Voraussetzung zur Rephosphorylierung darstellt [9, 11, 17].

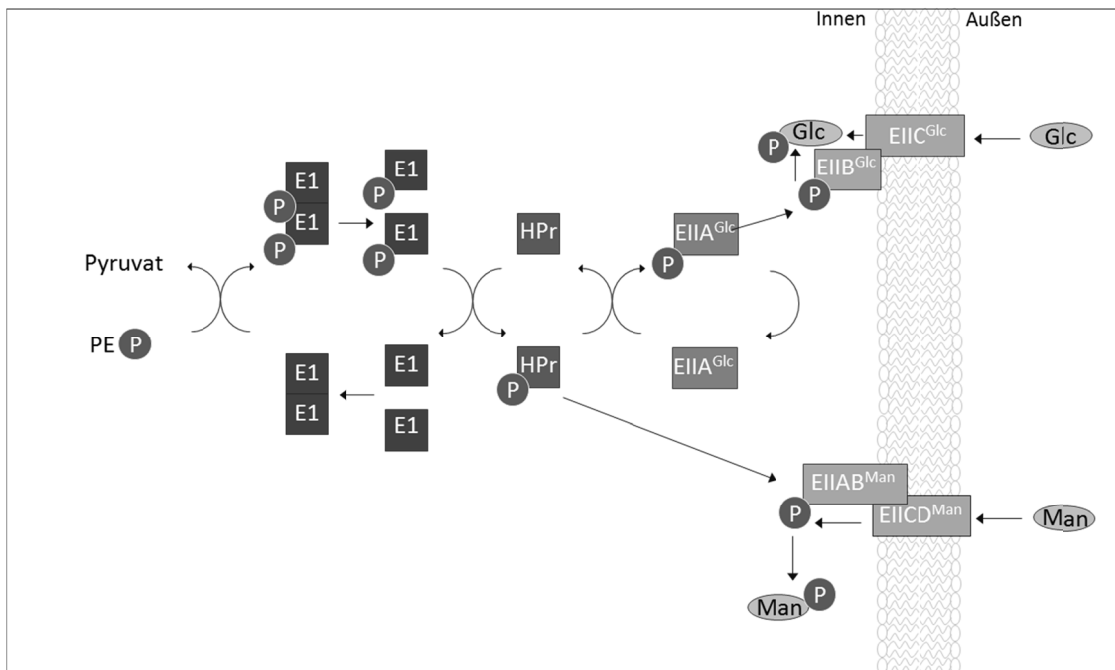


Abbildung 1.1: Genereller Aufbau verschiedener Phosphotransferasesysteme

Das als Homodimer vorliegende EI fungiert als PEP-abhängige Proteinkinase, welches PEP als Phosphoryldonor zur Autophosphorylierung nutzt. Die Dimerisierung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des gesamten Prozesses. Das phosphorylierte EI zerfällt zu Monomeren und gibt die Phosphatgruppe an das HPr weiter. Von hier wird der Phosphatrest an die jeweilige Komponente EIIA übertragen, welche den Rest an die spezifische B-Domäne weitergibt. Die membranständige Translokationsdomäne (EIIIC bzw. EIICD) transportiert das Substrat aus dem Periplasma in das cytoplasmatische Kompartiment, wobei die Phosphatgruppe der B-Domäne gleichzeitig auf das Substrat übertragen wird. Weitere Einzelheiten im Text.

1.2.1 Das Glukose-PTS

Glukose gilt als die „bevorzugte“ Kohlenstoffquelle, die auch in Anwesenheit anderer Kohlenhydrate als erstes metabolisiert wird [18-20]. Somit ist das Glukose-PTS ein zentrales und wesentliches System in *Escherichia coli*, auf das in dieser Arbeit im Besonderen eingegangen werden soll. Zu dem Glukose-PTS gehören die allgemeinen Proteine EI und HPr sowie das cytosolische EIIA^{Crr} (auch: EIIA^{Glc}, Gen *crr*, Teil des *ptsH/crr*-Operons [21]). Die substratspezifische Komponente ist das Protein EIICB^{Glc}, welches aus den fusioniert

vorliegenden funktionellen Domänen EIIC^{Glc} und EIIB^{Glc} besteht (Gen *ptsG*). Dieses Protein transportiert spezifisch die Substrate D-Glukose, 1- und 5-thio-Glukose, die nicht verstoffwechselbare α -Methylglukose, aber auch, mit einer geringeren Affinität, die Substrate D-Mannose und 2-deoxy-Glukose [19, 22, 23]. Glukose stellt dabei das Hauptsubstrat dar. Das Enzym EIIA^{Cr} ist nicht nur Bestandteil des Glukose-PTS, sondern auch Teil der Phosphorylierungskaskade für Sucrose und Trehalose [14, 24] und wird daher hier nach seinem Gen statt nach dem Substrat Glukose benannt.

Seit der Entdeckung des Glukose-PTS im Jahr 1964 sind vielfältige und wichtige Erkenntnisse über dieses System gewonnen worden. Eine der wichtigsten Feststellungen ist dabei, dass das PTS^{Glc} nicht nur der Aufnahme und Phosphorylierung der Glukose dient, sondern auch der Regulation einer Vielzahl von zellulären Vorgängen. Diese regulatorischen Eigenschaften sind abhängig vom Phosphorylierungszustand der PTS-Enzyme. Jedes PTS-Enzym kann, je nachdem, ob Glukose im Medium vorhanden ist, entweder in seiner phosphorylierten (keine Glukose, auf die der Phosphatrest übertragen werden kann; die PTS-Enzyme liegen größtenteils phosphoryliert vor) oder seiner unphosphorylierten Form vorliegen (die Phosphorylgruppe wurde auf Glukose übertragen). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der PTS-Reaktion liegt dabei in der Dimerisierung des EI [9, 11, 17]. Der Phosphorylierungszustand der PTS-Enzyme hängt von der Aufnahmerate des Substrats ab und der daraus resultierenden Dephosphorylierungsrate des EI sowie von der Verfügbarkeit des PEP, welches bei der Glykolyse gebildet wird. Dieses hat einen direkten Einfluss auf die Autophosphorylierungsrate des EI [25]. Auf diese Weise ist es der Zelle möglich, über den Phosphorylierungszustand der PTS-Komponenten den Metabolismus an die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten zu koppeln. Darüber hinaus ist das System in der Lage, weitere zelluläre Vorgänge zu steuern. Abbildung 1.2 zeigt einige Beispiele für die regulatorischen Einflüsse des Glukose-PTS aus *E. coli*. Das Enzym EIIA^{Cr} des für die Aufnahme von Glukose verantwortlichen PTS spielt bei diesem Prozess eine zentrale Rolle. Liegt EIIA^{Cr} vermehrt in seiner unphosphorylierten Form vor, liegt also Glukose im Medium vor, so kann das Protein direkt mit verschiedenen Transport- oder Stoffwechselproteinen (z.B. LacY, GlpK, MalK) für andere Kohlenhydrate wechselwirken und diese inaktivieren [20, 26] (s. auch Abschnitt 1.4).

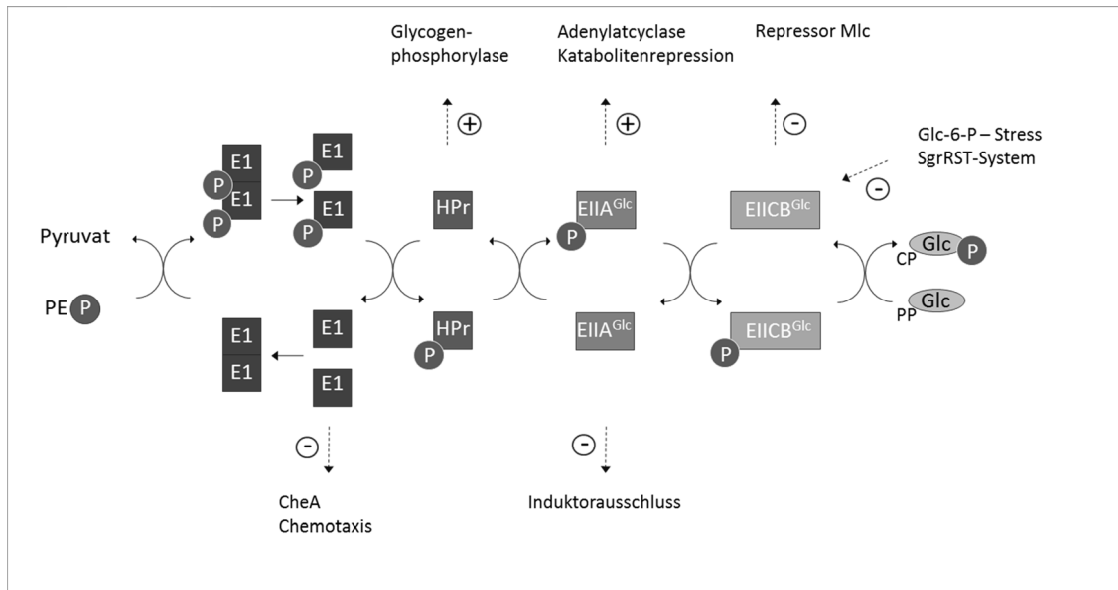


Abbildung 1.2: Regulatorische Eigenschaften des Glukose-Phosphotransferasesystems

In Abhängigkeit des Phosphorylierungszustands üben die Enzyme des PTS regulatorische Einflüsse auf verschiedene zelluläre Vorgänge aus. +: Aktivierung; -: Hemmung; PP: periplasmatisch vorliegende Glukose; CP: cytoplasmatische Glukose-6-Phosphat. Weitere Einzelheiten im Text. Verändert nach [16].

Dieser Sachverhalt wird auch als Induktorausschluss bezeichnet und verhindert, dass Induktormoleküle, die für die Aktivierung der Transkription der Gene einiger Nicht-PTS-Kohlenhydrataufnahmesysteme zuständig sind, in die Zelle gelangen [4, 7, 27]. Auf diese Weise können andere, ebenfalls verfügbare Kohlenhydrate von der Zelle kaum aufgenommen werden, es bleibt bei der Nutzung der Glukose. Liegt das Enzym $EIIA^{Cr}$ in seiner phosphorylierten Form vor, wenn also keine Glukose im Medium vorhanden ist, hat das Protein einen direkten Einfluss auf die Adenylatcyclase *CyaA* [28]. Diese ist für die Bildung von cAMP zuständig, welches eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionen, dem Metabolismus und anderen zellulären Vorgängen spielt [29, 30]. cAMP gilt allgemein als „Hungersignal“ in Bakterien, welches zusammen mit dem Protein CRP (cAMP receptor protein) die transkriptionelle Aktivierung verschiedener Operons bewirkt, die für die Aufnahme von Nicht-PTS-Kohlenhydraten verantwortlich sind, z.B. Maltose, Laktose und Glycerol [30, 31]. Unter Glukosemangel, wenn $EIIA^{Cr}$ phosphoryliert vorliegt, wird die Bildung von cAMP gesteigert, indem das phosphorylierte $EIIA^{Cr}$ die Aktivität der Adenylatcyclase erhöht. Auf diese Weise wird die Verwertung anderer Kohlenhydrate ermöglicht. Dieser wichtige Vorgang wird auch als Katabolitenrepression bezeichnet und betrifft alle Gene des sogenannten *crp*-Modulons, die von cAMP in Verbindung mit dem CRP-Protein positiv oder negativ reguliert werden [32].

Auch die anderen Komponenten des PTS üben regulatorische Einflüsse auf zelluläre Vorgänge aus. Wenn das Enzym I unphosphoryliert vorliegt, kommt es zu einer Wechselwirkung mit dem Chemotaxisprotein CheA, welches für die Phosphorylierung eines weiteren Chemotaxisfaktors (CheY) zuständig ist, der einen direkten Einfluss auf die Drehrichtung der Flagellen des petritrich begeißelten Bakteriums hat [11, 33]. Auf diese

Weise wird sichergestellt, dass das Bakterium seine eingeschlagene Richtung beibehält und nicht durch einen zufälligen Richtungswechsel in ein glukoseärmeres Medium schwimmt. Auch die unphosphorylierte Form des HPr hat einen regulatorischen Einfluss auf andere Zellsysteme. Die Glykogenphosphorylase GlgP bewirkt einen Abbau von Glykogen zu Glukose-1-Phosphat, welches dann weiter umgebaut wird zu Glukose-6-Phosphat und somit für die Glykolyse zur Verfügung steht [34]. Seok et al. postulierten, dass die Aktivierung des Abbaus des Energie- und Kohlenstoffspeicherstoffs Glykogen bei Anwesenheit eines PTS-Kohlenhydrats den Übergang aus der stationären Phase in die logarithmische Phase bei frischer Nährstoffzufuhr erleichtern könnte [31, 35]. Diese Wechselwirkung stellt eine weitere direkte Verbindung zwischen dem PTS als Kohlenhydrataufnahmesystem und dem Kohlenhydratmetabolismus dar.

Der globale Repressor Mlc, der als Regulator der *ptsG*-Expression fungiert (s. Abschnitt 1.2.2), wird durch das Transportprotein EIICB^{Glc} reguliert. Dies geschieht ebenfalls in Abhängigkeit des Phosphorylierungszustands von EIICB^{Glc}.

1.2.2 Die Regulation des *ptsG*-Gens

Das Gen *ptsG*, welches für das Membranprotein EIICB^{Glc} kodiert, liegt bei etwa 25 Minuten auf dem *E. coli*-Genom [36, 37]. Seine Expression unterliegt einer Vielzahl differenzierter Regulationsmechanismen, die in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt sind.

Globale Regulatoren sind für die Feinregulation der Expression unter Glukoseanwesenheit verantwortlich. Durch sie wird die Genregulation von *ptsG* an verschiedene Zellvorgänge gekoppelt, z.B. an den cAMP-CRP-Komplex, welcher die *ptsG*-Expression unter Kohlenhydratmangel aktiviert [20, 31].

ArcA, welches phosphoryliert vorliegt, unterbindet die Expression von *ptsG* unter anaeroben Bedingungen [38]. Das Protein Fis hilft den Bakterien bei der Anpassung an unterschiedliche Umweltbedingungen durch die Bildung eines Nukleoproteinkomplexes entweder in Kombination mit cAMP-CRP (Glukoseanwesenheit) oder mit dem Repressor Mlc unter Glukosemangel [39]. SoxS ist ein Protein, welches für die Aktivierung der *ptsG*-Expression unter oxidativen Stress-Bedingungen verantwortlich ist [40]. Verschiedene Transkriptionsfaktoren haben ebenfalls einen Einfluss auf die Transkription des *ptsG*-Gens, unter ihnen der primäre Sigma-Faktor σ^{70} , der die meisten Gene in wachsenden Zellen transkribieren hilft, aber auch σ^S [41] in der stationären Wachstumsphase, sowie σ^{32} [42], der bei einem Hitzeschock die Aktivierung des *ptsG*-Gens verursacht. Weitere wichtige Faktoren bei der Regulation des *ptsG*-Gens sind der Repressor Mlc sowie die Faktoren SgrR, *sgrS* und SgrT.

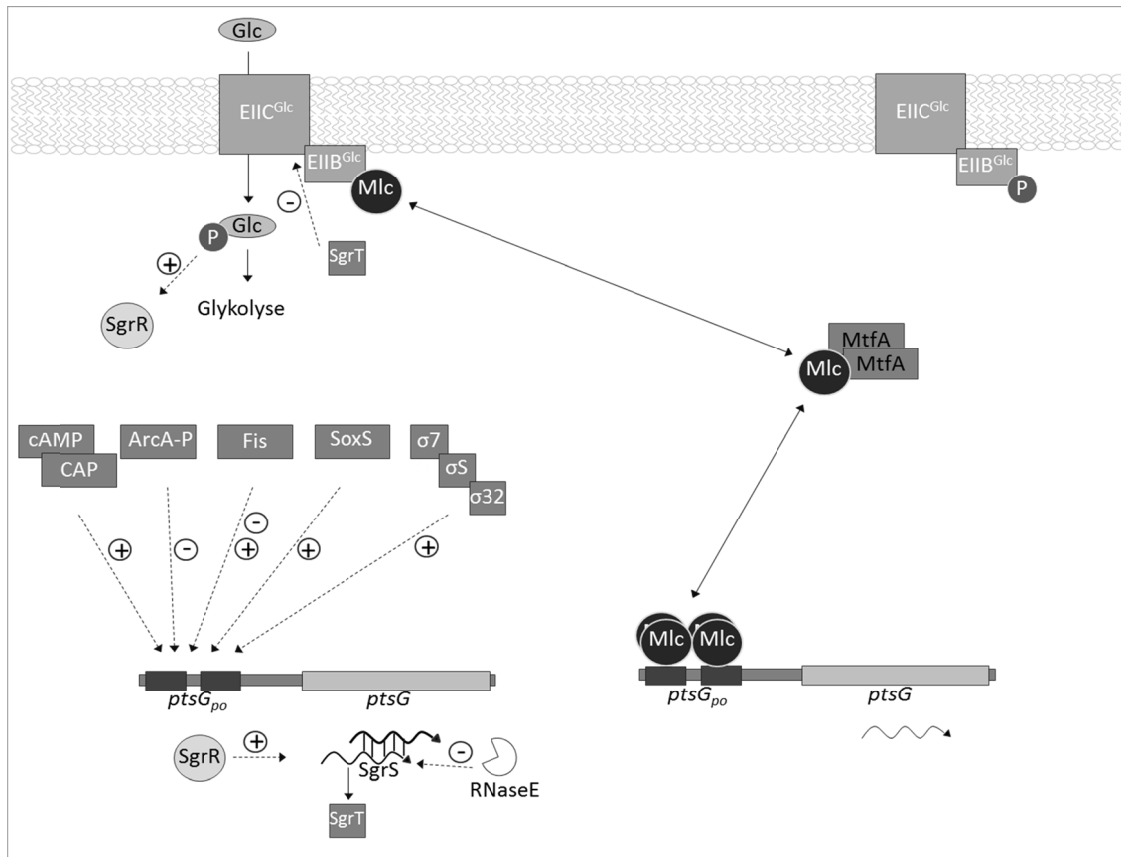


Abbildung 1.3: Regulation der Expression des *ptsG*-Gens unter Glukoseanwesenheit und unter Glukosemangel

Im linken Teil des Bildes ist die Situation der Glukoseaufnahme gezeigt. Hier kommt es zu einer Feinregulation der Expression des *ptsG*-Gens durch globale Regulatoren, sowie durch das Sgr-System (weitere Erläuterungen im Text). Der Repressor Mlc kann durch die B-Domäne des EIICB^{Glc}-Proteins gebunden werden und wird somit an die Cytoplasmamembran titriert. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Situation unter Glukosemangel. Mlc kann nicht von der phosphorylierten B-Domäne gebunden werden und übt somit seine Funktion als Repressor des *ptsG*-Gens aus. +: Aktivierung, -: Hemmung. *po*: Promotor-Operator-Region des *ptsG*-Gens

Mlc ist ein globaler Repressor, der neben dem *ptsG*-Gen auch andere, z.T. metabolische Gene reprimiert, z.B. die Operons *ptsHIcrr*, *manXYZ* (Mannose-PTS) und das Gen *araC* (Arabinose-Regulator) [19]. Wenn Glukose im Medium vorhanden ist, liegt das Gleichgewicht bei der unphosphorylierten Form von EIICB^{Glc}. In diesem Fall kann EIICB^{Glc} den Repressor Mlc binden und ihn somit temporär an der Cytoplasmamembran verankern. Unter diesen Voraussetzungen kann Mlc nicht an den Operator-Promotor-Bereich des *ptsG*-Gens binden und dessen Transkription reprimieren; das *ptsG*-Gen wird abgelesen und mehr EIICB^{Glc} für den weiteren Glukose-Transport zur Verfügung gestellt [19, 43, 44]. Für diesen Vorgang ist es notwendig, dass das EIIB^{Glc} eine räumliche Verbindung zur Cytoplasmamembran aufweist, die natürlicherweise durch die EIIC^{Glc}-Domäne gegeben ist. EIIB^{Glc} alleine kann Mlc zwar binden, aber nicht von der Promotor-Operator-Region des *ptsG*-Gens titrieren [45]. Wird die B-Domäne aber mit Membranproteinen fusioniert, z.B. dem Hüllprotein Gp8 des Phagen M13, kann die B-Domäne Mlc wieder an der Repression des *ptsG*-Gens hindern [45]. Bei phosphoryliertem

EIICB^{Glc}, unter Glukosemangelbedingungen also, kann das Mlc nicht von der Wirkstelle Operator rekrutiert werden, und die Expression von *ptsG* ist unterbunden. Ein Faktor, der bei diesem Mechanismus eine weitere Rolle spielt, ist das Protein MtfA. Dieses cytoplasmatische Protein bindet und inaktiviert Mlc und hat somit ebenfalls einen Anteil an der *ptsG*-Regulation [19, 46].

Die *ptsG*-mRNA unterliegt darüber hinaus einer posttranskriptionellen Regulation durch die Faktoren SgrR, *sgrS* und SgrT. Bei einer Anhäufung von Glukose-6-Phosphat oder Fruktose-6-Phosphat in der Zelle wird ein transkriptionaler Aktivator, SgrR, aktiviert, durch den in der Folge die regulatorische RNA *sgrS* gebildet wird [47-49]. Diese ist komplementär zu dem 5'-Ende der *ptsG*-mRNA und bildet mit dieser Hfq-abhängig ein RNA-RNA-Hybrid, das von der RNaseE abgebaut wird [49]. *sgrS* beinhaltet darüber hinaus ein offenes Leseraster für ein kleines Peptid, welches als SgrT bezeichnet wird [50]. Während *sgrS* den Abbau der *ptsG*-mRNA ermöglicht und so die Fertigstellung neuer Transportmoleküle für Glukose verhindert [51], blockiert SgrT vermutlich schon bestehende EIICB^{Glc}-Moleküle durch eine direkte Wechselwirkung [50]. Somit verhindern beide Faktoren auf unterschiedliche Weise, dass sich weiter Kohlenhydratphosphate in der Zelle akkumulieren.

Diese Beispiele für die ausgeklügelte Regulation des *ptsG*-Gens verdeutlichen, wie ausschlaggebend die Rolle ist, die das durch *ptsG* kodierte Membranprotein EIICB^{Glc} bei der Regulierung der metabolischen Balance in der Zelle innehat.

1.2.3 Das Membranprotein EIICB^{Glc}

Das Membranprotein EIICB^{Glc} ist der Haupttransporter für Glukose, dem bevorzugten Kohlenhydrat von *E. coli*. Das Protein EIICB^{Glc} übt mehrere Funktionen aus, zum einen die sogenannte vektorielle Phosphorylierung, bei der ein Glukosemolekül vom Periplasma in das Cytoplasma überführt wird und dieses eine gleichzeitige Phosphorylierung erfährt, zum anderen eine nicht-vektorielle Phosphorylierung der Glukose im Cytoplasma, bei der ebenfalls Glukose-6-Phosphat gebildet wird [51]. Eine dritte Reaktion ist der Transport des Substrats, der ein von der Phosphorylierung getrennter Prozess ist (s.u.). Darüber hinaus muss das Protein in der Lage sein, mit dem Phosphorylüberträger EIICB^{Glc} zu interagieren sowie den Repressor Mlc und das Regulatorpeptid SgrT zu binden. EIICB^{Glc} führt also eine Vielzahl von Reaktionen aus.

EIICB^{Glc} hat eine Größe von 50,7 kDa und besteht aus 477 Aminosäuren [5]. Es ist aus zwei funktionellen Domänen aufgebaut, der membranständigen C-Domäne, und der löslichen B-Domäne, die den C-Terminus des Proteins bildet. Diese beiden Domänen sind über eine Linkerregion miteinander verbunden.

Die lösliche B-Domäne enthält das Cystein 421, welches die Phosphorylgruppe vom EIICB^{Glc} auf das Substrat überträgt [15, 52]. Die umgebenden Aminosäuren dieses Cysteins

sind hoch konserviert, das Motiv DACITRLR findet sich also auch in anderen EII der Glukosefamilie [5, 52]. Die beiden Argininreste dieses Motivs werden dabei für die Weitergabe des Phosphatrestes benötigt [53]. Die Struktur der B-Domäne konnte durch NMR-Studien aufgeklärt werden [54]. Sie besteht aus 4 antiparallelen β -Strängen und 3 α -Helices. Das Cystein befindet sich in dem Verbindungsstück zwischen den Strängen β_1 und β_2 und liegt somit exponiert vor [5]. Die B-Domäne in ihrer unphosphorylierten Form ist darüber hinaus für die Bindung des Repressors Mlc verantwortlich, solange sie über die C-Domäne oder ein anderes Membranankerprotein peripher an die Cytoplasmamembran gebunden ist [19, 43-45, 55]. Die B-Domänen der EII unterschiedlicher PTS-Familien können sich sowohl in ihrer Aminosäuresequenz als auch in ihrer Struktur unterscheiden [54].

Der Linkerbereich zwischen der C- und der B-Domäne liegt an der Oberfläche des Proteins, da er proteolytisch gespalten werden kann. Bei phosphoryliertem EIICB^{Glc} ist diese Proteolyse nicht mehr möglich, was dafür spricht, dass der Linker in diesem Fall eine Konformationsänderung durchläuft [5]. Die beiden Domänen des Proteins EIICB^{Glc} können in der Linkerregion getrennt und als individuelle Proteine exprimiert werden, die gemeinsam wieder in der Lage sind, Glukose zu transportieren und zu phosphorylieren (allerdings mit 50fach niedrigerer *in vitro*-Aktivität im Gegensatz zum WT) [56]. Die Linkerregion enthält ebenfalls ein hoch konserviertes Motiv aus den Aminosäuren LKTPGRED [53, 57]. Die Funktion des Linkerbereichs ist nicht vollständig geklärt. Die Aminosäure P384 konnte aber als Bindestelle für das Regulatorpeptid SgrT identifiziert werden [16].

In den letzten 3 Jahrzehnten wurden viele Struktur- und Funktionsuntersuchungen durchgeführt, die zu Vorstellungen über den Aufbau der Domäne EIIC^{Glc} beigetragen haben. Die membranständige C-Domäne, die den N-Terminus des Proteins EIICB^{Glc} bildet, ist für die Substraterkennung und -bindung sowie die Translokation zuständig. Dies wurde durch Hybridproteine aus der C-Domäne des EII^{Glc} mit der B-Domäne des verwandten EII^{Nag}-Transportproteins deutlich, die Glukose transportieren [58]. Für die C-Domäne wurde weiterhin eine Reihe von Mutanten charakterisiert, die das Substratspektrum des Glukosetransporters erweitern und als „relaxed“ bezeichnet werden. So können auch Mannose oder Glukosamin [57, 59], Fruktose [60], Ribose und Xylose [61], Mannitol [62] sowie Ribitol und Arabinitol [57] von diesen Mutanten transportiert werden. Dies unterstützt die Beobachtung, dass die C-Domäne für die Substratspezifität verantwortlich ist.

Eine weitere Klasse von Mutationen, die sich auf die Aktivität des Proteins EIICB^{Glc} auswirkt, stellen die sogenannten entkoppelten Mutationen dar [63]. Im Wildtyp-Protein geht der Transport des Substrats immer mit der gleichzeitigen Phosphorylierung einher. Die beiden Prozesse sind streng gekoppelt [64]. Es sind aber vier Aminosäuremutationen bekannt, die in der Lage sind, das Substrat zu transportieren, ohne es zu phosphorylieren,

namentlich R203S, V206A, K257N und I296N [5, 63]. Die Mutanten zeigen eine fast normale Aktivität, wenn die Kopplung zwischen Transport und Phosphorylierung möglich ist [5]. Ist dies nicht der Fall, z.B. in einem Stammhintergrund, der Deletionen der Gene für die allgemeinen PTS-Komponenten EI und HPr trägt, zeigen die Mutanten eine verringerte Affinität für Glukose und transportieren diese vermutlich über erleichterte Diffusion [63]. Diese Mutationen zeigen, dass der Transport und die Phosphorylierung durch EIICB^{Glc} getrennte Prozesse sind, die indes normalerweise, wenn Substrate mit einer hohen Affinität gebunden werden, streng gekoppelt ablaufen [65]. Für eine mögliche Entkopplung spricht auch die Charakterisierung einer Gruppe von Mutanten, die das Substrat nicht mehr transportieren können, jedoch noch in der Lage sind, es zu phosphorylieren [64]. Besonders bemerkenswert sind hier die Aminosäuren K150 und G149. Für sie wurde postuliert, dass sie eine Rolle bei der Konformationsänderung spielen, die vermutlich essentiell bei dem Transport der Glukose von der periplasmatischen Seite auf die cytoplasmatische Seite der Membran ist [64]. Die Mutante K150E verhindert diese Konformationsänderung, das Protein liegt somit in einer „eingefrorenen“ (engl: „locked-in“) Konformation vor.

Ebenso wie in der B-Domäne gibt es auch in der C-Domäne konservierte Aminosäurebereiche, insbesondere das Motiv aus den Aminosäuren GITE [12, 66]. Die entkoppelte Mutation I296N liegt in diesem Motiv, das in allen Vertretern der Glukose-PTS-Familie vorkommt. Es ist vermutlich direkt an der Substratbindung beteiligt [12, 16].

Anders als für die B-Domäne liegen für die membranständige C-Domäne keine NMR-Ergebnisse vor, die Auskunft über die Struktur der Domäne geben. Die Struktur dieses Transporters zu kennen ist jedoch ein grundlegender Schritt für das Verständnis seiner Funktionsweise. Die komplette Topologie eines Proteins zu erforschen gelingt beispielsweise über Kristallisationsverfahren und über NMR-Techniken. Diese Verfahren eignen sich allerdings nur beschränkt für die Strukturaufklärung von Membranproteinen, da diese eine überdurchschnittliche Anzahl an hydrophoben Aminosäuren aufweisen, die eine Kristallisation erschweren. Des Weiteren behindern die bei der Reinigung von Membranproteinen eingesetzten Detergenzien eine Bereitstellung der Membranproteine für NMR-Studien. Die Kristallisation des Proteins EIICB^{Glc} ist zwar mittlerweile gelungen, jedoch ist die Auflösung zu gering, um Schlüsse auf die Struktur des Proteins zu ziehen [67]. Es müssen daher indirekte Methoden für die Strukturanalyse von EIICB^{Glc} herangezogen werden, wie z.B. die Sequenzanalyse, Vergleiche mit anderen PTS-Transportern, Komplementationstudien funktioneller Domänen, die Untersuchung von Reporterproteininfusionen, Strukturuntersuchungen an Proteinen mit geänderten N- und C-Termini [12, 24, 68, 69] sowie die Charakterisierung von funktionell relevanten Mutationen (s.o). Viele Untersuchungen wurden auch an dem PTS-Transporter für Mannitol, EII^{Mt}, welches das bislang am besten untersuchte EII in *E. coli* darstellt, vorgenommen [70, 71] sowie am PTS-Transporter für β -Glukoside, EII^{Bgl} [72, 73]. Ein Vergleich aller bisherigen

Daten zeigte, dass die PTS-Transporter der Glukose-Superfamilie mindestens 6 transmembrane α -Helices aufweisen. Für jede Familie lassen sich 10 Regionen erhöhter Hydrophobie zeigen. Das GITE-Motiv ist in allen zugehörigen Familien konserviert, wobei das Glutamat in jeder Familie voll konserviert auftritt. Die N- und C-Termini liegen jeweils cytoplasmatisch vor [13]. Mit der Kristallisation der membranständigen Domäne des Diacetylchitobiosetransporters des Bakteriums *Bacillus cereus*, EIIC^{Chb}, gelang kürzlich erstmals die Strukturaufklärung eines PTS-Transporters [74]. Die gewonnenen Erkenntnisse bestätigen die allgemeinen Aussagen über die Struktur der PTS-Transportdomänen der Glukose-Superfamilie.

Hydrophobizitätsstudien, die die cytoplasmatische Lage des C-Terminus mit einbeziehen, sagen 10 transmembrane Regionen für EIICB^{Glc} voraus [75]. Biochemische Untersuchungen deuten hingegen auf die Existenz von 8 transmembranen Helices hin [12], wobei sich der N- und der C-Terminus jeweils im Cytoplasma befinden. Dabei wurden LacZ- bzw. PhoA-Fusionsproteinaktivitäten [76] untersucht sowie Regionen, in denen artifizielle Linker oder die Teilung des Proteins toleriert werden [77]. Auch artifiziell veränderte Positionen der C- und N-Termini unterstützen diese Beobachtungen [69]. Auf diese Weise wurden Modelle der möglichen 2D-Struktur der Membrandomäne EIIC^{Glc} erstellt. Während über die ersten 6 Helices generell Einigkeit herrscht, gibt es zwei verschiedene Modelle für die letzten beiden Segmente. Abbildung 1.4 zeigt diese beiden Modelle mitsamt allen charakterisierten funktionellen Mutanten. Das erste Modell (A) wurde von der Arbeitsgruppe um Bernard Erni vorgeschlagen und basiert auf LacZ- und PhoA-Fusionsproteinen [5], Split-Varianten des Proteins, Linker-Insertions-Mutanten [77] und Untersuchungen an zirkulär permutierten EIICB^{Glc}-Proteinen. In diesem Modell werden die beiden letzten Helices von den Aminosäuren 280-297 und 304-323 gebildet. Das zweite Modell (B), welches von unserer Arbeitsgruppe um Lengeler [12] postuliert wurde, basiert auf Hydrophobizitätsstudien [78] und dem Sequenzvergleich verschiedener Enzyme II [12]. In diesem werden die beiden letzten transmembranen Helices von den Aminosäuren 304-323 und 354-372 gebildet. Die Helix VII des Erni-Modells wurde hier als cytoplasmatisch postuliert, da die Region zu viele geladene Aminosäuren enthält, um membranständig zu sein. Daraus ergibt sich im Lengeler-Modell (B) eine sehr viel längere cytoplasmatische Schleife zwischen Helix VI und Helix VII. In dieser Schleife befindet sich das für die Substratbindung verantwortliche GITE-Motiv (s.o.). Diese cytoplasmatische Region mit der Substratbindestelle spielt vermutlich eine Rolle bei der für den Transport notwendigen Konformationsänderung und ist somit hoch beweglich [16]. Im Erni-Modell liegt das GITE-Motiv dagegen in der Membran. Wie schon erwähnt, kann die unphosphorylierte B-Domäne Mlc binden, wenn sie durch einen Membrananker an die Cytoplasmamembran gebunden vorliegt [45, 55]. Lee et al. zeigten, dass EIICB^{Glc} ohne die Aminosäuren 5-320 noch immer in der Lage ist, Mlc zu binden [43].

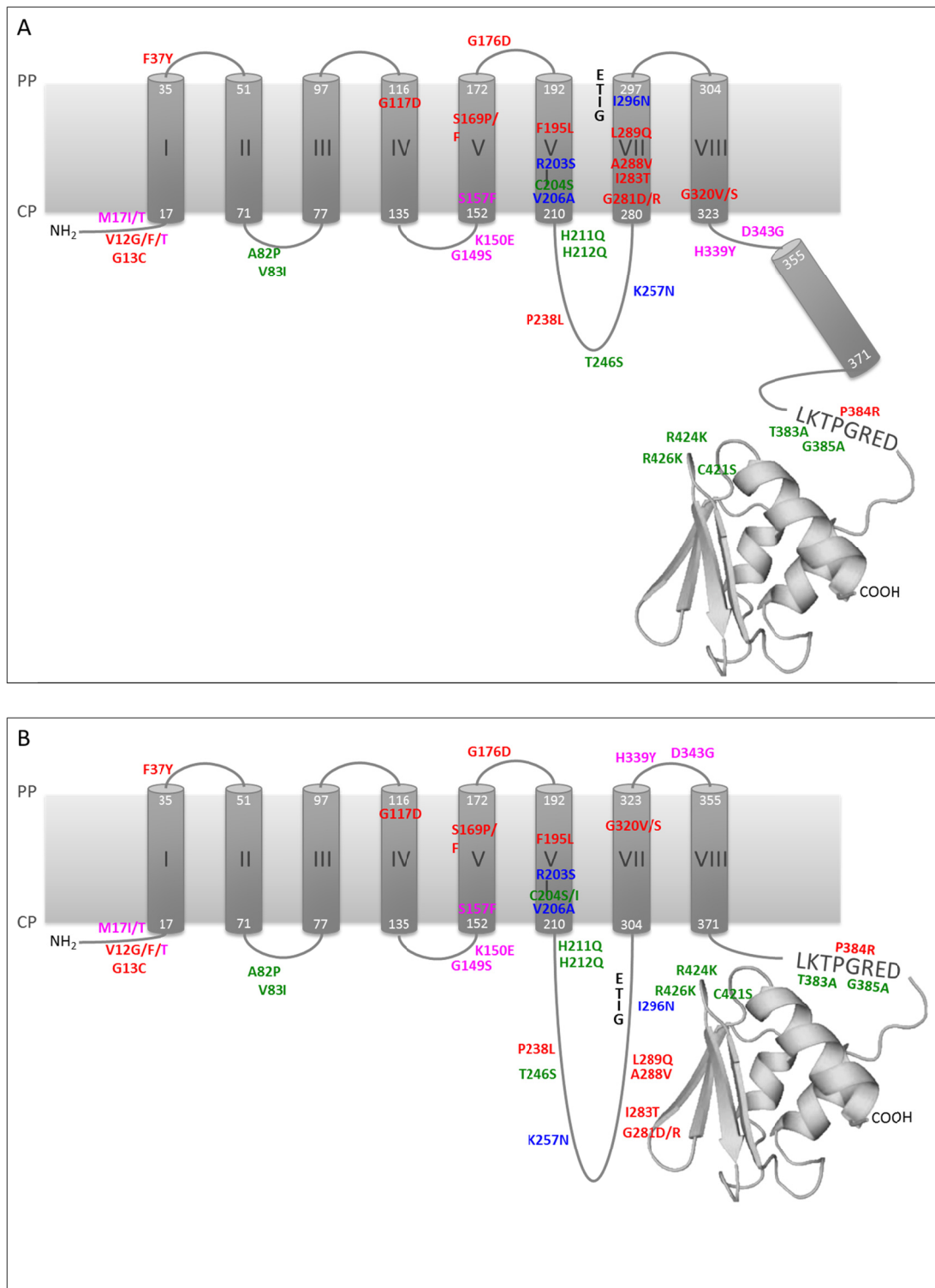


Abbildung 1.4: Modelle der Struktur des Membranproteins EIICB^{Glc}

A: Modell der Arbeitsgruppe um Erni, B: Modell der Arbeitsgruppe um Lengeler. Weiß: Aminosäuresequenz des Proteins; Schwarze Buchstaben: konservierte Aminosäuren, römische Zahlen: Nummerierung der α -helikalen Bereiche, rot: Mutationen, die die Spezifität für Substrate erweitern; rosa: Mutationen, die verminderten Transport bei gleichbleibender Fähigkeit zur Phosphorylierung bewirken; dunkelblau: entkoppelnde Mutationen (Transport ohne Phosphorylierung möglich); grün: Mutationen, die die Transportaktivität einschränken. Struktur der B-Domäne entnommen aus [79].

Dies setzt voraus, dass die verbleibenden Aminosäuren einen Membrananker für die B-Domäne enthalten. Diese Untersuchung spricht daher für das Lengeler-Modell (B), in dem die Aminosäuren 355-371 die transmembrane Helix VIII bilden, die somit auch in der verkürzten Mutante der Studie den Membrananker für die B-Domäne stellen kann, während es im Erni-Modell hier keine transmembrane Region gibt. In vorangegangenen Arbeiten wurde versucht, mit LacZ- und PhoA-, „Sandwich“-Reporterproteinfusionen (in denen nicht nur der C- oder N-Terminus von EIICB^{Glc} an ein Reporterprotein fusioniert vorliegt, sondern dieses in die gesamte Aminosäuresequenz von EIICB^{Glc} eingebettet ist) eines der beiden in Abbildung 1.4 gezeigten Modelle zu bestätigen [80-83]. Die Ergebnisse sprechen aber nicht eindeutig für eine der beiden Varianten. Ein Nachteil derartiger Untersuchungen besteht darin, dass die eingebrachten Markerproteine sehr groß sind. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Faltung des zu untersuchenden Membranproteins durch die Fusion nicht mehr der ursprünglichen Faltung des Proteins entspricht und es daher zu falschen Schlüssen kommen kann, was die Auswertung von derartig gewonnenen Ergebnissen betrifft. Andere Möglichkeiten zur Topologieaufklärung bieten die weit weniger invasiven chemischen Modifizierungen, wie z.B. das Cystein-Scanning, die NEM-Inaktivierung oder das Cystein-Crosslinking [84]. Beim Cystein-Scanning wird an unterschiedlichen Positionen des Membranproteins eine Aminosäure durch einen Cysteinrest ausgetauscht. Es kommt also lediglich zu einer Punktmutation durch eine kleine, relativ hydrophobe Aminosäure. Dieses Cystein kann anschließend modifiziert werden. Dabei werden sowohl membrandurchlässige- als auch membranundurchlässige Reagenzien benutzt. Mit einer Kombination dieser beiden Reagenzienarten ist es möglich, Rückschlüsse hinsichtlich der Lage der markierten Cysteinreste im Hinblick auf die Cytoplasmamembran zu erhalten [85]. Diese Art der Untersuchung konnte schon an anderen Proteinen wie den PTS-Enzymen EII^{Md} und EII^{Bgl}, der Laktose-Permease LacY oder auch der F₀F₁-ATP-Synthase durchgeführt werden [72, 73, 86-88]. Eine Herausforderung dabei ist, dass als Ausgang für die Untersuchungen ein cysteinfreies Protein vorliegen muss. Ist das native Protein nicht cysteinfrei, muss die Funktionalität artifiziell erzeugter cysteinfreier Mutanten unbedingt überprüft werden, da nicht-funktionelle Proteine ggf. starke Strukturabweichungen gegenüber dem WT zeigen. Auch die Einzel-Cystein-Varianten müssen jeweils auf ihre Funktionalität hin überprüft werden

1.2.4 Konformationszustände des Proteins EIICB^{Glc} im WT und in Mutanten

Um seine vielfältigen Funktionen wie die Aufnahme, Phosphorylierung und die Abgabe seines Substrats, aber auch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen wie Mlc, EIIA^{Glc} oder SgrT ausführen zu können, muss das Protein EIICB^{Glc} verschiedene Konformationen einnehmen können. Hinweise auf unterschiedliche Konformationszustände können dabei erneut von Mutationen erhalten werden, die die Funktion des Proteins beeinflussen.

Viele der Mutationen, die eine Erweiterung der Substratspezifität bedingen, befinden sich nahe dem für die Substratbindung wichtigen GITE-Motiv. Sie könnten einen direkten

Einfluss auf die Bindung „neuer“ Substrate haben, die vom WT nicht erkannt und gebunden werden. Einige Mutationen mit Auswirkungen auf die Substratspezifität liegen aber auch in dem N-terminalen Bereich des Proteins. Möglicherweise liegen die Aminosäuren dieses Bereichs im dreidimensionalen Molekül ebenfalls in der Nähe der Substratbindestelle, wenn das Protein einen Kanal für die Substrattranslokation bildet. Es wäre auch möglich, dass beide Protomere des als Dimer vorliegenden Proteins (s. Abschnitt 1.3) dabei eine Rolle spielen und die N-terminalen Aminosäuren des einen Protomers in der Nähe der Substratbindestelle des anderen Protomers liegen. Eine weitere Erklärung für die N-terminale Lage einiger der „relaxed“-Mutanten wäre, dass die Aminosäuren des N-Terminus einen Einfluss auf die Struktur des Gesamtproteins ausüben und auch für verschiedene Konformationen des Proteins zuständig sind. Für die Mutation V12F wurde beispielsweise gezeigt, dass das Protein gegenüber dem WT verändert in die Membran eingebaut wird. Daraus ergibt sich eine veränderte Konformation, durch die vermutlich die Bindung des Repressors Mlc durch die B-Domäne verstärkt wird [89]. Möglicherweise ähnelt das Protein stark dem dephosphorylierten WT-Protein und kann Mlc so konstitutiv binden [89]. Dieses Protein wird daher nahezu konstitutiv exprimiert und Zellen, die diese Mutante exprimieren, weisen höhere Transportaktivitäten für Glukose auf [89]. Da es sich um eine Mutante mit erweiterter Substratspezifität handelt, bewirkt die durch den Basenaustausch hervorgerufene Konformationsänderung offensichtlich auch eine veränderte Zugänglichkeit für Substratmoleküle [89]. Auch die Mutation K150E weist auf eine Konformationsänderung hin, die während der Substrattranslokation stattfindet. Der Austausch K150E verhindert die nötige Konformationsänderung, das Substrat kann nicht mehr transportiert werden [64]. Auch für die entkoppelten Mutationen wurde ein Einfluss auf die Konformation des Proteins postuliert [63]. Alle bekannten Mutationen, die in der Lage sind Glukose zu transportieren, ohne diese zu phosphorylieren, liegen in der Nähe des GITE-Motivs in Helix V oder dem cytoplasmatischen Loop zwischen Helix V und VI. Vermutlich spielt also dieser Bereich eine Rolle bei der Kopplung von Transport und Phosphorylierung. In entkoppelten Mutanten findet diese Kopplung nicht mehr statt, die dafür nötige Konformationsänderung wird hier also möglicherweise unterbunden. Eine Betrachtung der funktionellen Mutanten des Proteins EIICB^{Glc} lässt somit die Unterscheidung zwischen funktionell relevanten Bereichen des Proteins von solchen, die eher für die Gesamtstruktur eine Rolle spielen, zu. Dabei scheinen die Helix I, sowie Helices V-VII des Lengeler-Modells direkt an der Substratbindung, -translokation und -phosphorylierung beteiligt zu sein, während Helices II-V und Helix VIII strukturgebend zu sein scheinen [16].

Vermutlich haben sowohl die Bindung von Glukose als auch die Phosphorylierung von EIIB^{Glc} einen Einfluss auf die Proteinkonformation [63, 90]. Für hoch-affine Substrate gibt es eine Bindestelle, die im nach außen offenen Zustand zugänglich ist. Bei der Bindung eines Substrats erfährt das Protein eine Konformationsänderung, die die Substratbindetasche vom Cytoplasma aus zugänglich macht [90]. Durch die

Phosphorylierung des Substrats wird die Affinität für die Substratbindung herabgesetzt und das Substrat wird in das Cytoplasma entlassen [90, 91]. Möglicherweise spielt der Linkerbereich eine Rolle zur Vermittlung der Konformationsänderung, die zur Phosphorylierung des Substrats führt [5, 57]. Bei entkoppelten Mutationen wird das Substrat nicht mehr hoch-affin gebunden, sondern mit einem erhöhten K_m über erleichterte Diffusion transportiert [63]. In ihnen ist die Phosphorylierung, die im WT nötig ist, um das Substrat in das Cytoplasma zu entlassen, nicht erforderlich, da die Bindung des Substrats niedrig-affin ist [91].

1.3 EIICB^{Glc} liegt als Homodimer vor

PTS-Transporter liegen als Homodimere vor [92], wie durch verschiedene Versuche wie Cystein-Crosslinking-Analysen [70], die Komplementation einzelner Domänen, kinetische Untersuchungen, Größenausschlussuntersuchungen [93] oder Kristallographieverfahren [23, 94] gezeigt werden konnte. Viele dieser Ergebnisse beziehen sich auf das EII^{Mtl}, bei dem die A-, B- und C-Domäne als ein zusammenhängendes Protein exprimiert werden [12, 95-97] oder auf das EIICB^{Glc} des Bakteriums *Salmonella typhimurium* [98]. Dimere wurden von der phosphorylierten und der unphosphorylierten Form des Proteins EII^{Mtl} gefunden [99]. Es hat des Weiteren auch Hinweise auf Trimere und Tetramere gegeben [70]. Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die Dimerisierung über die membranständige C-Domäne vermittelt wird [98, 100]. Die Dimerisierung spielt vermutlich bei der durch die jeweilige B-Domäne vermittelten Phosphorylierung des Substrats eine Rolle, da bei Messungen von Monomeren festgestellt wurde, dass deren Phosphorylierungsaktivität stark reduziert ist [93]. Es wurde postuliert, dass es pro Dimer zwei Substratbindestellen gibt, wobei eine der Bindestellen eine hohe Affinität zum Substrat aufweist, während die andere Bindestelle eine geringere Affinität für das Substrat besitzt [92, 93] (s. auch Abschnitt 1.2.4). Über die B-Domäne ist in diesem Zusammenhang bekannt, dass sie an der Konformationsänderung bei der Substratbindung der Dimere beteiligt ist [70]. Es ist darüber hinaus für EIICB^{Glc} vorstellbar, dass die Substratbindung des einen Protomers die Reaktivität der Aminosäure C421, welche in der B-Domäne liegt und für den Phosphotransfer von EIIC^{Crr} zu der Glukose verantwortlich ist, gegenüber einem zweiten Substratmolekül im anderen Protomer verstärkt [92].

1.4 Regulatorischer Einfluss des Proteins EIIC^{Crr} auf Proteine der „major fascilitator superfamily“ beim Induktorausschluss

Unphosphoryliertes EIIC^{Crr} kann durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen Transportproteine von Oligosacchariden hemmen, was als Induktorausschluss bezeichnet wird (Abschnitt 1.2.1). Für die Laktose-Permease, ein Membranprotein, das aus 12 transmembranen Helices aufgebaut ist, konnte diese Wechselwirkung nachgewiesen [101, 102] und gezeigt werden, dass der zentrale Loop zwischen Helix VI und Helix VII für eine Bindung von EIIC^{Crr} erforderlich ist [103]. LacY gehört zu der Gruppe der „major fascilitator superfamily“ (Klasse 5), einer Gruppe von strukturell verwandten H⁺-

Symportern, zu denen auch die *E. coli*-Proteine RafB und CscB gehören [104]. RafB ist dabei Teil eines plasmidkodierten *raf*-Operons zur Aufnahme und Verstoffwechslung von Raffinose [105]. Auch CscB ist nicht im Genom von *E. coli*-K12 lokalisiert. Das Protein, das für einen Sucrose-H⁺ Symporter kodiert, konnte aber aus dem Wildisolat *E. coli*-EC3132 isoliert werden [106]. Für RafB wurde ebenso wie für LacY postuliert, dass es der allosterischen Regulation von unphosphoryliertem EIIA^{Crr} unterliegt [107]. Nachweise hierzu wurden in einem Stammhintergrund durchgeführt, dessen EI temperatursensitiv ist. In diesen wurden Plasmide transformiert, auf denen die Expression des *raf*-Operons induzierbar oder konstitutiv war. Versuche mit dem induzierbaren *raf*-Operon zeigten, dass Raffinose nicht verstoffwechselt wurde, wenn die Zellen bei 42°C wuchsen. In diesem Fall lag das EIIA^{Crr} durch die temperatursensitive Mutante von EI unphosphoryliert vor und die Raffinose wurde nicht verstoffwechselt, was darauf schließen lässt, dass das unphosphorylierte EIIA^{Crr} an RafB bindet und dessen Transportaktivität hemmt. Bei 37°C, also wenn EI normal exprimiert wurde, konnte die Raffinose verstoffwechselt werden. Dies änderte sich aber durch die Zugabe von α -Methylglukose, durch welches EIIA^{Crr} durch die Abgabe eines Phosphatrestes an das artifizielle Substrat erneut unphosphoryliert vorlag und die Bindung an RafB wieder eingehen konnte. In einem Stamm mit konstitutiv exprimiertem *raf*-Operon konnte keinerlei Hemmung des Raffinose-Stoffwechsels beobachtet werden. In diesem Fall lagen vermutlich zu wenige EIIA^{Crr}-Moleküle vor, um RafB vollständig hemmen zu können [107]. Dieser Sachverhalt wurde auch für die Wechselwirkung zwischen konstitutiv exprimiertem LacY und EIIA^{Crr} gezeigt [108]. Möglicherweise unterliegt auch die Sucrosepermease CscB der Regulation von EIIA^{Crr}. CscB ist Teil des *cs*-Operons, zu dem auch eine Fruktokinase (Gen: *csK*), eine Invertase, die die Sucrose in Glukose und Fruktose spaltet (Gen: *csA*) und ein Repressor (Gen: *csR*) gehören [106]. In dem Wildisolat EC3132 wurden Untersuchungen durchgeführt, die eine Regulation von CscB vermuten ließen [109]. Jedoch wurde in diesem Fall eine konstitutive Mutante von CscB benutzt und die Untersuchungen in diesem Stamm lassen sich schlecht mit dem Laborstamm K-12 vergleichen [109]. Daher wurden ebenfalls Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen CscB und EIIA^{Crr} in einem Derivat des Stammes K-12 durchgeführt, in den das konstitutiv exprimierte *cs*-Regulon über homologe Rekombination eingebracht wurde [110]. In diesem Fall wurde ebenfalls ein Stammhintergrund mit einem hitzesensitiven EI genutzt. Ein direkter Einfluss des EIIA^{Crr} konnte mit dieser Methode nicht festgestellt werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte abermals die konstitutive Expression von CscB sein. Jedoch wurde eine Hemmung der Maltose-Verstoffwechslung in diesem Stamm bemerkt, die auf unphosphoryliertes EIIA^{Crr} zurückzuführen sein könnte. Bei Zugabe von Sucrose wurde diese Hemmung abgeschwächt. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass CscB sehr wohl eine Wechselwirkung mit EIIA^{Crr} eingehen kann, die dafür sorgt, dass unphosphoryliertes EIIA^{Crr} von CscB titriert wird und damit nicht mehr an MalK binden kann [110]. Ob eine

Wechselwirkung von unphosphoryliertem EII^{Crr} und CscB vorliegt, ist daher zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt.

1.5 Hinweise auf einen möglichen cAMP-Transporter in *Escherichia coli*

Im Genom des Bakteriums *Escherichia coli*-K12 gibt es Schätzungen zufolge rund 4300 offene Leseraster. Den rasanten Fortschritten der Wissenschaft in den letzten Jahren zum Trotz war die Funktion von mehr als 30% dieser Leseraster im Jahr 2005 noch unbekannt [111].

EIIA^{Crr} ist nicht nur am Induktorausschluss beteiligt, sondern spielt auch eine maßgebliche Rolle bei der Regulation des zellinternen cAMP-Spiegels. Dies geschieht durch die Wechselwirkung zwischen EIIA^{Crr} und der Adenylatcyclase (Gen *cyaA*). Die Adenylatcyclase ist in der Lage, die Umwandlung von ATP zu cAMP zellintern zu katalysieren.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zellen auch in der Lage sind, cAMP aus dem umgebenden Medium aufzunehmen [112]. Ebenso kann überschüssiges cAMP exkretiert werden [31, 112]. Es scheint also Transportmechanismen für den Signalstoff cAMP in *E. coli* zu geben, über die aber bisher wenig bekannt ist. Goldenbaum et al. fanden Hinweise auf ein cAMP-Transportprotein, welches cAMP vermutlich über aktiven Transport aus der Zelle transportieren und über erleichterte Diffusion aus dem Medium internalisieren kann [112]. Charakterisierungen dieses Systems zeigten, dass das cAMP bei dem Transport in die Zelle nicht verändert wird. Des Weiteren ist bekannt, dass das Protein eine geringe Affinität für cAMP aufweist (K_m ca. 10mM). Möglicherweise handelt es sich bei dem Transporter um ein Protein, welches nicht in erster Linie cAMP, sondern Nukleotide oder Purinbasen transportiert [112]. Das Gen für dieses Protein konnte aber bislang nicht identifiziert werden.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Struktur des Membranproteins EIICB^{Glc} ist funktionell relevant. Um weitere Informationen hinsichtlich der Topologie dieses Proteins zu erhalten, war es das Ziel dieser Arbeit, ein reproduzierbares System zur Strukturaufklärung mit Hilfe des Cystein-Scannings zu schaffen, wie es z.B. für EII^{Mtl} schon durchgeführt wurde [86]. Für das Cystein-Scanning müssen zunächst alle nativen Cystein-Reste von EIICB^{Glc} ausgetauscht werden. Dabei handelt es sich um die Cysteine 204, 326 und das katalytisch aktive Cystein 421, welches für die Phosphorylierung des Substrats Glukose essentiell ist. Um ein aktives Protein bei fehlendem C421 zu erhalten, muss daher ebenfalls eine Mutation in das Protein eingebracht werden, die den Transport der Glukose von der Phosphorylierung entkoppelt und so die Aufnahme von Glukose über das cysteinfreie Protein ermöglicht. Dies ist z.B. über das Einbringen der Mutation I296N möglich. Anschließend können in dieses Protein einzelne Cystein-Reste an strukturell kontrovers diskutierten Positionen eingebracht werden. Über Cystein-spezifische Reagenzien, die sich in ihrer Membranpermeabilität

unterscheiden, sollten Nachweise über die Position der einzelnen Cysteinreste in Hinsicht auf die Cytoplasmamembran erfolgen. Die gewonnenen Ergebnisse können zu einem besseren Verständnis der Topologie von EIICB^{Glc} beitragen.

Für das Cystein-Scanning mit dem Protein EIICB^{Glc} ist die Verwendung entkoppelter Mutanten erforderlich. Die Charakterisierung funktioneller Mutanten konnte darüber hinaus viele Erkenntnisse über die Struktur von EIICB^{Glc} liefern. Um neue Mutanten für das Cystein-Scanning einsetzen zu können und um mehr über potentielle Konformationszustände oder funktionell essentielle Regionen des Proteins zu erfahren, war es ein Ziel der Arbeit, weitere entkoppelte Mutanten zu identifizieren. Die Charakterisierung der gefundenen Mutanten kann ebenfalls weitere Erkenntnisse über die Struktur von EIICB^{Glc} liefern.

Des Weiteren sollte die Oligomerisierung verschiedener Mutanten des Glukosetransporters EIICB^{Glc} und insbesondere der Domäne EIIB^{Glc} mit Hilfe der vernetzenden Substanz Formaldehyd überprüft werden. Dieses verknüpft reversibel Proteine miteinander, die beim Zeitpunkt der Zugabe rund 2Å voneinander entfernt sind [113]. Eine Wechselwirkung bzw. Oligomerisierung kann daher mit Hilfe des Formaldehyds beim Zeitpunkt der Zugabe „eingefroren“ und detektiert werden.

Bislang ist unklar, ob der Sucrose-H⁺-Symporter CscB durch das Protein EIIA^{Ctr} in seiner unphosphorylierten Form reguliert wird. Die Untersuchung beider Proteine mittels der Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation kann darüber Aufschluss geben. Bei dieser Methode werden Fusionsproteine aus N- und C-terminalen GFP-Fragmenten und zu untersuchenden Proteinen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Kommt es zu einer Wechselwirkung der Proteine, kann ein GFP-Signal detektiert werden, da die GFP-Fragmente bei ausreichender räumlicher Nähe ein Vollängenprotein bilden können, welches in der Lage ist bei entsprechender Anregung zu fluoreszieren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Screeningverfahren für die Identifikation des Gens für ein cAMP-Transportprotein zu erarbeiten. Dies sollte mittels Transposonmutagenese und der phänotypischen Charakterisierung mutierter Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie geschehen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Geräte und Puffer

2.1.1 Chemikalien

Für die Herstellung von Puffern, Lösungsmitteln, Nährmedien, Elektrophoresegelele und Färbepuffer wurden Chemikalien verschiedener Hersteller genutzt:

Roche (Mannheim)
 Difco (Michigan, USA)
 Merck (Darmstadt)
 Sigma (Deisendorf)
 Invitrogen (Paisley, UK)
 Applichem (Darmstadt)

2.1.2 Geräte

Tabelle 2.1: Häufig verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Pipetten	Gilson (Limburg), 10µl, 25µl, 200µl, 1000µl, Eppendorf Multipette
SDS-Gel-Kammer	Bio-rad, München
SpeedVac	Univapo UVC 150H (UniEquip, Planegg)
Spektralphotometer	UV mini SVS1-Spectrometer (Shimadzu, Duisburg)
Thermoblock	Thermomixer, (Eppendorf, Hamburg) Eppendorf ThermoStat plus
Thermocycler	T-Gradient, Tpersonal (Biometra)
Tischzentrifugen	Thermo ,Schwerte; Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifuge Optima™ MAX-XP	Beckman, Krefeld
Vortex	Jürgens

2.1.3 Pufferlösungen

Tabelle 2.2: Verwendete Pufferlösungen und Reagenzien

Bezeichnung/Abkürzung	Komponenten	Endkonzentration/Stocklösung
Äquilibrierungspuffer	Tris-Glycin, pH=8,9	10mM
	β-Mercaptoethanol	10mM
	Methyl-α-D-glucopyranosid	1mM
Äquilibrierungspuffer 2	NaCl	300mM
	β-Mercaptoethanol	10mM
	NaP	50mM
	Methyl-α-D-glucopyranosid	1mM
	Triton-X-100	0,1%
		pH=8, eingestellt mit 5M HCl
Biotinmaleimid	Lösungsmittel DMSO	200µM
Blotpuffer	Tris	29mM
	Glycin	0,192M
	Methanol	20%
Bradford-Reagenz	85% Phosphorsäure	10%
	95% Ethanol	5%
	Coomassie Brilliant blue G-250	0,1%
Citrat-Saline	NaCl	145mM
	Natrium-Citrat	50mM

Coomassie	Serva Blue	0,1%
	Essigsäure	10%
	Methanol	25%
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄	50mM
	NaCl	300mM
	Imidazol	20mM
Elutionspuffer 2	Wie Äquilibrierungspuffer 2	pH=5, eingestellt mit 5M HCl
FM4-64	Lösungsmittel DMSO	10mM
GLB, 5-fach	Glyzerin	50%
	TBE 10x	0,5ml
	Bromphenolblau	0,25%
	Xylencyanoblau	0,25%
	H ₂ O	ad 10ml
Lösung A (für kompetente Zellen nach der RbCl-Methode)	RbCl	10mM
	MOPS, pH=7,0	10mM
Lösung B (für kompetente Zellen nach der RbCl-Methode)	RbCl	10mM
	CaCl ₂	50mM
	MOPS, pH=6,5	100mM
Lysispuffer	NaH ₂ PO ₄	50mM
	NaCl	300mM
	Imidazol	10mM
MTSET	Lösungsmittel DMSO	100mM, dunkel lagern
P1-Weichagar	Trypton	8g
	NaCl	5g
	H ₂ O	auf 1l auffüllen
PBS-Puffer	NaCl	8g/l
	KCl	0,2g/l
	Na ₂ HPO ₄	1,7799g/l
	KH ₂ PO ₄	0,24g/l
Ponceau	Ponceau	0,1%
	Trichloressigsäure	5%
PP1	Natriumphosphatpuffer, pH=7,2	50mM
SDS-Probenpuffer, 2-fach	Tris, pH=6,76	0,25M
	SDS	4%
	Glycerin	20%
	2 - Mercaptoethanol	10%
Stilben	Lösungsmittel: DMSO	50mM
TBE, 10-fach	Tris-Base	108g/l
	Borat	55g/l
	EDTA 0,5M, pH=8	40ml/l
TBS	Tris, pH=7,5	10mM
	NaCl	150mM
TE-Puffer	Tris 2M, pH=8	5ml
	EDTA 0,5M, pH=8	2ml
	H ₂ O	auf 1l auffüllen
TNT	Tris-HCl, pH=7,5	20mM
	NaCl	500mM
	Tween 20	0,05%
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄	50mM
	NaCl	300mM
	Imidazol	20mM
Waschpuffer 2	Wie Äquilibrierungspuffer 2	pH=6, eingestellt mit 5M HCl
Minimal Medium Lösung A	NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	53,13g
	K ₂ HPO ₄	115g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	26,4g
	Ad 1000 H ₂ O	
		Autoklavieren

Minimal Medium Lösung B	HCl	0,5ml
	FeSO ₄ x7H ₂ O	14g
	MgSO ₄ x7H ₂ O	3,7g
	ZnCl ₂	7,75g
	CaCl ₂ x2H ₂ O	73,5g
	500ml H ₂ O	Steril filtrieren

2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die Nomenklatur der im Folgenden aufgeführten Bakterienstämme und Plasmide richtet sich nach Berlyn [114].

2.2.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Phänotyp	Referenz
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	LKS
JFG1	LR2-175 Δ <i>ptsG::cat</i> Cam ^R	Diese Arbeit
JFG2	JFG1 Δ <i>manXYZ::tn10</i> , Tet ^R	Diese Arbeit
JM109	<i>thi-1</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>recA1 hsdR1/F' traD36 proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15</i>	[115]
LJ110	W3110 <i>Fm⁺</i>	[57]
LJ120	Δ(<i>ptsG::cat</i>)	[57]
LJ121	Δ(<i>ptsG::cat man-8 zea-225::Tn10^{Tet^R} glk⁺</i>)	[57]
LJ139	LJ141 <i>ptsG168fru-175</i>	LKS Jahreis
LJ141	LJ110Δ(<i>ptsHIerr</i>):: <i>kan mgl-500::Tn10 galP::cat glk⁺</i>	[82]
LR2-175	F ⁻ <i>thi-1 metB1 argG6 hisG1 nagE167 manA162 manI161 ptsG168 fru-175 rpsL104 phoA galI glk⁺</i>	[116]
LZ150F ⁻ Δ(<i>ptsG_{po}/lacZ</i>)	LZ110 Δ(<i>ptsG::cat</i>)	[57]
STB154	Δ <i>ptsG</i> , Δ(<i>ptsHIerr</i>)F ^{'8} ::Δ(<i>ptsG_{po}-lacZ</i>) CRP*	[82]
SU202	<i>lexA71::Tn5 (Def) sulA211 lacU169/F lac^FZ M15::Tn9 (op₄₀₈/op)</i>	[117]
XL1-Blue MR TM	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i>	Stratagene Agilent
LDN2	Δ <i>cya854::tet</i>	[118]
ECB1	F ⁻ <i>csc⁺ Csc⁺ cscB1 Csc³</i>	[106]

2.2.2 Plasmide

Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Resistenz	Referenz oder Herkunftsquelle
pACYC184::Δ(<i>scrY_{po}-gfp</i>)	Enthält Operator-Promotor Bereich des <i>scrY</i> -Gens vor das <i>gfp</i> -Gen kloniert	Cm ^R	[119]
pBAD24	Klonierungsvektor	Ap ^R	[117]
pBGH24	pBAD24 mit <i>ptsG</i> -Gen	Ap ^R	[118]
pDL801	Bakterielles Two-Hybrid System (BTH)	Ap ^R	[117]
pDL801B	pDL801 mit B-Domäne und His-“Tag”, BTH	Ap ^R	Anne Kosfeld, Dissertation
pEGA2	pRR48 <i>ptsG</i> R203H	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA8	pRR48GH I296N C204I C326S C421A	Ap ^R	Diese Arbeit

pEGA9	pEGA8 Q180C	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA12	pEGA8 E471C	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA13	pEGA8 A42C	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA14	pEGA8 E301C	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA15	pEGA8 S54C	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA16	pEGA8 H339C	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA17	pEGA8 L289C	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA18	pEGA8 L250C	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA21	pEGA8 G230C	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA22	pEGA8 S351C	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA23	pEGA17 K150E	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA24	pTM30BHis I36N	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA25	pTM30BHis V63D	Ap ^R	Diese Arbeit
pEGA26	pEGA8 A64C	Ap ^R	Diese Arbeit
pET11a-crr-NGFP	Split-GFP Vektor mit <i>crr</i> -Gen	Ap ^R	Diese Arbeit
pET11a-cscB-NGFP	Split-GFP Vektor mit <i>cscB</i> -Gen	Ap ^R	Diese Arbeit
pET11a-link-NGFP	Split-GFP-Vektor	Ap ^R	[120]
pET11a-Z-NGFP	Split-GFP-Vektor mit Leucin-Zipper-Peptid	Ap ^R	[120]
pGEM [®] -T	Klonierungsvektor für PCR-Produkte	Ap ^R	Promega
pHex. <i>ScrYp,ogfpmut2</i>	Enthält Operator-Promotor Bereich des <i>scrY</i> -Gens vor das <i>gfpmut2</i> -Gen kloniert	Cm ^R	Diese Arbeit
pJEM1	Kodiert für die B-Domäne, induzierbar durch Arabinose		[121]
pKEN2GFP <i>mut2</i>	Enthält eine <i>gfp</i> -Mutation, dessen Produkt für FACS optimiert wurde	Ap ^R	[122]
pMRBAD-crr-CGFP	BiFC-Vektor mit dem <i>crr</i> -Gen	Km ^R	Diese Arbeit
pMRBAD-cscB-CGFP	BiFC-Vektor mit dem <i>cscB</i> -Gen	Km ^R	Diese Arbeit
pMRBAD-lacY-CGFP	BiFC-Vektor mit dem <i>lacY</i> -Gen	Km ^R	Diese Arbeit
pMRBAD-link-CGFP	BiFC-Vektor	Km ^R	[120]
pMRBAD-Z-NGFP	BiFC-Vektor mit Leucin-Zipper - Peptid	Km ^R	[120]
pMRBAD-ptsG-CGFP	BiFC-Vektor mit <i>ptsG</i> -Gen	Km ^R	Anne Kosfeld
pMS604	Bakterielles Two-Hybrid	Tc ^R	[117]
pMS604B	Bakterielles Two-Hybrid mit B-Domäne von EIICB ^{Glc} inkl. C-terminalem His-“Tag”	Tc ^R	Anne Kosfeld
pNK2859	Transposonmutagenese	Ap ^R (Plasmid), Km ^R (Transposon)	[123]
pNK2883	Transposonmutagenese	Ap ^R (Plasmid), Tc ^R (Transposon)	[123]
pRR48	Klonierungsvektor	Ap ^R	[124]
pRR48GH	pRR48 mit <i>ptsGhis</i> aus pBGH24 (HindIII, PstI)	Ap ^R	Diese Arbeit
pRR48ptsG	Enthält das <i>ptsG</i> -Gen (HindIII, PstI)	Ap ^R	Diese Arbeit
pSU18	Klonierungsvektor	Cm ^R	[125]
pTM30	Klonierungsvektor	Ap ^R	[126]
pTM30BHis	pTM30BHis, enthält die B-Domäne mit C-terminalem His-“Tag”	Ap ^R	[127]
pUC18	Klonierungsvektor	Ap ^R	LKS

2.2.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide für PCRs wurden von der Firma Thermo Electron GmbH (Ulm) bezogen.

Tabelle 2.5: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
CrrAatII-	GAAGACGTCCCCTTCTTGATGCGGATAAC	Klonierung
CrrBamHI-	CGGGGATCCTTACTTCTTGATGCGG	Klonierung
CrrNcoI+	GATCCCATGGCTGGTTTGTTCGATAAAC	Klonierung
CrrXhoI+	GATCCTCGAGCGGTTTGTTCGATAAAC	Klonierung
cscB10	CTGGTAAACTGGTTGACCGAATAA	Sequenzierung
cscB7	CATATCAACTTCTGGTTGGTCTCGC	Sequenzierung
cscB8	GATCGTCGACGACAGGCGCTTATC	Sequenzierung
cscB9	AGAAGTTGATATGGGGACTGATAC	Sequenzierung
CscBAatII-	CGCGGACGTCCCTATTGCTGAAGGTAC	Klonierung
CscBBamHI-	CGGCGGATCCCTATATTGCTGAAGGTAC	Klonierung
CscBNcoI+	AATTCCATGGCTGCACTGAATATTCC	Klonierung
CscBXhoI+	GGGCCCCTCGAGCGCACTGAATATTCC	Klonierung
E301C*-	GAACATGAAGGAGAAGCAGATCGGCTCGGTGTTAC	Mutagenese, I296N Template
E301C*+	GTAACACCGAGCCGATCTGCTTCTCCTTCATGTTTC	Mutagenese, I296N Template
GF1	CGCGTCTAGATTTAAGAAGGAG	Klonierung
GF2	CTCTCGATCGCCAAAACAGCC	Klonierung
H339C-*	GAT GAA GTC GAT CAG ACC GCA CGA GAA CGA CGT ACC GTC	Mutagenese
H339C+	GACGGTACGTCGTTCTCGTGCGGTCTGATCGACTTCA TC	Mutagenese
K279C-	GATCATAATACCGCCACGCACGCGCGGTTTTCTGGT TT	Mutagenese
K279C+	AAACCAGAAAACCGCGCGTGCGTGGGCGGTATTATG ATC	Mutagenese
K279C+5'P	AAAACCGCGCGTGCGTGGGCGGTATTATGATC	Mutagenese
K279C- NEB5'P	TTTAGCAGAGTGCCAGATAGCAATTGCGGCAGCTG	Mutagenese
L289C*-	CCGGTCAGGAACGAGGTGCACGCCGCGGAGATCATA ATA	Mutagenese
L289C*+	TAT TAT GAT CTC CGC GGC GTG CAC CTC GTT CCT GAC CGG	Mutagenese
LacYAatII-	TTGCGACGTCCCAGCGACTTCATTCACC	Klonierung
LacYBamHI-	TGCGGATCCTTAAGCGACTTCATTC	
LacYNcoI+	CATTCATGGCTTACTATTTAAAAAACACA	Klonierung
LacYXhoI+	GATCCTCGAGCGGTTTGTTCGATAAAC	Klonierung
pET11a+	GCT AGT TAT TGC TCA G	Klonierung
pMRBAD+	GTT TCT CCA TAC CCG	Sequenzierung
pRR48+	CTGCATGTGTCAGAGGTTTTTC	Sequenzierung
PtsG A421C+5'P	CTAACCTCGACGCATGTATTACCCGCTGCGCGTC	Mutagenese
PtsG A421C- NEB5'P	TAATGTTTTCTTTACCACCAAATGCAGCAACCAG	Mutagenese
PtsG A64C- (5'P)	TTTGCAAAGACGGAACCGCTGCTTCTGCCATAACAT	Mutagenese
PtsG A64C+(5'P)	CATGCCACTGATTTTTTGCATCGGTGTGCGCCCTCGGC	Mutagenese
PtsG G230C- PtsG G230C+	CGCCGTGGAAAACCTGACATGCTGCGTTGGTG CACCAACGCAGCATGTCAGGTTTTCCACGGCG	Mutagenese Mutagenese
PtsG G360C+5	GTTCCCGATCGTCTGTATCGGTTATGCGATTG	Mutagenese
PtsG G360C-	AGCCACAGTTTGCTGCTGTTACCAGACAGAAC	Mutagenese

NEB5'P		
PtsG K150E-	GAAATGATCGGCACAAAGCGTTCACCGGCAAAGAAG	Mutagenese
PtsG K150E+	CTTCTTTGCCGGTGAACGCTTTGTGCCGATCATTC	Mutagenese
PtsG K150E+5'P	GGCTTCTTTGCCGGTGAACGCTTTGTGCCGATC	Mutagenese
PtsG K150E-NEB5'P	AAGATACTCAGGCAGCTTAATACGGTAGAAAC	Mutagenese
PtsG L250C-	GAACAGGAAGCCACCAGAGCATTTACCCGCAGTC	Mutagenese
PtsG L250C+	GACTGCGGGTAAATGCTCTGGTGGCTTCCTGTTC	Mutagenese
PtsG L255C-	GCAGACCGTACATTTTGAAGCAGAAGCCACCAGACA G	Mutagenese
PtsG L255C+	CTGTCTGGTGGCTTCTGCTTCAAAAATGTACGGTCTGC	Mutagenese
PtsG V216C-	GCATCTGGAAAGGGCAGTTCAGATGTGGTG	Mutagenese
PtsG V216C+	CACCACATCTGGAAGTCCCTTTCCAGATGC	Mutagenese
ptsG10	5'-GGT ACC AGC GAA ATG GCA CCG GCT-3'	Sequenzierung
ptsG7	5'-A ACC ATG GCC GTG GTT GCG CC-3'	Sequenzierung
ptsG8	5'-CTG GTA CCG TTT GGT CTG CAC-3'	Sequenzierung
ptsG9	5'-G GCA GGC CTG GCA TTC CCA ATC G-3'	Sequenzierung
ptsG-AatIII-	CGC GAC GTC GGG TTA CGG ATG TAC TC	Klonierung (f. BiFC)
PtsGB I36N+5'P	GGTGGTAAAGAAAACAATACTAACCTCGACGCATG	Mutagenese (B-Domäne)
PtsGB I36N-5'P	AAATGCAGCAACCAGAGCCGGTGCCATTTTCGCTGG	Mutagenese (B-Domäne)
PtsGB V36D+5'P	CTGGGCGCAGCGGGCGACGTGGTTGCTGGTTCTGGT	Mutagenese (B-Domäne)
PtsGB V36D-5'P	TTTCTTCAGGCCGGCCTGATCCACTTTAGACACATC	Mutagenese (B-Domäne)
ptsG-C-AatII-	GCG GAC GTC AGA TCC AGT GCT TTA ATC	Klonierung (f. BiFC)
PtsGE472C-	GCAGTGGTTACGGATGTAGCAATCCATCTCGGTTTTC AG	Mutagenese
PtsGE472C+	CTGAAAACCGAGATGGATTGCTACATCCGTAACCACT GC	Mutagenese
PtsGG330C-	CGCATGCACAGAAGAATACAGATTGGGAATGCCAG	Mutagenese
PtsGG330C+	CTGGCATTCCTCAATCTGTATTCTTCTGTGCATGCG	Mutagenese
PtsGQ180-	CCA CTG AGA GAA GGT ACA GAT TGC AGA ACC AAT CGG	Mutagenese
PtsGQ180C+	CCG ATT GTT TCT GCA ATC TGT ACC TTC TCT CAG TGG	Mutagenese
PtsGS351C (+5'P)	GTTCTGTCTGGTAACTGCAGCAAACCTGTGGCTGTTC	Mutagenese
PtsGS351C- (NEB5'P)	GATGAAGTGCATCAGACCGTGCAGAGAACGACGTACC	Mutagenese
ptsG-SphI+	CCC GCA TGC TTT AAG AAT GCA TTT GC	Klonierung (f. BiFC)
Rev-Primer	GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA	Sequenzierung
S42C-	CCATAACATGCGATACAACGCAGGGCAGCCAGCTG	Mutagenese
S42C+	CCATAACATGCGATACAACGCAGGGCAGCCAGCTG	Mutagenese
S54C-	GTACAAACGTTTCTGCGTTGGCGGACGAAGACGGT	Mutagenese
S54C+	TGGCAGAAGCAGGCGGTTCGCTTTGCAAACATG	Mutagenese
Univ-Primer	TGT GGA ATT GTG AGC GGA TAA CA	Sequenzierung

2.3 Medien und Wachstumsbedingungen

2.3.1 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien wurden angesetzt wie in Tabelle 2.6 beschrieben. Alle hitzelablen Komponenten wurden steril filtriert und nach Abkühlen der Medien auf ca. 50-60°C zugegeben. Die Sterilfiltration erfolgte durch Filter mit einer Porengröße von 0,22µm

(Millipore, Schwalbach). Hitzestabile Komponenten wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

Tabelle 2.6: Anzuchtmedien

Bezeichnung	Komponenten	Bemerkungen
LB ₀ -Medium	10g Trypton (Difco, Michigan, USA) 5g Hefeextrakt (Life Technologies) 5g NaCl 1l H ₂ O	Für Platten zusätzlich 15g Agar
2xTY-Medium	16g Trypton (Difco, Michigan, USA) 10g Hefeextrakt (Life Technologies) 5g NaCl 1l H ₂ O	Für Platten zusätzlich 15g Agar
McConkey-Platten	40g McConkey-Agar-Base (Difco, Michigan, USA) 1l H ₂ O	Zugegeben werden Kohlenhydrate in einer Endkonzentration von 1%
Slant-Medium	20g Trypton (Difco, Michigan, USA) 10g Hefeextrakt (Life Technologies) 0,2 % Glycerin (v/v) 1l H ₂ O	
50/50-Medium (Dauerkulturmedium)	5g Trypton (Difco, Michigan, USA) 2,5g Hefeextrakt (Life Technologies) 43,5 % Glycerin (v/v) 1l H ₂ O	
LB Medium	10g Trypton (Difco, Michigan, USA) 5g Hefeextrakt (Life Technologies) 5g NaCl 1l H ₂ O 0,25mM CaCl ₂ 0,2% (v/v) Glukose	
Minimal-Medium (l)	178ml H ₂ O 2ml Lösung B 20ml Lösung A	Lösung A , Thiamin (Tabelle 2.8) und Kohlenstoffquelle (0,2% Endkonzentration) nach dem Autoklavieren steril hinzugeben.
Minimal-Medium-Platten	890ml H ₂ O 10ml Lösung B 15g Agar 100ml Lösung A	Lösung A , Thiamin (Tabelle 2.8) und Kohlenstoffquelle (0,2% Endkonzentration) nach dem Autoklavieren steril hinzugeben.

2.3.2 Antibiotika-Stocklösungen

Die Stocklösungen wurden nach dem Ansetzen durch einen Filter mit der Porengröße 0,22µm steril filtriert.

Tabelle 2.7: Antibiotika

Bezeichnung	Komponenten	Bemerkungen
Ampicillin [119]	500mg Ampicillin 25ml EtOH 25ml H ₂ O	Lagerung bei -20°C 100µg/ml
Chloramphenicol (Cam)	125mg Chloramphenicol 25ml EtOH 25ml H ₂ O	Lagerung bei -20°C 25µM/ml
Kanamycin [128]	125mg 50ml H ₂ O	Lagerung bei 4°C 25µM/ml
Tetracyclin (Tet)	50mg Tetrazyklin 25ml EtOH 25ml H ₂ O	Lichtempfindlich, Lagerung bei -20°C 10µg/ml

2.3.3 Aminosäuren

Für auxotrophe Stämme wurden dem Minimalmedium je nach Bedarf Aminosäuren und Vitamine zugesetzt. Diese wurden wie in Tabelle 2.8 gezeigt in Wasser angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 2.8: Aminosäuren/Vitamin B1

Aminosäure	Konzentration	Endkonzentration
Methionin	4g/l	40mg/l
Arginin	2g/l	20mg/l
Histidin	2g/l	20mg/l
Casamino acids	10% (w/v)	0,1% (v/v)
Thiamin (Vitamin B1)	500mg/l	5mg/l

2.3.4 Anzuchtverfahren

Die Inkubation der verwendeten Stämme erfolgte bei 37°C im Brutschrank oder im Wasserbad. Es wurde unter aeroben Bedingungen gearbeitet, daher wurden Flüssigkulturen im Roller oder Schüttler angezogen, um eine gute Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte im Spektralphotometer. Dieses misst die Abschwächung von Licht durch die Streuung der Zellen (optische Dichte=OD). Ist die OD einer Kultur bei der Wellenlänge 650nm (OD_{650})=1, entspricht dieses einer Zellzahl von 1×10^9 Bakterien und einer Gesamtproteinmenge von 0,25mg pro 1ml Zellsuspension (in Vollmedium). In Minimalmedium wurde die OD_{420} bestimmt, eine OD_{420} =1 entspricht hier 5×10^8 Zellen.

Als Leerwert diente das jeweils eingesetzte Medium ohne Zellen.

2.3.5 Dauerkulturen

Um in der Arbeit hergestellte Stämme oder Plasmide dauerhaft zu konservieren, wurden diese in Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden die Stämme in 10ml Slant-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum über Nacht angezogen, geerntet (abzentrifugiert) und in 4ml 50/50-Medium resuspendiert. Diese Kulturen können bei -20°C dauerhaft gelagert werden.

2.3.6 MacConkey-Indikatorplatten

MacConkey-Indikatorplatten [129] sind Selektivmedien für gramnegative Bakterien, denen der pH-Indikator Neutralrot beigelegt ist. Zusätzlich wurden verschiedene Kohlenhydratquellen (z.B. Glukose, Laktose, Sucrose) steril zugegeben. Können die Bakterien die jeweilige C-Quelle verstoffwechseln, bilden die Organismen Säure, welche den pH-Indikator rot färbt. So können Zellen, die die Kohlenstoffe verwerten (rote Kolonien), von solchen, die dazu nicht in der Lage sind (weiße Kolonien), unterschieden werden. Dabei gibt es folgende Abstufungen:

Tabelle 2.9: Verschiedene Abstufungen der Koloniefarbe beim Markertest auf McConkey-Platten

Bezeichnung	Erscheinung
W	Weißer Kolonien
1+	Rosa Kolonien
2+	Tiefrote Kolonien
3+	Tiefrote Kolonien, umgebendes Medium ebenfalls rot gefärbt

2.4 Genetische und molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zum Isolieren von Plasmid-DNA wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) laut Herstellerangaben benutzt. Die Elution erfolgte mit Wasser. Zellen für die Plasmidisolierung wurden in 2xTY-Medium angezogen.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit[®] Fluorimeter von Invitrogen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen und doppelsträngiger DNA erfolgte gemäß Herstellerangaben mit dem Quant-iT Protein Assay Kit, bzw. dem Quant-iT dsDNA BR Assay Kit.

2.4.3 Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer wurden von New England Biolabs (Frankfurt/Main) und von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Für die Gelelektrophorese verwendete Standards waren der 1kb und der 100bp Standard der Firma New England Biolabs sowie der Standard GeneRuler™ DNA Ladder Mix von Fermentas. Die Nomenklatur für Restriktionsenzyme in dieser Arbeit richtet sich nach Roberts et al. [130].

Tabelle 2.10: Häufig verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz 5' → 3'-Richtung
BamHI	G GATCC
HindIII	A AGCTT
KpnI	GGTAC C
NdeI	CA TATG
SphI	GCATG C
PvuI	CGAT CG

Um DNA einer Restriktion zu unterziehen, wurden pro μg DNA 1-3 Einheiten Enzym eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30min bei 37°C . Zum Beenden der Reaktion wurde GLB-Puffer zugegeben und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Bei den Restriktionsenzymen der Firma Fermentas wurden die Reaktionen im GreenBuffer durchgeführt. Um Enzyme nach erfolgter Restriktion zu deaktivieren, wurden sie entweder gemäß Herstellerangaben hitzeinaktiviert oder durch Gelelektrophorese von der DNA getrennt.

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese mit Agarosegelen werden DNA-Fragmente ihrer Größe und Konformation nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Während dieser Arbeit wurden, abhängig von der Größe der DNA-Fragmente, 0,7% und 1,5% Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von ca. 150V und ungefähr 50mA in TBE-Puffer. Zu den DNA-Proben wurde GLB gegeben, um die Proben mit Glycerin zu beschweren und einen Anhaltspunkt für den Fortschritt der Elektrophorese zu bekommen.

Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid (20 μl einer 1% Lösung in 200ml TBE Puffer) gefärbt, welches zwischen den Basen der DNA interkaliert. Die DNA kann somit unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Geldokumentationsanlage von LTF Labortechnik, Wasserburg/B).

2.4.5 Präparative DNA-Behandlung

Um Enzyme, die nicht hitzeinaktiviert werden können, zu entfernen, sowie um DNA-Fragmente gewünschter Größe zu isolieren, wurde die verdaute DNA in einem präparativen Agarosegel getrennt. Die Agarose hierfür stammte von Invitrogen (Darmstadt). Bis zu 50 μl Restriktionsansatz wurde auf ein Gel aufgetragen, aufgetrennt und wie üblich mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Banden wurden unter energiearmem UV-Licht sichtbar gemacht, um Thymindimere zu vermeiden, und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Reinigung von DNA, die in Agarosegelen getrennt worden war, erfolgte mit dem Kit QIAgen MinElute laut Herstellerangaben. Abweichend wurde die DNA mit 20 μl H_2O eluiert.

2.4.6 Antarktische Phosphatase-Behandlung

Um eine Religation von mit Restriktionsenzymen behandelten Vektoren mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurde das Enzym Antarctic Phosphatase von New England Biolabs benutzt. Es katalysiert die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe an geschnittenen Vektoren. Diese ist für die Ligase notwendig. Die Abspaltung verhindert somit eine Religation des Vektors.

Pro 20µl Vektor wurden dabei 1µl Phosphatase und 2µl Puffer eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 15min, dann wurde eine Hitzeinaktivierung bei 65°C für 5min durchgeführt.

2.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen wurde die T4-Ligase von Fermentas benutzt. Die Reaktion wurde mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer durchgeführt und erfolgte über Nacht bei 4°C. Dabei wurde folgender Ansatz benutzt:

Vektor	2µl
Ligationspuffer	2µl
T4-DNA-Ligase	0,5µl
DNA-Fragment	15,5µl

2.4.8 Isolierung von chromosomaler DNA

Zum Isolieren von chromosomaler DNA, wurde der entsprechende Stamm zunächst auf eine Platte gepatcht und über Nacht bei 37°C inkubiert, um möglichst viel Zellmaterial zu erhalten. Von diesem Patch wurde mit einem sterilen Holzstäbchen Zellmaterial abgenommen und in 50µl 0,05M NaOH resuspendiert. Die Probe wurde für 1min in der Mikrowelle erhitzt und daraufhin 5min bei RT abgekühlt. Danach wurde die Probe kurz gevortext und anschließend für 3min bei 12000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt unverdünnt als Template für PCRs eingesetzt (Abschnitt 2.4.9).

2.4.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei PCRs kamen Polymerasen der Firma TaKaRa (Taq-Polymerase) und Boline (IMMOLASE) zum Einsatz. Folgender Reaktionsansatz wurde benutzt:

5µl Puffer
5µl dNTPs
5µl Primer +
5µl Primer -
0,5µl Immolase bzw. Takara Polymerase
2µl MgCl ₂ (nur für Immolase)
5µl DNA (1 :100)
22,5µl H ₂ O

Folgender Reaktionsablauf wurde benutzt:

Hitzeinaktivierung	7min	95°C	} x34
Denaturierung	1min	94°C	
Annealing	30s	40-60 °C	
Elongation	30s	72°C	
Elongation	5min	72°C	

2.4.10 Reinigen von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem Wizard PCR Kit von Promega (Mannheim) gemäß Herstellerangaben.

2.4.11 pGEM[®]-T Vektor-System

PCR-Produkte wurden gegebenenfalls zum weiteren Klonieren und zum Sequenzieren in den Vektor pGEM[®]-T der Firma Promega kloniert. Dabei können die PCR-Produkte direkt in den Vektor kloniert werden, da die bei der PCR eingesetzten Polymerasen an die Enden der PCR-Produkte durch unspezifische Verlängerung ein Adenin einfügen. Der pGEM[®]-T Vektor wird linear eingesetzt und enthält ein überhängendes Thymin an jedem 3'-Ende. Das System wurde gemäß den Herstellerangaben benutzt. Abweichend wurden nach der Ligation 10 µl in kompetente Zellen des Stammes JM109 transformiert. Die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte erfolgte mit dem Universal Primer und dem Reverse Primer.

2.4.12 Ortsgerichtete Mutagenese (Agilent Technologies)

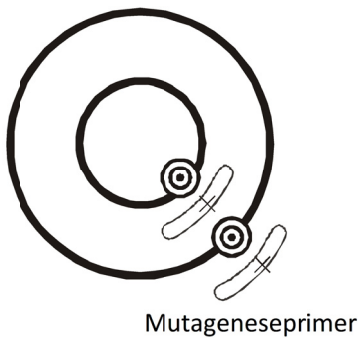


Abbildung 2.1: Ortsgerichtete Mutagenese mit dem QuickChange[™] Site-Directed Mutagenesis Kit.

Abbildung verändert nach Stratagene. X: Stelle der Punktmutation.

Mit dem QuickChange[™] Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene Europe (Waldbronn) konnten gezielt Mutationen in einen DNA-Vektor eingebracht werden. Dazu wurde folgender PCR Ansatz genutzt:

5 µl Reaktionspuffer	[10x]
1,25 µl Primer+	[10 pmol/µl]
1,25 µl Primer-	[10 pmol/µl]
1 µl dNTPs	[10 mM]
5 µl DNA	[1:100]
1 µl Pfu Polymerase	
36,5 µl H ₂ O	

Folgender Reaktionsablauf wurde benutzt:

Hitzeinaktivierung	30s	95°C	}
Denaturierung	30s	95°C	
Annealing	1min	50-55°C	
Elongation	10min	68°C	

Kompetente Zellen für die Mutagenese (XL1-Blue) wurden nach der RbCl-Methode hergestellt.

Der gesamte Mutagenese-Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C mit DpnI verdaut. Anschließend wurden 20µl des Ansatzes in kompetente XL1-Blue-Zellen transformiert und auf Vollmedium mit Antibiotikum ausgestrichen.

2.4.13 Ortsgerichtete Mutagenese (New England Biolabs)

Bei Mutagenesen mit dem Phusion® Site-Directed Mutagenesis Kit von New England Biolabs wird auf 5'-phosphorylierte Primer zurück gegriffen. Diese sind, anders als bei dem System von Stratagene, nicht komplementär, sondern aneinanderlagernd (Abbildung 2.2). Nach der Amplifikation des Plasmids über PCR wurde die lineare DNA ligiert und in den Stamm JM109 transformiert.

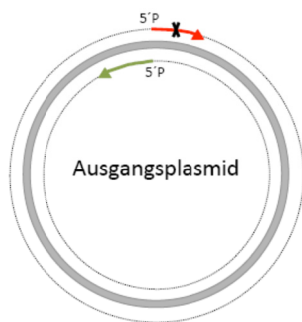


Abbildung 2.2: Prinzip der ortsgereichten Mutagenese mit dem Phusion®-Kit

(verändert nach NEB). X: Stelle der Punktmutation.

Die PCR mit den Primern, von denen der Forward(+)-Primer die Mutation trägt, wurde nach folgendem Schema durchgeführt.

10µl Puffer
 1µl dNTPs
 5µl Primer + [10pmol]
 5µl Primer- [10pmol]
 5µl DNA
 0,5µl Polymerase
 23,5µl DNA

98°C	30s	} x32
98°C	10s	
65°C	30s	
72°C	200s	
72°C	5min	
15°C	Pause	

Die Elongationszeit von 200s erfolgte für Plasmide von einer Größe von ca. 5kb.

Die Ligation erfolgte mit 5µl PCR-Produkt, 5µl Quick Ligation buffer und 0,5µl T4 DNA Ligase (Bestandteil des Kits) bei 25°C für 5min. Anschließend wurde der Ansatz komplett in kompetente Zellen des Stammes JM109 transformiert.

2.4.14 Herstellung kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode

Eine Bakterienkultur wurde bis zu einer $OD_{650}=0,7-1,0$ angezogen und dann geerntet (5min, 5000rpm). Das Pellet wurde in ½ des Volumens in Lösung A (auf Eis)

resuspendiert und anschließend wieder 5min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in $\frac{1}{2}$ des Ausgangsvolumens in Lösung B (auf Eis) resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz wieder 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde in $\frac{1}{10}$ Volumen in Lösung B resuspendiert. Es wurde zusätzlich Glycerin in einer Endkonzentration von 40% zugegeben. Die Zellen wurden dann aliquotiert und konnten bei -80°C gelagert werden.

2.4.15 Transformation

Für jede Transformation wurden 200 μl kompetente Zellen eingesetzt. Diese wurden auf 2 μl Plasmid-DNA in ein auf Eis vorgekühltes Zentrifugenröhrchen gegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach den 60min wurden die Zellen für 90s 42°C ausgesetzt (Hitzeschock). Nach weiteren 5min auf Eis wurden 5ml LB_0 -Medium ohne Antibiotikum zu der Probe gegeben und diese für eine Stunde bei 37°C inkubiert („phänotypische Expression“). Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (5min, 5000rpm) und auf eine Vollmediumplatte mit entsprechendem Antibiotikum gegeben.

2.4.16 P1-Transduktion

Die P1-Transduktion wird allgemein genutzt, um Allele mit Hilfe eines Phagens von einem Bakterienstamm in einen anderen Bakterienstamm zu überführen. Der Phage P1 ist ein allgemein transduzierender Phage und kann DNA-Fragmente mit einer Größe von bis zu 100kb aufnehmen. Diese Fragmente können später im Wirtsstamm über homologe Rekombination in das Genom eingebaut werden.

Zunächst wurde ein P1-Lysat hergestellt:

Zu 0,25ml einer ÜNK wurden 0,1ml Phagenlysat (5×10^7 Partikel) des Phagens P1 gegeben und diese Mischung mit 2,5ml Weichagar versetzt, gemischt und sofort auf eine 37°C warme Platte mit LB-Medium gegeben. Nach ca. 4-6h Inkubation bei 37°C setzte die konfluente Lyse ein. Die Lyse wurde mit 3ml LB-Medium abgestoppt. Anschließend wurde das flüssige Medium abpipettiert und mit Chloroform gut durchmischt. Der Überstand wurde abzentrifugiert (5min, 5000rpm), abgenommen und in ein zu verschließendes Röhrchen gegeben.

Als nächstes wurde eine Bestimmung der „plaque forming units“ mittels einer Verdünnungsreihe vorgenommen (Verdünnungen 10^{-6} und 10^{-7}). Dazu wurde das Lysat in LB-Medium verdünnt und je 0,1ml in LB-Weichagar zu dem *E. coli*-Stamm gegeben, in den später transduziert werden sollte. Diese Mischung wurde auf vorgewärmte LB-Platten ausgegossen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Plaques ausgezählt und die Anzahl der Phagen pro ml bestimmt werden.

Nun folgte die eigentliche Transduktion. Dazu wurde eine ÜNK benutzt, die in LB-Medium angewachsen war (ca. 8×10^8 Bakterien/ml, entspricht ungefähr einer 1:5 Verdünnung der ÜNK). Von dieser wurden 0,8ml zu 0,2ml P1-Lysat (eingestellt auf 1×10^9 Phagen/ml) gegeben und genau 20min im Wasserbad inkubiert bei 37°C . Mit Zugabe von

5ml Citrat-Saline wurde die Reaktion abgestoppt. Es wurde 10min zentrifugiert, erneut 5ml Citrat-Saline zugegeben und abermals 10min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 0,2ml Citrat-Saline resuspendiert und auf LB₀-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert, allerdings mit einem Viertel der üblichen Menge an Antibiotikum, um die Wahrscheinlichkeit für die Isolierung von Transformanten zu erhöhen.

2.5 Biochemisch-analytische Methoden

2.5.1 β-Galaktosidase-Aktivitätstest

Um die spezifische Aktivität der β-Galaktosidase zu bestimmen, wurde eine Messung der Spaltungsrate des künstlichen Substrats β-ONPG vorgenommen. Dazu wurden die Zellen einer ÜNK zu einer OD₆₅₀=0,05 in LB₀-Medium angeimpft und bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach ca. 40min wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von IPTG induziert und bis zu einer OD₆₅₀=1 wachsen gelassen. War diese OD erreicht, erfolgte die Ernte der Zellen mittels Zentrifugation (5min, 5000 rpm). Dabei wurde 1ml für den eigentlichen Test und 1ml für spätere Analysen (z.B. Western Blot) abzentrifugiert.

Das Pellet für den Test wurde in 1ml PP1 resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2ml PP1 resuspendiert. Davon wurde 1ml zur OD₆₅₀-Bestimmung genutzt. Die OD₆₅₀ sollte bei ca. 0,5 liegen. Dem restlichen 1ml wurden 2 Tropfen Toluol zugefügt und sorgfältig gevortext. Die Zellen wurden 10min auf Eis inkubiert und dann erneut kurz durchmischt. Anschließend wurden sie für 5min bei 37°C inkubiert.

Der Test startete mit Zugabe von 0,1ml 10mM β-ONPG. Bei Gelbfärbung wurde die Reaktion mit 1,5ml 0,25M Na₂CO₃ abgestoppt und die Zeit notiert. Nach spätestens 20min wurde allen Proben Na₂CO₃ zugegeben und 1,5ml jeder Probe für 3min abzentrifugiert. Vom Überstand wurde die OD₄₂₀ bestimmt (Leerwert: 1ml PP1, Toluol, 0,1ml 10mM β-ONPG, 1,5ml 0,25M Na₂CO₃). Die Enzymaktivität wurde folgendermaßen berechnet:

Spezifische Aktivität =

$$\frac{\text{Gesamtvolumen} \cdot \text{OD}_{420}}{\text{Extinktionskoeffizient} \cdot \text{OD}_{650} \cdot \text{Proteingehalt} \cdot \text{Schichtdicke} \cdot \text{Probenvolumen}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg Protein}} \right]$$

Extinktionskoeffizient [cm*cm/μMol]=4,5

Gesamtvolumen [ml]=2,6

Probenvolumen [ml]=1

Schichtdicke der Küvette [cm]=1

OD₆₅₀=1

Zeit T [min]=1

Proteingehalt [mg Protein/ml]=0,25

2.5.2 Reinigung von EIICB^{Glc}(His)₆ mit Ni-NTA Spin-Säulen von Qiagen

Die Reinigung mit Spin-Säulen kann nicht erfolgreich auf EIICB^{Glc} angewendet werden. Für die Reinigung mit Ni-NTA-Agarose s. Abschnitt 2.5.5. Die Reinigung erfolgte wie im Handbuch angegeben mit den unter Abschnitt 2.1.3 angegebenen Äquilibrierungs-, Wasch- und Elutionspuffern.

2.5.3 Reinigung von EIICB^{Glc}(His)₆ mit Ni-NTA Agarose von Qiagen

Für die Anzucht, Überproduktion, Solubilisierung und Reinigung von EIICB^{Glc}(His)₆ wurden folgende Parameter gewählt:

Von einer Übernachtskultur wurde ein wie im Ergebnisteil jeweils angegebenes Volumen Vollmedium auf eine OD₆₅₀=0,1 angeimpft und die Zellen wachsen gelassen bis zu einer OD₆₅₀=1,0. Dann wurden die Zellen mit IPTG (1mM für pRR48-Derivate, 25µM für pTM30-Derivate) induziert und wuchsen weitere 4-5 Stunden. Eine Probe der Zellen wurde genommen (Probe 0). Nach der Ernte der Zellen und dem Waschen in Lysispuffer wurde das Pellet in Lysispuffer resuspendiert (Ankonzentration 5-50fach, Probe 1). Bevor der Zellaufschluss mittels Ultraschall erfolgte, wurden die Zellen mit 0,5mM AEBSF versetzt. Der Ultraschall erfolgte je nach Volumen zwischen 5-30min, jeweils mit 10s Schall und 10s Pause bei einer Amplitude von 10% mit dem Gerät Branson Digital Sonifier Model 250-D. Anschließend wurden Zelltrümmer abzentrifugiert (4°C, 14000rpm, 10min; Pellet: Probe 2, ÜS: Probe 3). Zu dem Überstand wurde tröpfchenweise Triton-X-100 (Endkonzentration 2%) bei RT gegeben, um die Membranproteine zu solubilisieren. Der Ansatz wurde anschließend einer Ultrazentrifugation unterzogen für eine Stunde bei 4°C bei 72000rpm (280500xg). Im Pellet (Probe 4) befanden sich nun die Membranvesikel, im Überstand bei erfolgreicher Solubilisierung die Proteine (Probe 5). Die Reinigung von EIICB^{Glc}(His)₆ erfolgte durch die Affinität des His-, „Tags“ für die Ni-NTA Agarose von Qiagen. Dazu wurde die Ni-NTA Agarose invertiert, bis die Phasen verschwunden waren. Pro ml Probe wurden rund 250µl Agarose abgenommen und in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen gegeben. Die in Ethanol gelagerte Agarose wurde nun zunächst zweimal mit zweifach destilliertem Wasser gewaschen, um das Ethanol zu entfernen. Dabei wurde entweder niedrigtourig zentrifugiert (1min bei 800xg) oder das Röhrchen ruhig stehen gelassen, bis die Agarose und das Wasser zwei Phasen bildeten. Das Wasser wurde abgenommen und verworfen. Auf diese Weise wurden auch die folgenden Schritte durchgeführt. Nach dem Waschen wurde die Ni-NTA-Agarose mit Lysispuffer versetzt, anschließend mit den zu reinigenden Proben. Die Inkubation mit den EIICB^{Glc}(His)₆ Proben wurde bei RT für 1h auf einer Wippe durchgeführt, um eine möglichst hohe Flexibilität und Mobilität von Proteinen und Ni-NTA Matrix zu erreichen. Anschließend sollten die EIICB^{Glc}(His)₆-Proteine an die Matrix gebunden haben, der Überstand also frei von ihnen sein (Probe 6). Nun wurde die Matrix zweimal mit dem Waschpuffer versetzt, um unspezifische Bindungen an die Agarose zu entfernen (Probe 7 und 8). Als letztes wurde Elutionspuffer (1/8 des bisher eingesetzten Volumens) zu der Agarose gegeben. Die

Elutionsfraktionen (Probe 9-12) wurden ggf. erneut mit AEBSF versetzt und im Kühlschrank gelagert oder direkt für eine SDS-PAGE verwendet. Die genommenen Proben dienten als Kontrolle, um die Effektivität der Reinigung in Hinblick auf die einzelnen Schritte zu beurteilen.

2.5.4 Cystein-Scanning-Methode nach Turgut

Das Cystein-Scanning von Einzel-Cystein-Mutanten des Proteins EIICB^{Glc} wurde zunächst nach folgendem Ansatz durchgeführt. Zu beachten ist, dass dieses Protokoll nicht das für EIICB^{Glc}-optimierte und letztendlich verwendete darstellt. Das optimierte Protokoll ist im nächsten Absatz zu finden.

Das jeweilige Plasmid wurde in den Stamm LR2-175 transformiert. Von einer Übernachtskultur wurden 30ml LB₀-Amp-Medium angeimpft, bei einer OD₆₅₀=1 mit 1mM IPTG induziert und weitere 5 Stunden wachsen gelassen. Die Zellen wurden geerntet und in KPi gewaschen.

Zunächst wurde das Pellet aus 15ml Kultur in 3ml KPi-Puffer resuspendiert. Diese 3ml wurden in zwei gleich große Portionen aufgeteilt (Proben 1 und 2). Eine Hälfte (Probe 1) wurde mit Stilben (Endkonzentration 1mM, Stocklösung 50mM) versetzt und bei RT 15min inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend zweimal mit KPi gewaschen. Beide 1,5ml Portionen (Proben 1 und 2) wurden anschließend mit Biotinmaleimid versetzt (200µM Endkonzentration, Stocklösung 30mM) und bei RT inkubiert. Nach 30min wurden die Reaktionen mit 50mM β-MeOH abgestoppt.

Das Pellet aus den weiteren 15ml Kultur wurde ebenfalls in 3ml resuspendiert und aufgeteilt (Proben 3 und 4). Alle 4 Proben (Proben 1-4) wurden mit 0,5mM AEBSF versetzt und in COREX-Röhrchen überführt. Sie wurden einer Ultraschall-Behandlung unterzogen wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden Proben 1 und 2 auf Eis verwahrt. Probe 3 wurde mit 1mM Stilben versetzt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden Proben 3 und 4 mit Ethanol-Trockeneis oder flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für 1 Minute im Ultraschallbad (RT) aufgetaut. Diese Behandlung sollte die Membranen permeabler für das Biotinmaleimid machen. Mit den Proben 3 und 4, die als Membranvesikel behandelt wurden, sollte die allgemeine Zugänglichkeit für das Biotinmaleimid getestet werden. Anschließend wurden Proben 3 und 4 bei RT mit 200µM Biotinmaleimid versetzt (30 Minuten). Die Reaktion wurde anschließend mit 50mM β-MeOH abgestoppt. Die Proben 1-4 wurden parallel weiter behandelt. Es folgte die Reinigung der Proteine wie im Abschnitt 2.5.3 beschrieben. Die gereinigten Proteine wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Dabei wurden alle Proben zweimal aufgetragen und einem anschließenden Westernblot unterzogen. Die eine Hälfte der Proben 1-4 wurde mit Anti-His-AK behandelt (s. Abschnitt 2.5.9). Hiermit wurde die Reinigung der Proteine überprüft. Zu den anderen Proben wurde fluoreszenzmarkiertes Streptavidin (Li-cor)

gegeben. Dieses wurde 1:10000 verdünnt eingesetzt. Es kann direkt mit den Proteinen inkubiert werden.

2.5.5 Cystein-Scanning-Methode (für EIICB^{Glc} optimiert)

300ml 2-TY-Amp-Medium wurden angeimpft mit dem Stamm LR2-175, in den zuvor das entsprechende Plasmid, welches für ein Single-Cystein-EIICB^{Glc} kodiert, transformiert worden war. Bei einer $OD_{650}=1$ wurde 1mM IPTG zugegeben, um die Transkription des plasmidkodierten Gens zu induzieren. Bei einer $OD_{650}=1,5$ (ca. 1,5h nach der Induktion) wurde eine Probe der angezogenen Zellen entnommen und auf McCGlc-Platten mit 100 μ M IPTG zu Einzelkolonien (um zu testen, ob alle Zellen das Plasmid noch besitzen) sowie auf McCGlc-Amp-Platten mit 100 μ M IPTG (um die Komplementation zu überprüfen) ausgestrichen. Die restlichen Zellen wurden geerntet und in Lysispuffer ohne Imidazol gewaschen. Die Zellen wurden in 6ml Lysispuffer ohne Imidazol resuspendiert und in 4 gleich große Portionen aufgeteilt. 2x 1,5ml wurden für das Cystein-Scanning verwendet, die anderen Portionen wurden als Reserve aufbewahrt und nach abgeschlossenem Cystein-Scanning verworfen.

Eine 1,5ml Portion wurde mit 10mM MTSET (Stocklösung 100mM, Lagerung im Dunkeln) versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. (Die andere Portion wurde im Kühlschrank gelagert). Am nächsten Morgen wurde die mit MTSET versetzte Probe zweimal in Lysispuffer ohne Imidazol gewaschen. Beiden Portionen wurden dann 200 μ M Biotinmaleimid (Stocklösung 30mM) zugeführt und 45 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde beiden Proben 50mM β -MeOH zugeführt, um die Reaktion mit BM abzustoppen. Die Proben wurden einer Ultraschallbehandlung und Reinigung wie in Absatz 2.5.3 beschrieben unterzogen. Vor der Reinigung mit der Ni-NTA Agarose wurden den Proben 10mM Imidazol zugegeben. Mit den gereinigten Proben wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt (s. Abschnitt 2.5.6) und alle Proben wurden auf dieselbe Konzentration eingestellt. Die Proben wurden mit 2x SDS-Puffer ohne β -MeOH versetzt und je zweimal auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurden die Proben einem Western Blot unterzogen. Eine Hälfte der Proben wurde mit primärem und sekundärem Antikörper gegen den His-Tag der Proteine versetzt, um die Überproduktion und Reinigung zu überprüfen. Die andere Hälfte wurde mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin (Li-Cor, 1:10000 verdünnt) behandelt, um das BM zu detektieren.

In diesem Protokoll wurde auf die Verwendung von Membranvesikeln zur Überprüfung der allgemeinen Zugänglichkeit für BM verzichtet. Da BM unter diesen Umständen minimal membranpermeabel ist, kann bei einer durch den Ultraschall entstandenen Mischung aus ISO- und RSO-Vesikeln keine Aussage über die allgemeine Zugänglichkeit gemacht werden, die über die Beobachtungen in den eigentlichen Proben hinausgeht.

2.5.6 Bradford-Test

Das im Bradford-Reagenz enthaltene Coomassie-Blue bildet unter sauren Bedingungen Komplexe mit Proteinen, die dann bei einer Wellenlänge von $\lambda=595\text{nm}$ photometrisch detektiert werden können. Hiermit lässt sich die Konzentration von Proteinlösungen bestimmen. Dazu wurden 10 μl Probe mit 90 μl Wasser versetzt und mit 900 μl Bradford-Reagenz gemischt. Dieser Ansatz wurde 2-60min bei RT inkubiert und dann im Photometer bei 595nm gegen den Leerwert aus 100 μl und 900 μl Bradford-Reagenz gemessen. Als Standard diente eine Eichgerade, in der 0, 20, 40, 60, 80 und 100 μg des Proteins BSA gemessen wurden.

2.5.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE [131] dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts. Das verwendete SDS erzeugt eine Überlagerung der Eigenladung der Proteine, so dass alle Proteine eine negative Ladung erhalten, die mit der Molekülgröße ansteigt. Des Weiteren liegen die Proteine durch die Zugabe von SDS und β -Mercaptoethanol denaturiert vor. Unterschiede in der Proteinkonformation und Struktur haben somit kaum mehr einen Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit während der Elektrophorese.

Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben mit 100 μl H₂O, 100 μl SDS-Probenpuffer (2-fach) und 10% β -Mercaptoethanol versetzt. Die Proben für die SDS-PAGE wurden in 10% Polyacrylamidgelen in SDS-Puffer gelelektrophoretisch getrennt.

2.5.8 Zusammensetzung von SDS-Gelen

Tabelle 2.11: Zusammensetzung von 10% SDS-Gelen

Inhaltsstoffe	Trenngel Angaben in ml	Sammelgel Angaben in ml
Polyacrylamid (39:1)	25	5
H ₂ O	31	31,5
1,5 M Tris, pH=8,8	18,8	-
0,5M Tris, pH=6,8	-	12,5
10% SDS	0,75	0,25
10% Ammoniumpersulfat	0,5	0,325
TEMED	0,0625	0,04

Tabelle 2.12: Zusammensetzung von 15% SDS-Gelen

Inhaltsstoffe	Trenngel Angaben in ml	Sammelgel Angaben in ml
Polyacrylamid (39:1)	37,5	5
H ₂ O	18	31,5
1,5 M Tris, pH=8,8	18,8	-
0,5M Tris, pH=6,8	-	12,5
10% SDS	0,75	0,5
10% Ammoniumpersulfat	0,5	0,325
TEMED	0,0625	0,04

2.5.9 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine durch ein elektrisches Feld aus einem SDS-Gel auf eine Trägermembran (z.B. aus Nitrozellulose) transferiert. Diese Membran kann später genutzt werden, um proteinspezifische Antikörper einzusetzen, mit denen Zielproteine charakteristisch nachgewiesen werden können.

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-PAGE-Gel für 30min in Blotpuffer inkubiert. Je 4 Filterpapiere mit der Größe des Gels, sowie eine Nitrozellulosemembran, wurden in Blotpuffer getränkt.

Der eigentliche Blot fand nach der Semi-Dry-Methode im Trans Blot[®] SD Semydry Transfer-Cell von BIO-RAD (München) statt. Von der Kathode ausgehend wurden Filterpapiere, Gel und Membran folgendermaßen aufgebaut:

Kathode
2 Filterpapiere
Gel
Membran
2 Filterpapiere
Anode

Der Blotvorgang erfolgte für 40min mit 20V. Anschließend wurde das Gel für ca. 15min mit Coomassie Blue gefärbt, danach über Nacht mit Wasser und Zellstoff entfärbt. Die Membran wurde ebenfalls für 15min mit 0,2% Ponceau gefärbt. Im Anschluss wurde die Membran mit Wasser und TBS entfärbt. Zum Absättigen mit Protein („Quenchen“) wurde die Membran mit 3% BSA in TBS über Nacht bei 4°C oder bei RT eine Stunde lang inkubiert.

Die Membran wurde für 10min in frischem TBS gewaschen. Anschließend wurde ein primärer Antikörper (z.B. Anti-His, Qiagen) in TBS mit 1% BSA (1:2000 verdünnt) auf die Membran aufgebracht und für mindestens eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Membran dreimal für je 10min in TNT gewaschen. Als nächstes wurde ein sekundärer Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung in TBS mit 1% BSA aufgebracht und erneut für mindestens eine Stunde inkubiert (Fluoreszenzlabel-tragende Streptavidinproteine wurden 1:10000 verdünnt, bevor sie eingesetzt wurden). Daraufhin folgten drei weitere Waschschrte mit TNT-Puffer für je 10min und ein letzter 10 minütiger Waschschrte in TBS-Puffer. Die Membran konnte dann mit dem Odyssey[®] Imaging System von Li-Cor[®] Biosciences GmbH (Bad Homburg) gescannt werden. Der sekundäre Antikörper besitzt einen Marker, der mit dem Lichtkanal des Li-Cor-Scanners mit der Wellenlänge $\lambda=700$ bzw. $\lambda=800\text{nm}$ sichtbar gemacht werden kann. Quantifizierungen wurden mit der Odyssey-Software (Version 2.1.12) von Li-Cor Biosciences vorgenommen. Die Software integriert die Intensität des Signals über die Fläche des Signals (Integrierte Intensität).

2.5.10 Chemolumineszenz mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase

Biotinmaleimid markierte Proteine aus einem SDS-Gel wurden ebenfalls mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Streptavidin-HRP) sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel wie oben beschrieben auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Im Anschluss wurde die Membran mit Streptavidin-HRP (1:5000 verdünnt in TBS mit 2% BSA) für 1h bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde dann 3 mal 10min mit TNT gewaschen. Die Chemolumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem ECL Western Blotting Substrate von Pierce (Rockford, USA) und wurde gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Die Membran wurde kurz in TNT gewaschen. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Stücke Folie gelegt und überschüssige Flüssigkeit entfernt. Die Membran wurde auf einer verschließbaren Kassette fixiert und diese in der Dunkelkammer mit einem Film (Hyperfilm™ ECL von GE Healthcare, Amersham, UK) versehen. Die Entwicklung erfolgte mit dem SRX-101A der Firma Konika Minolta, Langenhagen.

2.5.11 Silberfärbung

Um Proteine in einem SDS-Gel sichtbar zu machen, wurde neben der Coomassie-Blue-Färbung auch die sensitivere Silberfärbung angewandt [132].

Das Gel wurde dazu mindestens eine Stunde in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde es dreimal 20min in 50% Ethanol gewaschen. Danach wurde das Gel für 1min in Thiosulfat inkubiert und im Anschluss dreimal 20s in bidestilliertem H₂O gewaschen. Danach folgte die 20-minütige Inkubation in der Imprägnierlösung. Daraufhin wurde 3-10min mit Entwicklerlösung angefärbt, bis die Banden gut sichtbar waren. Dann wurde sofort mit bidest. H₂O gewaschen und das Gel mindestens 15min in Stopplösung inkubiert.

Tabelle 2.13: Lösungen für die Silberfärbung

Lösung	Zusammensetzung	Bemerkungen
Fixierlösung	500ml MeOH 120ml Eisessig Ad 1000ml H ₂ O Vor Gebrauch 0,5ml Formaldehyd zusetzen	
Thiosulfatlösung	0,04g Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O Ad 200ml bidest. H ₂ O	Immer frisch ansetzen
Imprägnierlösung	0,4g AgNO ₃ 150µl 37% Formaldehyd Ad 200ml bidest. H ₂ O	Immer frisch ansetzen
Entwicklerlösung	12g Na ₂ CO ₃ 4ml Thiosulfatlösung 100µl 37%iges Formaldehyd Ad 200ml H ₂ O	Immer frisch ansetzen
Stopplösung	23g Na ₂ EDTA (Titriplex III) Ad 1000ml bidest. H ₂ O	

2.5.12 Blau-Weiß-Nachweis

Bei dem Blau-Weiß Nachweis erfolgte der qualitative Nachweis für das Enzym β-Galaktosidase durch das Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-

Galaktopyranosid). Dazu wurden 150µl einer 2%igen X-Gal-Lösung (in N,N-Dimethylformamid=DMF) und 150µl einer 100mM IPTG -Lösung auf einer Agarplatte ausgestrichen und die Zellen darauf ausplattiert. Beim Spaltvorgang von X-Gal kommt es zu einer Blaufärbung durch die Zellen, die eine vollständige β -Galaktosidase exprimieren.

2.5.13 Radioaktive Transporttests

Von einer Übernachtskultur in LB₀-Medium wurde eine 10ml-Kultur im 100ml Erlenmeyerkolben auf eine OD₆₅₀=0,05 angeimpft. Bei einer OD₆₅₀=0,1 wurde mit IPTG induziert (1mM für pRR48-Derivate, 25µM für pTM30-Derivate). Die Zellen wuchsen, bis sie eine OD₆₅₀=1,0 erreicht hatten, dann wurden 3ml geerntet und zweimal in Minimalmedium ohne Kohlenhydrate oder andere Zusätze gewaschen. 1ml der Zellen wurde benötigt, um die OD₆₅₀ zu bestimmen (Minimalmedium als Leerwert). Von den restlichen Zellen wurden 740µl abgenommen und in ein Reagenzglas überführt. Im Isotopenlabor wurden die Reagenzgläser in einem Wasserbad bei 25°C äquilibriert. Zur Bestimmung der Transportaktivität wurden Zelluloseacetat/Zellulosenitrat-Membranen mit einer Porengröße von 0,65µm benötigt (Millipore). Diese wurden zunächst in zweifach destilliertem Wasser befeuchtet. Anschließend wurden sie auf einen Kamin, welcher an eine Vakuumpumpe angeschlossen war, aufgelegt und angesaugt. Als Substrat wurde α -Methylglukose (Pyranosid, Methyl(α -D-glucopyranosyl)[U-¹⁴C]) verwendet (PerkinElmer, Rodgau, Lagerung bei -20°C), die zunächst 1:30 verdünnt wurde. Von dieser Verdünnung wurden 2µl, 5µl und 10µl abgenommen, um die cpm der Verdünnung zu bestimmen.

Die Reaktion für die Transporttests wurde gestartet, indem 10µl der verdünnten α -Methylglukose zu 740µl Zellen gegeben wurde und das Reagenzglas leicht geschwenkt wurde. Nach 30, 60 und 90 Sekunden wurden von dieser Mischung jeweils 200µl abgenommen und auf eine der vorbereiteten Membranen gegeben. Der Kamin unter dieser Membran wurde geöffnet, um die Flüssigkeit abzusaugen, während die Zellen auf der Membran hängen blieben. Anschließend wurde die Membran zweimal mit Minimalmedium gewaschen und getrocknet. Dazu wurde die Membran mit Hilfe einer Stecknadel möglichst frei schwebend auf einer Styroporplatte befestigt. Anschließend wurden die Membranen in 5ml Szintillationsflüssigkeit gegeben (Qicksafe N, Zinsser Analytic, Frankfurt/M). Die Bestimmung der cpm-Rate erfolgte im Szintillationszähler „Liquid Scintillation Analyzer 1600TR“ von Canberra Packard. Die Auswertung erfolgte, indem drei zeitabhängige Werte einer Probe graphisch aufgetragen wurden. Der Δ cpm Wert wurde dabei dem linearen Teil der Kurve entnommen und auf eine Minute umgerechnet. Die Auswertung erfolgte nach folgender Formel:

Spezifische Transportaktivität=

$$\frac{4 \cdot V_A \cdot \Delta \text{cpm} \cdot K}{\text{OD}_{650} \cdot T \cdot V_F \cdot Z \cdot V_B} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mg Protein}} \right]$$

mit

4=	Umrechnungsfaktor für die Berechnung der Proteinmenge aus der Extinktion ($\text{OD}_{650}=1$ entspricht 0,25mg Protein/ml)
V_A =	Volumen des Ansatzes [ml] (hier: 1)
T=	Zeitpunkt der Probenentnahme [min]
V_F =	Volumen der eingesetzten Probe [ml] (hier: 0,2)
Δcpm =	Gezählte Impulse pro Minute abzüglich Nullwert
Z=	radioaktive Zerfallsrate der Arbeitslösung [cpm/ml]
K=	Substratkonzentration der radioaktiven Stammlösung [mol/l] (hier: 6×10^{-5})
V_B =	Volumen der eingesetzten Bakteriensuspension [ml]; (hier: 0,74)
OD_{650} =	gemessene Extinktion der eingesetzten Zellsuspension bei 650nm

2.5.14 Vernetzungs-Experimente mit Formaldehyd

Formaldehyd gilt als Vernetzungsreagenz, welches Proteine, die eine Wechselwirkung miteinander zeigen, im Moment der Zugabe verknüpft [113]. Somit ist es möglich, Interaktionen zwischen Proteinen zu detektieren. Für die Versuche wurde eine Stocklösung mit 4g Paraformaldehyd eingesetzt, welches in 100ml PBS-Puffer unter Hitze und Rühren gelöst wurde.

300ml LB_0 -Medium wurden auf eine $\text{OD}_{650}=0,05$ angeimpft. Bei einer $\text{OD}_{650}=0,1$ wurde mit $25 \mu\text{M}$ IPTG induziert und die Zellen wachsen gelassen bis zu einer $\text{OD}_{650}=1$. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Formaldehydlösung dazu gegeben (Endkonzentration 0,3%) und die Zellen weitere 20min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit Lysispuffer gewaschen. Der Zellaufschluss und die weitere Reinigung erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend für eine SDS-PAGE benutzt. Dazu wurde SDS-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol verwendet. Die Elutionsfraktionen wurden entweder direkt oder nach Erhitzen (10min, 95°C) auf das SDS-Gel aufgetragen. Gegebenenfalls wurden die Proben mittels einer Speed-Vac ankonzentriert, bevor sie für die SDS-PAGE eingesetzt wurden.

2.5.15 Bakteriellies „Two-Hybrid“-System zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Proteinen

Das bakterielle „Two-Hybrid“-System dient der Interaktionsanalyse zwischen Proteinen [117]. Zu den theoretischen Hintergründen s. Abschnitt 3.3.3. Die entsprechenden Plasmide wurden in den Stamm SU202 kotransformiert und über Nacht unter selektiven Bedingungen in LB_0 -Medium angezogen. Die Zellen wurden in 10ml frischen Mediums überimpft und auf eine Ausgangs- $\text{OD}_{650}=0,05$ eingestellt. Den Kulturen wurden des

Weiteren 1mM IPTG zugefügt. Die Kulturen wurden, abweichend vom Original-Protokoll [117], bis zu einer $OD_{650}=0,8-1$ inkubiert. Anschließend wurden 1ml der Zellen geerntet und einem β -Galaktosidase-Aktivitätstest unterzogen (s. Abschnitt 2.5.1).

2.5.16 Massenspektrometrie

Mit einer massenspektrometrischen Untersuchung ist es möglich die Aminosäuresequenz eines Proteins zu bestimmen. Die erhaltene Sequenz kann gegen eine Proteinbank abgeglichen werden. Das zu untersuchende Protein kann somit identifiziert werden.

Zur Analyse von Proteinen wurden die Proben einer SDS-PAGE unterzogen und das Gel anschließend über Nacht mit Coomassie gefärbt und so lange entfärbt, bis die relevanten Banden eindeutig sichtbar waren. Die Banden wurden ausgeschnitten und ggf. in zweifach destilliertem Wasser bei 4°C in Reaktionsgefäßen ohne Weichmacher (Eppendorf, Hamburg) gelagert. Anschließend wurden die Proben gemäß dem folgenden Protokoll behandelt, das den Massenspektrometrie-Seiten der Biologie an der Universität Osnabrück entnommen wurde (<http://www.biologie.uni-osnabrueck.de/Massenspektrometrie/>).

2.5.16.1 Benötigte Puffer und Lösungen für die Massenspektrometrie

Solution	Preparation
1 Ammonium hydrogen carbonate	100 mM, pH 8.5 Dissolve 790.6 mg NH_4HCO_3 in 90 ml water, adjust the pH to 8.5 with 2 M NH_4OH , then use water to bring the final volume to 100 ml. IMPORTANT: DON'T USE NaOH FOR TITRATION!!!! NH_4OH IS NH_3 IN SOLUTION (WATER) PREPARE THIS SOLUTION ALWAYS FRESH BEFORE USE CAREFULLY CONTROL THE pH
2 Destaining Solution	30% acetonitrile in 100 mM NH_4HCO_3 Bring 30 ml acetonitrile to a final volume of 100 ml with 100 mM NH_4HCO_3 (Solution 1)
3 Reducing Solution	10 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3 Dissolve 15.4 mg DTT in 10 ml NH_4HCO_3 (Solution 1)
4 Alkylating Solution	54 mM Iodoacetamide in 100 mM NH_4HCO_3 Dissolve 10 mg Iodoacetamide in 1ml NH_4HCO_3 (Solution 1) (Iodoacetamide crystals have been white!!!)
5 not necessary	
6 Reconstitution Solution	10 mM HCl Add 100 μ l 1 M HCl to 9.90 ml water, then mix
7 Digestion Buffer	50 mM NH_4HCO_3 pH 8.5 with 5% acetonitrile Add 500 μ l acetonitrile to 5 ml 100 mM NH_4HCO_3 (Solution 1), add ultrapure water to a final volume of 10 ml.
8 Reconstituted Trypsin Solution	Reconstitute the lyophilizate (one bottle) to a Trypsin concentration of

		0.1 mg/ml by adding 250 µl Reconstitution Solution (Solution 6) to 25 µg Trypsin Storage: -15 to -25°C for up to one month
9	Trypsin Digest Solution	Dilute Reconstituted Trypsin Solution (Solution 8) to a final trypsin concentration of 0.01 mg/ml by mixing it with a 9-fold volume of Digestion Buffer (Solution 7) in a separate reaction vial. Prepare this solution immediately before you begin the tryptic digest

2.5.16.2 Entfärben von Coomassie-gefärbten SDS-Gelen

Step	Action
1	Cut the Coomassie-stained protein band out of the gel
2	Transfer the pieces into appropriate container (microtiter plate or Eppendorf cups) which is free of plasticiser.
ATTENTION	In all steps below the volumes are given in relation to a small gel piece. Depend on the size of yours you have to increase the volume of the solution, that in all steps the gel pieces are "swimming" in the solutions.
3	Add 250 µl ultra pure water to the sample and then shake for 10 min at 15–25°C on a thermo mixer.
4	Aspirate the ultrapure water with a suitable pipette.
5	Repeat the wash steps (steps 3 and 4).
6	Add 250 µl Destaining Solution (Solution 2), then incubate and shake for 10 min at 15–25°C.
7	Aspirate the supernatant with a suitable pipette.
8	Repeat the destaining step until the Destaining Solution remains colorless and the gel piece is colorless, too.
9	Add 250 µl ultrapure water to the well, and then shake for 15 min at 15–25°C on a thermo mixer.
10	Aspirate the water with a pipette.
11	Repeat the wash steps (steps 9 and 10)
12	Add 250 µl acetonitrile, and then shake for 15 min at 15–25°C on a thermo mixer
13	Aspirate the acetonitrile.
14	If the gel pieces are dry (they appear white) and the acetonitril is completely removed, skip step 15.
15	Dry the sample at 10 mbar and 37°C in a vacuum concentrator for 15 min.

2.5.16.3 Reduktion und Alkylierung

Step	Action
1	Add 100 µl Reducing Solution (Solution 3) per sample, then incubate and shake at 15 to 25°C for 5 min.
2	Incubate another 30 min at 50°C
3	Aspirate the supernatant
4	Add 250 µl acetonitrile per sample, and then incubate for 15 min at 15–25°C
5	Aspirate the supernatant
6	Add 100 µl Alkylating Solution (Solution 4), and then incubate for 15 min in the dark
7	Aspirate the supernatant.

8	Add 250 µl Destaining Solution (Solution 2), then incubate and shake for 10 min at 15–25°C.
9	Aspirate the supernatant.
10	Add 250 µl acetonitril, then incubate and shake for 15 min at 15–25°C
11	Aspirate the supernatant.
12	If the gel pieces are dry (they appear white) and the acetonitril is completely removed, skip step 15.
13	Dry the sample at 10 mbar and 37°C in a vacuum concentrator for 15 min.

2.5.16.4 Tryptischer Verdau hydrophiler Proteine

Step	Action
1	Add 50 µl of freshly prepared Trypsin Digest Solution (Solution 9) ATTENTION: gel pieces has to be covered even after its swelling, otherwise increase the volume of the Trypsin Digestion solution as appropriate.
2	Incubate at least 6h or overnight at 15–37°C.
3	Remove and store the supernatant
4	To the gel pieces, add 30 µL (enough to cover) of 100% acetonitril and shake 20-30 min. The size of gel piece has to be significant reduced and has to appear "white"
5	Place the tube for 3 min in a sonificaton bath
6	transfer the supernatant into a new cup and evaporate the acetonitril by a vacuum concentrator
7	Dissolve the dried peptids from step 6 with the supernatant from step 3. If necessary store the sample at -20°C
8	carefully remove particles by centrifugation
9	Determine the total volume of the sample and transfer it to HPLC-vials or microplates

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software BiTools von Bruker und die Datenbanksuche wurde anhand der Software von www.matrixscience.com durchgeführt.

2.5.17 BiFC (Bimolekulare-Fluoreszenzkomplementation)

Diese Methode dient der Untersuchung der Wechselwirkung von zwei Proteinen. Dabei liegen die zu untersuchenden Proteine jeweils fusioniert an ein N-terminales oder C-terminales GFP-Fragment vor. Bei einer Wechselwirkung beider Proteine kommen auch die GFP-Fragmente in räumliche Nähe und bilden ein fluoreszierendes Volllängenprotein.

Zunächst wurden die entsprechenden Plasmide in den Stamm BL21(DE3) kotransformiert. Hierbei wurden 20µl Plasmid-DNA eingesetzt, da der Stamm BL21(DE3) eine sehr schlechte Transformationseffizienz besitzt. Gegebenenfalls wurde nur ein Plasmid transformiert und von diesem Stamm kompetente Zellen hergestellt, die dann mit dem zweiten Plasmid transformiert wurden. Von den erhaltenen Kolonien wurden ÜNK in Vollmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Die ÜNK wurden in frisches Medium überimpft und dieses erneut mit Antibiotikum versetzt. Zusätzlich wurden 100µM IPTG und 0,4% Arabinose zugegeben um die pET11a-Derivate (IPTG) und die pBAD-Derivate (Arabinose) zu induzieren. Die Kulturen wurden bei 30°C unter Schütteln drei Tage inkubiert. Die Zugabe von Laktose, Sucrose oder Glukose erfolgte drei Stunden vor der Zellernte. Von den Kulturen wurde je 1ml abgenommen und diese Zellen zweimal in Minimalmedium gewaschen. Von einer 1:100 Verdünnung der Zellen wurde die

OD₄₂₀ bestimmt. Der Wert aus dieser Messung wurde genutzt, um 1ml Zellen in Minimalmedium zu einer OD₄₂₀=5 anzusetzen. 100µl dieser Probe wurde in eine schwarze Mikrotiterplatte (Corning, Lowell, USA) gegeben und in einem Fluorimeter (FLUOstar OPTIMA von BMG Labtechnologies, Offenburg) gemessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen vorgenommen. Als Leerwert diente Minimalmedium.

2.5.18 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von GFP-Signalen in Bakterienzellen

Zu untersuchende Zellen wurden in Vollmedium mit dem entsprechendem Antibiotikum angezogen bis zu einer OD₆₅₀=1. Nach der Ernte wurden die Zellen in PBS gewaschen und 2µl auf einen Objektträger aufgetragen, der vorher mit Poly-L-Lysin (1mg/ml in H₂O) eingestrichen worden war. Die Zellen wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt und sofort fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Untersuchung erfolgte mit einem Axioplan2 Mikroskop mit einem Plan-Apochromat 100x/1.45 NA Oil DIC Objektiv (Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz) und entsprechenden Filtern (Chroma, Rockingham, USA). Die zusätzliche Lichtquelle für Fluoreszenz-Aufnahmen war eine 100 W HBO Lampe (OSRAM AG, Augsburg). Der Kameraschließer wurde durch eine MAC200 (LUDL, Hawthorne, USA) Kontrolleinheit kontrolliert, welcher mit der CoolSNAP HQ Kamera synchronisiert wurde (Roper Scientific, Tucson, USA). Das Mikroskop wurde mit der Software MetaMorph v6.2 (Universal Imaging Corporation, Downington, USA) bedient.

2.5.19 Durchfluscytometrie (FACS; Fluorescence activated cell sorting)

Bei der Durchfluscytometrie können Zellen aufgrund verschiedener Eigenschaften voneinander unterschieden werden. Dazu werden einzelne Zellen an einem Laserstrahl vorbei geleitet. Durch Detektoren kann dabei die Ablenkung des Laserstrahls durch die Zellen gemessen werden. Diese Ablenkung gibt Auskunft über die Größe der Zellen und wird auch als „Vorwärtsstreuung“ (engl. forward scatter) bezeichnet. Zusätzlich kann ebenfalls die Ablenkung des Laserstrahls im 90° Winkel erfasst werden (Seitliche Streuung; engl. sideward scatter). Diese Streuung fällt unterschiedlich aus, je nach der Oberflächenbeschaffenheit, der Anzahl von Vakuolen und der Granularität der Zellen. Durch den Laser können auch Fluoreszenzproteine oder fluoreszierende Antikörper angeregt werden, deren Emissionsstrahlung mit entsprechenden Filtern detektiert werden. Auf diese Weise lassen sich unterschiedlich emittierende Zellen unterscheiden. Spezielle Geräte sind außerdem in der Lage, die verschiedenen Zellen ihren Eigenschaften nach zu sortieren und zu separieren.

Für die hier vorgenommenen Untersuchungen wurden die Bakterien in Vollmedium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen und bei einer OD₆₅₀=0,1 mit 1mM cAMP versetzt. Die Zellen wurden bei einer OD₆₅₀=1 geerntet und anschließend mit sterilem PBS zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Bakterienzellen mit 4µM FM4-64 versetzt und 10min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden danach einmal mit sterilem PBS gewaschen und 1:100 verdünnt, bzw. so verdünnt, dass sich in 2ml Gesamtvolumen

1×10^7 Zellen befanden und sofort der Analyse unterzogen. Die FACS-Analysen der *E. coli*-Zellen wurden mit dem Gerät FACSAria der Firma Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software BD FACSDiva. Grünfluoreszierende Zellen wurden mit dem Filter FITC-A und rotfluoreszierende Zellen mit dem Filter PerCP-Cy5-5-A detektiert. Die notwendigen Einstellungen entsprachen dabei dem voreingestellten Standard, lediglich der Verstärkungsgrad (gain) wurde auf 800 festgesetzt.

2.6 Sonstiges

2.6.1 Alignments

Alignments wurden mit der Software ClustalW erstellt und mit dem Programm Genedoc bearbeitet. In dem Programm Genedoc wurde die Einstellung Conservation Mode mit den zugehörigen Standardeinstellungen gewählt.

2.6.2 Sequenzierungen

Sequenzierungen von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten wurden von der Firma SRD (Scientific Research and Development, Bad Homburg) oder GATC Biotech (Konstanz) vorgenommen. Die anschließende Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Clone Manager 9 und Chromas Pro.

2.6.3 Software

Die im Rahmen dieser Arbeit für die Auswertung, Dokumentation und Quantifizierung verwendete bioinformatische Software ist nachfolgend zusammengefasst.

Tabelle 2.14: Bioinformatische Software

Software	Anbieter	Verwendungszweck
Clone manager 9	Scientific & Education Software	Virtuelle Klonierungen, Oligonukleotid-Design, Sequenzanalysen
BioCapt Color Version 99.03s	Vilber Lourmat	Geldokumentation
Chromas Version 2.13	Technelysium Pty Ltd	Sequenzanalyse
ClustalW2	www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	Multiple Alignments
Genedoc 2.5.000	www.nrbcs.org/gfx/genedoc/	Alignmentanalyse
Metamorph 6.2r6	Universal Imaging Corp.	Fluoreszenzmikroskopie
Odyssey Application Software 2.1.12	Li-Cor Biosciences	Dokumentation, Analyse und Quantifizierung von Westernblot-Membranen

3 ERGEBNISSE

3.1 Optimierung der Methode zur Aufklärung der Lokalisation einzelner Aminosäuren von EIICB^{Glc} im Hinblick auf die Cytoplasmamembran mittels Cystein-Scanning

Da die Struktur der membranständigen C-Domäne des Glukosetransporters EIICB^{Glc} bisher nicht aufgeklärt werden konnte, war ein Hauptziel dieser Arbeit, ein reproduzierbares System zur Analyse der Membrantopologie von EIICB^{Glc} mittels Cystein-Scanning zu erstellen [133]. Mit Hilfe dieser Methode sollte versucht werden, neue Erkenntnisse über die Struktur des Proteins EIICB^{Glc} zu erhalten (s. Abbildung 1.4).

Bisherige Untersuchungen zu dieser Thematik wurden in dieser Arbeitsgruppe mit Reporterproteininfusionen durchgeführt [80-83]. Die eingesetzten Reporterproteine β -Galaktosidase und Alkalische Phosphatase sind dabei sehr groß (464kDa für ein LacZ-Tetramer; 99kDa für ein PhoA-Dimer) und können daher einen Einfluss auf die Struktur von EIICB^{Glc} nehmen. Das Cystein-Scanning ist eine weit weniger invasive Methode, da es hier lediglich zu einem Austausch von Aminosäuren kommt.

Für das Cystein-Scanning ist es notwendig, Einzel-Cystein-Varianten des zu untersuchenden Proteins zu benutzen, um Rückschlüsse auf eine bestimmte Position ziehen zu können. Nativ vorhandene Cysteine müssen daher zunächst ausgetauscht werden. Dabei muss bei dem Protein EIICB^{Glc} beachtet werden, dass der Cysteinrest C421 essentiell für die Transportfunktion des Proteins ist, da über dieses Cystein die Phosphatgruppe an das Substrat weitergegeben wird [15, 52]. Dieser Defekt einer cysteinfreien Mutante muss über das Einbringen einer weiteren Mutation wieder ausgeglichen werden. Die Funktionalität der so entstandenen Proteine muss nachgewiesen werden, da ein nicht-funktionelles Protein strukturell womöglich so stark vom Wildtyp-Protein abweicht, dass Strukturuntersuchungen falsche Ergebnisse liefern könnten. In dieses funktionelle, cysteinfreie Protein wird dann jeweils ein einzelnes Cystein an einer zu untersuchenden Position wieder eingebracht. Dieses Cystein kann anschließend mit Sulfhydryl-spezifischen Reagenzien markiert werden, die eine kovalente Bindung mit der SH-Gruppe eingehen. Das Prinzip der Methode ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Die eingesetzten Markierungen können sich in der Membranpermeabilität unterscheiden. Somit stellen Cysteine an verschiedenen Positionen auch unterschiedlich zugängliche Ziele für die Reagenzien dar. Ein Nachweis der Markierungen kann über die Position des gebundenen Cysteins Aufschluss geben. Um diese Methode durchführen zu können, müssen für jedes neu zu untersuchende Protein viele verschiedene Parameter optimiert werden. Neben der Konstruktion funktioneller cysteinfreier Mutanten ist es notwendig, das Protein überproduzieren und reinigen zu können. Dies ist erforderlich, da alle anderen Cystein-tragenden Proteine der Zelle durch die Sulfhydrylreagenzien ebenfalls markiert werden und in der späteren Detektion auftauchen. Nicht zuletzt

müssen auch die Markierung selber und die dazu nötigen Schritte einer Optimierung unterzogen werden. Die Erarbeitung des Cystein-Scanning-Protokolls für ein Protein ist daher nicht trivial. Die Schritte dieser Optimierung für das Protein EIICB^{Glc} werden nachfolgend im Einzelnen aufgeführt.

3.1.1 Konstruktion eines Überexpressionsvektors mit dem *ptsG*-Gen

Für das Cystein-Scanning sollte eine plasmidkodierte Variante des *ptsG*-Gens verwendet werden, in der auch die Kodons für 6 Histidin-Reste am 3'-Ende des Gens vorhanden sind. Dieser His₆-„Tag“ dient später der Reinigung und dem Nachweis des exprimierten Proteins. Zu Beginn dieser Arbeit lag ein Plasmid vor, auf welchem das gewünschte *ptsG*-Gen kodiert wird. Dieser Vektor pBGH24 ist ein Derivat des Plasmids pBAD24 und wird durch das Kohlenhydrat Arabinose induziert. Da es bei der Überproduktion von Membranproteinen zu Schädigungen der Zellmembran oder zum Falscheinbau der überexprimierten Proteine kommen kann, sollte auch ein weiteres Plasmidsystem für die Expression von EIICB^{Glc} getestet werden. Hierfür wurde zunächst das Gen für EIICB^{Glc}(His)₆ aus dem Vektor pBGH24 über die Restriktionsschnittstellen PstI und HindIII in den Expressionvektor pRR48 überführt. Die Expression von Genen auf diesem Vektor ist durch das nicht zu verstoffwechselnde IPTG induzierbar. Das resultierende Plasmid wurde pRR48GH genannt. Die Sequenzierung des Konstrukts bestätigte eine erfolgreiche Klonierung.

Um zunächst die Funktionalität der kodierten EIICB^{Glc}(His)₆-Varianten zu überprüfen, wurden die Plasmide pBGH24 und pRR48GH in den Stamm LR2-175 transformiert. Dieser Stamm beinhaltet uncharakterisierte Mutationen in den Genen für verschiedene Glukoseaufnahmesysteme der Zelle (Glukose-PTS, Mannose-PTS, Galaktose-Katabolismus) und eignet sich daher für Komplementationsversuche auf McCGlc-Indikatorplatten [116]. Eine Induktionskinetik beider Zelltypen ist in Tabelle 3.1 gezeigt. Die EIICB^{Glc}(His)₆-Derivate, die von den beiden Plasmiden kodiert werden, sind demnach in der Lage, Glukose zu transportieren und zu phosphorylieren. Der (His)₆-„Tag“ stört die Funktionalität der Proteine nicht.

Tabelle 3.1: Induktionskinetik mit LR2-175/pRR48GH und LR2-175/pBGH24

Ergebnis des Markertests auf McCGlc-Platten mit verschiedenen IPTG- und Arabinose-Konzentrationen. W: Kolonien zeigten einen weißen Phänotyp, konnten die Glukose also nicht verstoffwechseln; 2+: tieferer Phänotyp der Kolonien, Glukose wird verstoffwechselt; 3+: tieferer Phänotyp der Kolonien mit Rotfärbung des umgebenden Mediums.

IPTG-Konzentration [μM]/ Arabinose-Konzentration [%]	0/0	10/0,05	25/0,1	50/0,125	75/0,15	100/0,2
pRR48 (Leervektor)	w	w	w	w	w	w
pRR48GH	w	2+	2+	2+	3+	3+
pBAD24 (Leervektor)	w	w	w	w	w	w
pBGH24	w	3+	3+	3+	3+	3+

Ein Vergleich beider Vektoren hinsichtlich der Expression des kodierten Gens wurde durchgeführt, um den optimalen Vektor für die Überexpression von EIICB^{Glc} zu

ermitteln. Dafür wurden Induktionskinetiken beider Zelltypen in Flüssigkultur vorgenommen. Abbildung 3.1 zeigt das Wachstum mit unterschiedlichen IPTG- bzw. Arabinosekonzentrationen, sowie die Expressionsstärke der Proteine. Das System mit dem Vektor pRR48GH zeigte ein besseres Wachstum als Zellen mit dem pBAD-Konstrukt. Um die Expression der plasmidkodierten EIICB^{Glc}(His)₆-Proteine zu überprüfen, wurden je 1ml der uninduzierten als auch der induzierten Proben beider Ansätze geerntet und einem Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen den (His)₆-„Tag“ unterzogen. Die Quantifizierung der Western Blot-Signale zeigte, dass Zellen mit dem Plasmid pRR48GH eine höhere Expression des Proteins EIICB^{Glc}(His)₆ aufwiesen als Zellen, die das Plasmid pBGH24 trugen (Abbildung 3.1).

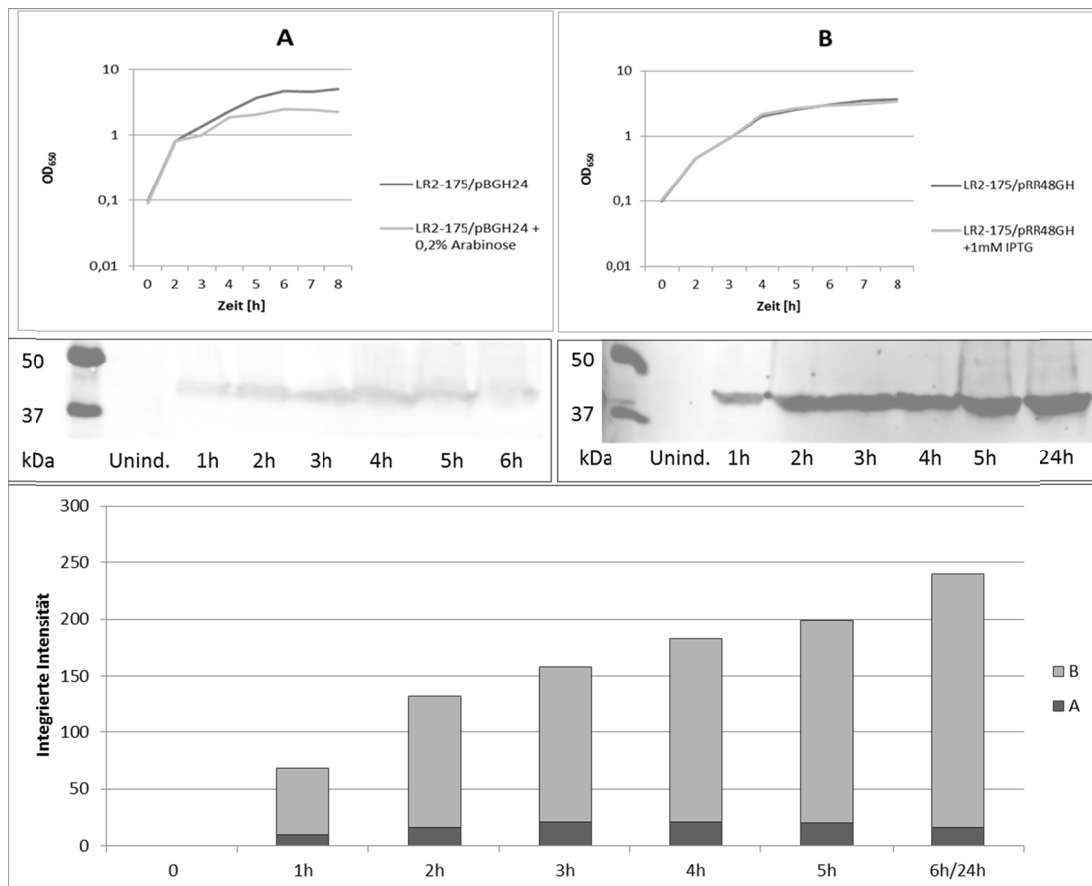


Abbildung 3.1: Vergleich des Wachstums von LR2-175/pRR48GH und LR2-175/pBGH24

Oben: Abbildung A zeigt das Wachstum des plasmidkodierten EIICB^{Glc} im pBAD24 Vektor, Abbildung B im pRR48-Vektor. Im Ersteren wird das Wachstum der Zellen durch die Überexpression von EIICB^{Glc} beeinträchtigt.

Mitte: Links: Western Blot mit den Proben, die während der Wachstumskurve A genommen wurden. Rechts: entsprechende Proben der Wachstumskurve B.

Unten: Quantifizierung der Western Blot-Signale. A: pBGH24, B: pRR48GH. Die Expression des EIICB^{Glc}(His)₆-Proteins von dem pRR48GH-Vektor liefert mehr Protein als die von dem pBGH24-Plasmid.

Der Vektor pRR48GH eignet sich gut für die Überexpression von EIICB^{Glc}(His)₆ und wurde entsprechend für die nachfolgend beschriebenen Experimente eingesetzt.

3.1.2 Optimierung der Reinigung von EIICB^{Glc}(His)₆

Für das Cystein-Scanning ist es notwendig, das zu untersuchende Protein von den anderen Proteinen der Zelle zu trennen. Die Optimierung der Reinigung von EIICB^{Glc}(His)₆ ist im folgenden Abschnitt beschrieben.

Für die Reinigung mittels Affinitätschromatographie enthält das plasmidkodierte EIICB^{Glc} einen C-terminalen „Tag“ aus 6 Histidinen (His)₆. Die Reinigung wurde zunächst nach einem Standardprotokoll mithilfe von Ni-NTA-Säulen der Firma Qiagen durchgeführt. Als Basis wurde der Äquilibrierungspuffer eingesetzt (s. Material und Methoden). Es wurden Zellen des Stammes LR2-175, die *ptsG* mit den Kodons für den (His)₆-„Tag“ auf dem Vektor pRR48GH trugen, getestet. Die Induktion erfolgte mit 1mM IPTG. Abweichend von der zuvor beschriebenen Reinigung (s. Abschnitt 2.5.3) wurde außerdem bei einer OD₆₅₀=0,4 induziert und bei einer OD₆₅₀=0,8 geerntet. Die Zellen wurden einer einminütigen Ultraschallbehandlung unterzogen. Die Solubilisierung erfolgte auf Eis oder bei 4°C mit Triton-X-100 als Detergenz. Die pH-Werte vor der Reinigung wurden durch den jeweiligen Puffer (Äquilibrierungspuffer 2, Waschpuffer 2 und Elutionspuffer 2) bestimmt, nach der Reinigung wurde das Eluat auf pH=7 eingestellt. Die Proben der einzelnen Schritte der Reinigung wurden einem Western Blot mit Anti-His-Antikörpern unterzogen. Dabei konnte beobachtet werden, dass EIICB^{Glc}(His)₆ unter den gewählten Bedingungen nicht an die Matrix der Säule binden konnte und somit verloren ging (Abbildung 3.2).

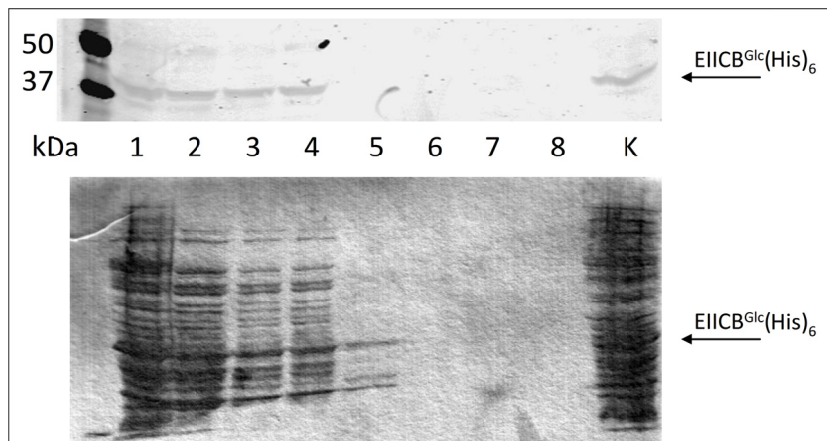


Abbildung 3.2: Fraktionen der Reinigung des Proteins EIICB^{Glc} mit Ni-NTA-Säulen

1: Rohextrakt, 2: Pellet nach niedrigtouriger Zentrifugation, 3: Überstand nach Ultrazentrifugation, 4: 1. Durchflussfraktion, 5: 1. Waschschritt, 6: 2. Waschschritt, 7: 1. Elutionsfraktion, 8: 2. Elutionsfraktion, K: Kontrolle der Antikörperfunktion. Oben: Immunoblot, unten: Coomassieblau. Die Überproduktion des Proteins funktioniert (1) ebenso wie die Solubilisierung (3). Das Protein bindet jedoch nicht an den Ni-NTA-Säulen (4) und geht verloren.

Um die Reinigung zu optimieren, wurden einige Parameter geändert. So wurden die Induktionsbedingungen umgestellt (Induktion erst bei OD₆₅₀=1; Ernte der Zellen 1, 2, 3, 4 oder 5 Stunden nach Induktion) und Puffer mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen eingesetzt (Äquilibrierungspuffer: 10mM Imidazol,

Waschpuffer: 20mM Imidazol, Elutionspuffer 250mM Imidazol; alle Puffer waren auf pH=8 eingestellt). Neben Triton-X-100 wurden als Detergenz für die Solubilisierung ebenfalls LDAO oder Octyl-POE verwendet. Keine dieser Änderungen brachte den gewünschten Erfolg, sodass die Reinigung über die Ni-NTA-Säulen aufgegeben wurde.

Alternativ wurde auch die Ni-NTA-Agarose von Qiagen getestet. In Hinblick auf die Annahme, dass der His-,Tag“ möglicherweise schwer zugänglich ist und daher keine Bindung zu den Säulen zustande kommen kann, ist die Ni-NTA-Agarose ein geeigneteres Medium zur Aufreinigung von EIICB^{Glc}(His)₆. Die Inkubationszeit von Matrix und Protein ist hier länger (eine Stunde) und die Matrix ist ebenso wie die Proteinsuspension in ständiger Bewegung, so dass die Bindung eines schwer zugänglichen His-,Tags“ eher möglich ist. Die Inkubation mit Ni-NTA-Agarose wie im Material- und Methoden-Abschnitt beschrieben, führte zu einer erfolgreichen Reinigung von EIICB^{Glc}(His)₆ (Abbildung 3.3). Die Protokolle für die Überexpression und die Reinigung der Proteine konnten daher auch für die später konstruierten Einzel-Cystein-Varianten genutzt werden und sind im Material- und Methoden-Teil im Detail beschrieben (s. Abschnitt 2.3.4 u. 2.5.3)

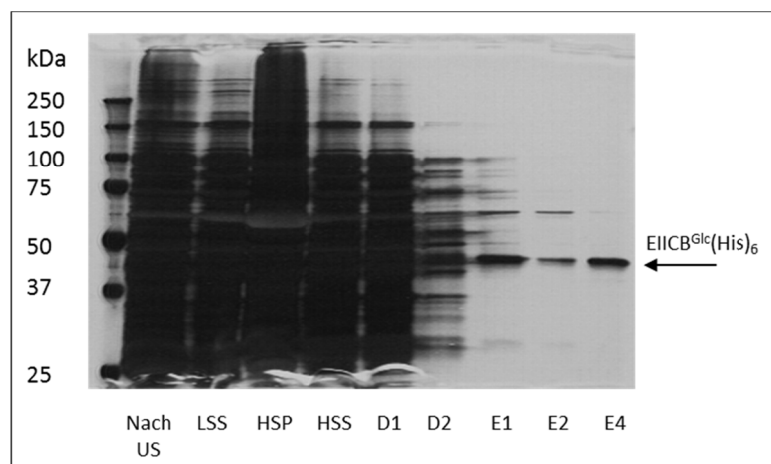


Abbildung 3.3: Fraktionen der Reinigung von EIICB^{Glc} mit der Ni-NTA-Agarose von Qiagen (Silberfärbung)

US: Ultraschall, LSS: Low-speed-supernatant (Überstand nach niedrigtouriger Zentrifugation), HSS: High-speed-supernatant (Überstand nach hochtouriger Zentrifugation im Anschluss an die Solubilisierung), D: Durchfluss (Proteinelat nach Zugabe von Waschpuffer, der 20mM Imidazol enthält), E: Eluat (nach Zugabe von Elutionspuffer, 250mM Imidazol).

3.1.3 Konstruktion einer cysteinfreien funktionellen Mutante von EIICB^{Glc}

Um das Cystein-Scanning (Cys-Scanning) durchzuführen, benötigt man zunächst ein Protein, in dem alle nativen Cysteine ausgetauscht wurden, da diese sonst zusammen mit den zu untersuchenden, neu eingebrachten Cysteinen von den Sulfhydryl-Reagenzien markiert werden. EIICB^{Glc} enthält drei natürlich vorkommende Cysteine: C204, C326 und C421. Während C204 und C326 nicht essentiell für die Funktion des Proteins sind

[52], kommt dem letzten Cystein an Position 421 eine besondere Bedeutung zu. Dieses ist verantwortlich für die Phosphorylierung von der aus dem Medium aufgenommenen Glukose [63]. Ein Austausch würde ein inaktives Protein verursachen, das nicht mehr in der Lage ist, Glukose zu transportieren. Um dennoch ein funktionelles EIICB^{Glc} für die Cys-Scanning-Analysen zu erhalten, muss zusätzlich eine entkoppelnde Mutation in das Protein eingebracht werden. Die Kombination der Mutanten I296N und C421A erwies sich als geeignet für das Cystein-Scanning, wie in einer vorangegangenen Arbeit getestet wurde [82]. I296N bildet im Gegensatz zu der anderen untersuchten entkoppelnden Mutante K257N ein stabiles Protein. Für die Mutation C421A konnte im Gegensatz zu dem Austausch C421S gezeigt werden, dass sie in der Lage ist, Mlc zu titrieren, was darauf schließen lässt, dass die Struktur dieses Proteins im Vergleich zum WT nicht erheblich verändert vorliegt. Daher wurden in dieser Arbeit diese beiden Mutationen gewählt. Die Mutationen **C204I**, **C326S**, **C421A** und **I296N** wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese sukzessive in den Vektor pRR48GH eingebracht und durch Sequenzierung überprüft. Dieser Vektor, der die entkoppelte, cysteinfreie Mutante von EIICB^{Glc} kodiert, wurde als pEGA8 bezeichnet und als Ausgang für alle weiteren für das Cystein-Scanning nötigen Mutationen verwendet.

Um die Funktionalität dieses Proteins zu überprüfen, wurde das Plasmid pEGA8 in den Stamm LR2-175 transformiert, welcher keine Glukose aufnehmen kann (s. Abschnitt 3.1.1.). Ein weiterer Nachweis erfolgte im Stamm LJ141, in dem die Gene *ptsHlcr* deletiert wurden, so dass die Enzyme, die die Phosphatgruppe vom PEP auf den Glukosetransporter übertragen, nicht vorhanden sind. Des Weiteren sind die Gene für die Glukosetransporter Mgl und GalP deletiert. Die Glukosekinase Glk kann in diesem Stammhintergrund die Phosphorylierung von Glukose übernehmen, die über EIICB^{Glc} transportiert, aber durch die Entkopplung nicht mehr phosphoryliert wird. In beiden Stämmen konnte der Transport und die Verstoffwechslung auf McCGlc-Platten anhand von roten Kolonien nachgewiesen werden (s. Tabelle 3.2). Das auf dem Plasmid pEGA8 kodierte EIICB^{Glc}_{C204I C326S C421A I296N} (His)₆ ist also in der Lage, die Glukose aufzunehmen, ohne dass diese durch das Protein phosphoryliert wird.

Tabelle 3.2: Funktionsnachweis des Glukosetransports einer cysteinfreien, entkoppelten Mutante von EIICB^{Glc} in den Stämmen LJ141 und LR2-175 auf McCGlc-Platten mit und ohne Zugabe von IPTG

pRR48: Leervektor (Negativkontrolle). pRR48GH: WT (Positivkontrolle)

Stamm/Plasmid	ohne IPTG	100µM IPTG
LJ141/pEGA8 (Cystein-frei)	w	3+
LJ141/pRR48GH (WT)	w	w
LJ141/pRR48 (Leervektor)	w	w
LR2-175/pEGA8 (Cystein-frei)	w	3+
LR2-175/pRR48GH (WT)	w	3+
LR2-175/pRR48 (Leervektor)	w	w

In die erfolgreich konstruierte cysteinfreie Mutante von EIICB^{Glc} konnten nun Cysteine an verschiedenen Positionen eingebracht und in Hinblick auf ihre Lage relativ zur Cytoplasmamembran untersucht werden.

3.1.4 Konstruktion von Single-Cystein-Varianten von EIICB^{Glc} für das Cystein-Scanning

Um das Cystein-Scanning durchzuführen, müssen einzelne Cysteine in die Aminosäurestruktur des zu untersuchenden Proteins eingefügt werden. Dabei ist es einerseits nötig, Cysteine an bekannten Positionen des Proteins einzubringen, die später als Kontrollen dienen. Kontrollpositionen, von denen in vorangegangenen Experimenten unterschiedlicher Arbeitsgruppen eine eindeutige Position in Bezug auf die Cytoplasmamembran vorhergesagt wurde, sind bei dem hier zu untersuchenden Protein EIICB^{Glc} die Aminosäuren 180 und 472 [12, 76]. Die Aminosäure Q180 wurde dem Periplasma zugeordnet, während die Aminosäure E472 in der cytoplasmatischen B-Domäne liegt. Die Austausche Q180C und E472C wurden ebenfalls jeweils per ortsgerichteter Mutagenese einzeln in das Plasmid pEGA8 eingebracht (s. Tabelle 3.3). Andererseits wird das Cystein-Scanning dazu benutzt, Aufschluss über die Bereiche des Proteins zu liefern, deren Topologie in Hinsicht auf die Cytoplasmamembran unbekannt sind. Hierzu werden Cysteine an ungeklärten Positionen eingebracht. Kontrovers diskutiert wird dabei bei dem Glukosetransporter EIICB^{Glc} der Bereich der Aminosäuren 211-355. Für diese Aminosäuren werden durch die bisher erhaltenen Modelle unterschiedliche Positionen in Bezug zur Cytoplasmamembran vorhergesagt (s. Abschnitt 1.2.3). Dem cytoplasmatischen Bereich zwischen den in beiden Modellen unterschiedlich postulierten Helices VI und VII wird zudem die eigentliche Substrattranslokation zugeschrieben [12]. Dieser Bereich ist daher von großem Interesse für die Strukturaufklärung des Glukosetransporters. In Tabelle 3.3 sind alle Single-Cystein-Mutationen des Proteins EIICB^{Glc} aufgeführt, die in dieser Arbeit für das Cystein-Scanning konstruiert wurden, sowie die Benennung der resultierenden Plasmide. Die Tabelle gibt zudem Aufschluss über die postulierte Position in den beiden bisherigen Modellen des Proteins EIICB^{Glc}. Alle Austausche wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese in das Plasmid pEGA8 (EIICB^{Glc}_{C204I C326S C421A I296N}(His)₆) eingebracht und durch Sequenzierung überprüft.

Tabelle 3.3: Konstruktion von Single-Cystein Varianten von EIICB^{Glc}

Aminosäurepositionen, die für die Konstruktion von Single-Cystein-EIICB^{Glc}-Varianten ausgewählt wurden. Normal: Positionen, die als Kontrollen für die Cystein-Scanning-Etablierung dienten. Fett: Positionen, die ausgewählt wurden, um die Struktur konträr diskutierter Positionen aufzuklären (Unterschiedliche Zuordnung im Erni- oder Lengelermodell) oder weitere Einblicke in den wichtigen cytoplasmatischen Loop zwischen den postulierten Helices VI und VII zu erhalten (s. Abschnitt 1.2.3). Die eingesetzten Oligonukleotide für die Mutagenesen und resultierenden Plasmidnamen sind angegeben.

Position	Erni-Model	Lengeler-Model	Resultierendes Plasmid	Oligonukleotide
Q180	Außen	Außen	pEGA9	PtsG Q180C+/-
E472	Innen	Innen	pEGA12	PtsGE472C+/-
S42	Außen	Außen	pEGA13	S42C+/-
S54	Membranständig	Membranständig	pEGA15	S54C+/-
A64	Membranständig	Membranständig	pEGA26	PtsG A64C+/-
G230	Innen	Innen	pEGA21	PtsG 230C+/-
L250	Innen	Innen	pEGA18	L250C+/-
L289	Membranständig	Innen	pEGA17	L289C*+/-
E301	Außen	Innen	pEGA14	E301C*+/-
H339	Innen	Außen	pEGA16	H339C+/-
S351	Innen	Außen	pEGA22	PtsGS351C+/-

3.1.5 Funktionsüberprüfung der Einzel-Cystein Varianten von EIICB^{Glc}

Bei allen konstruierten Mutanten (Tabelle 3.3) wurden 5 Austausche gegenüber der ursprünglichen Aminosäuresequenz vorgenommen. Dabei handelt es sich um die Entfernung der drei nativen Cysteine sowie um das neu eingebrachte Cystein, dessen Position ermittelt werden soll. Zusätzlich wurde die entkoppelte Mutation I296N eingebracht, um den Transport von Glukose zu gewährleisten, die durch den Austausch des Cysteins C421A ansonsten inhibiert wäre. Es ist notwendig, die Funktionalität dieser modifizierten Proteine nachzuweisen, da ein nicht funktionelles Protein in seiner Struktur möglicherweise stark vom WT-Protein abweicht und somit beim Cystein-Scanning Ergebnisse erhalten werden, die sich nicht auf das native Protein übertragen lassen. Die Überprüfung der Funktionalität der einzelnen Mutanten des Proteins EIICB^{Glc} erfolgte dabei auf McCGlc-Platten, wie in Tabelle 3.2 gezeigt. Der Nachweis erfolgte im LR2-175-Stammhintergrund (Mutationen in allen zellulären Glukoseaufnahme-Systemen, Glukokinase für die Phosphorylierung von Glukose) auf McCGlc-Ampicillin-Platten mit 100µM IPTG. Alle Konstrukte waren hier in der Lage, den Phänotyp des glukosenegativen Stammes zu komplementieren und sind somit funktionell. Dieser Funktionsnachweis über McC-Platten ist umso wichtiger, da eine Charakterisierung der Mutanten durch Transporttests nicht erfolgen konnte, wie die nachfolgenden Experimente zeigen. Aufgrund des entkoppelten Phänotyps der eingesetzten Mutanten konnte davon ausgegangen werden, dass der Transport von Glukose gegenüber dem WT deutlich verringert ist [63]. Um zu testen, ob eine quantitative und daher genauere Bestimmung der Transportrate über radioaktive Transporttests dennoch erfolgen kann, wurden einige Konstrukte (alle außer A64C, G230C, L250C, L289C K150E und S351C) radioaktiven Transporttests unterzogen, wie im Material und Methodenteil angegeben. Als Substrat wurde radioaktiv markierte α -Methylglukose verwendet. Dieses Substrat wird ebenso wie Glukose über EIICB^{Glc} von den Zellen aufgenommen, kann aber nicht verstoffwechselt werden. Daher ist es möglich, die aufgenommene Menge des Substrats

in den Zellen über die Radioaktivität zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 zu sehen.

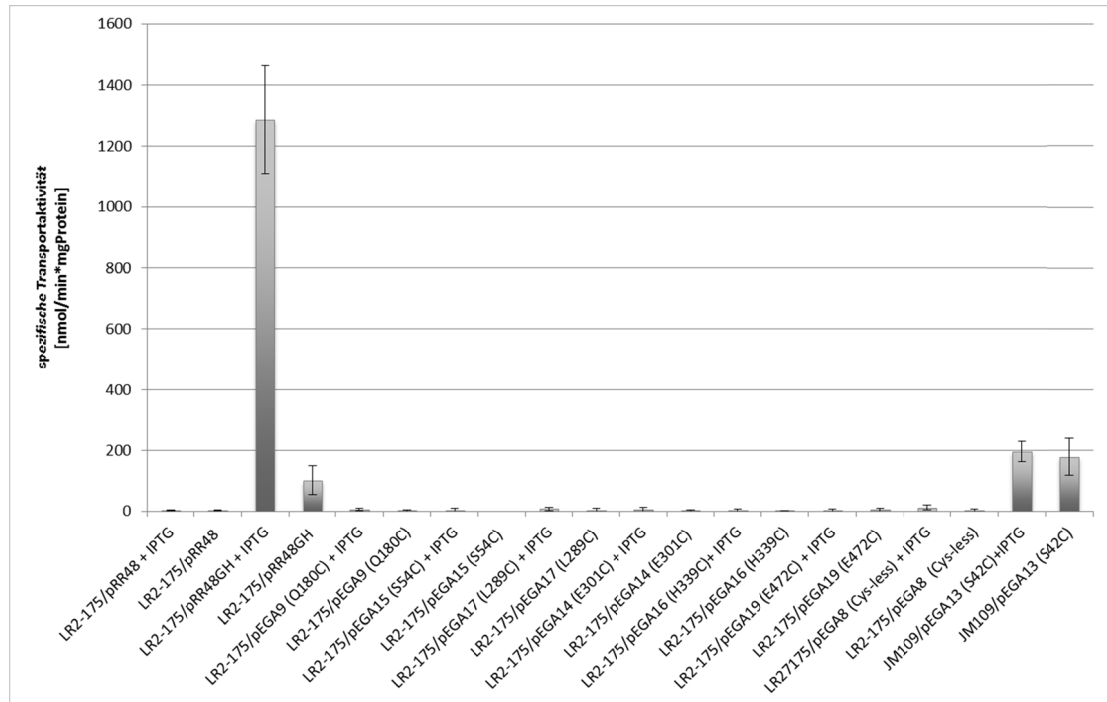


Abbildung 3.4: Spezifische Aktivitäten der Single-Cystein-Mutanten aus den radioaktiven Transporttests

pRR48: Leervektor, pRR48GH: WT. Weitere Erläuterungen im Text.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Einzel-Cystein-Mutanten fast vollständig inaktiv im Bezug auf ihre Transportfähigkeiten für das Substrat α -Methylglukose sind. Das Konstrukt mit der Mutation S42C bildet hier eine Ausnahme, zeigt aber im Gegensatz zum Wildtyp ebenfalls stark verringerten Transport. Auch Messungen nach 5, 15 und 30 Minuten zeigten ein ähnliches Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Alle getesteten Mutanten tragen Austausche der nativen Cysteine, d.h. es handelt sich um Proteine, denen auch das für die Phosphorylierung des Substrats nötige Cystein an Position 421 fehlt. Dieses Cystein liegt in der löslichen B-Domäne des Glukostransporters EIICB^{Glc}. Um zu untersuchen, ob das Defizit im Transport durch eine intakte B-Domäne ausgeglichen werden kann, wurde diese auf einem kompatiblen Vektor (pJEM1 [121]) mit dem Plasmid pEGA8 kotransformiert, überexprimiert und die spezifische Transportaktivität dieser Zellen untersucht (Abbildung 3.5).

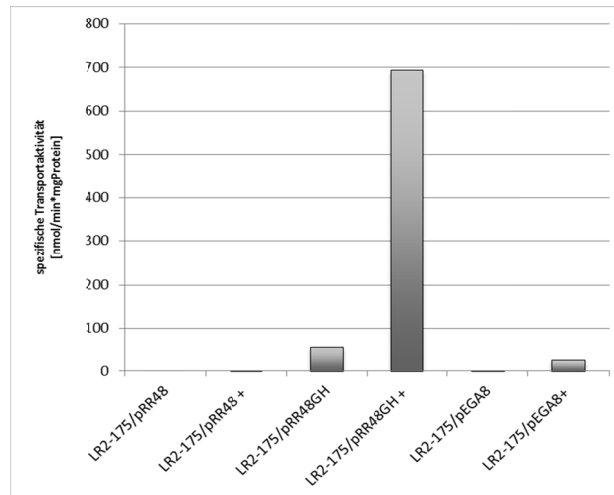


Abbildung 3.5: Spezifische Transportaktivität der WT-Variante und der cysteinfreien Mutante mit der B-Domäne in trans

pRR48: Leervektor, pRR48GH: WT, pEGA8: cysteinfreie Mutante von EIICB^{Glc} mit I296N-Austausch. Die mit + bezeichneten Proben waren mit dem Plasmid pJEM1 kotransformiert worden, welches die B-Domäne von EIIB^{Glc} kodiert.

Auch in diesem Experiment konnte eine wesentliche Transportaktivität nur für den Wildtyp von EIICB^{Glc} gemessen werden. Die geringe Transportaktivität der Mutanten trotz Koexpression der WT-B-Domäne bestätigt die Annahme, dass der entkoppelte Phänotyp I296N zu einer niedrigeren Transportaktivität im Gegensatz zum WT führt. Der entkoppelnde Austausch I296N liegt dabei in der C-Domäne und kann durch das WT-EIIB^{Glc} nicht komplementiert werden. Entkoppelte Mutanten zeigen eine geringere Affinität für ihr Substrat [63] und nehmen daher weniger α -Methylglukose auf. Des Weiteren stellt die α -Methylglukose ein artifizielles Substrat dar. Wird dieses überdies nicht oder kaum phosphoryliert, wie es bei entkoppelten Mutanten der Fall ist [63], kann es zu einem Efflux des Substrats kommen und dieses im Transporttest daher nicht detektiert werden.

Dies zeigt, dass die Mutationen, die in EIICB^{Glc} eingebracht werden mussten, um das Cystein-Scanning zu ermöglichen, dazu führen, dass die Proteine in ihrem Transport für Glukose eingeschränkt sind. Ein Nachweis der Funktionalität der entkoppelten Varianten ist daher unter den Bedingungen im Transporttest nicht möglich, da der K_m für Glukose in den Mutanten offensichtlich zu hoch ist. Der Funktionsnachweis auf McCGlc-Medium ist jedoch erfolgreich. In diesem Fall findet im Vergleich zu den Transporttests eine verlängerte Inkubation bei höherer Substratkonzentration statt, weswegen der Transport detektiert werden kann. Das heißt, dass die Einzel-Cystein-Proteine die Glukose zwar langsamer aufnehmen als der Wildtyp, sie aber nach wie vor für die Glukoseaufnahme funktionell sind. Für den Funktionsnachweis der eingesetzten Einzel-Cystein-Mutanten ist der Nachweis auf McC-Platten daher ausreichend.

3.1.6 Optimierung des Cystein-Scannings für Einzel-Cystein-Mutanten von EIICB^{Glc}

Da mit der Reinigung von EIICB^{Glc}(His)₆ und der Konstruktion von funktionellen Einzel-Cystein-Varianten die Voraussetzungen für das Cystein-Scanning geschaffen waren, sollte diese Methode mit allen in Tabelle 3.3 aufgeführten plasmid-kodierten EIICB^{Glc}-Varianten getestet werden. Als Grundlage diene das Protokoll von Sevket Turgut, welches für die Strukturaufklärung des Proteins EII^{Mtl} eingesetzt worden war [86]. Bei diesem Protokoll werden Zellen der Einzel-Cystein-Mutanten mit thiol-spezifischen Reagenzien (Biotinmaleimid, membranpermeabel und Stilben, membranimpermeabel) inkubiert. Das Prinzip des Cystein-Scannings zeigt Abbildung 3.6.

Wird das markierende Reagenz („Label“, hier Biotinmaleimid) mit ganzen Zellen inkubiert, die ein periplasmatisches Cystein tragen, so kommt es zu einer Markierung dieses Cystein-Restes, die später mit einem Immunoblot detektierbar ist. Wurde zuvor ein blockierendes Reagenz zugefügt (Block, hier Stilben), kann das Biotinmaleimid (BM) nicht mehr an das Cystein binden. Ein Signal im späteren Immunoblot ist nicht nachweisbar. Da das blockierende Reagenz nicht membranpermeabel ist, kann ein cytoplasmatischer Cysteinrest dagegen nicht blockiert werden; das markierende Reagenz aber durchquert die Membran und gibt so auch ein Signal, wenn vorher mit Stilben blockiert wurde (s. Abbildung 3.6). Auf diese Weise ist es möglich, zwischen einem cytoplasmatischen und einem periplasmatischen Cystein zu unterscheiden. Membranständige Cystein-Reste sollten unter diesen Bedingungen nicht zugänglich sein [86].

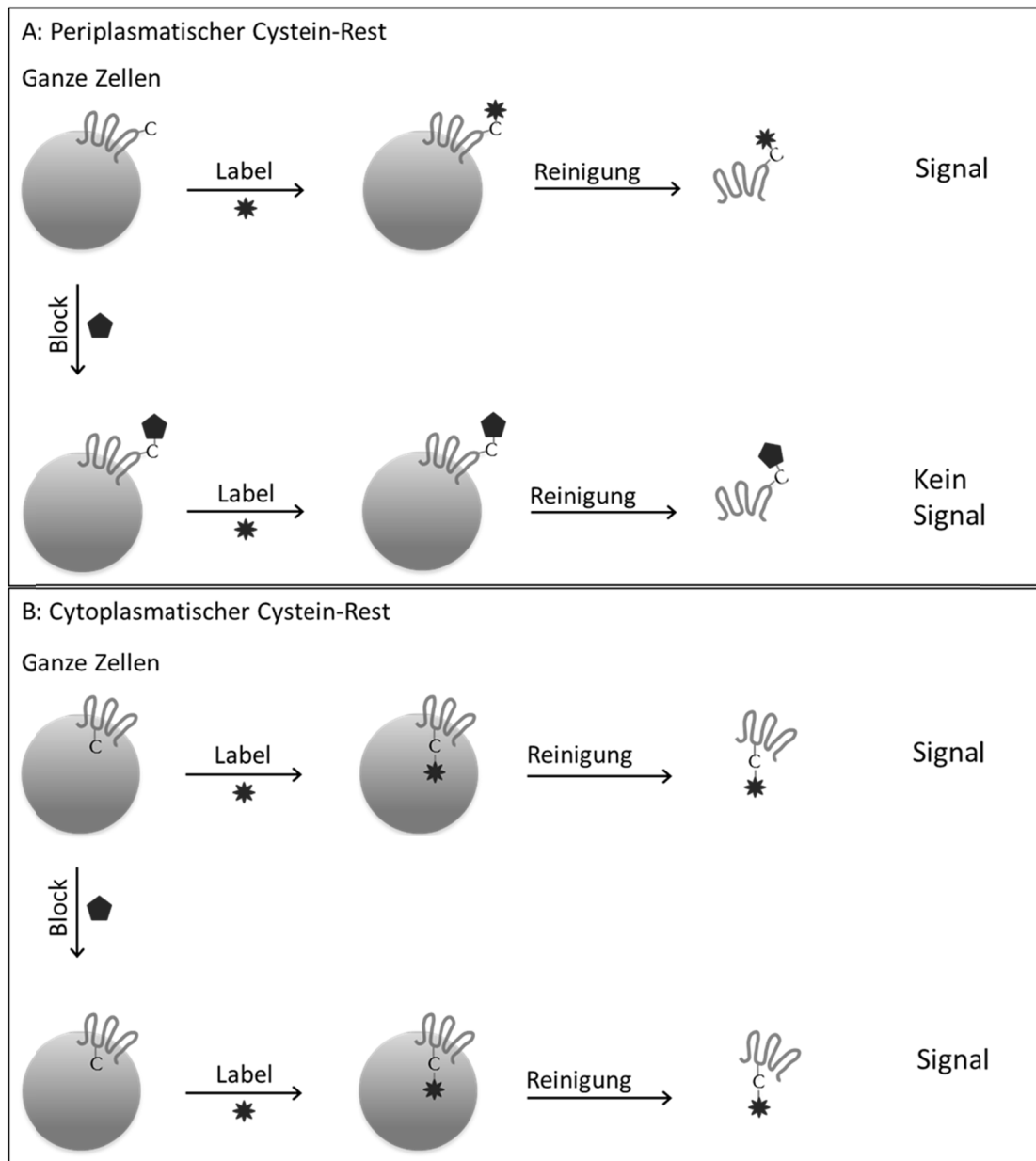


Abbildung 3.6: Prinzip des Cystein-Scannings

Verändert nach [85]. Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Signale, die sich nach einem Western Blot mit Antikörpern gegen die Cystein-spezifische Markierung ergeben. Bei einem perioplasmatischen Cystein wird nur ein Signal detektiert, wenn mit Biotinmaleimid alleine behandelt wird. Ist der Cystein-Rest cytoplasmatisch, so wird ein Signal auch nach Behandlung mit dem blockierenden Reagenz erwartet, da dieses nicht membranpermeabel ist.

Für das Cystein-Scanning wurden die angezogenen und IPTG-induzierten Zellen in KPi-Puffer gewaschen, resuspendiert und in Portionen aufgeteilt, die unterschiedlich behandelt wurden. Probe 1 bezeichnet ganze Zellen, die zunächst mit Stilben (zum Blockieren) und anschließend mit Biotinmaleimid (zum Markieren) inkubiert wurden. Probe 2 wurde nur mit BM inkubiert. Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und anschließend gereinigt, wie im Absatz 3.1.2 beschrieben. Die Proben

wurden dann einem Immunoblot mit Antikörpern unterzogen, die spezifisch gegen den His-,Tag“ der Einzel-Cysteinin-Proteine waren. So konnte die Überproduktion und die Reinigung der Proteine überprüft werden. Alle Proben wurden einem zweiten Western Blot unterzogen, bei dem sie mit fluoreszenzmarkierten Streptavidinproteinen inkubiert wurden. Das Streptavidin geht mit dem Biotinanteil des Biotinmaleimids eine Bindung ein. Dadurch wurde das BM markiert und konnte detektiert werden. Das Stilben wurde nicht markiert. Die erwarteten Signale für periplasmatische oder cytoplasmatische Cysteine sind Abbildung 3.6 zu entnehmen.

Um zunächst unspezifische Bindungen des BM an die cysteinfreie Mutante von EIICB^{Glc} auszuschließen, wurde das Plasmid pEGA8 (kodiert für EIICB^{Glc}_{C204I C326S C421A I296N} (His)₆) in den Stamm LJ120 transformiert, der eine Deletion des *ptsG*-Gens trägt. Wie erwartet, wurden hier keine Signale nach der Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Streptavidin detektiert (Abbildung 3.7).

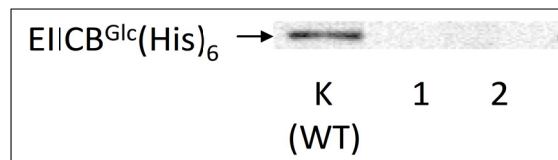


Abbildung 3.7: Cysteinfreie Mutante von EIICB^{Glc} im Stammhintergrund LJ120 (Δ *ptsG*).

K: Kontrolle (WT-EIICB^{Glc}(His)₆ mit drei nativen Cysteinen). 1: ganze Zellen, Stilben + Biotinmaleimid, 2: ganze Zellen, Biotinmaleimid. Das Streptavidin kann das EIICB^{Glc}_{C204I C326S C421A I296N} (His)₆ nicht binden, da es kein Cystein gibt, das zuvor mit BM markiert wurde. Unspezifische Bindungen von Biotinmaleimid können daher ausgeschlossen werden.

Unspezifische Bindungen des Biotinmaleimids konnten somit ausgeschlossen werden. Das Cystein-Scanning wurde im Anschluss mit den Einzel-Cystein-Proteinen durchgeführt. Die Methode wurde zunächst mit den Konstrukten getestet, deren Positionen in beiden Modellen des Proteins EIICB^{Glc} identisch sind und die daher als periplasmatische Kontrolle (Austausch Q180C) bzw. als cytoplasmatische Kontrolle (Austausch E472C) verwendet wurden.

Bei diesen ersten Versuchen konnten mehrere methodische Probleme festgestellt werden. Die Reinigung von EIICB^{Glc} unter diesen veränderten Bedingungen (Zugabe von Stilben und BM, KPi-Puffer) war nicht immer spezifisch. So konnten im Western Blot mit Streptavidin mitunter auch Signale auf anderer Höhe als der für EIICB^{Glc} erwarteten detektiert werden. Es wurden also auch andere Proteine als das zu Untersuchende eluiert. Da durch das bekannte apparente Molekulargewicht von EIICB^{Glc} und auch den simultan durchgeführten spezifischen Nachweis über den His-,Tag“ das von EIICB^{Glc} verursachte Signal eindeutig zugeordnet werden konnte, wurde hier auf eine weitere Optimierung verzichtet. Des Weiteren waren die Fluoreszenzsignale insgesamt sehr schwach. Deswegen wurde das anfängliche Zellvolumen von 30ml auf 300ml erhöht, um mehr Zellen und damit auch mehr Protein zu erhalten, welches bei einer Detektion zur

Verfügung steht. Ein weiteres schwerwiegendes Problem zeigte sich in der Reproduktion der Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Durch die Verwendung desselben SDS-Gels für Proben einer Position sowie die gleiche Proteinkonzentration aller Proben konnte die Blotineffizienz als Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Um zu prüfen, ob die Schwankungen in den Ergebnissen von instabilen Fluoreszenz-Streptavidin-Proteinen verursacht werden, wurden die Zellen in einem weiteren Optimierungsexperiment maximal mit Biotinmaleimid markiert und die Auswertung der Ergebnisse durch Chemolumineszenz und Fluoreszenz miteinander verglichen. Hierzu wurde das Kontrollprotein mit dem cytoplasmatischen Cysteinrest verwendet. Die gewaschenen und geernteten Zellen wurden in drei gleiche Portionen aufgeteilt und unterschiedlich behandelt. Portion A wurde mit Biotinmaleimid wie oben angegeben markiert, dann mit Ethanol-Trockeneis eingefroren und aufgetaut (zweimal) und erneut mit Biotinmaleimid markiert. Dieses wiederholte Einfrieren und Auftauen („Freeze-thaw“) sollte die Membranen durchlässiger für das BM machen, da Turgut in seiner Arbeit Probleme mit der Permeabilität des BM bemerkt hatte [86]. Portion B wurde erst markiert, dann über „Freeze-Thaw“ behandelt und anschließend nicht weiter markiert. Portion C wurde erst mit „Freeze-Thaw“ behandelt und dann mit Biotinmaleimid markiert. Nach einem Western Blot wurden die Signale so detektiert wie erwartet; das stärkste Signal konnte von den zweifach markierten Proben detektiert werden. Im Anschluss wurden die Proben A, B und C ebenfalls mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase behandelt und mittels Chemolumineszenz detektiert. Hier wurden die gleichen Signalintensitäten ermittelt wie mit dem Fluoreszenznachweis, sodass die Unregelmäßigkeiten nicht auf instabile Fluoreszenzproteine zurückzuführen sind (Abbildung 3.8).

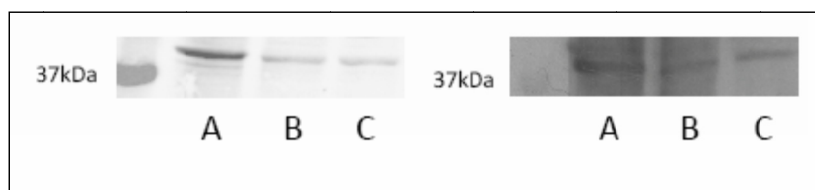


Abbildung 3.8: Vergleich der Signalintensität zwischen Fluoreszenzmarkierungen und Chemolumineszenz

Probe A: Markierung mit BM, Permeabilisierung der Membran durch Freeze-Thaw, erneute Markierung mit BM, Probe B: Markierung mit BM, Permeabilisierung durch „Freeze-Thaw“, Probe C: Permeabilisierung der Membran durch „Freeze-Thaw“, Markierung mit BM. Links: Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmarkierungen mit einem Infrarotscanner. Rechts: Auswertung erfolgte mittels Chemolumineszenz über Meerrettich-Peroxidase.

Ein weiteres Problem der Methode zeigte sich darin, dass die erhaltenen Signale nicht in jedem Fall den Erwartungen entsprachen (Abbildung 3.9).

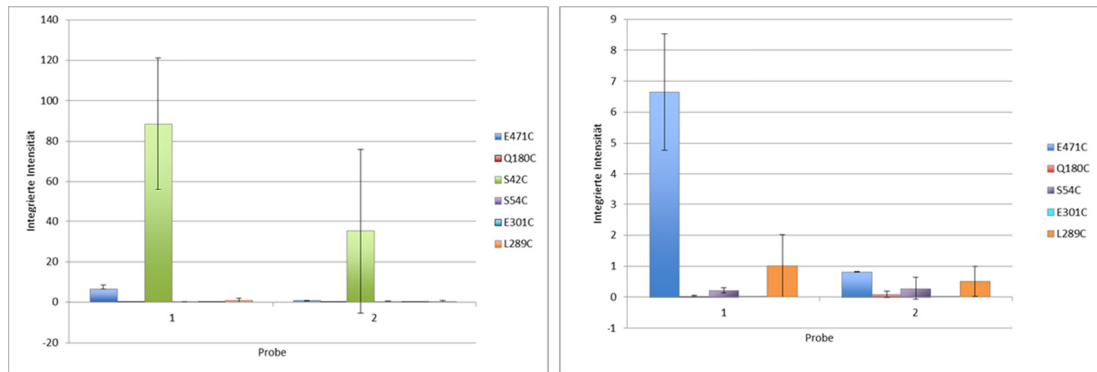


Abbildung 3.9: Erste Ergebnisse des Cystein-Scannings

Ergebnisse des Cystein-Scannings mit verschiedenen Einzel-Cystein-Mutanten. Links: alle Einzel-Cystein-Mutanten, rechts: gleiche Ergebnisse, aber der Übersichtlichkeit halber ohne die Probe S42C abgebildet. 1: Stilben + Biotinmaleimid, 2: Biotinmaleimid.

So zeigt das Cystein C42, welches in beiden bislang erstellten Modellen periplasmatisch vorliegt, ein stärkeres Signal bei Probe 1 als bei 2. Dies widerspricht den Erwartungen für einen periplasmatischen Rest (s. Abbildung 3.6), da bei dieser Probe eine Vorinkubation mit Stilben stattfand, die die Bindung von BM verhindern sollte. Für die cytoplasmatische Kontrolle E472C wurde für die Proben 1 und 2 ein Signal erwartet, da der cytoplasmatische Cysteinrest für das Stilben nicht zugänglich ist. Probe 2 (nur BM) liefert lediglich ein sehr schwaches Signal für diese Probe. Die einzelnen Mutanten sollten mit der periplasmatischen Kontrolle 180C und der cytoplasmatischen Probe 472C verglichen werden, um die jeweiligen Cystein-Austausche zuordnen zu können. Abbildung 3.9 zeigt jedoch, dass die Proteine $\text{EIICB}^{\text{Glc}}_{\text{Q180C}}$ und $\text{EIICB}^{\text{Glc}}_{\text{S42C}}$, die beide dem Periplasma zugeordnet werden (vgl. Abbildung 1.4), unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Eine Zuordnung unbekannter Positionen war daher nicht möglich. Einige Positionen, wie das C42 zeigten extrem starke Signale, waren also offensichtlich stark zugänglich für das Biotinmaleimid, während andere Reste wie C301 keinerlei Markierung mit Biotinmaleimid zeigten. Dieser Umstand könnte einen Hinweis auf mögliche Strukturen, wie haarnadelartige Strukturen, Helices oder β -Faltblattstrukturen liefern, die mit Hilfe dieser Methode nicht aufgeklärt werden können. Insgesamt gestaltete sich die Auswertung der Ergebnisse, die mit diesem Protokoll erhalten wurden, als schwierig.

Um die Methode mit Proteinen zu überprüfen, die schon einmal erfolgreich mit dem benutzten Protokoll untersucht wurden, wurden auch Tests mit einer Mutante des Transporters EII^{Mtl} der von Turgut konstruierten Einzel-Cystein Varianten des Proteins EII^{Mtl} durchgeführt (Austausch S158C). Hierbei zeigte sich, dass das Stilben keine Blockierung des Cysteinrests vollbringt (Daten nicht gezeigt). Das BM konnte trotz Vorinkubation mit Stilben an Cysteine binden. Daher wurde statt Stilben nun das ebenfalls membranimpermeable, thiol-spezifische MTSET [134] eingesetzt. Das verwendete Protokoll wurde auch durch weitere Änderungen optimiert. Ein Vergleich des für das Cystein-Scanning eingesetzten KPi-Puffers mit dem bei der

Reinigungsoptimierung verwendeten Lysispuffers zeigte beispielsweise, dass der Lysispuffer sich für die Solubilisierung und Reinigung der EIICB^{Glc}-Proteine besser eignet als der KPi-Puffer (Abbildung 3.10). Daher wurde im Folgenden für die Markierung der Lysispuffer eingesetzt, jedoch ohne Imidazol. Dieses wurde erst direkt vor der eigentlichen Reinigung mit der Ni-NTA Agarose zugefügt.

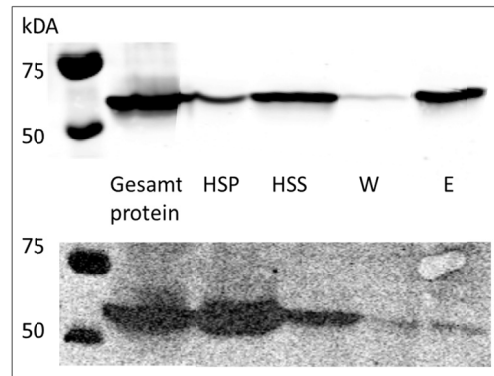


Abbildung 3.10: Vergleich verschiedener Puffer beim Cystein-Scanning mit dem Protein EIICB^{Glc}(His)₆

Oben: Reinigungsfractionen vom Cys-Scanning mit Lysispuffer, unten: Reinigungsfractionen vom Cys-Scanning mit KPi-Puffer. Die Solubilisierung und das Eluieren sind effektiver mit Lysispuffer, da weniger Protein bei der Solubilisierung verloren geht (HSP) und mehr Protein in der Elutionsfraktion vorhanden ist. HSP: High-speed-Pellet (nach UZ), HSS: High-Speed Supernatant (Überstand nach UZ), W: Waschfraktion, E: Eluat.

Die im Rahmen der Optimierung veränderten Parameter umfassten den Einsatz des Lysispuffers, ein höheres Zellvolumen, die Ernte der Zellen in der späten logarithmischen Phase, den Einsatz von MTSET und veränderte Inkubationszeiten mit BM. Das veränderte Protokoll kann dem Material- und Methoden-Teil entnommen werden (s. Abschnitt 2.5.5). Diese Methode wurde demnach nachfolgend für das Cystein-Scanning eingesetzt. Erneut wurden mit diesem Protokoll zunächst die Kontrollplasmide untersucht.

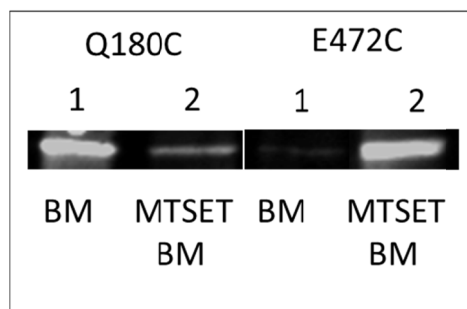


Abbildung 3.11: Cystein-Scanning mit den Kontrollpositionen EIICB^{Glc}_{Q180C} und EIICB^{Glc}_{E472C}

Cystein-Scanning der Proben Q180C und E472C. Links jeweils die Probe, die nur mit BM markiert wurde, rechts die Probe, die vor der Markierung mit BM zunächst mit MTSET blockiert wurde. Gezeigt ist ein Western Blot mit biotinspezifischen Streptavidinproteinen, die ein Fluoreszenzsignal tragen. Bei der periplasmatischen Kontrolle (Q180C) ist das erste Signal stärker als das zweite, bei der cytoplasmatischen Kontrolle (E472C) verhält es sich genau umgekehrt. Auf diese Weise ist eine Unterscheidung zwischen PP und CP möglich.

Die periplasmatische Kontrolle Q180C zeigt ein starkes Signal nach der Markierung mit BM und ein deutlich schwächeres Signal, nachdem zuvor mit MTSET[®] geblockt wurde. Dies entspricht den Erwartungen (s. Abbildung 3.6). Dieser Umstand ist ein Nachweis dafür, dass MTSET das Cystein blockiert, was bei dem vorher benutzten Stilben nicht der Fall war. Bei gleicher Behandlung der cytoplasmatischen Kontrolle E472C zeigt die Probe, die zunächst geblockt und dann markiert wurde, ein starkes Signal. Dies ist zu erwarten, da das Biotinmaleimid die Membran durchqueren kann, das blockierende Reagenz MTSET aber nicht. Unerwartet ist hingegen der Umstand, dass die Probe, die mit BM alleine behandelt wurde, ein extrem schwaches Signal zeigt. Auch hier wurde ein starkes Signal erwartet (s. Abbildung 3.6). Auch wenn die Erwartungen bezüglich der Markierung nicht bestätigt wurden, so können nun mit dem veränderten Protokoll periplasmatische und cytoplasmatische Cysteine eindeutig unterschieden werden. Darüber hinaus waren die Ergebnisse mit diesem Protokoll reproduzierbar. Dieses optimierte Protokoll wurde daher im Folgenden für die Untersuchung der Einzel-Cystein-Mutanten verwendet. Die Ergebnisse jeder Kontrolle und auch jeder später untersuchten Mutante wurden in mindestens drei unabhängigen Durchläufen verifiziert.

3.1.7 Ergebnisse des Cystein-Scannings mit verschiedenen Einzel-Cystein Mutanten von EIICB^{Glc}

Mit dem zuvor beschriebenen Protokoll wurden auch die anderen Einzel-Cystein-Varianten des Proteins EIICB^{Glc}(His)₆ (s. Tabelle 3.3) untersucht und mit den Kontrollpositionen verglichen. Abbildung 3.12 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

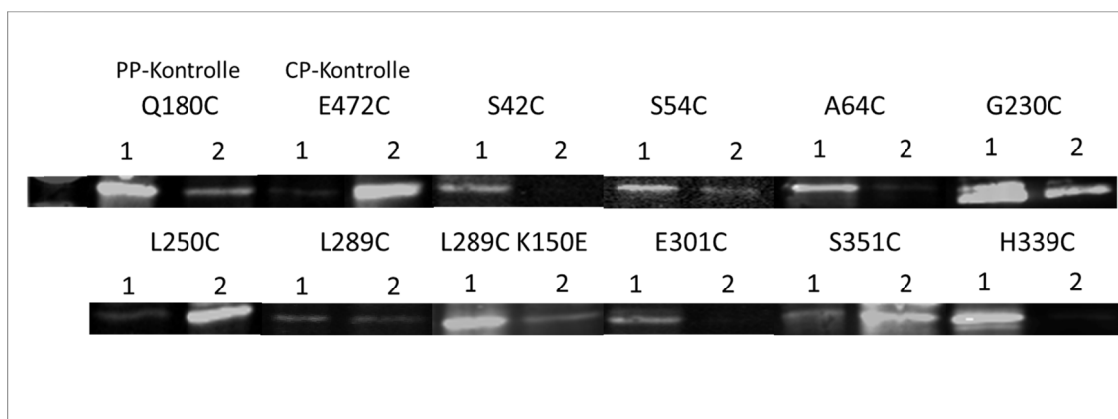


Abbildung 3.12: Ergebnisse der Cystein-Scanning-Untersuchung

Die gezeigten Ergebnisse konnten in mindestens drei unabhängigen Durchführungen verifiziert werden. EIICB^{Glc}_{Q180C} ist die periplasmatische Kontrolle, EIICB^{Glc}_{E472C} die cytoplasmatische Kontrolle. Alle anderen Konstrukte wurden mit diesen beiden Kontrollen verglichen, um Aufschluss über ihre Lage hinsichtlich der Cytoplasmamembran zu erhalten. 1: Markierung mit BM, 2: Markierung mit MTSET und anschließender BM-Behandlung. CP: Cytoplasma, PP.: Periplasma. Weitere Erläuterungen im Text.

Ausgehend von den Kontrollpositionen können die Positionen 351C und 250C dem Cytoplasma, die Positionen 42C, 54C, 64C, 230C, 301C und 339C dem Periplasma zugeordnet werden. 54C und 64C, die nach beiden bisher vorliegenden Modellen in der Membran liegen, scheinen daher für das BM zugänglich zu sein. Bemerkenswert ist, dass

die Position 289 ein annähernd gleich starkes Signal in beiden Probenansätzen (1 und 2) zeigt. Diese Position liegt in dem Lengeler-Modell in dem cytoplasmatischen Loop zwischen Helix VI und VII, dem eine hohe Beweglichkeit nachgesagt wird (Abbildung 1.4). In dieses Protein wurde zusätzlich die Mutation K150E eingebracht und das Cystein-Scanning wiederholt. Der Austausch K150E zeigt eine „locked-in“-Konformation [67]. Das bedeutet, dass die Änderung der Konformation nach der Bindung und Phosphorylierung von Glukose, die für den Translokationsschritt essentiell ist, nicht mehr stattfindet. Daher liegt EIICB^{Glc} mit dieser Mutation in einem sehr viel rigideren Status vor. Diese eingeschränkte Bewegung ermöglicht es, zu untersuchen, ob die Positon L289C mit K150E ein eindeutiges Signal zeigt. Dies ist der Fall, wie Abbildung 3.12 zeigt. Zusammen mit der K150E-Mutation kann die Position L289C der periplasmatischen Seite zugeordnet werden.

Die durch das Cystein-Scanning erhaltenen Ergebnisse lassen zunächst keine eindeutige Zuordnung in Hinsicht auf eines der beiden in Abbildung 1.4 gezeigten Modelle zu.

3.1.8 Zusammenfassung für das Cystein-Scanning

Die Methode des Cystein-Scannings für das Protein EIICB^{Glc} ließ sich nach dem bei [85] gezeigten Prinzip etablieren. Die Reinigung von EIICB^{Glc}(His)₆ konnte mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose durchgeführt werden. Die Funktionalität jeder eingesetzten Mutante wurde auf McCGlc-Platten überprüft. Als Expressionsnachweis diente jeweils der Nachweis des His-„Tags“ über spezifische Antikörper. Als Sulfhydrylreagenzien wurden Biotinmaleimid und MTSET verwendet. Von den zwölf getesteten Mutanten konnten 3 dem Cytoplasma zugeordnet werden, alle anderen dem Periplasma (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Zuordnung der mittels Cystein-Scanning getesteten Mutanten hinsichtlich der Cytoplasmamembran

Periplasmatisch	Cytoplasmatisch
Q180C	E472C
S42C	L250C
S54C	S351C
A64C	
G230C	
L289C	
E301C	
H339C	

3.2 Mutantenselektion zur Identifizierung entkoppelter Mutanten des Proteins EIICB^{Glc}

Für das Cystein-Scanning ist es notwendig, ein entkoppeltes Protein einzusetzen, um ein funktionelles, cysteinfreies Protein zu erhalten. Bislang sind für das Protein EIICB^{Glc} vier Mutationen bekannt, die einen entkoppelten Phänotyp verursachen, namentlich R203S, V206A, K257N und I296N. Der entkoppelte Phänotyp ist dadurch charakterisiert, dass die Proteine Glukose wie der WT transportieren und phosphorylieren, wenn der Phosphatfluss über die PTS-Enzyme gewährleistet ist. Ist dies nicht der Fall, z.B. in einem Stammhintergrund, in dem die Gene *ptsH* und *ptsI* deletiert wurden, können die entkoppelten Proteine die Glukose jedoch mit geringerer Affinität über erleichterte Diffusion aufnehmen, ohne sie dabei zu phosphorylieren [63]. Die Mutationen EIICB^{Glc}_{I296N} und EIICB^{Glc}_{K257N} wurden im Vorfeld dieser Arbeit auf ihre Eignung für den Einsatz im Cystein-Scanning überprüft [82]. Während EIICB^{Glc}_{K257N} abgebaut wird und daher kein stabiles Protein bildet, wurde gezeigt, dass sich EIICB^{Glc}_{I296N} für das Cystein-Scanning eignet. In einem Stammhintergrund, in dem EIICB^{Glc} nicht phosphoryliert werden kann, sollten weitere entkoppelte Mutanten von EIICB^{Glc} identifiziert und ggf. als Basis für das Cystein-Scanning verwendet werden. Darüber hinaus kann die Untersuchung weiterer Mutanten neue Einblicke in die Struktur- und Funktionsbeziehungen des Proteins EIICB^{Glc} liefern.

3.2.1 EIICB^{Glc}-Mutantenselektion im Stamm LJ141

Der *Escherichia coli*-Stamm LJ141 trägt eine Deletion der Gene *ptsHIerr*, der Gene also, die für die Proteine EI, HPr und EIICB^{Glc} des Phosphotransferasesystems kodieren. Normalerweise wird ein Phosphatrest über diese Proteine auf EIICB^{Glc} transferiert, welches dann das Substrat Glukose sowohl aufnehmen, als auch phosphorylieren kann. In diesem Stammhintergrund liegt EIICB^{Glc} in seiner dephosphorylierten Form vor und ist aufgrund der strengen Kopplung von Transport und Phosphorylierung im Wildtyp-Protein nicht in der Lage, Glukose zu transportieren (s. Tabelle 3.2). Um Glukose verwerten zu können, muss die Glukose in Glukose-6-Phosphat umgewandelt werden, die dann durch die Glykolyse abgebaut werden kann. Der Stamm enthält ein intaktes *glk*-Gen, welches die Glukokinase kodiert, die diese Umwandlung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat PTS-unabhängig katalysiert. Des Weiteren sind die Galaktose-Transporter Mgl und GalP, die auch Glukose transportieren können, deletiert. Kolonien eines solchen Stammes zeigen einen leicht rosafarbenen Phänotyp auf McCGlc-Platten, da die Gene für das Mannose-PTS, über das ebenfalls Glukose aufgenommen werden kann, nicht deletiert vorliegen und Glukose so minimal aufgenommen und verstoffwechselt wird. Dieser Stamm LJ141 wurde mit dem Plasmid pRR48ptsG, welches das *ptsG*-Gen enthält, transformiert und zusammen mit dem entsprechenden Antibiotikum und 100µM IPTG auf McCGlc-Platten ausgestrichen. Wie erwartet waren alle gebildeten Kolonien weiß-rosa auf dieser Platte. Die Kolonien wurden jede Woche mehrmals auf einer frischen Platte unter den gleichen Bedingungen ausgestrichen. Zusätzlich wurden die Platten nicht

im Kühlschrank gelagert, sondern bei Raumtemperatur verwahrt, wo es den Zellen möglich war, weiterhin zu wachsen. Nach einigen Tagen wurden rote Papillen in einigen dieser Kolonien gefunden. Diese Kolonien wurden gereinigt und aus den Zellen wurde das Plasmid pRR48ptsG isoliert und erneut in LJ141 transformiert, um zu überprüfen, ob dieser Phänotyp von einer Mutation in dem plasmidkodierten EIICB^{Glc} verursacht wird oder im Genom des Stammes LJ141 eine andere Suppressionsmutation stattgefunden hatte. War Ersteres der Fall, wurde das Plasmid durch Sequenzierung auf Mutationen überprüft. Auf diese Weise wurde ein Basenaustausch im plasmidkodierten *ptsG*-Gen gefunden, der einen entkoppelten Phänotyp zur Folge hat. In dieser Mutante liegt die Aminosäure Arginin 203 zu einem Histidin ausgetauscht vor. (Das Kodon cgt wurde durch eine Punktmutation in cat geändert). Diese Mutation wurde so vorher noch nicht beschrieben. Allerdings gibt es eine andere Mutation dieser Aminosäure, die ebenfalls einen entkoppelten Phänotyp zeigt, R203S [63]. Diese Aminosäure scheint also eine große Rolle dabei zu spielen, den Transport der Glukose mit der Phosphorylierung zu koppeln. Dass der entkoppelte Phänotyp durch die Mutation einer Aminosäure, die schon vorher mit diesem Phänotyp in Bezug gebracht wurde, verursacht wird, deutet darauf hin, dass nur die bisher bereits bekannten Aminosäuren R203, V206, I296 und K257 durch Mutation den definierten entkoppelten Phänotyp zeigen können. Auch für das Protein EII^{Mtl} konnten nur vier entkoppelte Mutationen isoliert werden [65]. Das hier dargestellte Selektionsverfahren eignet sich für die Suche nach einem entkoppelten Phänotyp des Proteins EIICB^{Glc}.

3.2.2 Charakterisierung der Mutante EIICB^{Glc}_{R203H} in Hinblick auf ihre Fähigkeit, Mlc zu titrieren

Für einen möglichen Einsatz der Mutante für die Cystein-Scanning-Analysen sollte getestet werden, ob EIICB^{Glc}_{R203H} in der Lage ist, Mlc zu binden. Dies würde auf eine Struktur schließen lassen, die sich nicht stark vom WT unterscheidet, was für das Cystein-Scanning essentiell ist. Dazu wurde das Plasmid, das das Gen für EIICB^{Glc}_{R203H} enthält (pEGA2, pRR48-Derivat), in den Stamm LZ150/F[']lacØ(*ptsGp, o-lacZ*) transformiert und ein β-Gal-Aktivitätstest gemacht. Als Kontrollen wurden ebenfalls die Plasmide pRR48 und pRR48ptsG in diesem Stammhintergrund untersucht. Der Stamm LZ150 trägt Deletionen des *lacZ*- und des *ptsG*-Gens [57]. Das F[']-Plasmid trägt das *lacZ*-Gen hinter der WT-Promotor-Operator-Sequenz des *ptsG*-Gens, welche die Bindestelle von Mlc darstellt. So kann in diesem Stamm die Bindung von Mlc an der β-Galaktosidase-Aktivität überprüft werden. Wird der Repressor Mlc von den plasmidkodierten EIICB^{Glc}-Varianten gebunden, kann er nicht an den F[']-Plasmidkodierten Operator-Promotor-Bereich vor dem *lacZ*-Gen binden. Dieses kann daher transkribiert und die β-Galaktosidaseaktivität quantitativ bestimmt werden. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 3.13 dargestellt.

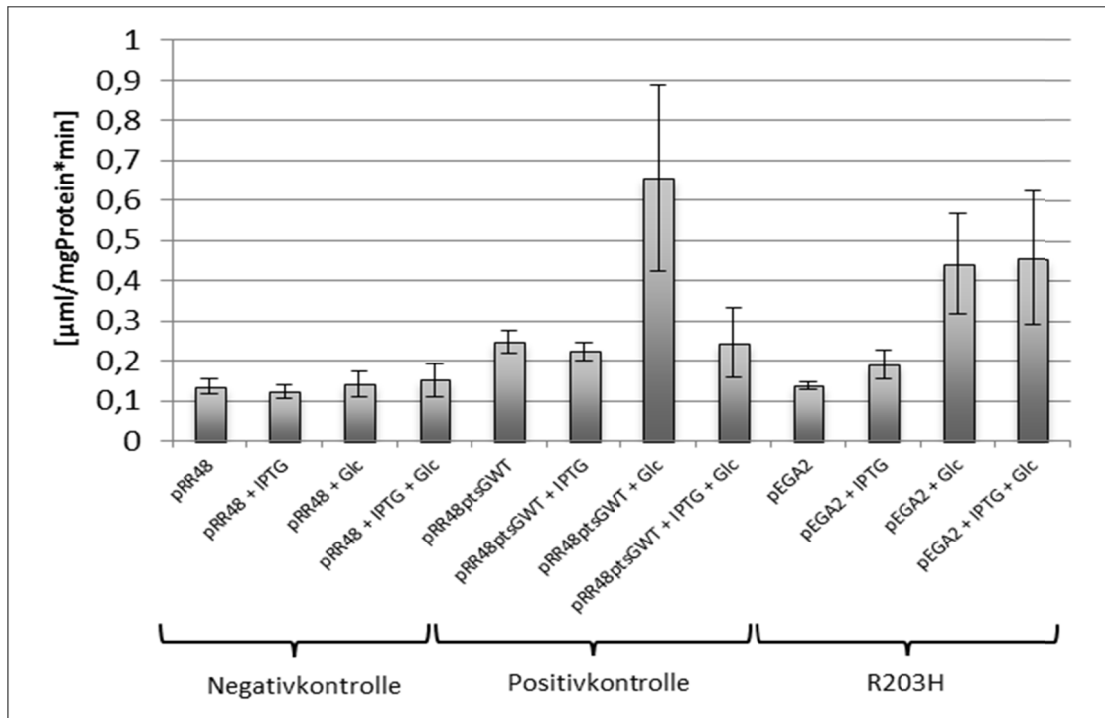


Abbildung 3.13: Titration von Mlc durch EIICB^{Glc}_{R203H} im Stamm LZ150/F'lacΦ(ptsGp,o-lacZ)

Gemessen wurde die β-Galaktosidase-Aktivität (weitere Einzelheiten im Text). Als Kontrolle wurde der Leervektor pRR48 und das plasmidkodierte Wildtypprotein (pRR48ptsGWT) verwendet. Ein Vergleich der Aktivitäten zeigt, dass die Mutante EIICB^{Glc}_{R203H} (pEGA2) unter diesen Bedingungen ebenso wie der Wildtyp in der Lage ist, Mlc zu titrieren. IPTG: die Plasmide lagen mit 1mM IPTG induziert vor. Glc: Es wurden 0,2% Glukose bei der Anzucht der Plasmide eingesetzt. Eine hohe Aktivität bedeutet, dass der Repressor Mlc durch die plasmidkodierte EIICB^{Glc}-Varianten von der *ptsGp,o*-Region titriert wurde.

Die β-Galaktosidase-Aktivitäten des Leervektors (pRR48) sind erwartungsgemäß niedrig. Es liegt kein EIICB^{Glc} vor, welches Mlc binden könnte. Das *lacZ*-Gen wird daher von Mlc reprimiert. Die β-Galaktosidase-Aktivitäten dieser Kontrolle zeigen das Basalniveau der β-Galaktosidaseaktivität. Beim WT (pRR48ptsGWT) sind höhere Aktivitäten bei den Proben ohne externe Glukose zu erkennen, die darauf zurückzuführen sind, dass in diesem Fall EIICB^{Glc}-Moleküle in der Zelle vorhanden sind, die in der Lage sind, Mlc zu binden. Dabei liegen jedoch die meisten Proteine phosphoryliert vor, da keine externe Glukose im Medium vorhanden ist. Daher ist der Großteil der Proteine nicht in der Lage, Mlc zu binden und die β-Galaktosidaseaktivität ist somit nach wie vor niedrig. Bei Zugabe von Glukose verändert sich das Gleichgewicht zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem EIICB^{Glc} zugunsten der unphosphorylierten Form. Diese bindet Mlc, das *lacZ*-Gen kann daher abgelesen werden und die β-Galaktosidase-Aktivität ist dementsprechend hoch. Auffällig ist, dass die Induktion der EIICB^{Glc}-Transkription diesen Vorgang inhibiert. Für EIICB^{Glc}_{R203H} konnte beobachtet werden, dass es sich ähnlich verhält wie der WT. Bei Zugabe von Glukose steigt die β-Galaktosidase-Aktivität an, was dafür spricht, dass auch diese Mutante in der Lage ist, Mlc zu binden. Die β-Galaktosidase-Aktivität fällt jedoch unwesentlich geringer aus als die beim WT gemessene. In diesem Fall bewirkt eine Induktion mit IPTG auch eine erwartete höhere Titration von Mlc, da mehr EIICB^{Glc}_{R203H}-Moleküle vorliegen, die Mlc binden können.

Ein weiterer Versuch sollte in dem Stammhintergrund STB154 durchgeführt werden. Als Ausgang dieses Stammes diente der oben genannte Stamm LZ150/ $F'lac\emptyset$ (*ptsGp,o-lacZ*), bei dem über eine P1-Transduktion die Gene *ptsHlcr* deletiert wurden [82]. Da unter diesen Bedingungen die B-Domäne des plasmidkodierten EIICB^{Glc} nur unphosphoryliert vorliegen kann, wird der globale Repressor Mlc von der Operator-Sequenz des *ptsG*-Gens (*ptsGp,o-lacZ*) im WT konstitutiv titriert. Durch die *ptsHlcr*-Deletion liegt kein phosphoryliertes EIICB^{Crr} in der Zelle vor. Mit diesem Teststamm kann überprüft werden, ob die Mutante EIICB^{Glc}_{R203H} im unphosphorylierten Zustand in der Lage ist, Mlc zu titrieren. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in der Abbildung 3.14 zu sehen. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten des WT und der R203H-Mutante sind alle höher als die für den Leervektor gemessenen, der Repressor Mlc kann also titriert werden. In diesem Fall steigt die β -Galaktosidase-Aktivität des WT-Proteins wie erwartet mit der Induktion der Transkription der Proteine. Die Zugabe von Glukose bewirkt hier kaum einen Unterschied, da die EIICB^{Glc}-Proteine durch die Deletion der Gene *ptsHlcr* unphosphoryliert vorliegen. Das Protein EIICB^{Glc}_{R203H} ist demnach in der Lage, Mlc zu titrieren. Es könnte daher ebenfalls für das Cystein-Scanning eingesetzt werden.

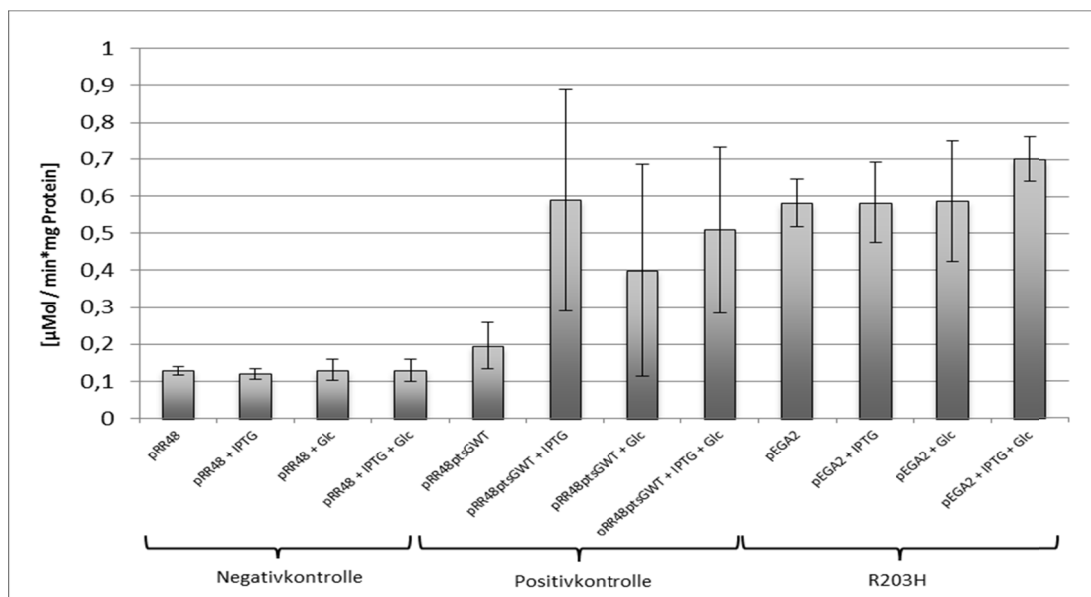


Abbildung 3.14: Fähigkeit der Mutante EIICB^{Glc}_{R203H}, Mlc zu titrieren

Gemessen wurde die β -Galaktosidase-Aktivität im Stamm STB154 (Einzelheiten im Text). Als Kontrollen wurden der Leervektor pRR48 und das plasmidkodierte WT-Protein (pRR48ptsGWT) verwendet. Ein Vergleich der Aktivitäten zeigt, dass die Mutante R203H (pEGA2) unter diesen Bedingungen ebenso wie der Wildtyp in der Lage ist, Mlc zu titrieren. IPTG: die Plasmide lagen induziert vor mit 1mM IPTG. Glc: Es wurden 0,2% Glukose bei der Anzucht der Plasmide eingesetzt. Eine hohe Aktivität bedeutet, dass der Repressor Mlc von der *ptsGp,o*-Region titriert.

3.2.3 Fähigkeit der Mutante EIICB^{Glc}_{R203H} zur Aufnahme von Ribitol und Arabinitol

Da die bisher charakterisierten entkoppelten Mutanten alle in der Nähe der Substratbindestelle liegen (Abbildung 1.4), sollte untersucht werden, ob mit dem

entkoppelten Phänotyp der Mutante EIICB^{Glc}_{R203H} auch ein sogenannter „relaxed“ Phänotyp einhergeht. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass der eigentlich für Glukose und α -Methylglukose sowie für L-Sorbose und 5-Thioglukose und, mit niedriger Affinität, für Mannose spezifische Transporter EIICB^{Glc} [19, 22, 23, 57] in der Lage ist, andere Kohlenhydrate zu transportieren [135]. Um dies zu testen, wurde das Plasmid pEGA2, welches die Mutation im *ptsG*-Gen trägt, die für den R203H-Austausch verantwortlich ist, in den Stamm LJ121 transformiert, der eine Deletion der Gene *manXYZ* und *ptsG* trägt. Dieser Stamm ist somit nicht in der Lage, Glukose oder Mannose über die PTS-Transporter aufzunehmen. Auch die Alkohole Ribitol (Rtl) und Arabinitol (Atl) können nicht aufgenommen werden, da *E. coli* K-12 weder die Aufnahmesysteme, noch die Gene für die Stoffwechselproteine für Ribitol und Arabinitol besitzt [128]. Es gibt aber Hinweise darauf, dass es *ptsG*-Mutationen mit erweiterter Substratspezifität gibt, die Arabinitol und Ribitol aufnehmen können [57], aber sensitiv auf ihre Anwesenheit reagieren, da diese nicht verstoffwechselt werden können. Der mit der plasmidkodierten R203H-Mutante des EIICB^{Glc} Proteins transformierte Stamm LJ121 wurde daher auf die Fähigkeit, auf Mannose, Ribitol und Arabinitol zu wachsen, untersucht. Das Wachstum auf Glukose diente als Kontrolle. Die Nachweise erfolgten jeweils auf McC-Platten. EIICB^{Glc} zeigte wie erwartet Wachstum auf Glukose, (3+-Phänotyp). Auf den Kohlenhydraten Mannose, Arabinitol und Ribitol wurden dagegen weiße Kolonien gebildet. Die Zellen waren demnach nicht in der Lage, Mannose in hohen Mengen zu verstoffwechseln und zeigten eine Resistenz gegen Ribitol und Arabinitol, da Kolonien nur gebildet werden können, wenn diese Alkohole nicht aufgenommen werden.

Die entkoppelte Mutante EIICB^{Glc}_{R203H} konnte durch das Wachstum in einem $\Delta ptsHIcrr$ -Stammhintergrund identifiziert werden. Sie ist in der Lage, auch im unphosphorylierten Zustand Glukose zu transportieren. Untersuchungen in Bezug auf ihre Fähigkeit, den Repressor Mlc zu titrieren, zeigten ein wildtypähnliches Verhalten. Es geht keine Erweiterung der Substratspezifität mit dem entkoppelnden Phänotyp einher.

3.3 Dimerisierung der B-Domäne des Proteins EIICB^{Glc}

Es ist bekannt, dass EIICB^{Glc} als Dimer aktiv ist [36]. Während für die membranständige C-Domäne stabile Dimere auch *in vivo* nachgewiesen werden konnten [67], wird davon ausgegangen, dass die lösliche B-Domäne als Monomer vorliegt [45].

Während der Versuchsdurchführungen mit den Cystein-Scanning-Proben, die ohne das denaturierende β -MeOH einer SDS-PAGE unterzogen wurden, konnten mitunter Banden detektiert werden, die möglicherweise von EIICB^{Glc} Dimeren verursacht wurden. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Versuche durchgeführt, in denen sowohl das ganze EIICB^{Glc} als auch nur die B-Domäne in Gegenwart eines Vernetzungsreagenzes

(Formaldehyd) überproduziert wurde. Das Formaldehyd vernetzt Proteine, die beim Zeitpunkt der Zugabe rund 2Å voneinander entfernt sind. Diese Vernetzung kann durch das Erhitzen der Proben wieder aufgehoben werden [113, 136, 137]. Die Detektion und Charakterisierung der Dimere wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.3.1 Dimer-Nachweis des WT

Das Plasmid pTM30GH wurde in den Stamm LR2-175 transformiert. Das Plasmid pTM30GH enthält das *ptsG*-Gen mit Kodons für einen C-terminalen His-, „Tag“-. Die Expression dieses Gens unterliegt der Kontrolle eines Tac-Promotors [126].

Die Überproduktion der Proteine und die Zugabe des Formaldehyds, welches wechselwirkende Proteine dauerhaft miteinander verbindet, wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Reinigung erfolgte über Ni-NTA Agarose. Die Elutionsfraktionen wurden aufgeteilt und eine Hälfte für 10min bei 95°C gekocht, um die Vernetzung aufzuheben. Alle Proben wurden anschließend einem Immunoblot mit Antikörpern gegen den His-, „Tag“ unterzogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.15 zu sehen.

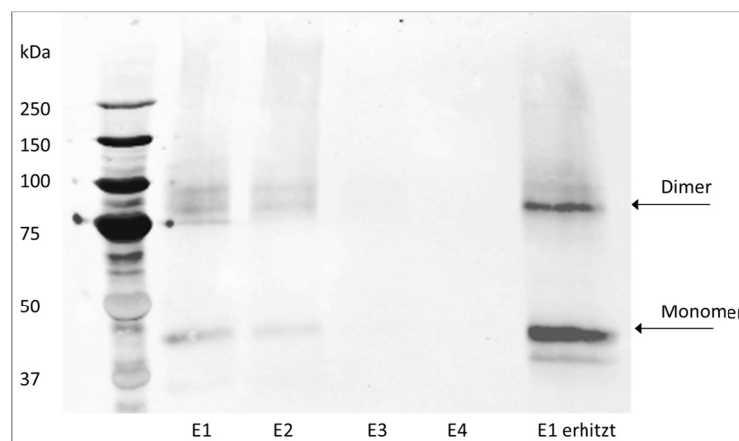


Abbildung 3.15: Vernetzungsexperiment des WT von EIICB^{Glc} im LR2-175-Stammhintergrund

E1-E4: Elutionsfraktionen. Erhitzt: Probe wurde 10min in bei 95°C erhitzt. Monomerbande: 45kDa, Dimerbande: 75kDa.

Deutlich zu erkennen sind Banden mit ca. 45kDa und Banden mit einer Größe von 80-90kDa. Ein Monomer von EIICB^{Glc} hat eine Größe von 50,7kDa [5]. Da die hydrophoben Membranproteine mehr SDS einlagern als durchschnittlich angegeben, laufen die Moleküle schneller durch das Gel und wirken daher kleiner als sie tatsächlich sind [5, 100]. Mit SDS und β -Mercaptoethanol denaturiertes EIICB^{Glc} läuft bei rund 45kDa, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass diese Signale monomeres EIICB^{Glc} darstellen. Die obere Bande könnte, der Größe nach zu schließen, durch dimere EIICB^{Glc}-Proteine verursacht werden. Die Banden für Monomere und Dimere sind am Besten in der Probe zu erkennen, die erhitzt wurde. Durch das Erhitzen wird die

Vernetzung durch das Formaldehyd aufgehoben. Demzufolge können durch das Formaldehyd entstandene Komplexe getrennt werden und besser in das Gel einlaufen [113]. Die durch das Formaldehyd ausgelöste Dimerisierung scheint dabei der Hitze zu widerstehen, da die Dimere in der erhitzten Probe deutlich zu erkennen sind (s. Abbildung 3.15).

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Methode geeignet ist, Dimere des Proteins EIICB^{Glc} nachzuweisen. Die Dimerisierung der Domäne EIIB^{Glc} sollte mit dieser Methode ebenfalls überprüft werden.

3.3.2 Dimer-Nachweis der B-Domäne

Um zu untersuchen, ob die B-Domäne des Proteins EIICB^{Glc} alleine ebenfalls in der Lage ist, Dimerstrukturen zu bilden, wurde der Stamm LR2-175 mit dem Plasmid pTM30BHis transformiert. Die resultierenden Kolonien wurden ebenso behandelt wie der WT. Das Plasmid pTM30BHis enthält Kodons für die Aminosäuren 383-477 des Proteins EIICB^{Glc}, also jener Aminosäuren, die für die EIIB^{Glc}-Domäne inklusive eines Teils der Linkerregion zwischen den beiden Domänen kodiert. N-Terminal ist des Weiteren ein His-, „Tag“ kodiert. Die Größe des exprimierten Proteins beträgt damit rund 10kDa [5]. Die gewaschenen und mit Formaldehyd versetzten Zellen wurden ohne den Solubilisierungsschritt gereinigt und auf ein 15% PAA-Gel geladen.

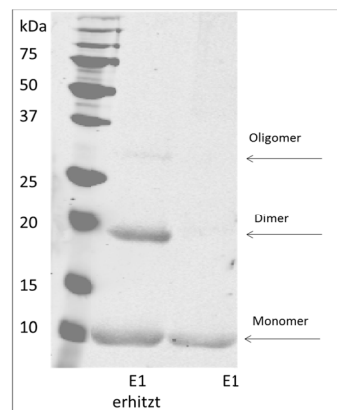


Abbildung 3.16: Formaldehydvernetzung der B-Domäne im LR2-175-Stammhintergrund

Überproduzierte B-Domäne im Stammhintergrund LR2-175. Die Bande auf der Höhe von ca. 10kDa entspricht der monomeren B-Domäne, die Bande auf der Höhe von ca. 20kDa entspricht der dimeren B-Domäne. Auch eine dritte Bande aus Oligomeren kann detektiert werden, sie ist ca. 30kDa groß. Erhitzt: Die Probe wurde 10min bei 95°C erhitzt. E1: Elutionsfraktion 1.

Es konnten auch in diesem Fall Dimere gezeigt werden (Abbildung 3.16). Zusätzlich gibt es eine Bande, die von einer trimeren Struktur gebildet worden sein könnte (ca. 30kDa). Abermals sind die Banden nach dem Erhitzen stärker sichtbar. Die entsprechenden Banden im PAA-Gel wurden mit einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, ausgeschnitten und für die Massenspektrometrie vorbereitet wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben. Mit dieser Behandlung sollte die Identität der Banden verifiziert werden. Ggf. wurden die Proben vor der Coomassiefärbung in einer Speed-

Vac ankonzentriert, um mehr Protein zu erhalten und dadurch besser sichtbar zu machen. Das Ergebnis der Massenspektrometrie-Untersuchung ist in Abbildung 3.17 zu sehen.

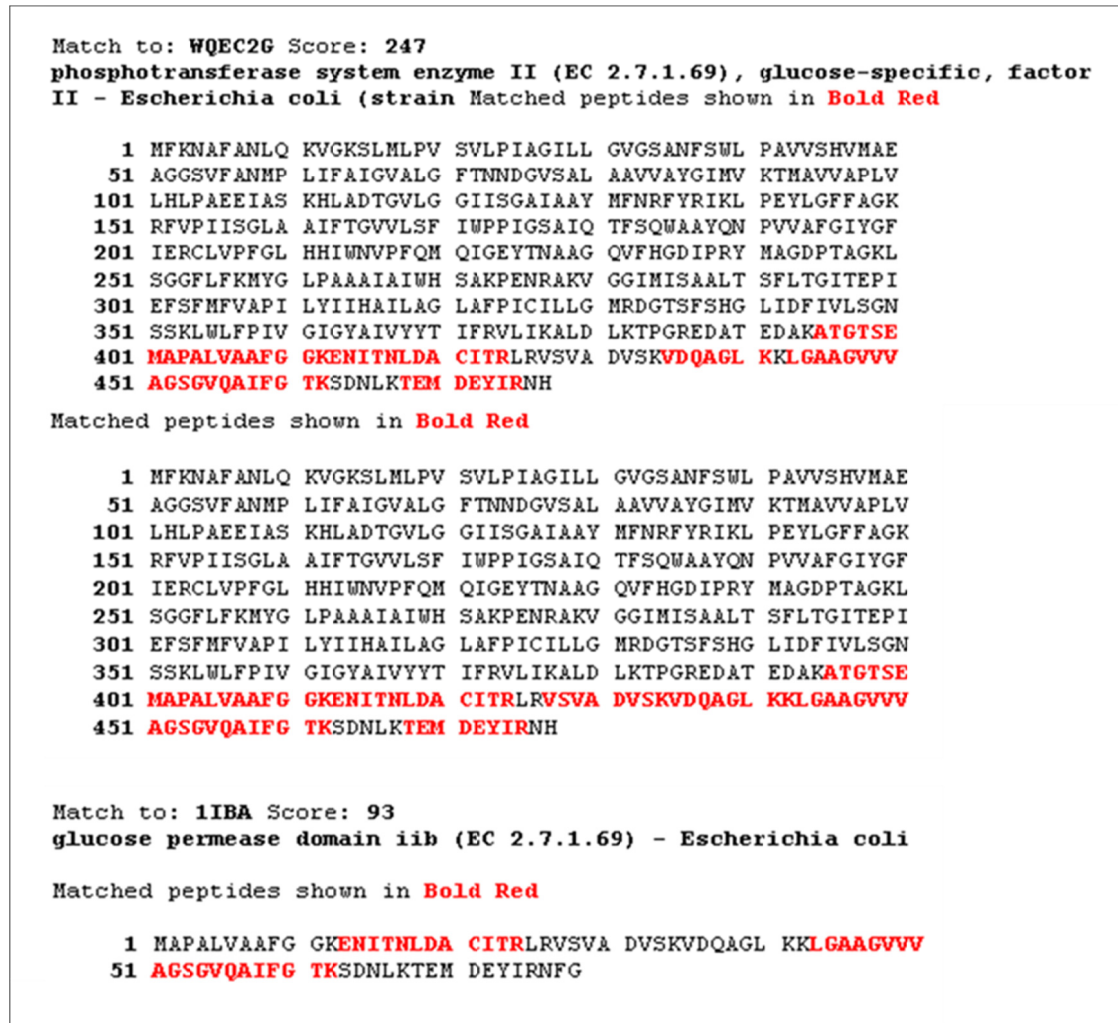


Abbildung 3.17: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der potentiellen Dimerbanden von EIIB^{Glc}

Oben: Monomer-Bande, Mitte: Dimer-Bande, Unten: Oligomer-Bande. In allen drei Fällen wurde bestätigt, dass es sich um die B-Domäne von EIIB^{Glc} handelt, die ab Aminosäure 401 beginnt. Durch die Klonierung beginnt die B-Domäne im Vektor pTM30BHis bei Aminosäure 383, daher sind in der Monomer- und der Dimerbande auch aus diesem Teil noch Aminosäuren zu finden. Massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt von Dr. Stefan Walter, Universität Osnabrück.

Durch diese Untersuchung wurde bestätigt, dass es sich bei den Signalen tatsächlich um EIIB^{Glc} handelt, welches offensichtlich Oligomere bildet.

Die Versuche wurden in dem Stamm LR2-175 durchgeführt. Dieser ist zwar negativ für die Glukoseaufnahme und daher geeignet, die Komplementation von Glukosetransportern zu überprüfen, allerdings sind die Mutationen, die zu diesem Phänotyp beitragen, nicht charakterisiert. So ist es möglich, dass es Punktmutationen im *ptsG*-Gen gibt, durch die das Enzym seine Funktion verliert. Dafür spricht, dass der

Stamm eine hohe Reversionsrate durch Suppressormutanten zeigt. Daher ist es möglich, dass chromosomal kodiertes EIICB^{Glc} in diesem Stamm durchaus exprimiert wird, aber nicht mehr in der Lage ist, Glukose zu transportieren. In diesem Fall besteht die Möglichkeit, dass die C-Domäne dieses Stammes Wechselwirkungen mit der B-Domäne des vektorkodierten EIIB^{Glc}(His)₆ eingeht und dieses nur dadurch in der Lage ist, zu dimerisieren. Die C-Domäne wurde zwar in den Massenspektrometrieanalysen nicht detektiert, dies kann aber möglicherweise darin begründet liegen, dass das mutierte EIICB^{Glc} nicht überproduziert wurde und somit gegebenenfalls in zu niedriger Konzentration vorlag, um mit Hilfe der Massenspektrometrie detektiert zu werden. Um dieses auszuschließen, wurde pTM30BHis ebenfalls in den Stamm LJ120 transformiert und das Crosslinking mit Formaldehyd wiederholt. Der Stamm LJ120 trägt eine Deletion des *ptsG*-Gens. Somit kann es in diesem Stammhintergrund nicht zu einer Wechselwirkung zwischen der B-Domäne und dem chromosomalen EIICB^{Glc} kommen. Die Dimerisierung in diesem Stammhintergrund konnte bestätigt werden (Abbildung 3.18). Auch diese Proben wurden einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen. Die Daten bestätigten, dass es sich bei den Proteinen um EIIB^{Glc} handelt (Daten nicht gezeigt).

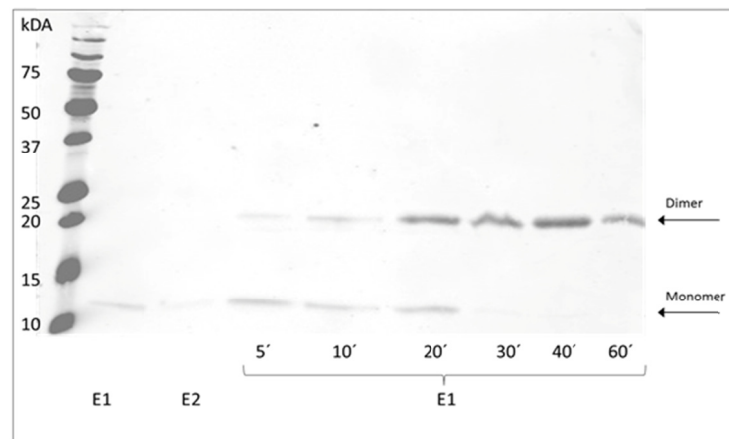


Abbildung 3.18: Vernetzung der B-Domäne im LJ120- Stammhintergrund

E1 und E2: Elutionsfraktionen. 5'-60': Zeit in Minuten, in der die einzelnen Proben bei 95°C gekocht wurden.

Auffällig ist, dass die Dimerbanden bei hoher Hitzeeinwirkung stärker sichtbar werden, während die Bande, die mit den Monomeren korreliert, bei langer Hitzeeinwirkung schwächer wird.

Um zu überprüfen, ob die gefundenen Dimere auch ohne das Vernetzungsreagenz Formaldehyd gebildet werden, wurde die Probe LJ120/pTM30BHis zweimal parallel angezogen und induziert, einmal jedoch mit Formaldehyd inkubiert, während die andere

Probe nicht mit Formaldehyd versetzt wurde. Beide Ansätze wurden parallel gereinigt und verarbeitet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.19 zu sehen.

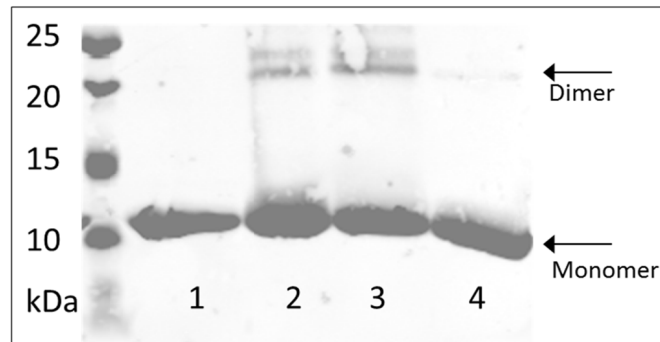


Abbildung 3.19: Ergebnis der Crosslinking-Versuche mit pTM30BHis im Stamm LJ120 mit und ohne Formaldehyd

1: LJ120/pTM30BHis ohne Formaldehyd; 2: mit Formaldehyd, für 10min bei 95°C erhitzt; 3: mit Formaldehyd ohne Erhitzen; 4: ohne Formaldehyd für 10min bei 95°C erhitzt. Auf der Höhe von ca. 10kDa ist die Monomerbande zu sehen, das Signal auf ca. 20kDa Höhe ist das Dimersignal.

Die Dimere kommen verstärkt durch die Aldehydvernetzung zustande. Eine leichte Dimerbande ist aber auch bei der Probe zu erkennen, die nicht vernetzt, aber für 10min bei 95°C erhitzt wurde. Dies ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass die ersten Hinweise auf die Dimerbildung in dieser Arbeit aus Versuchen stammen, in denen ebenfalls kein Formaldehyd eingesetzt wurde. Das Formaldehyd scheint die Dimerisierung zu unterstützen, sie findet aber in geringerem Ausmaß auch ohne das Vernetzungsreagenz statt. Auch ohne den Einfluss von Formaldehyd scheint Hitze die Bildung von Dimeren zu verstärken.

3.3.3 Nachweis der Dimerisierung der EIIB^{Glc}-Domäne über das bakterielle „Two-Hybrid“-System

Um die durch die Formaldehyd-Experimente erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf die B-Domäne zu überprüfen, wurde die Dimerisierung der B-Domäne mit dem bakteriellen Two-Hybrid-System untersucht [117]. In diesem steht das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle eines Hybridoperators, der sich von den Erkennungssequenzen des LexA-Repressors ableitet. Die linke Hälfte des Operators wurde so verändert, dass nur ein mutiertes LexA-Protein (LexA^M) binden kann. LexA^M enthält drei Aminosäureaustausche im Gegensatz zum WT (P40A, N41S und A42S [117]). Die rechte Hälfte des Operators entspricht der Wildtyp-Erkennungssequenz von LexA und wird auch nur von einem Wildtyp LexA-Protein (LexA^{WT}) gebunden. LexA kann nur als Dimer an die DNA binden (Abbildung 3.20).

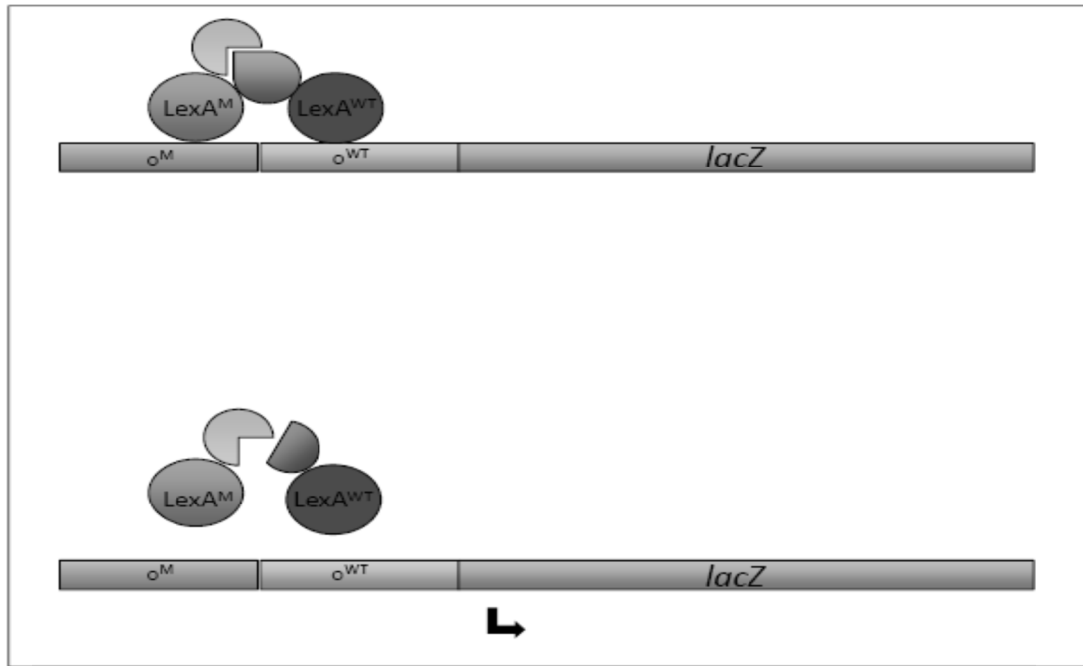


Abbildung 3.20: Prinzip des bakteriellen „Two-Hybrid-Assays“

Oben: LexA^M und LexA^{WT} dimerisieren durch die Wechselwirkung zweier fusionierten Proteine. Der Hybridoperator wird gebunden, die Expression des Reportergens wird reprimiert. Unten: LexA^M und LexA^{WT} können nicht dimerisieren, da die fusionierten Proteine nicht wechselwirken. Dadurch kann der Hybridoperator nicht reprimiert werden, die Expression des *lacZ*-Gens kann stattfinden und quantifiziert werden.

Die beiden Proteine LexA^{WT} und LexA^M sind nicht mehr in der Lage, zu dimerisieren, da ihre Dimerisierungsdomänen deletiert wurden. Eine Wechselwirkung und damit einhergehende Repression eines Reportergens kann daher nur stattfinden, wenn LexA^{WT} und LexA^M in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Dies geschieht durch Proteine, die als Dimer fungieren. Getestet wurde diese Wechselwirkung in dem Stammhintergrund SU202, in dem sich das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle des Hybridoperators befindet. Die beiden LexA-Varianten werden in diesem System von kompatiblen Vektoren exprimiert, die beide durch die Zugabe von IPTG induzierbar sind. Auf diese Weise kann der Teststamm mit beiden Plasmiden kotransformiert und die Expression der Fusionsproteine beider Plasmide mit Zugabe von 1mM IPTG induziert werden [117].

pDL801 bezeichnet das Plasmid mit der modifizierten DNA-Bindedomäne von LexA und dem eukaryotischen Jun-„Zipper“. pMS604 ist ein Plasmid mit dem WT der LexA-DNA-Bindedomäne und dem eukaryotischen Fos-„Zipper“. Fos und Jun können miteinander wechselwirken, sie bilden normalerweise einen Transkriptionsfaktor [117]. In den Plasmiden pMS604B und pDL801B wurden die Gene für die Fos und Jun-Proteine jeweils durch den Genteil der B-Domäne des EIICB^{Glc} Proteins ersetzt (Aminosäuren 388-477), welcher zusätzlich einen His-„Tag“ kodiert.

Die B-Domäne von EIICB^{Glc} wurde jeweils als Fusionsprotein mit dem LexA^{WT} bzw. dem LexA^M-Protein exprimiert. In einem anschließenden Test wurde die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Eine niedrige Aktivität spricht dabei für die Repression des Reportergens und damit für eine Wechselwirkung der beiden Komponenten. Die Ergebnisse des bakteriellen Two-Hybrid-Assays sind in Abbildung 3.21 gezeigt.

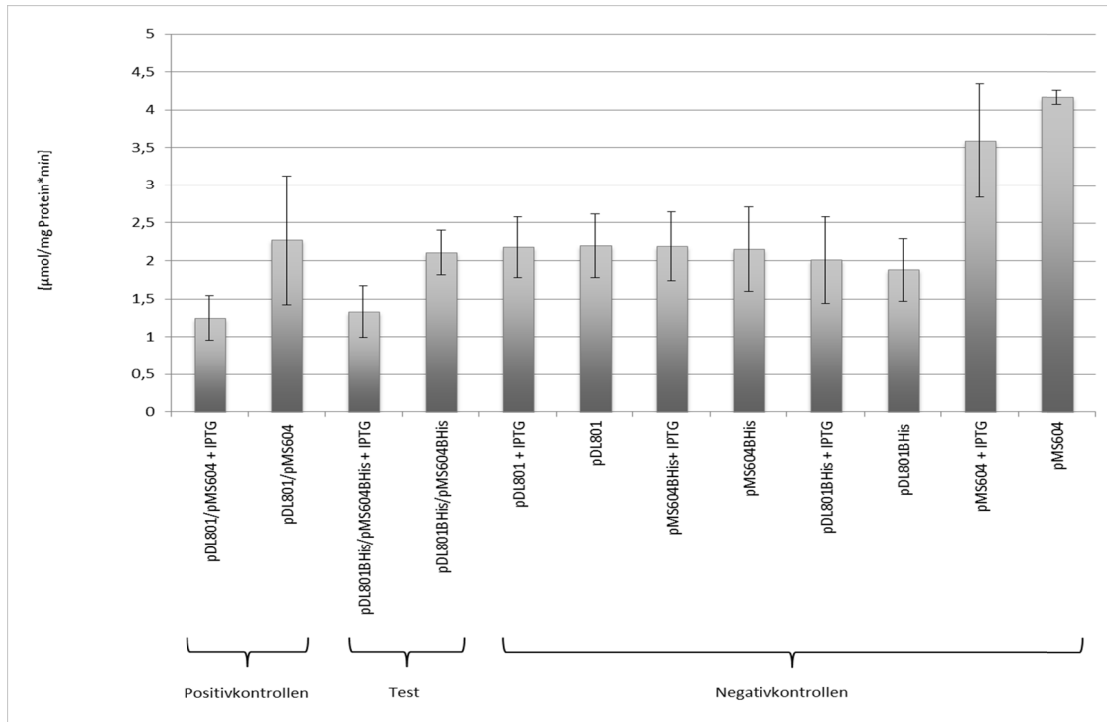


Abbildung 3.21: Spezifische β -Galaktosidase-Aktivität des bakteriellen „Two-Hybrid-Assays“ zur Untersuchung der Dimerisierung der B-Domäne von EIICB^{Glc}

pDL804: LexA^M mit Jun-Fusion; pMS604: LexA^{WT} mit Fos-Fusion. Unter Zugabe von 1mM IPTG werden beide Fusionsproteine exprimiert, können wechselwirken und das Reportergen reprimieren. pDL804BHis: LexA^M mit Fusion an die B-Domäne von EIICB^{Glc}; pMS604BHis: LexA^{WT} fusioniert mit der B-Domäne. Die alleinige Expression eines einzelnen Vektors führt nicht zur Reprimierung (Negativkontrolle). Die Analyse fand im Stamm SU202 statt.

Die β -Galaktosidase-Aktivität ist am geringsten in den Proben, in denen die Positivkontrollproteine und auch die Fusionsproteine B-Domäne/LexA^{WT} und B-Domäne/LexA^M durch die Zugabe von IPTG überexprimiert wurden. Eine geringe β -Galaktosidase-Aktivität zeigt, dass das *lacZ*-Gen reprimiert vorlag, was nur der Fall sein kann, wenn die Fusionskonstrukte miteinander wechselwirken. Alle anderen Kombinationen zeigen eine deutlich höhere β -Galaktosidaseaktivität, was gegen eine Wechselwirkung der gebildeten Fusionsproteine spricht und den Erwartungen für die Negativkontrollen und den uninduzierten Testplasmiden entspricht. Auch mit dieser Methode wurde daher gezeigt, dass die B-Domänen in der Lage sind, funktionelle Dimere zu bilden.

3.3.4 Untersuchung des Einflusses der PTS-Komponenten EI, HPr und EIIA^{Cr} auf das Dimerisierungsverhalten der B-Domäne

Die Ergebnisse der bakteriellen „Two-Hybrid“-Untersuchungen wurden in einem Stamm durchgeführt, der alle PTS-Komponenten enthält, u.a. den für EIIB^{Glc} bekannten Wechselwirkungspartner EIIA^{Cr}. Um einen Einfluss dieses Proteins auf die Dimerisierung von EIIB^{Glc} auszuschließen, sollten die Dimerisierungsversuche im LJ141-Stammhintergrund wiederholt werden. Dieser Stamm enthält u.a. Deletionen der Gene *ptsHIerr*, das heißt der Gene, die für die PTS-Proteine EI, HPr und EIIA^{Cr} kodieren (s. auch Abschnitt 3.1.3). In diesem Stammhintergrund kann es des Weiteren zu keinerlei PTS-abhängiger Phosphorylierung des EIIB^{Glc} kommen, da die dafür nötigen Enzyme fehlen. Das Ergebnis der Untersuchung im Stamm LJ141 zeigt Abbildung 3.22.

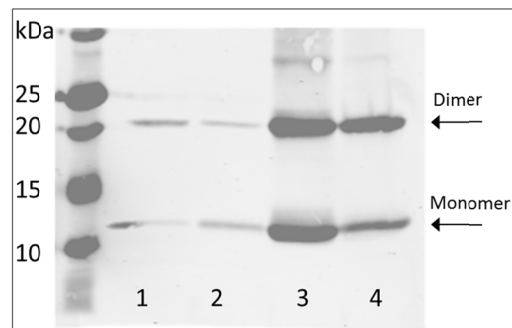


Abbildung 3.22: Ergebnis der Crosslinking-Versuche mit pTM30BHis im Stamm LJ141

1: Proben ohne Formaldehyd, Erhitzen für 10min bei 95°C; 2: kein Formaldehyd, kein Erhitzen; 3: mit Formaldehyd, kein Erhitzen; 4: Formaldehyd und Erhitzen.

Auch in diesem Stammhintergrund bilden sich Dimere, die stärker ausgebildet sind, wenn Formaldehyd zugegeben wurde. Die B-Domäne kann also offensichtlich in ihrem unphosphorylierten Zustand dimerisieren. Die Enzyme EI, HPr und EIIA^{Cr} haben keinen Einfluss auf die Dimerisierung der B-Domäne, da ihre Gene in den verwendeten Stämmen deletiert wurden. Im Stammhintergrund LJ141 liegt allerdings eine chromosomale Kopie von *ptsG* vor. Das Experiment wurde daher nochmal in dem Stammhintergrund LJ139 wiederholt. Dieser enthält ebenfalls die Deletion der PTS-Gene *ptsHIerr*. Zusätzlich trägt dieser Stamm die *ptsG*-Mutation aus dem Stamm LR2-175. Das Ergebnis der Versuche in dem Stamm LJ139 ist in Abbildung 3.23 zu sehen. In diesem Stammhintergrund kommt es ebenfalls zu der Ausbildung von Dimeren, die abermals durch die Zugabe eines Crosslinking-Reagenz verstärkt wird. Die Monomer- und auch die Dimerbanden aus den Abbildungen 3.19-3.21 wurden alle einer Massenspektrometrieanalyse unterzogen und erneut konnte dadurch nachgewiesen werden, dass es sich bei den Signalen um EIIB^{Glc} handelt (Daten nicht gezeigt).

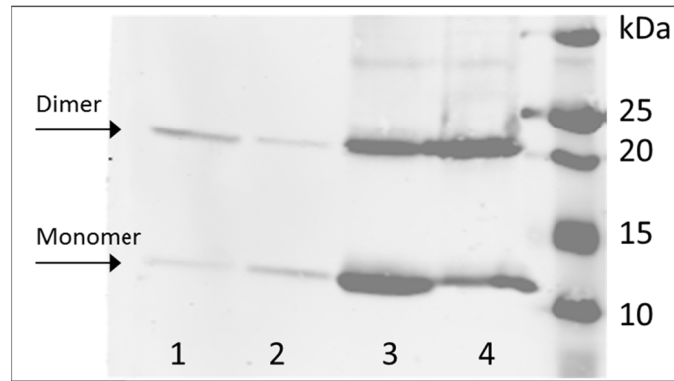


Abbildung 3.23: Ergebnis der Crosslinking-Versuche mit pTM30BHis im Stamm LJ139

Crosslinking Experimente mit der plasmidkodierte B-Domäne im Stammhintergrund LJ139.

1: Ohne Formaldehyd, mit Erhitzen (10min, 95°C); 2: ohne Formaldehyd; 3: mit Formaldehyd; 4: mit Formaldehyd, mit Erhitzen.

Die entkoppelte C-Domäne alleine sollte ebenfalls auf diese Art und Weise auf ihre Fähigkeit zur Dimerisierung überprüft werden. Es scheint allerdings so, als wäre der C-terminale His-„Tag“ an der C-Domäne nicht zugänglich oder als würde das Protein abgebaut, da es im Immunoblot nicht detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Eine zusätzliche Klonierung, durch die ein 3facher „HA-Tag“ mit eingebracht werden sollte, der durch seine Größe ggf. besser zugänglich ist, konnte während dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden. Somit konnte der Nachweis über die Dimerisierung der C-Domäne über dieses System nicht erfolgen.

3.3.5 Untersuchung der Fähigkeit zur Dimerisierung des Proteins $\text{EIIB}^{\text{Glc}}_{\text{V63D}}(\text{His})_6$

Da mit den bisherigen Ergebnissen gezeigt werden konnte, dass die B-Domäne alleine in der Lage ist, zu dimerisieren, sollte untersucht werden, welche Bereiche hierfür verantwortlich sind. Dazu wurden Aminosäuren gesucht, die konserviert vorliegen und durch ihre Lage an der Oberfläche des Proteins für die Ausbildung von Bindungen in der Lage sein könnten. Aminosäuren, die an der Oberfläche exponiert vorliegen, zeigt die Abbildung 3.24. Des Weiteren wurde die Aminosäuresequenz der B-Domäne aus *Escherichia coli* K-12 einem Alignment mit der Sequenz der B-Domänen anderer Bakterien unterzogen (Abbildung 3.25), um konservierte Aminosäuren zu identifizieren.

zwischen dem Cystein und dem Phosphatrest [138] bzw. der Stabilität des Phosphatrestes während seines Transfers zum Substrat [53] beteiligt. Dennoch sollte untersucht werden, ob Aminosäuren dieses Bereiches darüber hinaus auch für die Dimerisierung der B-Domäne verantwortlich sein könnten. Ferner wurde die Aminosäure V63 gewählt, die nicht im aktiven Zentrum der Phosphorylierungsreaktion liegt. Die Austausch I36N und V63D wurden mittels ortsgerechter Mutagenese generiert und mit Hilfe der Crosslinking-Methode auf ihre Fähigkeit zur Dimerisierung von EIIB^{Glc} untersucht. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, das C35 der B-Domäne auszutauschen und auf seine Dimerisierungsfähigkeit hin zu untersuchen. Diese Mutagenese gelang jedoch nicht.

Mit den Plasmiden pTM30B_{I36N}(His)₆ und pTM30B_{V63D}(His)₆ wurden die entsprechenden Versuche im Stammhintergrund LJ120 durchgeführt. Für das Plasmid pTM30_{I36N}(His)₆ konnte kein Ergebnis erhalten werden. Möglicherweise schlug die Überproduktion fehl oder die Proteine wurden abgebaut, denn es konnten auf dem Western Blot keinerlei Signale, weder monomerische noch dimerische, erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis der Untersuchung des Plasmids pTM30B_{V63D}(His)₆ ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

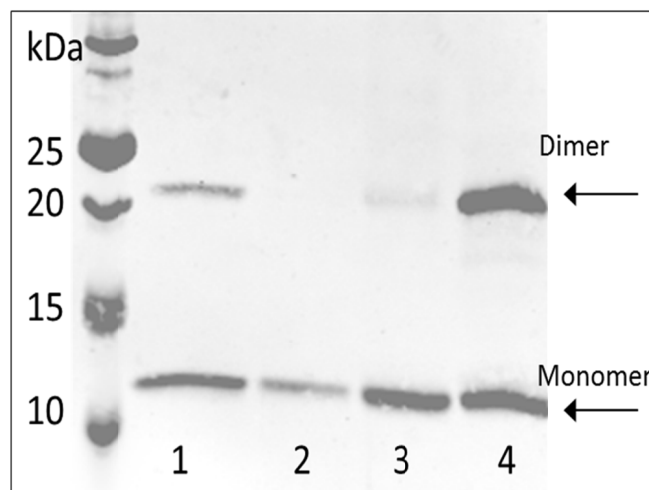


Abbildung 3.26: Crosslinking Experiment mit LJ120/pTM30B_{V63D}(His)₆

1: ohne Formaldehyd, 2: ohne Formaldehyd, Probe wurde 10min lang bei 95°C erhitzt; 3: mit Formaldehyd; 4: mit Formaldehyd nach Erhitzen der Probe. Dimere können auch von dieser Mutante gebildet werden.

Ausgehend von diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass auch die Mutante EIIB^{Glc}_{N63D} noch in der Lage ist, Dimere auszubilden.

Durch die hier durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, dass die B-Domäne des Proteins EIICB^{Glc} offensichtlich in der Lage ist, eigenständig zu dimerisieren, auch in

Stammhintergründen, in denen die Gene *ptsHlcr* oder *ptsG* deletiert wurden. Eine schwache Dimerisierung scheint auch ohne die Zugabe von Formaldehyd stattzufinden. Weitergehende Untersuchungen müssten zeigen, welche Regionen der EIIB^{Glc}-Domäne dafür verantwortlich sind.

3.4 Interaktionsanalysen zwischen Komponenten des PTS und der „major fascilitator superfamily“ mit Hilfe der BiFC-Methode

Eine der wichtigsten regulatorischen Funktionen des Glukose-PTS ist der sogenannte Induktorauschluss, bei dem das Protein EIIA^{Crr} durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen einen inhibitorischen Einfluss auf verschiedene Kohlenhydrattransportproteine ausübt [20, 26]. Ob EIIA^{Crr} auch einen derartigen Einfluss auf das Transportprotein CscB ausübt, ist derzeit noch unklar [107, 109, 110]. EIIA^{Crr} ist die lösliche Domäne des PTS-Transporters für Glukose und wird von dem Gen *crr* kodiert. CscB ist ein H⁺-Symporter für Sucrose und stammt aus derselben Familie wie die Laktose-Permease, die ebenfalls durch EIIA^{Crr} reguliert wird [104, 106]. Das unphosphorylierte EIIA^{Crr} kann an verschiedene nicht-PTS-Transporter binden und diese inhibieren. Dazu zählen zum Beispiel die Proteine MalK, LacY und RafD [4, 101, 102, 107, 139, 140]. Dass EIIA^{Crr} möglicherweise auch mit CscB wechselwirken könnte, wurde durch Experimente in dem Stamm LJM176 ersichtlich, in dem CscB konstitutiv exprimiert wird. Die Hemmung der Aufnahme des Substrats Maltose durch unphosphoryliertes EIIA^{Crr} wird in diesem Stamm vermutlich nur abgeschwächt, wenn EIIA^{Crr} von CscB titriert wird [110].

Die BiFC-Methode (Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation) erlaubt eine Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen anhand von Fluoreszenz-Signalen. Die Methode eignet sich zur Untersuchung cytoplasmatischer Proteine, lässt sich im Gegensatz zum bakteriellen „Two-Hybrid“-System prinzipiell aber auch für die Detektion der Wechselwirkung von Membranproteinen einsetzen [141].

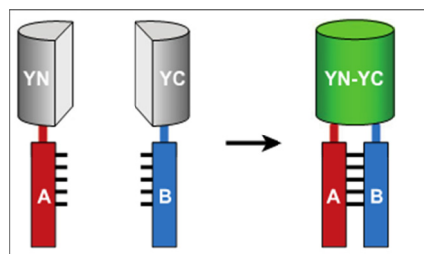


Abbildung 3.27: Prinzip des BiFC-Assays

Entnommen aus [141]. Gezeigt ist das Prinzip des BiFC-Assays hier mit YFP Varianten. Nur wenn die zu untersuchenden Proteine (A und B) miteinander wechselwirken, kommt ein Vollängen-YFP zustande, das bei entsprechender Anregung ein Fluoreszenzsignal generiert.

Die jeweils zu untersuchenden Proteine wurden mit Fragmenten von GFP fusioniert. Findet eine Wechselwirkung der beiden Proteine statt, so kommen die GFP-Fragmente in räumliche Nähe und ergeben somit ein Vollängen-GFP, welches in der Lage ist, bei entsprechender Anregung zu fluoreszieren. Diese Methode wurde eingesetzt, um die potentielle Wechselwirkung zwischen $EIIA^{Crr}$ und CscB zu untersuchen.

3.4.1 Klonierungen der erforderlichen Plasmide für das BiFC-Verfahren zur Detektion einer möglichen Wechselwirkung zwischen CscB- $EIIA^{Crr}$ und LacY- $EIIA^{Crr}$

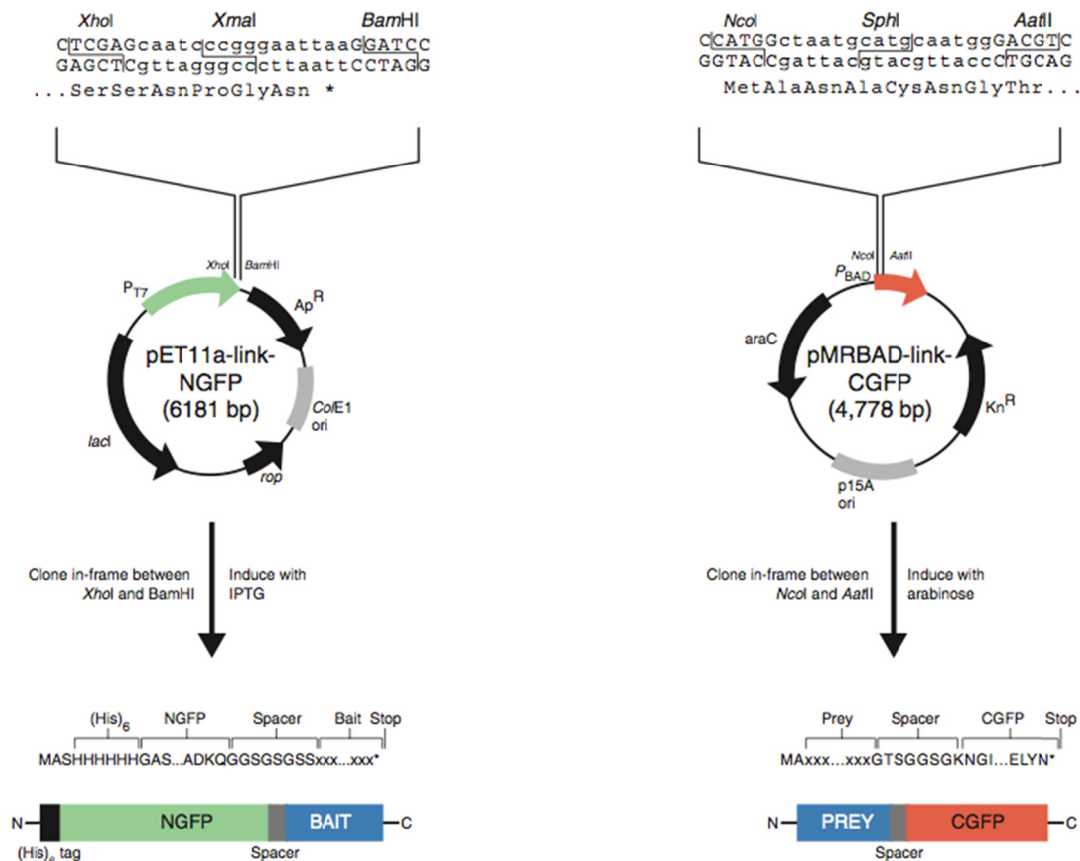


Abbildung 3.28: Klonierungsstrategie für die BiFC-Assay-Plasmide zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen $EIIA^{Crr}$ und CscB und Kontrollen

(Entnommen aus:[120])

Abbildung 3.28 zeigt die Klonierungsstrategie für die Plasmide, die für die BiFC-Methode eingesetzt werden können. Hierfür wurden mit den Primern aus Tabelle 3.5 die entsprechenden Schnittstellen in die Gene *crr*, *cscB*, und *lacY* eingebracht. Letzteres diente als Positivkontrolle, denn die Wechselwirkung zwischen $EIIA^{Crr}$ und LacY ist bestätigt [103]. Durch Klonierungen der PCR-Produkte in die oben gezeigten Vektoren entstanden die Plasmide, mit denen letztendlich die BiFC Untersuchungen vorgenommen

wurden (Tabelle 3.5). Das mit dem Sternchen markierte Plasmid konnte trotz mehrerer Versuche nicht kloniert werden.

Tabelle 3.5: Konstruktion der Plasmide für das BiFC-Verfahren

Template (Stamm)	Primer	Endvektor
LJ110	CrrXhoI+ / CrrAatII-	pET11a-crr-NGFP
ECB1	CscBXhoI+ / CscBBamHI-	pET11a-cscB-NGFP
LJ110	LacYXhoI+ / LacYBamHI-	pET11a-lacY-NGFP*
LJ110	CrrNcoI+ / CrrAatII-	pMRBAD-crr-CGFP
ECB1	CscBNcoI+ / CscBAatII-	pMRBAD-cscB-CGFP
LJ110	LacYNcoI+ / LacYAatII-	pMRBAD-lacY-CGFP

Die Konstrukte basierend auf dem Plasmid pET11a-link-NGFP kodierten jeweils das N-terminale GFP-Fragment und das zu untersuchende Protein als C-terminale Fusion. Dieser Vektor enthält einen ColE1 Replikationsursprung und einen T7-Promotor und Terminator. Daher wird ein Stammhintergrund benötigt, in dem die T7-Polymerase kodiert wird. Die pMRBAD-Derivate enthielten dagegen N-terminal das zu untersuchende Protein und C-terminal den C-Terminus des GFP-Proteins fusioniert. Diese Vektoren zeichnen sich durch einen p15A Replikationsursprung, einen Arabinose-Promotor und das *araC* Gen aus, so dass dieser Vektor durch Arabinose induzierbar ist [142]. Beide Vektoren sind kompatibel zueinander.

Da es sich bei dem Protein CscB um ein Membranprotein handelt, wurde davon ausgegangen, dass das C-terminale GFP-Fragment hier möglicherweise eher Ergebnisse liefert, da der N-Terminus von Membranproteinen meist für die Lokalisation in die Membran essentiell ist. Dennoch wurde das *cscB*-Gen in beide Konstrukte kloniert, um beide Möglichkeiten zu überprüfen. Als Template für die Amplifikation des Gens *cscB* diente der Stamm ECB1. In diesem Stamm liegt CscB mit dem Aminosäureaustausch Q353H vor. Dadurch kommt es hier zu einer erhöhten (Faktor 2) Sucroseaufnahme im Gegensatz zum Wildtyp [106].

3.4.2 Untersuchung der Wechselwirkung der Proteine EIIA^{Crr} und LacY, EIIA^{Crr} und EIICB^{Glc} sowie EIIA^{Crr} und CscB mittels BiFC

Die Durchführung der BiFC-Analyse erfolgte wie im Material und Methoden-Teil beschrieben im Stammhintergrund BL21(DE3). Um zunächst die Methode an Proteinen zu testen, bei denen eine Wechselwirkung bestätigt ist, wurden die Kontrollen des Systems (hierbei handelt es sich um „Leucine-Zipper“-Peptide, [142]) gemeinsam (kotransformiert) angezogen, ebenso wie die Plasmide pET11a-Crr-NGFP und pMRBAD-lacY-CGFP, auf denen GFP-Fusionsproteine der Proteine EIIA^{Crr} bzw. LacY kodiert sind. Wie schon erwähnt gibt es eine Wechselwirkung der beiden Proteine LacY und EIIA^{Crr}, so dass das System mit diesen Kontrollen getestet werden kann. Beide Konstrukte wurden außerdem jeweils mit dem entsprechenden Kontrollplasmid zusammen kotransformiert und koexprimiert, um ein unspezifisches Signal

auszuschließen. Um die Fluoreszenz der Proben quantifizieren zu können, wurden die Fluoreszenzintensitäten aller Proben im Fluorimeter untersucht. Das Ergebnis der Testreihe ist in Abbildung 3.29 zu sehen.

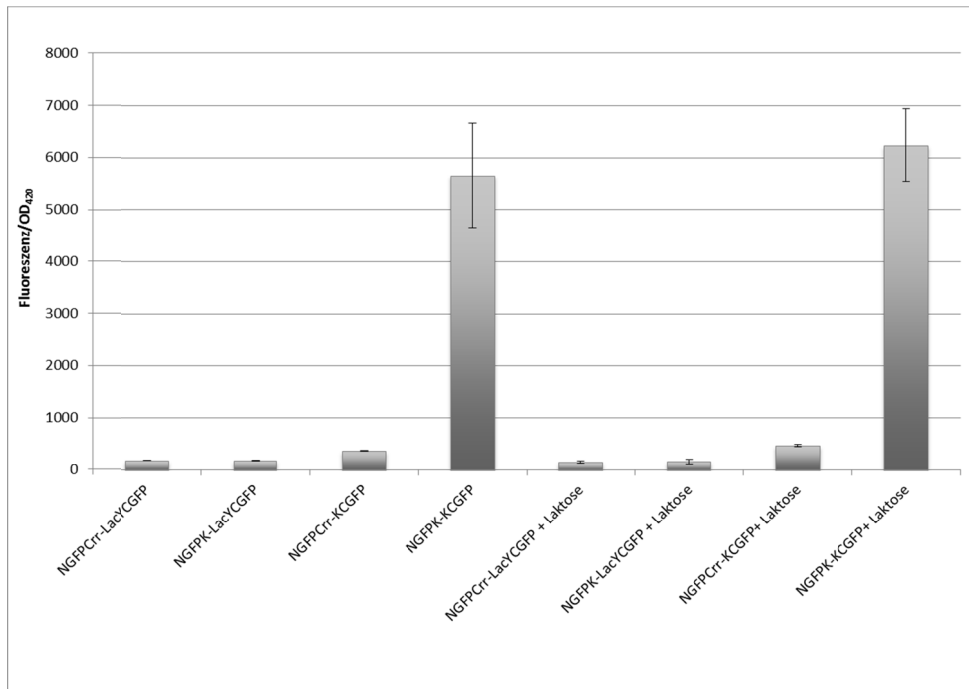


Abbildung 3.29: Ergebnis der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen EIIA^{Crr} und LacY

Die Zellen wurden jeweils ohne Laktose und mit 0,2% Laktose angezogen, um die Expression von LacY zu erhöhen und ansonsten behandelt wie im Material und Methoden-Teil beschrieben. Nur die Positivkontrolle, in der zwei Leucin-„Zipper“-Peptide angezogen wurden, zeigten eine Fluoreszenzintensität, die auf eine Wechselwirkung schließen lässt. K: „Leucine-Zipper“-Kontrollplasmid. NGFP bzw. CGFP zeigt an, ob das C- oder N-terminale GFP-Fragment von dem Plasmid kodiert wird. Crr: EIIA^{Crr}.

Wie Abbildung 3.29 zeigt, konnte eine Fluoreszenz nur in den Zellen mit den beiden „Leucine-Zipper“-Kontrollplasmiden detektiert werden. Da eine Wechselwirkung der Proteine EIIA^{Crr} und LacY auf anderem Wege schon bestätigt werden konnte, spricht dieses Ergebnis dafür, dass die Wechselwirkung mit der hier verwendeten Methode nicht nachgewiesen werden kann.

Um die BiFC-Analyse an einer weiteren Kontrolle zu testen, wurde die Wechselwirkung der Proteine EIIA^{Crr} und EIICB^{Glc} ebenfalls untersucht. EIIA^{Crr} überträgt die Phosphatgruppe, die es vom HPr erhalten hat, an EIICB^{Glc}, welches das Phosphat dann wiederum weitergibt an das Substrat Glukose. Eine Wechselwirkung zwischen diesen Proteinen findet also statt. Von Anne Kosfeld konnte das Plasmid pMRBAD-ptsG-CGFP genutzt werden, welches für das Fusionsprotein EIICB^{Glc}-GFP kodiert. Die Zellen wurden mit und ohne 0,2% Glukose angezogen. Da der Phosphatgruppentransfer verstärkt stattfindet, wenn die Phosphatgruppe letztlich an Glukose weitergegeben kann, sollte die Zugabe von Glukose diese Wechselwirkung stabilisieren. Erneut wurde keine Wechselwirkung detektiert, mit Ausnahme der Positivkontrolle, in der zwei Leucin-

Zipper-Peptide eine Wechselwirkung eingingen und in dem Ansatz auch eine starke Fluoreszenzintensität aufwiesen (Abbildung 3.30).

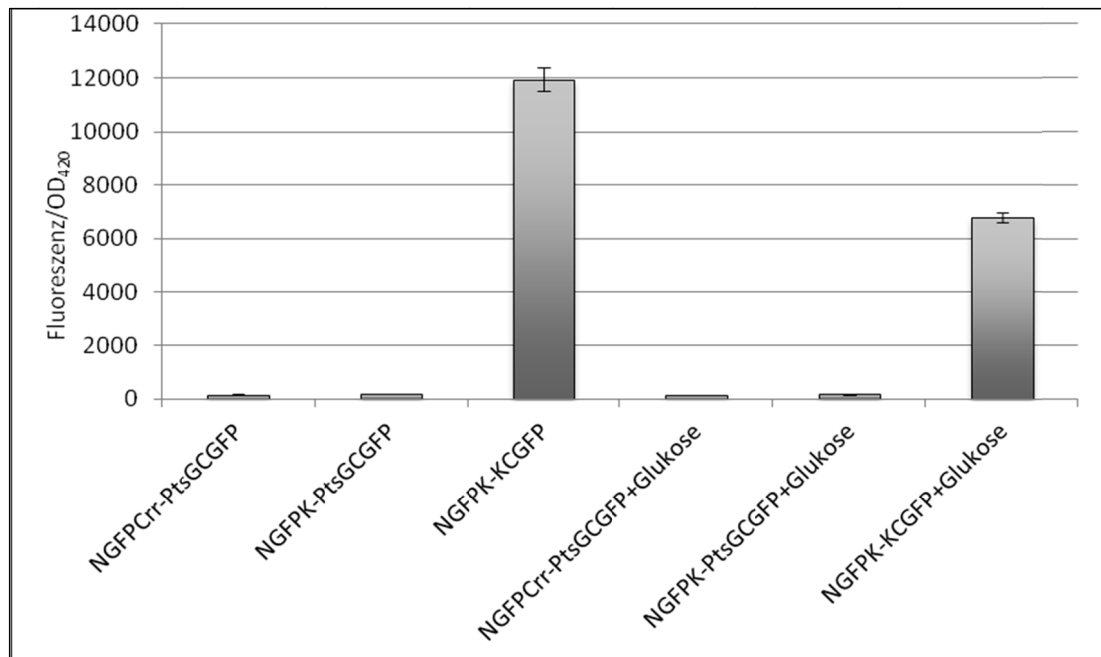


Abbildung 3.30: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen EIIA^{Crr} und EIICB^{Glc} mittels BiFC-Analyse

K bezeichnet immer die Kontrolle aus einem Leucin-, „Zipper“-Peptid, beide „Zipper“-Peptide zusammen ergeben die Positivkontrolle, die eine messbare Fluoreszenz aufweist, welche unter Zugabe von 0,2% Glukose etwas niedriger ist. Auf die Ergebnisse der Untersuchung zwischen EIIA^{Glc} und EIICB^{Glc} hat die Zugabe von Glukose keinen Einfluss, in den Ansätzen mit und ohne Glukose konnte kaum Fluoreszenz gemessen werden. K: „Leucin-Zipper“-Plasmid (Kontrolle), Crr: EIIA^{Crr}, PtsG: EIICB^{Glc}.

Obwohl für die bisher untersuchten Proteine keinerlei Wechselwirkungen nachgewiesen werden konnte, sollte die BiFC-Analyse für die ursprünglich zu untersuchenden Proteine EIIA^{Crr} und CscB dennoch durchgeführt werden. Abbildung 3.31 zeigt das Ergebnis der Untersuchung.

Die beiden Kontrollkonstruktionen zeigen ein deutliches GFP-Signal, wie auch erwartet wurde. Die Negativkontrollen mit jeweils einem Kontrollplasmid und dem entsprechenden komplementären Plasmid, die eines der zu untersuchenden Proteine kodieren, zeigen ebenfalls den Erwartungen entsprechend kein Signal. Die Zellen, in denen die beiden Plasmide, die die Gene *cscB* bzw. *crr* tragen, koexpressiert wurden, zeigen ebenso kein GFP-Signal. Dies deutet darauf hin, dass mit diesem System keine Wechselwirkung beider Proteine detektiert werden kann oder dass es keine Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen gibt.

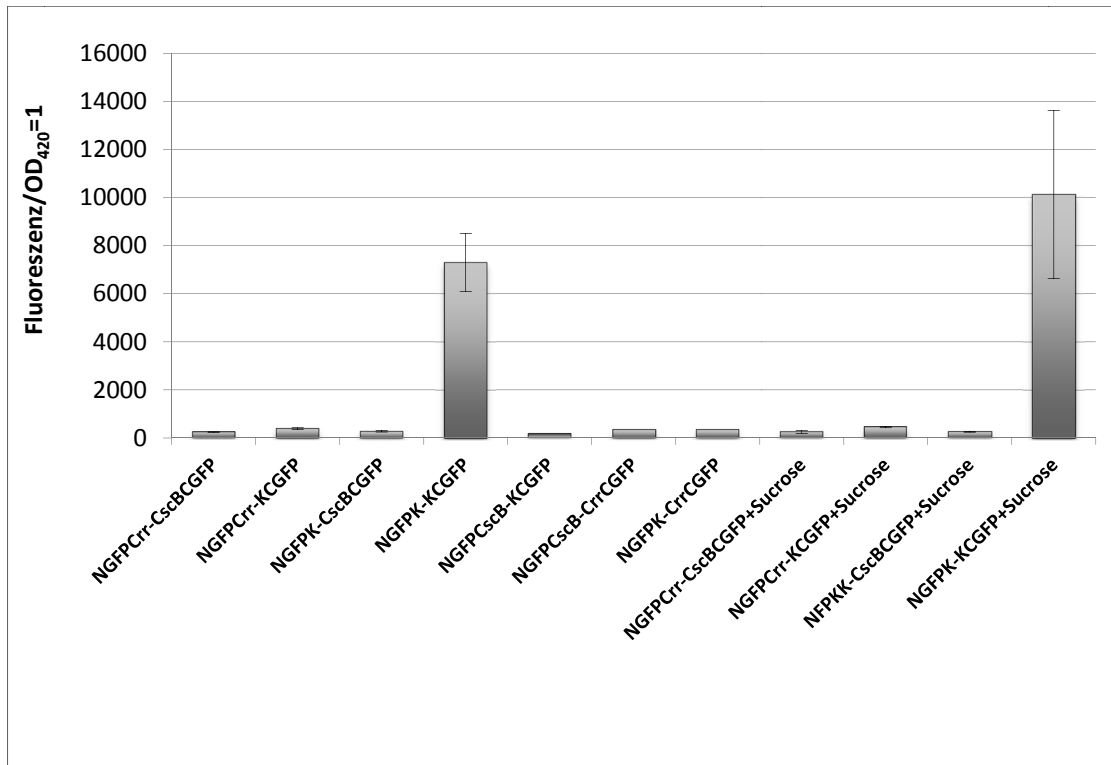


Abbildung 3.31: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen EIIA^{Crr} und CscB

Einzig die beiden Plasmide der Positivkontrolle zeigen eine deutlich messbare Fluoreszenz, was für eine Wechselwirkung spricht. K: „Leucin-Zipper“-Kontrollplasmide, Crr: EIIA^{Crr}. Sucrose: Zellen wurden mit 0,2% Sucrose angezogen wie im Material und Methoden-Teil angegeben.

Zusätzlich zu der Untersuchung im Fluorimeter wurden einige der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht, um die in Abbildung 3.31 gezeigten Ergebnisse zu überprüfen. Die Bilder bestätigen die Beobachtungen, die durch die fluorimetrischen Untersuchungen gemacht wurden (s. Abbildung 3.32).

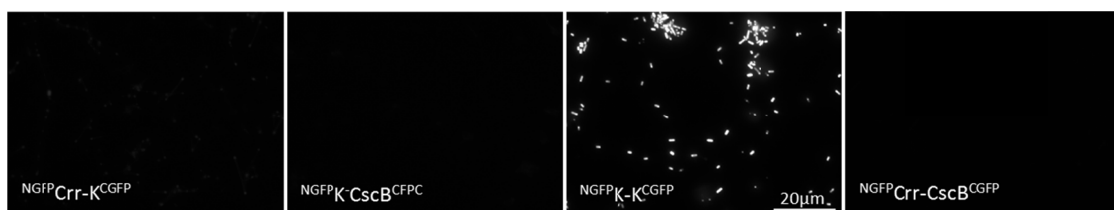


Abbildung 3.32: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der BiFC-Konstrukte von CscB und EIIA^{Crr} mit Kontrollen

K bezeichnet jeweils die Kontrolle (Leucin-Zipper Peptide [142]). Die beiden Kontrollproteine zeigen wie erwartet ein GFP-Signal, da sie miteinander wechselwirken. EIIA^{Crr} (Crr) und CscB zeigen keine Fluoreszenz, was darauf schließen lässt, dass es keine Wechselwirkung zwischen beiden gibt.

3.4.3 Probleme bei den BiFC-Untersuchungen

Die klonierten Plasmide, die bei den Untersuchungen eingesetzt wurden, konnten niemals vollständig sequenziert werden. Auch ein Wechsel der Sequenzierfirma (GATC,

Konstanz) änderte daran nichts. Offensichtlich sind die schlechten Sequenzierergebnisse auf nicht-inkorporierte Nukleotide zurückzuführen, die bei der anschließenden Aufreinigung nicht vollständig entfernt werden können (persönliche Mitteilung Kundendienst GATC). Auch die Transformation und neuerliche Plasmidisolierung zeigte keine Besserung. Es wurde ferner versucht, die Fusionsproteine über einen Immunoblot mit polyklonalem GFP-Antikörper nachzuweisen. Es wurden Banden detektiert, die aber nicht in allen Fällen eindeutig den erwarteten Größen der Fusionsproteine zugeordnet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Es ist also nicht auszuschließen, dass die negativen Ergebnisse der Versuche in falschen Fusionsproteinen resultierend aus Problemen bei der Klonierung begründet liegen.

3.5 Mutantenselektion eines potentiellen cAMP-Transporters mit Hilfe der Durchflusscytometrie

Die Expression des *ptsG*-Gens ist u.a. abhängig von der Anwesenheit des cAMP-CRP-Komplexes. Die Bindung von cAMP-CRP an die Promotor-Operator-Sequenz des *ptsG*-Gens aktiviert die Transkription des Gens [20, 31]. cAMP ist darüber hinaus auch für andere zelluläre Vorgänge ein wichtiges Signal in gramnegativen Bakterien. So liegt es z.B. bei Glukosemangel in hoher Konzentration vor und ermöglicht die Verstoffwechslung anderer Kohlenstoffquellen [31]. cAMP wird durch die Adenylatcyclase gebildet. Darüber hinaus gibt es aber auch Hinweise für Transportsysteme für cAMP aus dem umgebenden Medium. Über die Aufnahme und Abgabe von cAMP ist allerdings nur wenig bekannt [31]. In diesem Projekt sollten Zellen, die in der Lage sind, cAMP aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen, über Durchflusscytometrie (FACS; fluorescence associated cell sorting) von solchen Zellen, die dazu nicht mehr in der Lage sind, getrennt und aus letzteren Mutanten eines Transporters für cAMP identifiziert und isoliert werden. Um Zellen zu gewinnen, die kein cAMP aus dem umgebenden Medium aufnehmen können, wurde eine Transposonmutagenese durchgeführt. Eine Veränderung der Aufnahmefähigkeit von cAMP sollte über ein GFP-Signal detektiert werden, dessen Gen hinter einen cAMP-abhängigen Promotor fusioniert vorlag.

3.5.1 Transposonmutagenese mit den Minitransposons pNK2883 und pNK2859

Um Mutanten zu generieren, die nicht mehr in der Lage sind, cAMP aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen, wurde eine Transposonmutagenese eingesetzt. Hierfür wurden die Minitransposons pNK2883 (Tet^R) und pNK2859 (Kan^R) genutzt. Diese sind für die generelle Transposonmutagenese in *E. coli* geeignet und zeichnen sich durch ihre geringe Größe, die Induzierbarkeit durch IPTG und die Anwesenheit von Resistenzmarkern aus [123]. Zunächst sollte verifiziert werden, dass die Mutagenese mit diesen Minitransposons funktioniert. Dazu wurden die Transposons in einen

Wildtypstamm transformiert, induziert und regelmäßig überprüft, ob es in den Genen für die Aufnahme- und Stoffwechselsysteme für die Kohlenhydrate Glukose, Mannitol und Laktose zu Mutationen kommt. Für diesen Test wurden die beiden Minitransposons jeweils in den Wildtyp-Stamm LJ110 transformiert. Von jedem Transformationsereignis wurde je eine Kolonie gepickt und damit zwei Kulturen angeimpft. Die Kulturen wurden entweder ohne IPTG oder mit 1mM IPTG induziert und täglich überimpft. Nach 6 Tagen wurden aus den Kulturen Kolonien auf McCGlc-, McCLak-, McCMtl-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen, um zu testen, ob es durch das springende Transposon zu Mutationen in einem dieser Stoffwechselwege gekommen ist. Nach zwei Wochen konnten in dem Stamm mit dem Minitransposon pNK2859 Mutanten gefunden werden, die nicht mehr in der Lage waren, Laktose zu verstoffwechseln, also weiße Kolonien auf McCLak-Platten zeigten. Nach weiteren zwei Wochen trat dieser Phänotyp auch in dem Stamm mit pNK2883 auf. Die Kontrollen dieser Stämme, die jeweils ohne IPTG angezogen und überimpft worden waren, zeigten nur rote Kolonien auf McCLak-Platten, was darauf hindeutet, dass tatsächlich die Induktion des jeweiligen Minitransposons für den Phänotyp verantwortlich war. Für die Verstoffwechslung der anderen Kohlenhydrate, Glukose und Mannitol, konnte auch nach längerer Zeit (ca. 2 Monate) keine Mutation festgestellt werden.

Anschließend wurde überprüft, ob der Laktose⁻-Phänotyp der entsprechenden Zellen über eine P1-Transduktion übertragbar ist. Dazu wurde eine P1-Transduktion der Lak⁻-Mutanten in den Stamm LJ110 vorgenommen wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.6 dargestellt. Wenngleich die mit dem Transposon einhergehende Resistenz in jedem Fall transduziert wurde, wurde der Lak⁻-Phänotyp lediglich in 9 von 24 Fällen ebenfalls transduziert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass es mehrere Transposoninsertionen gab, von denen nur in manchen Fällen die Mutation im Laktosestoffwechsel transduziert wurde. Da die Transposonmutagenese für den Laktosestoffwechsel erfolgreich war und eine Transduktion dieses Phänotyps in einigen Fällen gelang, wurde das System für die Detektion eines möglichen cAMP-Transporters genutzt.

Tabelle 3.6: Ergebnisse der P1-Transduktion der Transposonmutagenese mit pNK2859

In allen Ereignissen wurde wie erwartet die Resistenz transduziert. Der Lak-Phänotyp konnte dagegen nicht in jedem Fall transduziert werden. Weitere Erläuterungen im Text.

Stamm	McCLak	Kan	Stamm	McCLak	Kan
LJ110/pNK2859 -1	w	r	LJ110/pNK2859 -15	3+	r
LJ110/pNK2859 -2	w	r	LJ110/pNK2859 -16	3+	r
LJ110/pNK2859 -3	w	r	LJ110/pNK2859 -17	w	r
LJ110/pNK2859 -4	w	r	LJ110/pNK2859 -18	3+	r
LJ110/pNK2859 -5	3+	r	LJ110/pNK2859 -19	3+	r
LJ110/pNK2859 -6	3+	r	LJ110/pNK2859 -20	3+	r
LJ110/pNK2859 -7	3+	r	LJ110/pNK2859 -21	3+	r
LJ110/pNK2859 -8	w	r	LJ110/pNK2859 -22	3+	r
LJ110/pNK2859 -9	w	r	LJ110/pNK2859 -23	3+	r
LJ110/pNK2859 -10	w	r	LJ110/pNK2859 -24	3+	r
LJ110/pNK2859 -11	w	r	LJ110-1		s
LJ110/pNK2859 -12	3+	r	LJ110-2		s
LJ110/pNK2859 -13	3+	r	LJ110-3		s
LJ110/pNK2859 -14	1+	r	LJ110-4		s

3.5.2 Überprüfung eines Systems mit einem cAMP-abhängig exprimierten GFP

Um Mutanten identifizieren zu können, die nicht mehr in der Lage sind, externes cAMP zu transportieren, sollte ein Plasmid verwendet werden, auf welchem ein Reportergen hinter einem cAMP-abhängigen Promotor kloniert vorlag. Hierfür wurde der Vektor pACYC184 verwendet, in den in vorangegangenen Arbeiten [118] der cAMP-abhängige Operator-Promotor-Bereich des *scrY*-Gens (*scrY_{p,o}*) vor das *gfp*-Gen kloniert worden war ([119]). In diesen Zellen kann ein GFP-Signal nur zustande kommen, wenn auch cAMP in den Zellen vorhanden ist. Da dies im WT der Fall ist, der cAMP über die Adenylatcyclase generieren kann, wurde der Stammbhintergrund LDN2 gewählt. In diesem ist das Gen für die Adenylatcyclase (*yaA*) deletiert, so dass kein cAMP mehr selbstständig hergestellt werden kann. Nur wenn cAMP im Medium vorliegt und durch den potentiellen cAMP-Transporter in die Zellen transportiert wird, zeigen diese Zellen ein GFP-Signal, wie in Abbildung 3.33 zu sehen ist.

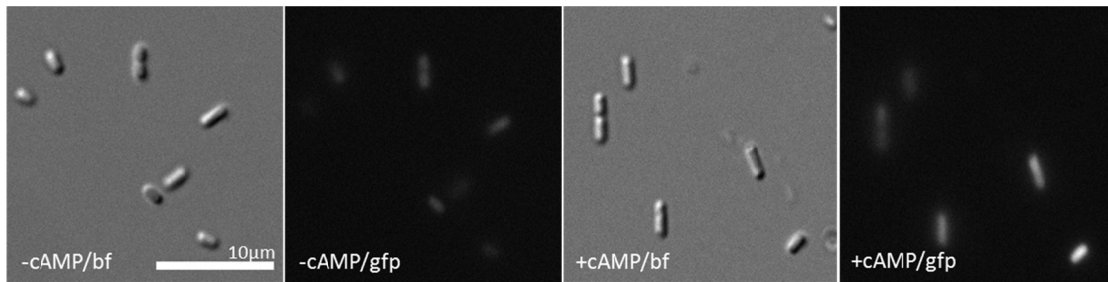


Abbildung 3.33: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Stammes LDN2/pACYC184::Ø(*scrY_{p,o}-gfp*) in Abhängigkeit von externem cAMP

Bf: brightfield (Hellfeld), gfp: GFP-Filter Die Zellen beider Kulturen zeigen normales Wachstum, wie im Hellfeld zu sehen ist. Das GFP-Signal ist stärker in dem Stamm, in dem sich cAMP im Wachstumsmedium befand. In dem Stamm ohne cAMP gibt es ein leichtes GFP-Signal, was auf ein Basallevel an exprimiertem GFP schließen lässt.

3.5.3 Detektion von Bakterienzellen mittels FACS

Um möglichst viele Zellen auf ihre Fähigkeit, cAMP aufnehmen zu können, zu untersuchen, wurde die Durchflusscytometrie verwendet. Die Methode des „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS) ist eine Art der Durchflusscytometrie, die es erlaubt, Zellen über ihre Größe und ihre Eigenschaften zu unterscheiden und zu sortieren. So lassen sich z.B. Blutzellen voneinander trennen. Um zu testen, ob mit den während dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Geräten und Möglichkeiten auch die erheblich kleineren Bakterienzellen detektiert und sortiert werden können, wurden zunächst Zellen des Stammes LDN2/pACYC184::Ø(*scrY_{p,o}-gfp*), deren Fluoreszenz zuvor im Fluoreszenzmikroskop überprüft worden war, mit dem FACS untersucht wie im Material- und Methodenteil beschrieben. Dabei wurde festgestellt, dass es ohne Gegenfärbung der Zellen nicht möglich war, die Bakterienzellen zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurden alle Zellen mit dem lipophilen Membranfarbstoff FM4-64 angefärbt. Dieser Farbstoff färbt nur lebende Zellen an [143]. Zur Kontrolle wurden auch Zellen durch Hitze zerstört (10min, 65°C), bei denen kein FM4-64 Signal mehr erwartet wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.34 gezeigt. Der Testlauf zeigte, dass FM4-64 als Lebendfarbstoff geeignet ist und die Zellen damit im FACS detektiert werden können.

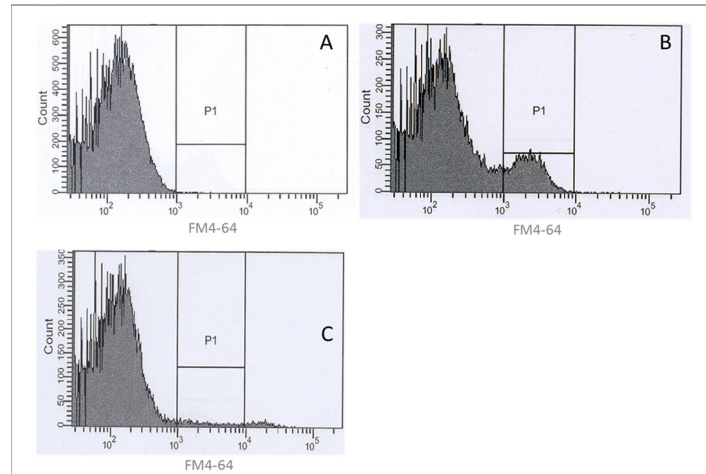


Abbildung 3.34: FACS-Ergebnis der *E. coli*-Färbung mit FM4-64

A: Zellen wurden nicht gefärbt. B: Zellen wurden mit dem Farbstoff FM4-64 gefärbt. C: Zellen wurden durch Hitzeinwirkung abgetötet und mit FM4-64 gefärbt. P1: In dieser Region werden bei entsprechender Anregung Zellen detektiert, die ein rotes Signal durch die FM4-64 Färbung emittieren. Nur lebende Zellen können mit FM4-64 angefärbt werden.

3.5.4 Konstruktion eines Plasmids mit einem Gen, das für FACS-Analysen optimiertes GFP kodiert

Während der ersten FACS-Testläufe wurde festgestellt, dass die hier verwendete GFP-Variante in den FACS-Analysen nicht detektiert werden konnte. Es wurde daher eine andere GFP-Variante benutzt, die für die FACS-Methodik optimiert wurde [122]. Dieses GFP enthält die Aminosäureaustausche S65A, V68L und S72A. Das Gen für dieses GFP wurde hinter den *scrY_{p,o}*-Bereich kloniert. Dazu wurde der *scrY_{p,o}*-Bereich von dem Plasmid pJoe637 mit den Primern YOP1 und YOP3 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit PstI und EcoRV geschnitten und in den ebenso verdauten Vektor pHex3 kloniert. In diesen wurde das *gfp*-Gen, welches zuvor per PCR aus dem Vektor pKENgfpmut2 amplifiziert (Primer GF1 und GF2) wurde, mit den Schnittstellen PstI und XbaI eingefügt. Das Plasmid wurde pHex $scrY_{p,o}$ -*gfpmut2* genannt.

Ein FACS-Testlauf mit Zellen des LDN2-Stammes, die dieses Plasmid enthielten, bestätigte, dass diese GFP-Variante in FACS-Analysen detektiert werden kann (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde auch hier fluoreszenzmikroskopisch überprüft, dass das GFP nur unter Zugabe von cAMP exprimiert wird (Abbildung 3.35). Zellen, die kein GFP-Signal mehr zeigten, konnten also im FACS detektiert werden. Diese Methode eignet sich daher zur Isolierung von Zellen, die kein cAMP aus dem Medium aufnehmen können und deren *gfp*-Gen daher nicht transkribiert wird.

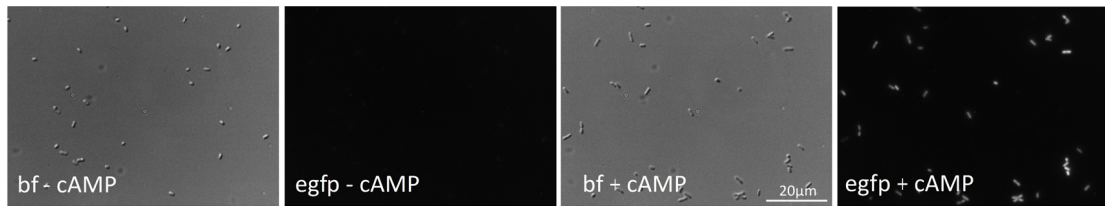


Abbildung 3.35: Fluoreszenzmikroskopische Überprüfung des Stammes LDN2/pHEXscrY_{p,ogfpmut2}

Die beiden linken Bilder zeigen Zellen der Kultur, die ohne cAMP angezogen wurde (Kontrollen). Die beiden rechten Bilder zeigen Zellen, denen 1mM cAMP im Medium zur Verfügung stand. Die GFP-Expression wird durch Zugabe von cAMP induziert.
Bf: Hellfeld, egfp: EGFP-Filter.

3.5.5 cAMP-abhängig metabolisierte Kohlenhydratquellen im Stamm LDN2

Da ein fehlendes GFP-Signal im FACS auch durch andere Mutationen als in dem möglichen Gen für einen cAMP-Transporter (z.B. im *gfp*-Gen) zustande kommen könnte, wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, Zellen zu identifizieren, die kein cAMP mehr aufnehmen können. Dazu sollte der Stamm LDN2 verwendet werden, in dem die interne Produktion von cAMP durch die Deletion der Adenylatcyclase unterbunden ist. Um Unterschiede zwischen cAMP-Aufnahmemutanten und Wildtyp-Zellen feststellen zu können, war es notwendig, in dem Stamm LDN2 ein Kohlenhydrat zu finden, welches in Abhängigkeit von cAMP verstoffwechselt wird. Dazu wurden Zellen dieses Stammes auf verschiedenen McC-Platten mit und ohne cAMP ausgestrichen. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.7 zu sehen. Der Zucker Maltose zeigte unterschiedliche Phänotypen in Abhängigkeit von cAMP und eignet sich daher zu einer Untersuchung von Defekten im cAMP-Aufnahmesystem im Stamm LDN2.

Tabelle 3.7: Untersuchung der Verstoffwechslung verschiedener Kohlenhydrate in Abhängigkeit von cAMP im Stamm LDN2

Der Stamm LDN2 kann Maltose nur mit cAMP im Medium verstoffwechseln. Die Kohlenhydrate Laktose und Mannose verstoffwechselt er (nicht), unabhängig von dem cAMP-Vorkommen. Eingesetzt wurden 1mM cAMP.

	- cAMP	+cAMP
McC-Laktose	w	w
McC-Mannose	3+	3+
McC-Maltose	w	3+

3.5.6 Mutantenselektion zur Identifizierung eines cAMP-Transporters

Mit den bisher etablierten Methoden der Transposonmutagenese, der FACS-Analysen und dem Nachweis von Mutanten der cAMP-Aufnahme im Stamm LDN2, waren die Voraussetzungen gegeben, mit denen Zellen isoliert werden können, die nicht mehr in der Lage sind, cAMP aufzunehmen. Hierfür wurde der Stamm LDN2/pHEXscrY_{p,ogfpmut2} mit den Transposons pNK2883(Tet^R), bzw. pNK2859(Kan^R) kotransformiert. Die Anzucht erfolgte mit den jeweiligen Antibiotika für die Selektion auf das Plasmid und das Transposon sowie je einmal mit 1mM IPTG (zur Induktion der Transposons) und je einmal ohne IPTG (als Kontrolle). Die Zellen wurden täglich in frisches Medium

überimpft. Nach ca. einem Monat wurden alle Kulturen zur FACS-Überprüfung frisch angezogen, wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben. Eine Hälfte jeder Kultur wuchs dabei unter Zugabe von 1mM cAMP, die andere ohne cAMP. Die Zellen wurden erneut unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und wie erwartet zeigten die Zellen mit cAMP ein GFP-Signal, während diejenigen ohne cAMP kein GFP-Signal generierten. Danach wurden die gewaschenen Zellen mit FM4-64 gefärbt und per FACS untersucht (Abbildung 3.36).

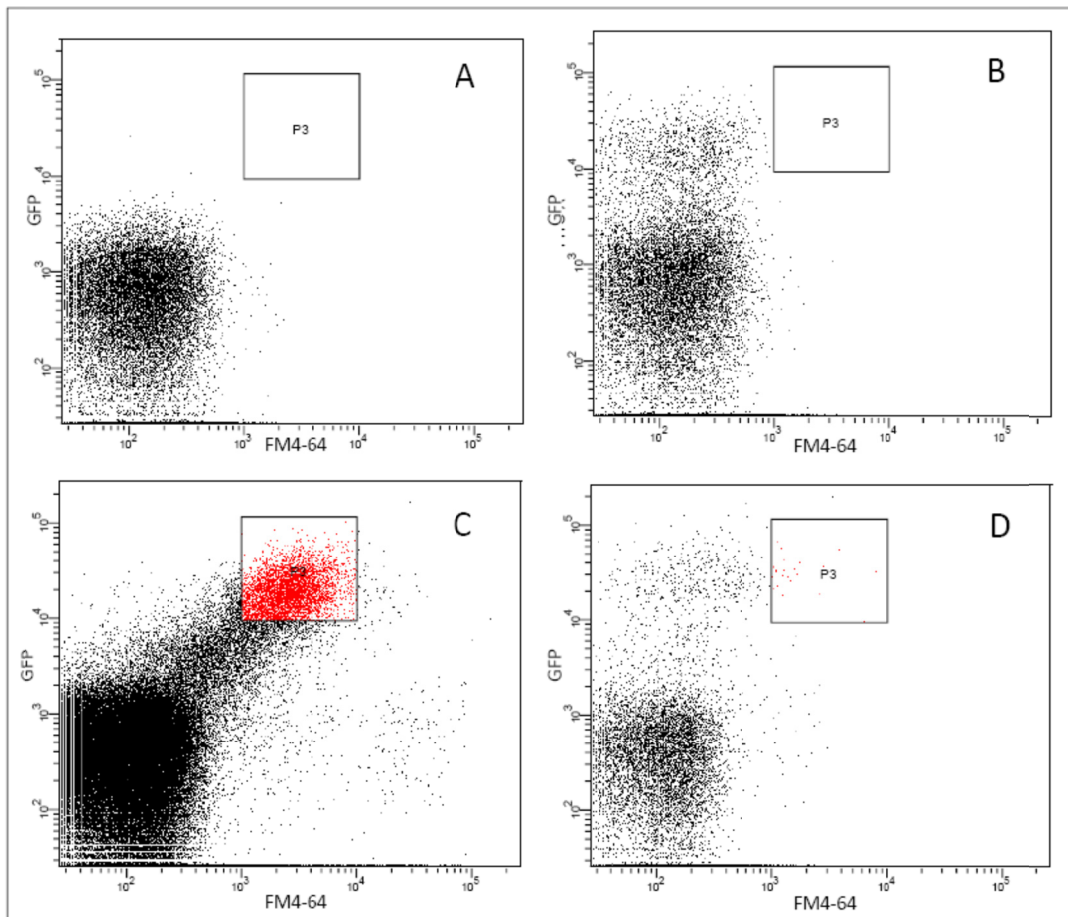


Abbildung 3.36: FACS-Analyse des Stammes LDN2/pHexscrY_{p,σ}-gfpmut2

A: Zellen, die ohne cAMP wuchsen und nicht mit FM4-64 behandelt wurden,
 B: Zellen, die mit cAMP wuchsen, aber nicht mit FM4-64 behandelt wurden,
 C: Zellen, die das Transposon pNK2883 trugen und mit cAMP wuchsen sowie mit FM4-64 behandelt wurden,
 D: Zellen, die das Transposon pNK2859 trugen und mit cAMP wuchsen sowie mit FM4-64 behandelt wurden,
 P3: Region, in der sowohl rote als auch grüne Zellen detektiert wurden.

Abbildung A zeigt eine Kontrollkultur, die weder in Gegenwart von cAMP angezogen, noch mit FM4-64 gefärbt wurde. In diesen Zellen konnte weder ein GFP-Signal noch ein FM4-64-Signal detektiert werden, nur unspezifische Signale sind zu erkennen (unten links). Abbildung B zeigt eine Kultur, die in Gegenwart von cAMP angezogen wurde, aber nicht mit FM4-64 gefärbt wurde. In dieser Kultur lassen sich Zellen detektieren, die ein GFP-Signal zeigen, (oben links), aber keine Zellen, die ein FM4-64 Signal generierten.

Abbildung C zeigt die Kultur, die das Transposon pNK2859 trägt. Die Zellen wurden mit cAMP angezogen und mit FM4-64 gefärbt. Zellen, die sowohl ein GFP-Signal als auch ein FM4-64-Signal zeigten, sind in rot zu sehen. Abbildung D zeigt ebenso behandelte Zellen, die das Transposon pNK2883 trugen. In den mit P3 bezeichneten Feldern sind jeweils die Zellen abgebildet, die sowohl ein rotes als auch ein grünes Signal zeigten. Aus der Kultur LDN2/pHex $scrY_{p,o}$ -gfpmut2/pNK2883+cAMP wurden ca. 4000 Zellen isoliert, die kein GFP-Signal mehr zeigten. Diese wurden in 500µl LB₀-Medium aufgefangen. Bei der Kultur LDN2/pHex $scrY_{p,o}$ -gfpmut2/pNK2859+cAMP wurden weniger Zellen detektiert. Dies könnte z.B. an einer unzureichenden Färbung des FM4-64 liegen. Auch die Zellen dieses Stammes wurden jedoch aufgefangen, um zu überprüfen, ob der Verlust des GFP-Signals in einer Mutation im potentiellen cAMP-Transporter begründet lag.

Die Zellen wurden verdünnt, so dass ca. 1000 Kolonien auf LB₀-Cam-Platten ausgestrichen werden konnten. Diese wurden einzeln gepickt und auf McCMal-Platten ausgestrichen mit dem jeweiligen Antibiotikum für das Transposon und Chloramphenicol (zur Selektion des Plasmides pHex $scrY_{p,o}$ -gfpmut2) sowie cAMP. Insgesamt wurden rund 1000 Kolonien gepickt und getestet. Zwei Kolonien blieben unter diesen Umständen weiß, hatten also entweder einen Defekt im Maltose-System oder aber in dem gesuchten cAMP-Aufnahmesystem. Beide Kolonien enthielten noch das Transposon pNK2859, was durch die transposonvermittelte Resistenz nachgewiesen wurde.

3.5.7 Phänotypische Untersuchung der gefundenen Mutanten und P1-Transduktion

Diese beiden gefundenen Mutanten wurden erneut einem Markertest auf McCMal-Platten unterzogen (Tabelle 3.8), um den Phänotyp zu verifizieren.

Tabelle 3.8: Untersuchung der FACS-Mutanten, die keine Maltose mehr verstoffwechseln konnten

	1*	2*	LDN2 (Kontrolle)
McCMal	w	w	w
McCMal + 1mM cAMP	w	w	3+

Bei dem erneuten Markertest konnte bestätigt werden, dass es sich bei Mutation 1* und 2* um Mutanten handelte, die einen Defekt im cAMP-Aufnahmesystem oder im Maltose-Aufnahmesystem trugen. Die Mutanten wurden einer P1-Transduktion unterzogen mit Selektion auf das Antibiotikum des jeweiligen Transposons. Zielstamm war wiederum der Stamm LDN2($\Delta cyaA$). Alle erhaltenen Kolonien wurden erneut auf McCMal +/- cAMP gepatcht. In keinem der Fälle wurde der Phänotyp transduziert. Auch eine neuerliche Transduktion zunächst in den Wildtyp-Stamm LJ110, dann erneut in den Teststamm LDN2 konnte keine Kolonien hervorbringen, die sowohl die Resistenz

des Transposons, als auch weiße Kolonien auf McCMal+cAMP-Platten aufwiesen. Damit war es sehr schwierig, die erhaltenen Mutationen einzugrenzen und ihre Lokalisierung im Genom festzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus Zeitgründen keine anderen Methoden zur Identifizierung einer Mutation in einem potentiellen cAMP-Transporter durchgeführt werden.

Mit der hier erläuterten Methode war es im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, Mutanten zu identifizieren, die einen Defekt in einem möglichen cAMP-Aufnahmesystem zeigten. Durch die erfolgreiche Transposonmutagenese mit den Minitransposons pNK2883 und pNK2859, die Konstruktion einer cAMP-abhängig exprimierten GFP-Mutation, die in FACS-Analysen nachweisbar ist, und der Möglichkeit, für den cAMP-Transport inhibierte Zellen des Stammes LDN2 phänotypisch nachzuweisen, ist aber ein System etabliert worden, mit dem die Identifikation derartiger Mutanten weiterhin verfolgt werden kann.

4 DISKUSSION

4.1 Topologie der Membrandomäne des Glukose-Transporters EIICB^{Glc}

4.1.1 **Strukturaufklärung mittels Cystein-Scanning**

Für die Topologie der Membrandomäne des Proteins EIICB^{Glc} existierten zu Beginn dieser Arbeit zwei Modelle, die für die Aminosäuren 1-280 identisch sind, sich aber in den letzten 100 AS der C-Domäne unterscheiden. In dieser Arbeit wurde durch den Einsatz funktioneller Einzel-Cystein-Varianten sowie den sulfhydrylspezifischen Komponenten MTSET und BM versucht, weitere Ergebnisse zu erhalten, die eines der beiden Modelle unterstützen oder für ein neues Modell dieses Transportproteins sprechen.

Für die Durchführung war es notwendig, die nativen Cysteine auszutauschen und dafür an kontrovers diskutierten Positionen Cysteine einzubringen, um die Untersuchung eines einzigen Cysteins zu gewährleisten. Eine hinreichende Optimierung der Protokolle für die Reinigung und das Cystein-Scanning des Membranproteins EIICB^{Glc} war erforderlich und konnte im Rahmen dieser Arbeit erzielt werden. Die Ergebnisse der Cystein-Scanning-Untersuchungen zeigen, dass eine Unterscheidung zwischen cytoplasmatischen und periplasmatischen Aminosäuren möglich ist. Membranständige Aminosäuren scheinen unter den gewählten Bedingungen für das Biotinmaleimid zugänglich zu sein.

Die Ergebnisse der Cystein-Scanning-Untersuchung sprechen nicht eindeutig für eines der beiden für EIICB^{Glc} postulierten Modelle der Arbeitsgruppen um Erni oder Lengeler. Auch die Ergebnisse früherer LacZ- und PhoA-Fusionsproteine ließen keine eindeutige Zuordnung zu einem Modell zu [80-83]. Es ist daher wahrscheinlich, dass keines der beiden Modelle haltbar ist. Auf der Basis der Daten aller vorangegangenen Arbeiten wird hier ein neues Modell für das Membranprotein EIICB^{Glc} vorgeschlagen und bisherige Erkenntnisse über die Struktur, wie z.B. in dieser Arbeit erhobene Cystein-Scanning-Ergebnisse, sollen anhand dieses Modells diskutiert werden.

4.1.2 **Hinweise auf einen Aufbau der Domäne EIIC^{Glc} aus 10 transmembranen Helices**

Bei den bisherigen Modellen dieses Membrantransporters wurde, basierend auf experimentellen Ergebnissen, von 8 transmembranen Helices ausgegangen (s. Abschnitt 1.2.3). Andere Studien von Daley et al. postulieren hingegen 10 Helices für dieses Protein [144]. Diese Ergebnisse beziehen sich auf die Untersuchung hydrophober Bereiche des Proteins, die aufgrund ihrer Größe α -helicale Strukturen bilden können [78]. Dabei wird davon ausgegangen, dass mindestens 20 Aminosäuren nötig sind, um mit einer α -Helix die komplette Cytoplasmamembran zu durchspannen [78]. Zusätzlich zu den Hydrophobizitätsstudien wurde auch das Kompartiment der jeweiligen C-Termini der untersuchten Proteine bestimmt, um die Aussagekraft der Hydrophobizitätsstudien zu

erhöhen. Die Wahrscheinlichkeitsvorhersage der Aminosäuren von EIICB^{Glc} für periplasmatische, cytoplasmatische und transmembrane Bereiche zeigt Abbildung 4.1.

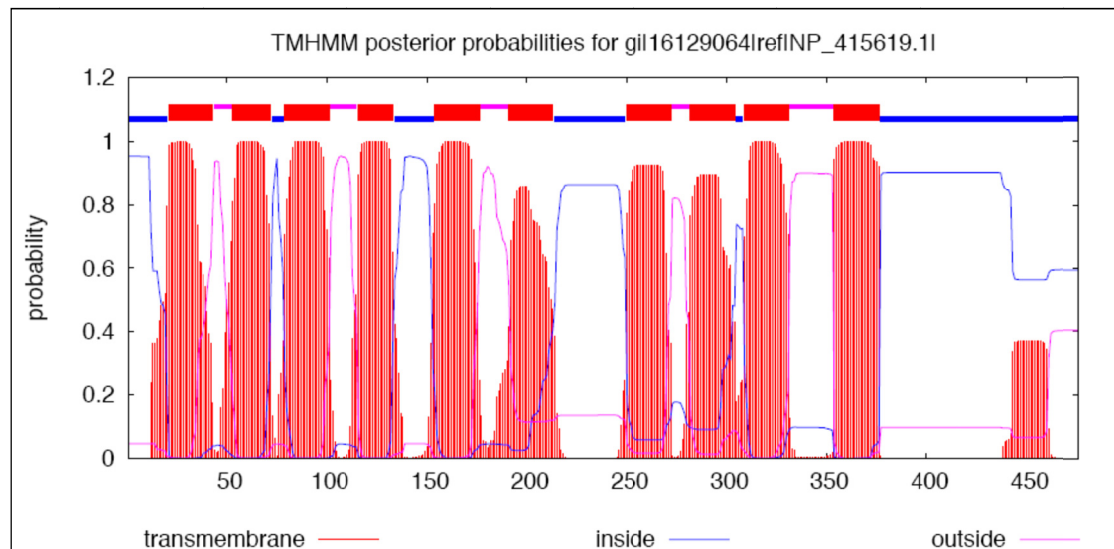


Abbildung 4.1: Vorhersage der Membrantopologie für EIICB^{Glc} durch Hydrophobizitätsuntersuchungen nach Daley et al.

Mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen und PhoA-Fusionsproteinen wurde bestimmt, dass sich der C-Terminus von EIICB^{Glc} im Cytoplasma befindet [144, 145]. Des Weiteren wurde die Hydrophobizität aller Aminosäuren des Proteins mit dem Modell TMHMM bestimmt. Rot: Transmembrane Bereiche, rosa: periplasmatische Bereiche, blau: cytoplasmatische Bereiche. Die Länge der transmembranen Bereiche beträgt im Durchschnitt 22 Aminosäuren. Entnommen aus [145].

Nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit wurde erstmals die komplette Struktur der C-Domäne eines PTS-Transportproteins veröffentlicht [74]. Es handelt sich hierbei um die membranständige Domäne des Diacetylchitobiosetransporters EII^{Chb} des Bakteriums *Bacillus cereus*. Die Membrandomäne von EII^{Chb} besteht aus 433 Aminosäuren. Der Transporter gehört zur Superfamilie der Glukosetransporter und zu der Unterfamilie der Laktose-PTS-Transporter [13, 14] und ist daher zu EIICB^{Glc} homolog. Die C-Domäne des Diacetylchitobiosetransporters ist aus 10 transmembranen Helices aufgebaut. Die Studie von Daley et al. sagte für das entsprechende Protein in *E. coli* K-12 (Protein ChbC oder CelB, Gen *chbC*) ebenfalls 10 Helices voraus, was die von ihnen gewählte Methodik zu bestätigen scheint [144]. Zusätzlich zu den helicalen Strukturen weist das Protein EII^{Chb} aus *B. cereus* noch mehrere haarnadel-ähnliche Strukturen auf. Diese treten vor allem in der Region auf, die das in der Glukose-PTS-Familie konservierte GITE-Motiv enthält. Derartige Strukturen lassen sich ausschließlich durch Kristallisationsverfahren wie in dieser Studie angewendet, detektieren. Auch amphipathische Helices an den Übergängen von der Lipiddoppelschicht zum löslichen Milieu konnten gezeigt werden. Somit ist die Struktur dieses Proteins wie erwartet sehr komplex und geht weit über die Frage nach der Position der transmembranen Helices hinaus. Ein Alignment der Aminosäuren dieses Proteins sowie der Aminosäuren von EII^{Chb} aus *Escherichia coli* und EIIC^{Glc} aus *Escherichia coli* ist in Abbildung 4.2 gezeigt. Dieses Alignment basiert auf der Studie von Cao et al. [74].

Konserviert vorliegend sind u.a. die Aminosäuren H211 (Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuren des Proteins EIICB^{Glc} aus *E. coli*), in diesem Alignment direkt hinter der transmembranen Helix VI, und den am GITE-Motiv beteiligten Aminosäuren I296 und E298.

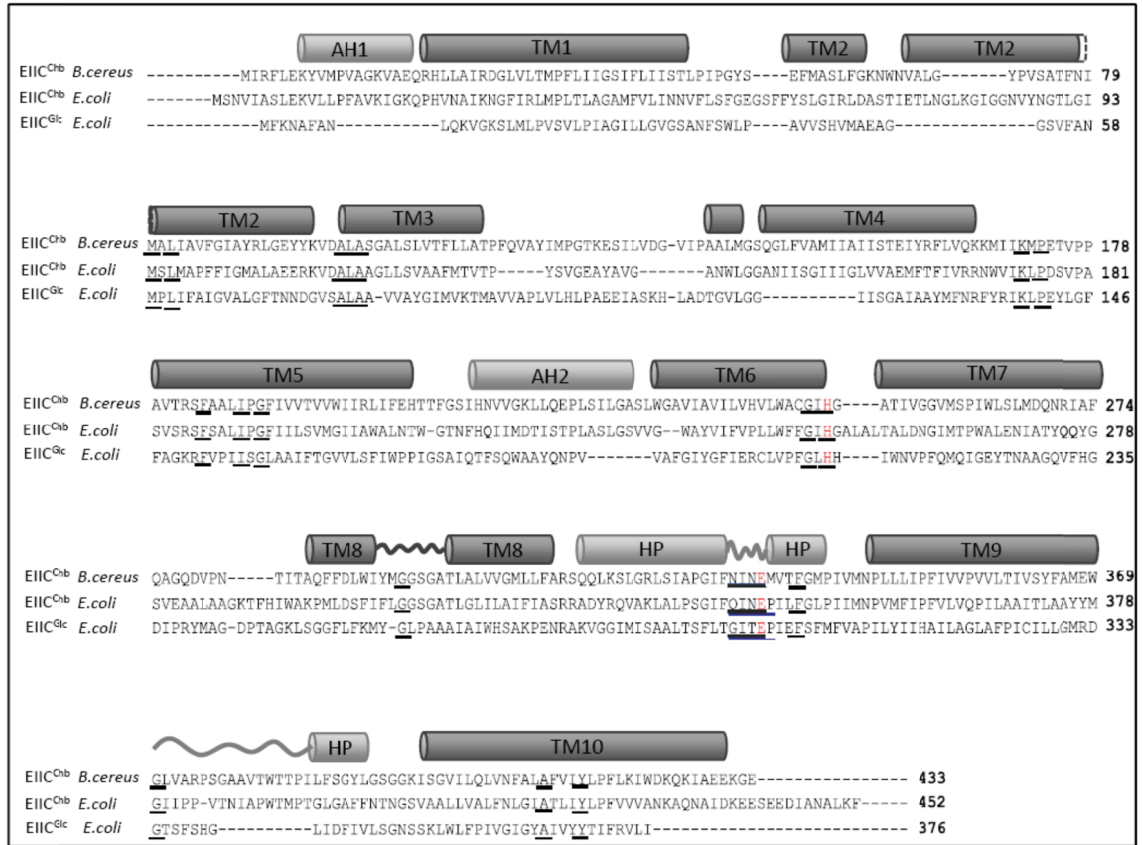


Abbildung 4.2: Alignment der Proteine EIICB^{Chb} (*B. cereus*), EIICB^{Chb} (*E. coli*) und EIIC^{Glc} (*E. coli*)

TM: Transmembrane Helix, AH: amphipathische Helix, HP: haarnadelartige Struktur. Alle genannten Strukturen beziehen sich auf die bereits aufgeklärte Struktur von EIICB^{Chb} aus *B. cereus*. Unterstrichen: Konservierte Aminosäuren. Verändert nach [74].

Aufgrund dieser Erkenntnisse und der TMHMM-Vorhersage für EIICB^{Glc} wurde ein neues Modell von EIIC^{Glc} gebildet, welches ebenfalls auf 10 transmembranen Helices basiert. Das neue Modell ist in Abbildung 4.3 gezeigt.

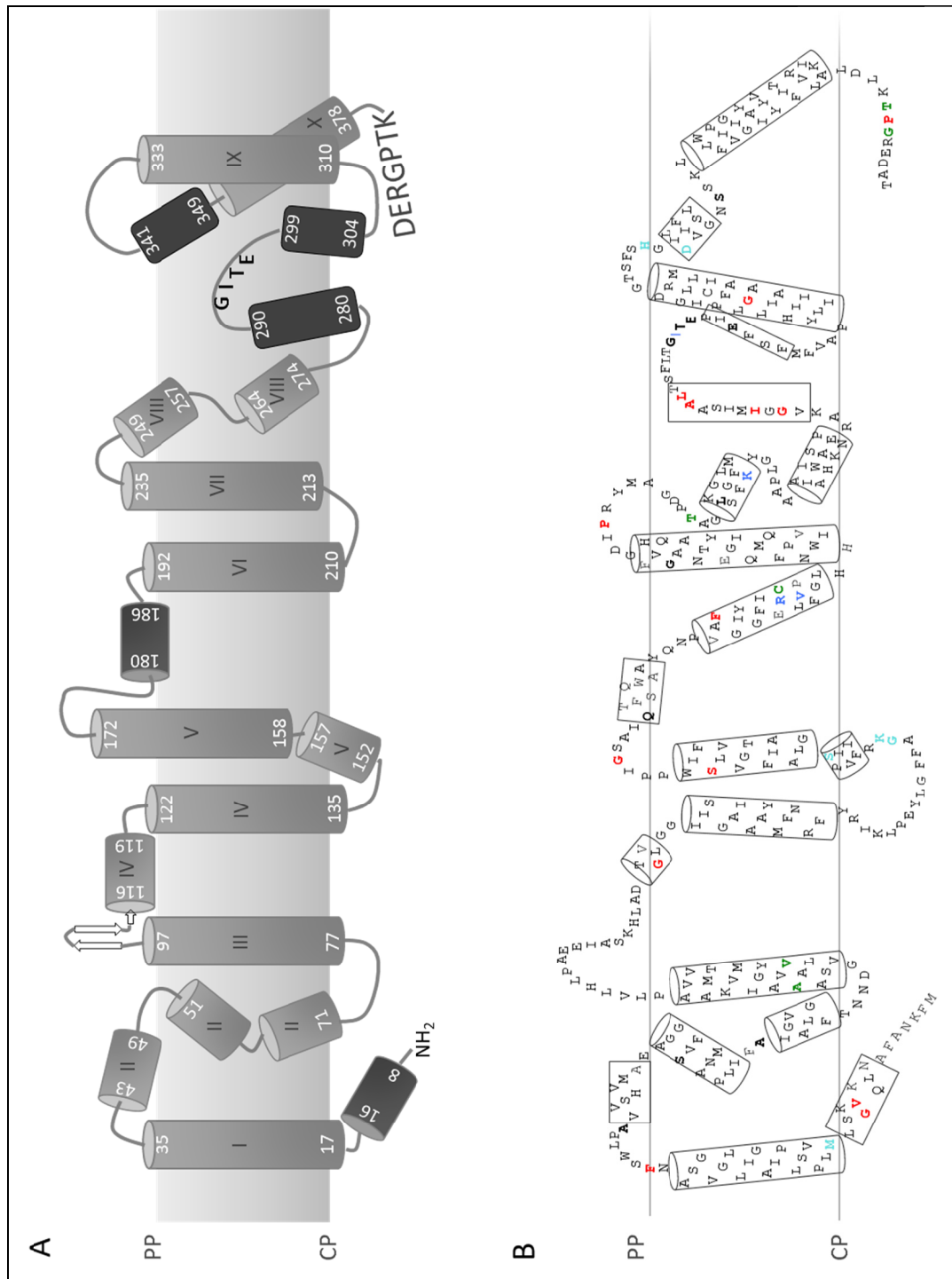


Abbildung 4.3: Neues Modell des Proteins EIIC^{Glc}

A: Schematische Darstellung der potentiellen Strukturen der C-Domäne von EIIC^{Glc}. PP: Periplasma, CP: Cytoplasma. Graue Zylinder: α-helicale Strukturen, dunkle Zylinder: amphipathische Helices, Pfeile: β-Stränge, dunkle Flächen: Haarnadelähnliche Strukturen, römische Zahlen: Nummerierung der α-Helices, Buchstaben: konservierte Aminosäuren der potentiellen Substratbindestelle und der Linkerregion. B: Darstellung der einzelnen Aminosäuren der C-Domäne. Zylinder: Transmembrane Helices. Quadrate: Amphipathische Helices, haarnadelähnliche Strukturen. Fett: Aminosäuren, die mit Hilfe des Cystein-Scannings untersucht wurden. Bunt: Aminosäuren, deren Austausch Mutationen verursachen (s. Abschnitt 1.2.3). Rot: Mutationen mit veränderter Substratspezifität, hellblau: Mutationen, die eingeschränkten Transport bei gleichbleibender Phosphorylierung zeigen, dunkelblau: Mutationen, die einen entkoppelnden Phänotyp zeigen, grün: Mutationen mit eingeschränktem Transport. Die untere Darstellung weicht aus grafischen Gründen leicht von der oberen Darstellung ab.

In dem Modell sind ausgehend von dem in Abbildung 4.2 gezeigten Alignment und den von Daley et al. erhobenen Daten 10 transmembrane Helices für EIICB^{Glc} gezeigt [144], wobei sich die ersten Helices größtenteils an den schon zuvor postulierten Helices für EIICB^{Glc} orientieren. Für die Aminosäuren 8-16 wird hier eine amphipathische Helix vorgeschlagen, da diese auch bei EIIC^{Chb} auftaucht und sich lipophile und hydrophile Aminosäuren in diesem Bereich abwechseln. Dies ist typisch für amphipathische Helices, die daher oft im Übergangsbereich zwischen Membran und Cytoplasma angesiedelt sind, wie es auch hier der Fall wäre. Auch Robillard et al. [51] schlugen eine Helix an ähnlicher Position vor. Die Helix I aus den Aminosäuren 17-35 wurde aus den Erni- und Lengeler-Modellen übernommen, ebenso wie die Helix II, die in diesen Modellen aus den Aminosäuren 51-71 gebildet wird. Zusätzlich wird hier nun vorgeschlagen, dass auch die Aminosäuren 43-49 noch der Bildung dieser Helix zugeteilt werden, wie im Alignment (Abbildung 4.2) zu sehen. Die transmembrane Helix III wurde den bisherigen Modellen entnommen. In dem Protein EII^{Chb} aus *B. cereus* folgt auf die dritte transmembrane Helix eine Struktur aus β -Strängen, die bei der Dimerisierung eine Rolle spielt [74]. Diese Struktur wurde für das vorliegende Modell übernommen, obwohl hierfür keine experimentellen Ergebnisse vorliegen. Es ist allerdings bekannt, dass dieser Bereich konserviert ist und Saier et al. schlugen eine amphipathische Helix für diese Region vor [146]. Weitere Experimente müssen daher klären, welche Struktur hier tatsächlich vorliegt. Im Anschluss daran folgen die Aminosäuren 116 bis 119, die in Anlehnung an das Alignment als Teil der transmembranen Helix IV gezeigt werden, ebenso wie die Aminosäuren 122-135. Helix V setzt sich wie im Lengeler- und Erni-Modell aus den Aminosäuren 152-172 zusammen. Die Aminosäuren 180-186 befinden sich in dem neuen Modell in einer amphipathischen Helix. Auch diese Struktur leitet sich aus dem Alignment ab. Transmembranhelix VI entspricht den Aminosäuren 192-210, ebenfalls wie im Lengeler- und Erni-Modell vorgeschlagen. Der Bereich der Aminosäuren 213-235 wird in dem neuen Modell der transmembranen Region der Helix VII zugeordnet. In diesem Bereich gab es bislang weder im Erni-, noch im Lengeler- oder Daley-Modell eine transmembrane Region. Für eine derartige Struktur an dieser Stelle spricht jedoch das hier durchgeführte Cystein-Scanning, welches die Aminosäure G230 dem Periplasma zuordnet. Die restlichen Aminosäuren der C-Domäne des Glukostransporters wurden in den beiden Modellen von Erni und Lengeler kontrovers diskutiert. Die Aminosäuren 249-280 wurden im Erni-Modell einem cytoplasmatischen Loop zugeordnet, im Lengeler-Modell erstreckte sich dieser sogar bis Aminosäure 304. Im neuen Modell stellen die Aminosäuren 249-274 dagegen die VIII. transmembrane Helix in Anlehnung an das Alignment mit EIIC^{Chb}. Es wurde bisher angenommen, dass dieser Bereich an der Substratbindung und -translokation beteiligt ist. Das GITE-Motiv liegt im Lengeler-Modell ebenfalls in diesem Loop [12, 66]. Im neuen Modell wird hier aber eine Helix angenommen. Dennoch kann dieser Bereich an der Substrattranslokation beteiligt sein, da er in direkter Nachbarschaft zu den Aminosäuren 280-309 liegt. Cao et al. zeigten in ihrer Arbeit des Weiteren mögliche

Konformationen, die bei der Bindung und Translokation des Substrats Diacetylchitobiose eine Rolle spielen. Ähnlich dynamische Proteinkonformationen scheinen auch für EIICB^{Glc} wahrscheinlich.

4.1.3 Cystein-Scanning-Daten in Bezug auf das neue Modell von EIICB^{Glc}

Auch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse aus den Cystein-Scanning-Untersuchungen fließen mit in das neue Modell ein. Die periplasmatische Position von C230 widerspricht sowohl dem Erni- als auch dem Lengeler-Modell. Im neuen Modell liegt die Aminosäure zwar in einer Helix vor, liegt aber in der Nähe zum Periplasma und wäre somit von hier aus zugänglich. Ähnliches gilt für die Aminosäure C54. Die durch das Cystein-Scanning ermittelten Positionen für die Aminosäuren A42, S54, G230, und H339 stimmen somit mit dem neu erstellten Modell überein. Für A64, welches zwischen den beiden Teilen der zweiten transmembranen Helix liegt, scheint dies nicht der Fall zu sein, da diese Aminosäure durch das Cystein-Scanning dem Periplasma zugeordnet wird, sie aber in Abbildung 4.3 anders als S54 nicht in der Nähe des Periplasmas zu liegen scheint. Abbildung 4.4 zeigt das Homodimer EIIC^{Chb}. Die Position C64 läge in diesem Protein in der markierten Region vor, die periplasmatisch zugänglich scheint, da die Helix II in diesem Bereich in das Periplasma ragt. Dieses Ergebnis spricht daher dafür, dass EIICB^{Glc} eine ähnliche Konformation einnehmen kann.

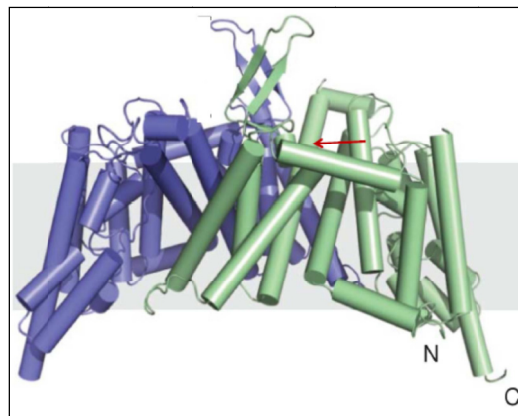


Abbildung 4.4: Abbildung der homodimeren C-Domäne des EIIC^{Chb}.

Die ungefähre Position der Aminosäure 64 ist mit dem roten Pfeil gekennzeichnet. Sie könnte vom Periplasma aus zugänglich sein.

Obwohl die Aminosäure L250 ebenso wie G230 in dem neuen Modell einer periplasmanahen Membranposition zugeordnet wird, zeigte das Cystein-Scanning für die Aminosäure L250 eine cytoplasmatische Position. Dies könnte durch eine Konformation des Proteins erklärt werden, in der die Substratbindestelle vom Periplasma aus gesehen abgeschirmt wird. Cao et al. [74] schlugen für diese Konformation vor, dass der erste Teilbereich der Helix VIII direkt an dieser Abschirmung des Substrats beteiligt ist, wenn

das Protein die Konformation einnimmt, in der das Substrat vom Cytoplasma aus zugänglich ist.

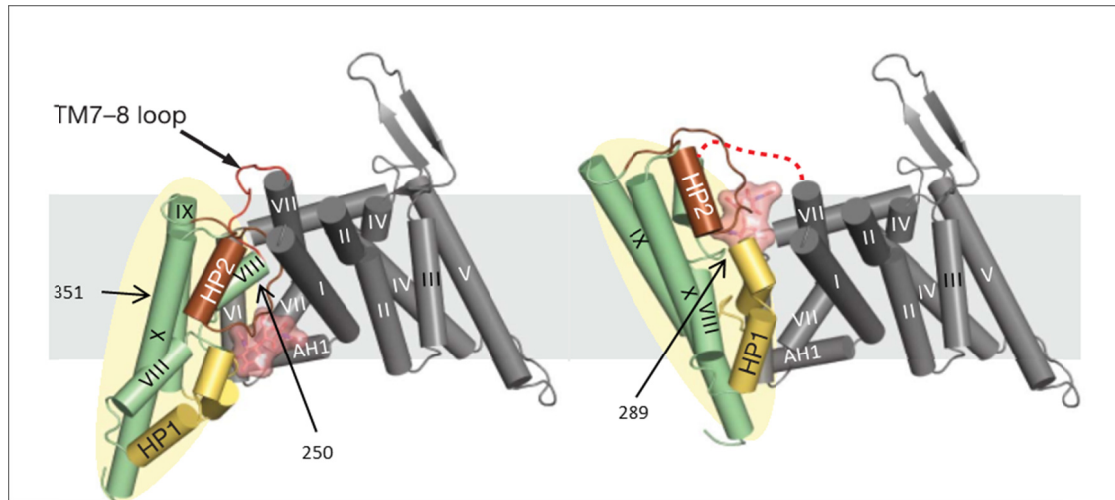


Abbildung 4.5: Konformationsänderung des EIIC^{Chb} bei der Substrataufnahme

Römische Buchstaben: Nummerierung der Helices. AH1: amphipathische Helix, HP: Haarnadelartige Struktur. Durch eine Veränderung der periplasmatischen Schleife zwischen Helix VII und Helix VIII kommt es zu einer Umgestaltung des bunt markierten Bereichs. Das Substrat ist rot eingezeichnet. Links: Nach innen offene Konformation, rechts: nach außen offene Konformation. Die im Text diskutierten Aminosäuren L250, L289 und S351 sind ebenfalls eingezeichnet. Verändert nach [74].

Diese Konformation ist in Abbildung 4.5 links zu sehen. Die Aminosäure L250 könnte hier nicht mehr vom Periplasma aus zugänglich sein. Derselbe Konformationszustand könnte auch für die cytoplasmatische Lage der Aminosäure S351 verantwortlich sein. Gemäß dem ursprünglich für EII^{Md} etablierten Cystein-Scanning-Protokoll, in dem kein Mannitol im Wachstumsmedium vorhanden war, wurde auch bei der Durchführung des Cystein-Scannings für EIICB^{Glc} keine Glukose eingesetzt. Eine nach außen hin offene Konformation scheint daher wahrscheinlicher als die hier vorgeschlagene. Letzlich handelt es sich bei den Cystein-Scanning-Mutanten aber nicht um WT-Proteine, weswegen nicht ausgeschlossen werden kann, dass die hier gezeigte Konformation von den Proteinen eingenommen wird.

Für die Lokalisierung der Aminosäure L289, die sich nach dem neuen Modell in der haarnadelähnlichen Struktur 1 befindet, könnte dagegen die gleichzeitig eingebrachte Mutation K150E verantwortlich sein. Diese Mutante kann zwar intrazelluläre Glukose phosphorylieren, aber keine extrazelluläre Glukose mehr transportieren, da sie vermutlich an der Isomerisierung des Proteins beteiligt ist, welche in der Konformationsänderung resultiert, mit der die Glukose ins Cytoplasma entlassen werden kann [64]. Die entsprechende Konformation des EIIC^{Chb} ist in Abbildung 4.5 rechts zu sehen. L289, welches in dem neuen Modell entsprechend in der ersten haarnadelartigen Struktur 1 liegt, ist hier vermutlich vom Periplasma aus zugänglich. Für die Aminosäure 301, für die sowohl

im Cystein-Scanning als auch durch Fusionsproteine [80] eine periplasmatische Position ermittelt wurde, kann ebenfalls die Vorstellung der nach außen hin offenen Konformation herangezogen werden. Sie befindet sich im neuen Modell im zweiten Teil der Haarnadelstruktur 1.

Somit entsprechen auch die Cystein-Scanning-Ergebnisse dem neuen Modell. Sie verdeutlichen, dass das Protein keine starre Struktur besitzt, sondern ein dynamischer Komplex ist.

4.1.4 Zuordnung der Fusionsprotein-Ergebnisse im neuen Modell von EIICB^{Glc}

In vorangegangenen Arbeiten dieser Arbeitsgruppe wurde die Struktur von EIIC^{Glc} des Weiteren mit LacZ- und PhoA-Sandwich-Fusionsproteinen untersucht. Einige Positionen, die mit dem Cystein-Scanning nicht untersucht wurden, sind die Aminosäuren 326 und 347. Für 326 wurden in zwei Arbeiten unterschiedliche Ergebnisse erhalten [82, 147]. So wurde ein C-terminales Fusionsprotein an dieser Stelle dem Cytoplasma zugeordnet [147], während ein Sandwichfusionsprotein für diese Position eine periplasmatische Lage voraussagte [82]. In dem hier erstellten Modell würde diese Position membranständig in der Helix IX liegen, was erklären könnte, dass es kein einheitliches Ergebnis für diese Position durch die Untersuchung von Fusionsproteinen gab. Für Aminosäure 347 kam es ebenfalls zu kontroversen Ergebnissen in diesen beiden Arbeiten. Diese Aminosäure liegt nach dem neuen Modell in der zweiten haarnadelartigen Struktur. Für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte wieder die postulierte Konformationsbildung (Abbildung 4.5) verantwortlich sein, da auch Proteine untersucht wurden, die durch die Mutation K150E in der nach außen offenen Konformation gehalten wurden, sowie Proteine ohne diese Einschränkung, die auch die andere Konformation einnehmen konnten.

4.1.5 Bekannte funktionelle Mutanten von EIICB^{Glc} und ihre Lage im neuen Modell

Die amphipathische Helix 1 ist vermutlich für den richtigen Einbau des Proteins in die Membran zuständig, wie auch die Mutation V12F zeigt [23, 89]. Diese Mutation verursacht einen veränderten Einbau des Proteins in die Membran und liegt in dem neuen Modell ebenfalls in dieser Helix [89].

Viele der Mutationen, die die Funktionalität von EIICB^{Glc} beeinträchtigen, liegen gruppiert vor. Die entkoppelten Mutationen (dunkelblau in Abbildung 4.3) liegen in dem neuen Modell in benachbarten helicalen Bereichen und in direkter Nähe des GITE-Motivs. Sie können daher direkt an der Bildung einer Substratbindetasche beteiligt sein. Beutler et al. untersuchten Positionen in funktionellen Proteinen, in denen artifizielle Linker toleriert wurden [77]. Es konnten keine funktionellen Proteine isoliert werden, in denen sich im Bereich der Aminosäuren 297-304 ein Aminosäurelinker befand, obwohl das dort verwendete Erni-Modell eine periplasmatische Schleife vorhersagte. Im neuen Modell bildet dieser Bereich eine haarnadelartige Struktur aus, die womöglich direkt an der Bildung

der Substratbindetasche beteiligt ist, was eine mögliche Erklärung dafür ist, dass hier keine Linkeramino­säuren toleriert werden. Auch Untersuchungen an Proteinen, deren C- und N-Terminus in die cytoplasmatischen und periplasmatischen Bereiche des Erni-Modells versetzt wurden, zeigten, dass das Protein mit C- und N-Terminus im Bereich der Aminosäuren 297-304 weder stabil noch funktionell ist. Ein Fusionsprotein mit PhoA am neuen N-Terminus konnte das Protein zwar stabilisieren, seine Funktionalität aber nicht wieder herstellen [69]. Dies lässt sich abermals mit der amphipatischen Helix im neuen Modell erklären, die entweder direkt essentiell für die Substrattranslokation ist, oder nur in Verbindung mit den umgebenden Helices und Strukturen zu der Funktion des Proteins beiträgt. Auch die Ergebnisse von Lee et al. [43], die einen Membrananker für die Region ab Aminosäure 320 vorhersagen, lassen sich auf das neue Modell anwenden.

Die hochkonservierte Aminosäure H212 befindet sich cytoplasmatisch zwischen Helix VI und Helix VII. Diese Aminosäure befindet sich auch beim Transporter EIIC^{Chb} an dieser Position. Sie ist hier vermutlich direkt an der Substratbindung beteiligt [74]. H212 ist in allen Transportern der Glukose-Superfamilie hoch konserviert, weswegen angenommen werden kann, dass sie bei all diesen Transportern eine Rolle bei der Substratbindung und -translokation [53] sowie ggf. der Phosphorylierung des jeweiligen Substrats spielt [148]. Diese Annahme wird auch durch die Mutation H212Q in EIICB^{Glc} unterstützt, die eine inhibierte Transportfähigkeit für Glukose aufweist [51, 53].

4.1.6 Strukturell und funktionell wichtige Bereiche des EIICB^{Glc}

Durch die Verteilung jener Mutationen, die die Funktionsweise des Proteins beeinflussen, sowie durch Untersuchungen von Split-Varianten des Proteins und Linkerinsertionen lassen sich funktionell essentielle Helices von eher strukturell bedeutenden Regionen trennen. Die Aminosäuren des N-Terminus sind vermutlich für den korrekten Einbau des Proteins in die Cytoplasmamembran notwendig [129]. Darüber hinaus finden sich auch hier Mutationen, die einen direkten Einfluss auf die Substrattranslokation haben, wie z.B. die Mutation M17T, die zur Folge hat, dass das Protein sein Substrat nicht mehr über die Cytoplasmamembran transportieren kann [64]. Abbildung 4.5 zeigt, dass sich diese Helix ebenso wie der hier postulierte amphipathische Teil vor der ersten Helix in direkter Nachbarschaft zu der Substratbindetasche befinden könnte. Ein Einfluss dieser Aminosäuren auf die Funktionalität des Proteins scheint daher plausibel. Auch den transmembranen Bereichen V-VII des Lengeler-Modells, die in dem neuen Modell den Helices V-IX entsprechen, wurde eine Rolle bei dem Substrattransport zugesprochen [16]. Zumindest für den Bereich nach der V. Helix trifft dies auch für das neue Modell zu, wobei Helix V ebenso wie Helix X eher eine Rolle bei der Vermittlung der Konformationsänderung zu spielen scheint. Auch die Annahme, dass die Helixbereiche II-IV eher eine strukturelle Rolle spielen [16], könnte mit dem neuen Modell erklärt werden.

4.1.7 Konformationsänderungen des Proteins EIICB^{Glc} und Funktion des Linkerbereichs

Cao et al. postulierten, dass eine Veränderung des Loops zwischen Helix IV und V des einen Protomers des EIIC^{Chb}-Dimers das Substrat im anderen Protomer freilegen könnte, um es in das Cytoplasma zu entlassen [74]. Auch für EIICB^{Glc} scheint diese Lösung plausibel, da die Mutationen G149S und K150E, die das Protein in einer eingefrorenen Konformation festhalten und so die Substrattranslokation verhindern [64], auch hier in der Schleife zwischen Helix IV und Helix V liegen. Der Linkerbereich, der sich direkt an die letzte Helix anschließt, beinhaltet ebenfalls Mutationen, die die Funktionalität des Proteins beeinflussen können, wenn sie mutiert vorliegen [53]. Möglicherweise liegt dieser Teil daher in direkter Nähe zu der Substratbindetasche, hat einen Anteil an der Substrattranslokation und könnte hier als „Verschluss“ fungieren, der das Substrat nach der Konformationsänderung frei gibt. Siebold et al. zeigten ebenfalls, dass die Linkerrregion eine Konformationsänderung durchläuft, wenn das Protein phosphoryliert wird [23].

Auf welche Art genau die Wechselwirkung zwischen der C-Domäne und der B-Domäne zu den verschiedenen Konformationen des Proteins beiträgt, ist derzeit noch Gegenstand von Untersuchungen. Die Verteilung der entkoppelten Mutationen im neuen Modell lässt darauf schließen, dass der Bereich der Helices VI und VII sowie der Substratbindebereich um das GITE-Motiv für die Wechselwirkung mit der B-Domäne eine Rolle spielen müssen. Möglicherweise findet eine direkte Interaktion zwischen den beiden positiv geladenen Argininresten 424 und 426 in der B-Domäne und den negativ geladenen Glutamatresten 298 und 301 statt. Eine weitere Möglichkeit zur Vermittlung einer Wechselwirkung besteht aus dem positiv geladenen K257. Diese könnte eine Wechselwirkung mit dem D419 eingehen, welches in der Nähe des Phosphorylakzeptors Cystein 421 liegt. Die Tatsache, dass die Mutation K257N einen entkoppelten Phänotyp verursacht, scheint diese Theorie zu untermauern.

4.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse für die Strukturaufklärung von EIIC^{Glc}

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hier entworfene Methode des Cystein-Scanning-Verfahrens erfolgreich für das Protein EIICB^{Glc} verwendet werden konnte. Mit Hilfe der gewonnenen Ergebnisse sowie mit anderen strukturellen Informationen über dieses Protein und mit den Erkenntnissen der Strukturaufklärung des PTS-abhängigen Diacetylchitobiosetransporters EIIC^{Chb} konnte ein neues Modell der Membrantopologie des Proteins EIICB^{Glc} gebildet werden. Weitergehende Untersuchungen, um das neue Modell zu bestätigen, sind jedoch nötig. So könnten noch mehr Cystein-Reste mit der hier etablierten Methode untersucht werden, um das vorgeschlagene Modell zu verifizieren. Um mehr über die Struktur von EIICB^{Glc} zu erfahren, wären sicherlich auch Ansätze wie das Cystein-Crosslinking hilfreich. Mit dieser Methode, die angewandt wurde, um den verwandten PTS-Transporter EIIC^{Bgl} und LacY zu untersuchen [72, 87], lassen sich

Abstände zwischen zwei Cysteinen messen und so ggf. auch die Positionen der einzelnen Helices zueinander bestimmen. Auch andere Methoden wie das EPR oder CD-Messungen wären erfolgversprechend. Letztendlich wäre aber eine Strukturaufklärung über die Bildung von Kristallen oder NMR-Techniken, wie sie für den Transporter EIIC^{Chb} gezeigt wurde, zum jetzigen Zeitpunkt die einzigen Methoden, die die tatsächliche Struktur des Proteins zeigen und nicht nur Hinweise für ein vorläufiges Modell liefern würden.

4.2 Charakterisierung der entkoppelten Mutante EIICB^{Glc}_{R203H}

Plasmidkodiertes EIICB^{Glc} wurde in einem Stammhintergrund gebildet, dem die PTS-Gene *ptsHI_{err}* fehlen. In diesem Stamm liegt das Protein konstitutiv dephosphoryliert vor. Ohne eine entkoppelte Mutation können die Zellen daher das Substrat Glukose nicht verstoffwechseln. Es wurden Mutanten gesucht, die in diesem Stamm auf McCGlc-Platten rote Kolonien zeigten, da diese in der Lage sind, Glukose zu verstoffwechseln und damit vermutlich eine entkoppelte Mutation tragen. Der Aminosäureaustausch R203H konnte auf diese Weise gefunden und identifiziert werden. Diese Aminosäure konnte auch in anderen Untersuchungen schon mit einem entkoppelten Phänotypen in Verbindung gebracht werden, was dafür spricht, dass die für die Kopplung von Transport und Phosphorylierung der Glukose verantwortlichen Aminosäuren mittlerweile alle identifiziert werden konnten. Um zu testen, ob die Mutante strukturell noch in der Lage ist, Mlc zu binden, wurde das Protein EIICB^{Glc}_{R203H} auf diese Fähigkeit hin untersucht. Offensichtlich ist das Protein nach wie vor in der Lage, Mlc zu titrieren. Interessanterweise fällt beim WT im Stamm LZ150/F⁺lac \emptyset (*ptsGp, o-lacZ*) die β -Galaktosidase-Aktivität ab, wenn die Expression des *ptsG*-Gens durch IPTG induziert wird. Eigentlich müssten in diesem Fall mehr EIICB^{Glc}-Proteine in der Zelle vorliegen, die Mlc binden können und die β -Galaktosidase-Aktivität müsste dementsprechend ansteigen. Auch Untersuchungen zur Proteinexpression von auf pRR48 kodierten Proteinen, die im Rahmen des Cystein-Scanning-Versuchs gemacht wurden, zeigten, dass IPTG die Transkription der auf dem pRR48-Plasmid kodierten Proteine steigert (Abbildung 3.1). Die Induktion mit IPTG bei den Versuchen im Stamm STB154 zeigte auch eine dementsprechend erhöhte Mlc-Titration, die vermutlich auf eine gesteigerte Expression des WT-Proteins zurückzuführen ist. Der Grund für das Fehlen dieses Effekts im Stamm LZ150/F⁺lac \emptyset (*ptsGp, o-lacZ*) ist daher unklar.

Auch im Stamm STB154, in dem die EIICB^{Glc}-Proteine konstitutiv in ihrer dephosphorylierten Form vorliegen, konnte gezeigt werden, dass die mutierten Proteine Mlc titrieren können (s. Abbildung 3.14). Bei dem Protein EIICB^{Glc}_{R203H} hat die Zugabe von Glukose kaum eine Auswirkung auf die Titration von Mlc. Dies ist zu erwarten, da das EIICB^{Glc} in diesem Stammhintergrund konstitutiv dephosphoryliert vorliegt, also unabhängig von der Anwesenheit der Glukose ist. Im WT-Protein scheint es hier dagegen einen Effekt zu geben. Die hier erhaltene hohe Standardabweichung ist aber ein Hinweis darauf, dass dieser Effekt vermutlich artifiziell ist. Der Test mit EIICB^{Glc}_{R203H} zeigte aber

sowohl im induzierten als auch im uninduzierten Zustand eine leicht erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität gegenüber dem WT. Möglicherweise wird das Protein stärker exprimiert als das WT-Protein. Dafür würde auch sprechen, dass die Titration von Mlc der Mutante EIICB^{Glc}_{R203H} auch ohne IPTG erhöht vorliegt. Um die Expressionslevel von EIICB^{Glc} und EIICB^{Glc}_{R203H} sicherheitshalber zu vergleichen, könnte beispielsweise ein Western Blot mit beiden Proteinen durchgeführt werden. Da die eingesetzten Proteine keinen nachweisbaren His-,Tag“ besitzen und keine EIICB^{Glc}-spezifischen Antikörper vorlagen, wurde diese Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit für die erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität wäre, dass das Protein EIICB^{Glc}_{R203H} den Repressor Mlc stärker binden kann als das WT-Protein.

Die Aminosäure R203 liegt im neuen Modell von EIICB^{Glc} in der transmembranen Helix IV (Abbildung 4.3). Eine Konformation, die die Bindung von Mlc inhibiert, liegt in dieser Mutante nicht vor. Da für diesen Locus schon eine weitere entkoppelte Mutation bekannt ist (R203S, [63]), ist dieser Bereich offensichtlich wichtig bei der Kopplung von Substrattransport und Phosphorylierung. Die Nähe dieser Aminosäure zur Substratbindetasche unterstreicht diese Beobachtung. Welche Mechanismen dem im Detail zugrunde liegen, kann erst geklärt werden, wenn mehr über die Interaktion zwischen der B- und der C-Domäne des Proteins bekannt wird.

4.3 EIIB^{Glc} kann als Oligomer vorliegen

Durch die Versuche mit der vernetzenden Substanz Formaldehyd, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die B-Domäne des Proteins EIICB^{Glc} in der Lage ist, eigenständig zu dimerisieren. Zu der Dimerisierung kam es auch ohne die Zugabe von Formaldehyd. Letztere verstärkte aber die Dimerisierung. Die Einwirkung von Hitze verschob das Gleichgewicht von der monomeren zur dimeren Form des EIIB^{Glc}.

Nachdem die Methode erfolgreich für den Nachweis der Dimerisierung des WT-Proteins eingesetzt wurde, wurde auch die Dimerisierung der B-Domäne alleine mittels Formaldehydvernetzung analysiert. Die resultierenden Banden entsprechen der monomeren und der dimeren B-Domäne, wie aus der Größe der jeweiligen Bande festzustellen ist. Darüber hinaus konnten die massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigen, dass es sich bei den detektierten Proteinen um EIIB^{Glc} handelt. Auch in einem Stammhintergrund, in dem die Gene für die Proteine EI, HPr und EIIA^{Cr} deletiert vorliegen, konnten Dimere detektiert werden (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23). Darüber hinaus ist es möglich, dass die B-Domäne in der Lage ist, auch Tri- oder Tetramere zu bilden, da auch Signale detektiert werden konnten, die aufgrund ihrer Größe dafür in Frage kommen (Abbildung 3.16). Für das Protein EII^{Mtl} konnten durch Untersuchungen am Volllängenprotein ebenfalls schon höher organisierte Oligomere

nachgewiesen werden [70], was dafür spricht, dass die Möglichkeit einer Trimerisierung der PTS-Transporter besteht.

Interessanterweise lösen sich die Dimerstrukturen unter dem Einfluss der Hitze nicht auf, sondern scheinen im Gegenteil bei hohen Temperaturen die bevorzugte Form gegenüber der monomeren B-Domäne darzustellen. Möglicherweise sind die Dimere der B-Domäne resistenter gegenüber der Hitze als die monomere Form. Dies zeigt sich z.B. in Abbildung 3.18, in der zu erkennen ist, dass die Dimerstrukturen bei längerer Hitzeeinwirkung zunehmen, während die Signale der monomeren B-Domäne schwächer werden. Auch in Proben ohne Formaldehyd konnte dieser Effekt beobachtet werden (Abbildung 3.19). Die Zunahme der Menge an dimerem EIIB^{Glc} unter Hitzeeinfluss ist daher offensichtlich unabhängig von der Anwesenheit des Formaldehyds. Welche physiologische Bedeutung dieser Umstand haben könnte, ist zu diesem Zeitpunkt aber nicht klar.

Durch die hier gewählte Methode kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Faktoren für die Dimerisierung von EIIB^{Glc} verantwortlich sind, da das Formaldehyd alle Proteine, die sich in räumlicher Nähe befinden, miteinander vernetzt. Auch beim bakteriellen „Two-Hybrid“-System, mit dem die Dimerisierung der B-Domäne ebenfalls erfolgreich nachgewiesen wurde, können andere Proteine für die Vermittlung der Dimerisierung verantwortlich sein. Insbesondere in den Stämmen, in denen eine chromosomale Kopie des *ptsG*-Gens vorliegt, ist es möglich, dass die beobachtete Dimerisierung durch das vom Bakterienchromosom exprimierte EIICB^{Glc} ausgelöst wird. In einem Stammhintergrund ohne *ptsG*-Gen konnten allerdings ebenfalls Dimere detektiert werden. In diesen Fällen kann eine chromosomal kodierte C-Domäne also nicht für die beobachtete Oligomerisierung verantwortlich sein. Auch weitere Faktoren könnten an einer Vermittlung der Dimerisierung der B-Domäne beteiligt sein. Der Repressor Mlc kann von der unphosphorylierten B-Domäne gebunden werden und liegt als Tetramer vor [79]. Dieses Protein könnte bei der Bindung der B-Domäne also gegebenenfalls eine Oligomerisierung der B-Domäne verursachen. Nam et al. konnten jedoch mit NMR-Untersuchungen zeigen, dass die B-Domäne als Monomer vorliegt, auch wenn sie das tetramere Mlc bindet [79]. Ein weiterer bekannter Wechselwirkungspartner von EIIB^{Glc} ist das Protein EIIA^{Cr}, welches einen Phosphatrest auf die B-Domäne übertragen kann [12]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten allerdings, dass EIIB^{Glc} auch ohne EIIA^{Cr} in der Lage ist zu dimerisieren, da die Stämme LJ141 und LJ139 eine Deletion des *orr*-Gens tragen. Dimeres EIIB^{Glc} konnte aber auch in diesen Stämmen gezeigt werden. Auch wenn durch die gewählten Methoden der Einfluss anderer Proteine auf die Dimerisierung der B-Domäne nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden kann, ist EIIB^{Glc} daher vermutlich auch ohne die bekannten Wechselwirkungspartner EIIA^{Cr} und Mlc sowie die C-Domäne in der Lage, zu dimerisieren. Um aber den Einfluss möglicher unbekannter Faktoren auszuschließen, wären Nachweise mit weiteren Methoden notwendig. So könnte zum Beispiel eine Affinitätschromatographie mit unmarkierten und markierten EIIB^{Glc}-

Proteinen durchgeführt werden, oder unmarkierte, gereinigte EIIB^{Glc}-Proteine auf Nitrozellulose-Membranen fixiert werden und radioaktiv oder anderweitig markierte, gereinigte, EIIB^{Glc}-Moleküle mit den fixierten Proteinen inkubiert werden. Lassen sich später Signale auf der Membran detektieren, fand eine Wechselwirkung zwischen freiem und fixiertem EIIB statt. In diesem Fall wären keine anderen Proteine anwesend. Diese Versuche konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Bei der gewählten Methode wurden Proteine eingesetzt, die einen N-terminalen His-„Tag“ besitzen. Bei den für das bakterielle „Two-Hybrid“-System eingesetzten Proteinen wurde ebenfalls ein His-„Tag“ kodiert, der aber aufgrund der fusioniert vorliegenden LexA-Proteinfragmente an anderer Stelle im Protein kodiert wird. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Histidine für die Dimerisierung verantwortlich sind. Weitere Untersuchungen mit Proteinen ohne His-„Tag“ müssten daher durchgeführt werden, um diese Möglichkeit auszuschließen.

Für die Dimerisierung der B-Domäne könnten einzelne Aminosäuren oder aber Bereiche der B-Domäne, z.B. mit komplementären Ladungsverhältnissen, verantwortlich sein. Um diese Faktoren zu bestimmen, wurden konserviert vorliegende Aminosäuren ausgetauscht und die resultierenden Mutanten auf ihre Fähigkeit zu dimerisieren überprüft. Da für EII^{Mtl} gezeigt wurde, dass die Dimere des Gesamtproteins einen Einfluss auf die durch die B-Domäne vermittelte Substratphosphorylierung haben [93], wurde während dieser Arbeit eine Aminosäure gewählt, die im aktiven Zentrum der Phosphorylierungsreaktion liegt (I36N). Die resultierende Mutante ließ sich aber im Immunoblot nicht nachweisen, so dass sie möglicherweise nicht exprimiert wurde oder aber abgebaut worden ist. Da ebenfalls die Möglichkeit besteht, dass die an der Substratphosphorylierung beteiligten Aminosäuren funktionell eingebunden und somit nicht in der Lage sind, auch bei der Dimerisierung eine Rolle zu spielen, wurde des Weiteren ein Aminosäureaustausch in einem an der Phosphorylierung nicht direkt beteiligten Bereich durchgeführt (V63D). Das resultierende Protein war nach wie vor in der Lage, Dimere zu bilden. Um die für die Dimerisierung zuständigen Aminosäuren oder Regionen zu identifizieren, müssten daher weitere Aminosäureaustausche durchgeführt werden und die entsprechenden Proteine auf ihre Fähigkeit zu dimerisieren untersucht werden.

Denkbar wäre, dass die Dimerisierung der B-Domäne eine Rolle bei der Konformationsänderung übernimmt, die nötig ist, um das Substrat in das Cytoplasma zu transportieren [70]. Darüber hinaus ist auch ein Einfluss auf die Konformation durch die Phosphorylierung wahrscheinlich [93]. Bislang ist noch nicht bekannt, ob die B-Domäne des einen Protomers auch das Substrat dieses Protomers phosphoryliert (intermolekulare Aktivität) oder ob die B-Domäne eines Protomers das Substrat des anderen Protomers phosphoryliert (intramolekulare Aktivität) [23]. Für die Dimerisierung der B-Domäne wäre beides vorstellbar.

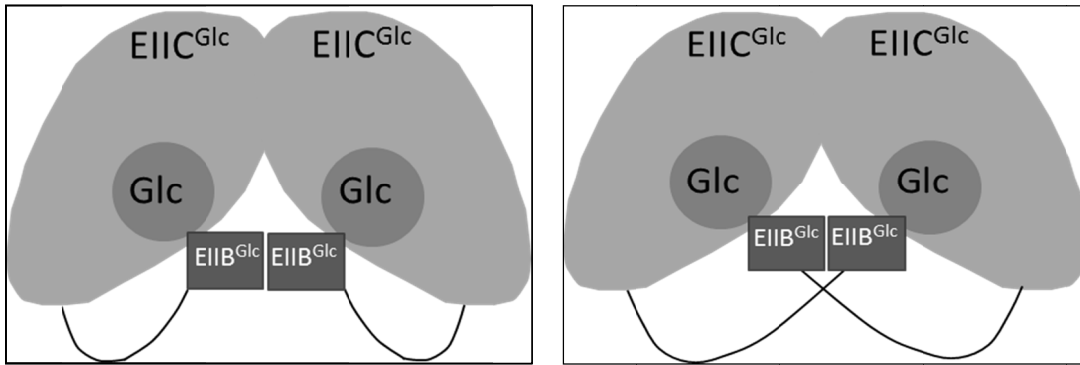


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des EIICB^{Glc}-Dimers (Querschnitt)

Die Abbildung zeigt einen möglichen Mechanismus der Dimerisierung der B-Domäne im EIICB^{Glc}. Diese könnte entweder bei intermolekularer Phosphorylierung (links) oder intramolekularer Aktivierung (rechts) eine Rolle spielen.

Um diese Rolle der dimeren B-Domäne bei der Konformationsänderung oder dem Phosphattransfer zu bestätigen, müssten jedoch weitere Experimente folgen, bzw. mehr Informationen über die Konformationsänderungen des Proteins EIICB^{Glc} vorliegen.

4.4 Untersuchung der möglichen Wechselwirkung der Proteine EIIA^{Crr} und CscB

Mit Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation wurde versucht, die Wechselwirkung der Proteine CscB und EIIA^{Crr}, sowie LacY und EIIA^{Crr} als auch EIICB^{Glc} und EIIA^{Crr} zu untersuchen. Für keines der Proteinpaare konnte eine Wechselwirkung gezeigt werden. Da es sich bei den Proteinen EIIA^{Crr}/LacY und EIIA^{Crr}/EIICB^{Glc} um Kontrollen handelte, besteht die Möglichkeit, dass die fehlenden Nachweise in der Methode begründet liegen. Möglicherweise kommen die GFP-Fragmente bei den untersuchten Proteinen durch eine Wechselwirkung nicht ideal in räumliche Nähe zueinander, um ein funktionelles Volllängenprotein zu bilden. Ein weiterer Faktor, der die Detektion der Wechselwirkung zwischen EIIA^{Crr} und seinen Substraten erschweren könnte, ist die Tatsache, dass in den meisten der hier durchgeführten Versuche ein EIIA^{Crr}-Protein vorlag, das das GFP-Fragment N-terminal kodiert trug. Möglicherweise ist der N-Terminus aber essentiell bei der Vermittlung der Wechselwirkung zwischen EIIA^{Crr} und seinen Partnern. Zumindest für die Wechselwirkung zwischen EIIA^{Crr} und EIICB^{Glc} gibt es Hinweise, die diese Möglichkeit unterstützen [149]. Die Untersuchung eines EIIA^{Crr} mit C-terminalem GFP-Fragment ist aber bei der Untersuchung einer Wechselwirkung mit Membranproteinen nicht optimal, da es bei diesen durch ein N-terminales GFP zu Problemen beim Einbau in die Membran kommen kann. Die Wechselwirkung zwischen CscB mit N-terminal fusioniertem GFP mit dem entsprechenden EIIA^{Crr} wurde getestet, eine Wechselwirkung konnte aber auch in diesem Fall nicht detektiert werden (s. Abbildung 3.31).

Die als Positivkontrollen des Systems genutzten „Zipper“-Proteine wurden für diese Methode optimiert. Sie sind sehr klein und zeigen eine starke Wechselwirkung. Diese artifizielle Kontrolle könnte möglicherweise nicht als Maßstab für physiologische Wechselwirkungen geeignet sein. Ein weiteres Problem ist, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die genetische Konstruktion der eingesetzten Plasmide fehlerhaft war, da keines der Konstrukte vollständig sequenziert werden konnte. Die erhaltenen Teilsequenzen waren zwar fehlerfrei, doch kann nicht garantiert werden, dass dies auch für die nicht sequenzierten Bereiche der Fall ist. Erschwerend kommt hinzu, dass ein einwandfreier Expressionsnachweis der Proteine ebenfalls nicht gelang. Eine Optimierung des Systems für die hier untersuchten Proteine sollte daher angestrebt werden.

Der Einfluss von Glukose und Sucrose auf die Positivkontrolle des Systems konnte in diesem Rahmen nicht geklärt werden.

Für die fragliche Wechselwirkung der Proteine CscB und EIIA^{Ctr} wurde eine Mutante gewählt, die den Basenaustausch Q353H trägt. Diese Mutante wurde gewählt, da sie einen höheren Sucrosetransport ermöglicht und daher besser charakterisiert ist als das WT-Protein [106]. Für einen kommenden Nachweis der Wechselwirkung beider Proteine sollte aber der Vollständigkeit halber auch ein WT-Protein eingesetzt werden, um einen Einfluss des Aminosäureaustauschs auf die Wechselwirkung ausschließen zu können. Des Weiteren könnten die Versuche unter Zugabe von Glukose noch einmal wiederholt werden, da diese die Menge an unphosphoryliert vorliegendem und damit für den Induktorausschluss aktivem EIIA^{Ctr} erhöht.

4.5 System zur Identifikation eines möglichen cAMP-Transporters

Um Zellen zu erhalten, die eine Mutation in dem Gen für einen möglichen cAMP-Transporter tragen, wurde die Transposonmutagenese mit den Minitransposons pNK2883 und pNK2859 durchgeführt. Im Vorfeld wurde das System der Transposonmutagenese getestet, indem die Minitransposons in den Wildtypstamm LJ110 transformiert wurden. Die Zugabe von IPTG zu den Kulturen erhöhte die Anzahl der Ereignisse, in denen das jeweilige Transposon in das Genom des Stammes sprang und hier zu Mutationen führte. Auf entsprechenden McC-Platten wurde getestet, ob der Stamm nach diesen Ereignissen noch in der Lage ist, Glukose, Mannitol oder Laktose zu verstoffwechseln. Dabei gilt es zu bedenken, dass es für Glukose und Mannitol mehr als ein Transportsystem in *E. coli*-Zellen gibt [19]. Neben dem Glukose-PTS-Transporter EIICB^{Glc} wird Glukose auch über die PTS-Enzyme EII^{Man} [150] und EII^{Nag} [4] sowie über die Galaktose-Permease GalP und die Methyl-Galaktosid-Permease MglBAC in die Zellen transportiert [151]. Die Wahrscheinlichkeit, Mutanten zu finden, die keine Glukose mehr aufnehmen können, ist unter diesen Umständen gering, da die Transposons gleich mehrere relevante Gene treffen müssen. Tatsächlich wurde in diesem Vorversuch keine Mutante gefunden, die weiße Kolonien auf McCGlc zeigte. Auch für das Kohlenhydrat Mannitol gibt es mehr als ein

Aufnahmesystem, nämlich das EII^{Mtl} und das EII^{Gut} [152]. In diesem Fall konnten ebenfalls keine Mutationen gefunden werden, die durch die Transposons verursacht wurden. Lediglich für die Aufnahme des Kohlenhydrats Laktose, für das bisher nur die Permease LacY gefunden wurde, wurden in diesem Versuch schon nach kurzer Zeit Mutanten gefunden. Sollte es für die Aufnahme von cAMP mehr als ein Transportsystem geben, ist eine Detektion von Mutanten für dieses System schwierig und zeitaufwändig. Für diesen Umstand gibt es in der Literatur aber bisher keinen Hinweis.

Die FACS-Analysen von *E. coli*-Zellen ließen sich erfolgreich durchführen, nachdem die Zellen mit dem Farbstoff FM4-64 gefärbt wurden. Auch die Detektion eines GFP-Signals gelang. Jedoch musste hier eine GFP-Mutante eingesetzt werden, die speziell für FACS-Analysen optimiert wurde [122]. Es wurden 2 Mutanten gefunden. Ein derartiges Ereignis ist daher offenbar selten. Der Nachweis über Zellen, die nicht mehr in der Lage sind, cAMP aufzunehmen, kann in dem Stamm LDN2 über McCMal-Platten erbracht werden. In diesem Stamm sind die Zellen nur unter Zugabe von externem cAMP in der Lage, Maltose zu verstoffwechseln. Der Stamm trägt eine Deletion des *glaA*-Gens und ist daher nicht in der Lage, cAMP eigenständig zu generieren. Zellen, die weiß bleiben, obwohl sie unter cAMP-Zugabe wuchsen, könnten den gesuchten Defekt in einem cAMP-Aufnahmetransportprotein aufweisen. Möglich ist aber auch, dass ein Gen des Maltose-Stoffwechsels betroffen ist und die Zellen deswegen einen weißen Phänotyp auf McCMal aufweisen. Ebenso verhält es sich mit der Detektion der Zellen im FACS, die kein GFP-Signal mehr zeigen. Auch in diesem Fall kann es zu Mutationen gekommen sein, die nicht die cAMP-Aufnahme, sondern z.B. das *gfp*-Gen betreffen. Durch die Anwendung beider Nachweissysteme zusammen (kein GFP, weißer Phänotyp auf McCMal + cAMP) sollten unspezifische Mutationen aber weitgehend ausgeschlossen werden. Letzendlich ließ sich der so gefundene Phänotyp nicht transduzieren. Durch eine erfolgreiche P1-Transduktion hätte z.B. mit Primern für das jeweilige Transposonresistenzgen das gekoppelte Gen für den gesuchten cAMP-Transporter amplifiziert, kloniert und sequenziert werden können. Dies gelang im Rahmen der Arbeit nicht. Dennoch ist das etablierte Testsystem grundsätzlich für die Suche nach einem cAMP-Transporter geeignet. Die Selektion im Stamm LDN2 in Verbindung mit der FACS-Analyse macht das Screening möglich. Die erfolgreiche Untersuchung weiterer Mutanten könnte gegebenenfalls zu einer erfolgreichen Identifikation und Isolation des gesuchten Gens für einen möglichen cAMP-Transporter führen, dessen weitere Charakterisierung neue Einsichten in den cAMP-Haushalt von *E. coli* liefert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein System zur chemischen Modifizierung von Einzelcysteinvarianten des PTS-Transporters EIICB^{Glc} etabliert, mit dem durch unterschiedliche Zugänglichkeit von Markersubstanzen die Zuordnung der jeweiligen Cysteine in Hinblick auf die Cytoplasmamembran gelang. Für die Methode war es notwendig, eine cysteinfreies EIICB^{Glc} zu konstruieren. Dieses trägt des Weiteren eine Mutation, die die Phosphorylierung des Substrats Glukose von dem Transport entkoppelt. Dies ist notwendig, da das Cystein 421, das für die Phosphorylierung des WT verantwortlich ist, in dem cysteinfreien Protein nicht mehr vorhanden ist. Die Transportfähigkeit der Mutanten konnte nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des Cystein-Scannings, Daten über dieses Protein aus vorangegangenen Arbeiten, sowie ein Vergleich der Struktur des EII^{Chb} aus *B. cereus*, ermöglichten die Erstellung eines neuen Modells des Proteins EIICB^{Glc}. In diesem Modell enthält das Protein 10 transmembrane Helices. Die postulierte Substratbindetasche wird aus haarnadelartigen Strukturen gebildet. Die Lage funktioneller Mutanten in dem Modell wurde diskutiert.

Die entkoppelte Mutation R203H des Proteins EIICB^{Glc} wurde isoliert. Eine Charakterisierung in Bezug auf ihre Fähigkeit Mlc zu titrieren, zeigte, dass eine Bindung von Mlc in diesem Protein möglich ist. Eine Konformationsänderung, die die Wechselwirkung zu Mlc inhibiert, liegt daher in diesem Protein nicht vor. Es wurde außerdem gezeigt, dass keine Erweiterung der Substratspezifität in diesem Protein vorliegt.

Mithilfe von Crosslinking-Versuchen mit Formaldehyd konnte gezeigt werden, dass die B-Domäne von EIICB^{Glc} eigenständig in der Lage ist, zu dimerisieren. Ein Einfluss der C-Domäne des Proteins sowie der bekannten Wechselwirkungspartner Mlc und EIIA^{Cr} konnte dabei ausgeschlossen werden.

Die Wechselwirkung des Sucrose-H⁺-Symporters CscB aus dem Wildisolat *Escherichia coli* 3132 mit dem PTS-Protein EIIA^{Cr} sollte mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation untersucht werden. Eine Wechselwirkung wurde nicht detektiert. Methodische Unzulänglichkeiten des Systems in Bezug auf die untersuchten Proteine können nicht ausgeschlossen werden.

Eine Methode zur Identifizierung eines cAMP-spezifischen Transportproteins mit Hilfe einer Transposonmutagenese und der Isolierung von Mutanten mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurde etabliert. Die Identifizierung eines cAMP-Transportproteins konnte im Rahmen der Arbeit jedoch nicht erfolgen.

6 SUMMARY

A system for the chemical modification of single-cysteine variants of the PTS-transport-protein EIICB^{Glc} was established which enabled the mapping of the cysteine residues in regard to the plasma membrane according to their accessibility for labeling substances. For the successful application of the method it was essential to construct a cysteine-less mutant of EIICB^{Glc}. Furthermore, the protein carries a mutation that uncouples the phosphorylation of the substrate glucose from the transport. This is essential, as the cysteine residue C421, which is responsible for the phosphorylation of glucose in the WT-protein, is absent from the cysteine-less protein. The transport activity of the mutants could be confirmed. The results of the cysteine-scanning method as well as data concerning this protein from preceding experiments and the comparison of the structure of the protein EII^{Chb} from *B.cereus* lead to the postulation of a new model for the protein EIICB^{Glc}. In this model, EIICB^{Glc} consists of 10 transmembrane helices. The putative substrate binding site consists of hairpin-like structures. The location of functional mutations in this model was discussed.

The uncoupled mutation R203H of the protein EIICB^{Glc} was isolated and characterized. The mutant has the ability to titrate the repressor Mlc which points to structural similarity compared to the WT-protein. A conformational change which inhibits the interaction with Mlc can thus be excluded. Furthermore, it was shown that this protein does not show a relaxed substrate specificity.

Using formaldehyde as a crosslinking reagent it was shown that the functional domain EIIB^{Glc} is capable of autonomous dimerization. The influence of the EIIC-domain of the protein as well as the well-known interaction partners Mlc, and EIIA^{Cr} could be ruled out.

The interaction between the sucrose-H⁺-symporter CscB from the *E. coli* wild-type strain EC3132 and the PTS-protein EIIA^{Cr} was analyzed using bimolecular fluorescence complementation. An interaction could not be detected. However, inadequateness of the method regarding the analyzed proteins can not be ruled out.

A method for the identification of a cAMP-specific transport protein using transposon mutagenesis as well as isolation of mutants via flow cytometry (FACS) was established. The identification of a cAMP transport protein could not be provided during the course of this work.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Pedersen, P.L., 2007.** Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr*, 39(5-6), 349-355, PMID: 18175209
2. **West, I.C., 1970.** Lactose transport coupled to proton movements in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 41(3), 655-661, PMID: 4920870
3. **Mitchell, P., 1963.** Molecule, group and electron transfer through natural membranes. *Biochem. Soc. Symp.*, 22, 142-169, PMID: nicht vorhanden
4. **Postma, P.W., Lengeler, J.W. and Jacobson, G.R., 1993.** Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev*, 57(3), 543-594, PMID: 8246840
5. **Erni, B., 2002** Microbial Transport Systems, Editor: Winkelmann, G., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
6. **Tchieu, J.H., Norris, V., Edwards, J.S. and Saier, M.H., Jr., 2001.** The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 3(3), 329-346, PMID: 11361063
7. **Kotrba, P., Inui, M. and Yukawa, H., 2001.** Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J Biosci Bioeng*, 92(6), 502-517, PMID: 16233138
8. **Kundig, W., Ghosh, S. and Roseman, S., 1964.** Phosphate Bound to Histidine in a Protein as an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 52, 1067-1074, PMID: 14224387
9. **Postma, P.W. and Lengeler, J.W., 1985.** Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol Rev*, 49(3), 232-269, PMID: 3900671
10. **Kornberg, H.L., 2001.** Routes for fructose utilization by *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 3(3), 355-359, PMID: 11361065
11. **Lengeler, J.W. and Jahreis, K., 2009.** Bacterial PEP-dependent carbohydrate: phosphotransferase systems couple sensing and global control mechanisms. *Contrib Microbiol*, 16, 65-87, PMID: 19494579
12. **Lengeler, J.W., Jahreis, K. and Wehmeier, U.F., 1994.** Enzymes II of the phospho *enol* pyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport. *Biochim Biophys Acta*, 1188(1-2), 1-28, PMID: 7947897
13. **Nguyen, T.X., Yen, M.R., Barabote, R.D. and Saier, M.H., Jr., 2006.** Topological predictions for integral membrane permeases of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 11(6), 345-360, PMID: 17114898

14. **Saier, M.H., Hvorup, R.N. and Barabote, R.D., 2005.** Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 1), 220-224, PMID: 15667312
15. **Meins, M., Jenö, P., Müller, D., Richter, W.J., Rosenbusch, J.P. and Erni, B., 1993.** Cysteine phosphorylation of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 268(16), 11604-11609, PMID: 8505292
16. **Gabor, E., Göhler, A.K., Kosfeld, A., Staab, A., Kremling, A. and Jahreis, K., 2011.** The phosphoenolpyruvate-dependent glucose-phosphotransferase system from *Escherichia coli* K-12 as the center of a network regulating carbohydrate flux in the cell. *Eur J Cell Biol*, 90(9), 711-720, PMID: 21621292
17. **Chauvin, F., Brand, L. and Roseman, S., 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(32), 20270-20274, PMID: 8051119
18. **Monod, 1942.** Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Dissertation
19. **Jahreis, K., Pimentel-Schmitt, E.F., Bruckner, R. and Titgemeyer, F., 2008.** Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 32(6), 891-907, PMID: 18647176
20. **Bruckner, R. and Titgemeyer, F., 2002.** Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett*, 209(2), 141-148, PMID: 12007797
21. **De Reuse, H. and Danchin, A., 1988.** The *ptsH*, *ptsI*, and *err* genes of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: a complex operon with several modes of transcription. *J Bacteriol*, 170(9), 3827-3837, PMID: 2457575
22. **Plumbridge, J., 2000.** A mutation which affects both the specificity of PtsG sugar transport and the regulation of *ptsG* expression by Mlc in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 146 (Pt 10), 2655-2663, PMID: 11021940
23. **Siebold, C., Flukiger, K., Beutler, R. and Erni, B., 2001.** Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Lett*, 504(3), 104-111, PMID: 11532441
24. **Lengeler, J.W., Jahreis, K., 1996** Phosphotransferase systems or PTSs as carbohydrate transport and as signal transduction systems, in *Transport Processes in Eukaryotic and Prokaryotic Organisms. Handbook of biological Physics*, Editor: Konings, W.N., Kaback, H.R., Lolkema, J.S.
25. **Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J.W. and Gilles, E.D., 2007.** Correlation between growth rates, EIIA^{Cr} phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 189(19), 6891-6900, PMID: 17675376

26. **Saier, M.H. and Roseman, S., 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(3), 972-975, PMID: 4550766
27. **Lengeler, J., 1966.** Studies on the glucose effect in the synthesis of the galactose enzyme of *Escherichia coli*. *Z Vererbungsl*, 98(3), 203-229, PMID: 4863695
28. **Park, Y.H., Lee, B.R., Seok, Y.J. and Peterkofsky, A., 2006.** In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 281(10), 6448-6454, PMID: 16407219
29. **Reddy, P. and Kamireddi, M., 1998.** Modulation of *Escherichia coli* adenyl cyclase activity by catalytic-site mutants of protein IIA^{Glc} of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J Bacteriol*, 180(3), 732-736, PMID: 9457881
30. **Botsford, J.L. and Harman, J.G., 1992.** Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev*, 56(1), 100-122, PMID: 1315922
31. **Jahreis, K., 2010** cAMP signaling in prokaryotes, in *Bacterial Signaling*, Editor: Krämer, R., Jung, K.
32. **Peterkofsky, A., 1981.** *Escherichia coli* adenylate cyclase as a sensor of sugar transport function. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 14, 215-228, PMID: 6269380
33. **Lux, R., Jahreis, K., Bettenbrock, K., Parkinson, J.S. and Lengeler, J.W., 1995.** Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(25), 11583-11587, PMID: 8524808
34. **Alonso-Casajus, N., Dauvillee, D., Viale, A.M., Munoz, F.J., Baroja-Fernandez, E., Moran-Zorzano, M.T., Eydallin, G., Ball, S. and Pozueta-Romero, J., 2006.** Glycogen phosphorylase, the product of the *glgP* gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the nonreducing ends in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 188(14), 5266-5272, PMID: 16816199
35. **Seok, Y.J., Sondej, M., Badawi, P., Lewis, M.S., Briggs, M.C., Jaffe, H. and Peterkofsky, A., 1997.** High affinity binding and allosteric regulation of *Escherichia coli* glycogen phosphorylase by the histidine phosphocarrier protein, HPr. *J Biol Chem*, 272(42), 26511-26521, PMID: 9334229
36. **Erni, B. and Zanolari, B., 1986.** Glucose-permease of the bacterial phosphotransferase system. Gene cloning, overproduction, and amino acid sequence of enzyme II^{Glc}. *J Biol Chem*, 261(35), 16398-16403, PMID: 3023349
37. **Bouma, C.L., Meadow, N.D., Stover, E.W. and Roseman, S., 1987.** II-B^{Glc}, a glucose receptor of the bacterial phosphotransferase system: molecular cloning of *ptsG* and purification of the receptor from an overproducing strain of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(4), 930-934, PMID: 3029764

38. **Jeong, J.Y., Kim, Y.J., Cho, N., Shin, D., Nam, T.W., Ryu, S. and Seok, Y.J., 2004.** Expression of *ptsG* encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 279(37), 38513-38518, PMID: 15252051
39. **Shin, D., Cho, N., Heu, S. and Ryu, S., 2003.** Selective regulation of *ptsG* expression by Fis. Formation of either activating or repressing nucleoprotein complex in response to glucose. *J Biol Chem*, 278(17), 14776-14781, PMID: 12588863
40. **Rungrassamee, W., Liu, X. and Pomposiello, P.J., 2008.** Activation of glucose transport under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 190(1), 41-49, PMID: 18368388
41. **Seeto, S., Notley-McRobb, L. and Ferenci, T., 2004.** The multifactorial influences of RpoS, Mlc and cAMP on *ptsG* expression under glucose-limited and anaerobic conditions. *Res Microbiol*, 155(3), 211-215, PMID: 15059634
42. **Shin, D., Lim, S., Seok, Y.J. and Ryu, S., 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(28), 25871-25875, PMID: 11340070
43. **Lee, S.J., Boos, W., Bouche, J.P. and Plumbridge, J., 2000.** Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *Embo J*, 19(20), 5353-5361, PMID: 11032803
44. **Tanaka, Y., Kimata, K. and Aiba, H., 2000.** A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *EMBO J*, 19(20), 5344-5352, PMID: 11032802
45. **Seitz, S., Lee, S.J., Penetier, C., Boos, W. and Plumbridge, J., 2003.** Analysis of the interaction between the global regulator Mlc and EIIB^{Glc} of the glucose-specific phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 278(12), 10744-10751, PMID: 12529317
46. **Becker, A.K., Zeppenfeld, T., Staab, A., Seitz, S., Boos, W., Morita, T., Aiba, H., Mahr, K., Titgemeyer, F. and Jahreis, K., 2006.** YeeI, a novel protein involved in modulation of the activity of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 188(15), 5439-5449, PMID: 16855233
47. **Vanderpool, C.K. and Gottesman, S., 2004.** Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol*, 54(4), 1076-1089, PMID: 15522088
48. **Kimata, K., Tanaka, Y., Inada, T. and Aiba, H., 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(13), 3587-3595, PMID: 11432845

49. **Vanderpool, C.K. and Gottesman, S., 2007.** The novel transcription factor SgrR coordinates the response to glucose-phosphate stress. *J Bacteriol*, 189(6), 2238-2248, PMID: 17209026
50. **Wadler, C.S. and Vanderpool, C.K., 2007.** A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(51), 20454-20459, PMID: 18042713
51. **Robillard, G.T. and Broos, J., 1999.** Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim Biophys Acta*, 1422(2), 73-104, PMID: 10393270
52. **Nuoffer, C., Zanolari, B. and Erni, B., 1988.** Glucose permease of *Escherichia coli*. The effect of cysteine to serine mutations on the function, stability, and regulation of transport and phosphorylation. *J Biol Chem*, 263(14), 6647-6655, PMID: 3129430
53. **Lanz, R. and Erni, B., 1998.** The glucose transporter of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. Mutant analysis of the invariant arginines, histidines, and domain linker. *J Biol Chem*, 273(20), 12239-12243, PMID: 9575173
54. **Eberstadt, M., Grdadolnik, S.G., Gemmecker, G., Kessler, H., Buhr, A. and Erni, B., 1996.** Solution structure of the IIB domain of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 35(35), 11286-11292, PMID: 8784182
55. **Tanaka, Y., Itoh, F., Kimata, K. and Aiba, H., 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(3), 941-951, PMID: 15255904
56. **Buhr, A., Flukiger, K. and Erni, B., 1994.** The glucose transporter of *Escherichia coli*. Overexpression, purification, and characterization of functional domains. *J Biol Chem*, 269(38), 23437-23443, PMID: 8089109
57. **Zeppenfeld, T., Larisch, C., Lengeler, J.W. and Jahreis, K., 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(16), 4443-4452, PMID: 10913077
58. **Hummel, U., Nuoffer, C., Zanolari, B. and Erni, B., 1992.** A functional protein hybrid between the glucose transporter and the N-acetylglucosamine transporter of *Escherichia coli*. *Protein Sci*, 1(3), 356-362, PMID: 1304343
59. **Notley-McRobb, L. and Ferenci, T., 2000.** Substrate specificity and signal transduction pathways in the glucose-specific enzyme II (EII^{Glc}) component of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J Bacteriol*, 182(16), 4437-4442, PMID: 10913076
60. **Kornberg, H.L., Lambourne, L.T. and Sproul, A.A., 2000.** Facilitated diffusion of fructose via the phosphoenolpyruvate/glucose phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4), 1808-1812, PMID: 10677538

61. **Oh, H., Park, Y. and Park, C., 1999.** A mutated *PtsG*, the glucose transporter, allows uptake of D-ribose. *J Biol Chem*, 274(20), 14006-14011, PMID: 10318813
62. **Begley, G.S., Warner, K.A., Arents, J.C., Postma, P.W. and Jacobson, G.R., 1996.** Isolation and characterization of a mutation that alters the substrate specificity of the *Escherichia coli* glucose permease. *J Bacteriol*, 178(3), 940-942, PMID: 8550539
63. **Ruijter, G.J., van Meurs, G., Verwey, M.A., Postma, P.W. and van Dam, K., 1992.** Analysis of mutations that uncouple transport from phosphorylation in enzyme Π^{Glc} of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *J Bacteriol*, 174(9), 2843-2850, PMID: 1569016
64. **Buhr, A., Daniels, G.A. and Erni, B., 1992.** The glucose transporter of *Escherichia coli*. Mutants with impaired translocation activity that retain phosphorylation activity. *J Biol Chem*, 267(6), 3847-3851, PMID: 1310984
65. **Otte, S., Scholle, A., Turgut, S. and Lengeler, J.W., 2003.** Mutations which uncouple transport and phosphorylation in the D-mannitol phosphotransferase system of *Escherichia coli* K-12 and *Klebsiella pneumoniae* 1033-5P14. *J Bacteriol*, 185(7), 2267-2276, PMID: 12644498
66. **Lengeler, J.W., Titgemeyer, F., Vogler, A.P. and Wöhrle, B.M., 1990.** Structures and homologies of carbohydrate: phosphotransferase system (PTS) proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 326(1236), 489-504, PMID: 1970652
67. **Zurbriggen, A., Schneider, P., Bahler, P., Baumann, U. and Erni, B., 2010.** Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the EIIC^{Glc} domain of the *Escherichia coli* glucose transporter. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 66(Pt 6), 684-688, PMID: 20516600
68. **Deutscher, J., Francke, C. and Postma, P.W., 2006.** How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(4), 939-1031, PMID: 17158705
69. **Beutler, R., Ruggiero, F. and Erni, B., 2000.** Folding and activity of circularly permuted forms of a polytopic membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4), 1477-1482, PMID: 10677487
70. **van Montfort, B.A., Schuurman-Wolters, G.K., Durkens, R.H., Mensen, R., Poolman, B. and Robillard, G.T., 2001.** Cysteine cross-linking defines part of the dimer and B/C domain interface of the *Escherichia coli* mannitol permease. *J Biol Chem*, 276(16), 12756-12763, PMID: 11278734
71. **van Montfort, B.A., Schuurman-Wolters, G.K., Wind, J., Broos, J., Robillard, G.T. and Poolman, B., 2002.** Mapping of the dimer interface of the *Escherichia coli* mannitol permease by cysteine cross-linking. *J Biol Chem*, 277(17), 14717-14723, PMID: 11854301

72. **Yagur-Kroll, S., Ido, A. and Amster-Choder, O., 2009.** Spatial arrangement of the β -Glucoside transporter from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 191(9), 3086-3094, PMID: 19251853
73. **Yagur-Kroll, S. and Amster-Choder, O., 2005.** Dynamic membrane topology of the *Escherichia coli* β -glucoside transporter BglF. *J Biol Chem*, 280(19), 19306-19318, PMID: 15755739
74. **Cao, Y., Jin, X., Levin, E.J., Huang, H., Zong, Y., Quick, M., Weng, J., Pan, Y., Love, J., Punta, M., et al., 2011.** Crystal structure of a phosphorylation-coupled saccharide transporter. *Nature*, 473(7345), 50-54, PMID: 21471968
75. **Granseth, E., Daley, D.O., Rapp, M., Melen, K. and von Heijne, G., 2005.** Experimentally constrained topology models for 51,208 bacterial inner membrane proteins. *J Mol Biol*, 352(3), 489-494, PMID: 16120447
76. **Buhr, A. and Erni, B., 1993.** Membrane topology of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 268(16), 11599-11603, PMID: 8505291
77. **Beutler, R., Kaufmann, M., Ruggiero, F. and Erni, B., 2000.** The glucose transporter of the *Escherichia coli* phosphotransferase system: linker insertion mutants and split variants. *Biochemistry*, 39(13), 3745-3750, PMID: 10736174
78. **Kyte, J. and Doolittle, R.F., 1982.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157(1), 105-132, PMID: 7108955
79. **Nam, T.W., Jung, H.I., An, Y.J., Park, Y.H., Lee, S.H., Seok, Y.J. and Cha, S.S., 2008.** Analyses of Mlc-IIB^{Glc} interaction and a plausible molecular mechanism of Mlc inactivation by membrane sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(10), 3751-3756, PMID: 18319344
80. **Gabor, E., 2007.** Molekulargenetische Analyse der Struktur- und Funktionsbeziehungen des Zuckertransporters EIICB^{Glc} aus *Escherichia coli* K-12. Universität Osnabrück, Diplomarbeit
81. **Buck, K., 2004.** Untersuchungen zur Struktur von PtsG aus *Escherichia coli* K-12 durch Reporterfusionen. Universität Osnabrück, Bachelorarbeit
82. **Bleicken, S., 2003.** Struktur- und Funktionsbeziehungen des Glukosetransporters EIICB^{Glc} aus *Escherichia coli* K-12. Universität Osnabrück, Diplomarbeit
83. **Busch, M., 2006.** Molekularbiologische Analyse von verschiedenen EIICB^{Glc}-Fusionsproteinen in *Escherichia coli* K-12. Universität Osnabrück, Bachelorarbeit
84. **Bogdanov, M., Zhang, W., Xie, J. and Dowhan, W., 2005.** Transmembrane protein topology mapping by the substituted cysteine accessibility method (SCAMTM): application to lipid-specific membrane protein topogenesis. *Methods*, 36(2), 148-171, PMID: 15894490
85. **van Geest, M. and Lolkema, J.S., 2000.** Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(1), 13-33, PMID: 10704472

86. **Turgut, S., 2003.** Molekulargenetische und biochemische Untersuchung zur Funktion und Struktur des Enzym II^{Mtl} aus *Escherichia coli* K-12. Universität Osnabrück, Dissertation
87. **Frillingos, S., Sahin-Toth, M., Wu, J. and Kaback, H.R., 1998.** Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. *FASEB J*, 12(13), 1281-1299, PMID: 9761772
88. **Long, J.C., Wang, S. and Vik, S.B., 1998.** Membrane topology of subunit a of the F₁F₀ ATP synthase as determined by labeling of unique cysteine residues. *J Biol Chem*, 273(26), 16235-16240, PMID: 9632682
89. **Aboulwafa, M., Chung, Y.J., Wai, H.H. and Saier, M.H., Jr., 2003.** Studies on the *Escherichia coli* glucose-specific permease, PtsG, with a point mutation in its N-terminal amphipathic leader sequence. *Microbiology*, 149(Pt 3), 763-771, PMID: 12634344
90. **Lolkema, J.S., Dijkstra, D.S. and Robillard, G.T., 1992.** Mechanics of solute translocation catalyzed by enzyme II^{mtl} of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 31(24), 5514-5521, PMID: 1610796
91. **Otte, S., 2000.** Untersuchung zum molekularen Mechanismus der Substrattranslokation über das EII^{Mtl} und Analyse der *mtl*-Gene aus *Klebsiella pneumoniae*. Osnabrück, Dissertation
92. **Garcia-Alles, L.F., Navdaeva, V., Haenni, S. and Erni, B., 2002.** The glucose-specific carrier of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *Eur J Biochem*, 269(20), 4969-4980, PMID: 12383255
93. **Boer, H., ten Hoeve-Duurkens, R.H., Schuurman-Wolters, G.K., Dijkstra, A. and Robillard, G.T., 1994.** Expression, purification, and kinetic characterization of the mannitol transport domain of the phosphoenolpyruvate-dependent mannitol phosphotransferase system of *Escherichia coli*. Kinetic evidence that the *E. coli* mannitol transport protein is a functional dimer. *J Biol Chem*, 269(27), 17863-17871, PMID: 8027040
94. **Koning, R.I., Keegstra, W., Oostergetel, G.T., Schuurman-Wolters, G., Robillard, G.T. and Brisson, A., 1999.** The 5A projection structure of the transmembrane domain of the mannitol transporter enzyme II. *J Mol Biol*, 287(5), 845-851, PMID: 10222194
95. **Solomon, E. and Lin, E.C., 1972.** Mutations affecting the dissimilation of mannitol by *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 111(2), 566-574, PMID: 4559737
96. **Jacobson, G.R., Lee, C.A., Leonard, J.E. and Saier, M.H., Jr., 1983.** Mannitol-specific enzyme II of the bacterial phosphotransferase system. I. Properties of the purified permease. *J Biol Chem*, 258(17), 10748-10756, PMID: 6350293
97. **Lee, C.A. and Saier, M.H., Jr., 1983.** Mannitol-specific enzyme II of the bacterial phosphotransferase system. III. The nucleotide sequence of the permease gene. *J Biol Chem*, 258(17), 10761-10767, PMID: 6309813

98. **Erni, B., 1986.** Glucose-specific permease of the bacterial phosphotransferase system: phosphorylation and oligomeric structure of the glucose-specific II^{Glc}-III^{Glc} complex of *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry*, 25(2), 305-312, PMID: 3513827
99. **Roossien, F.F. and Robillard, G.T., 1984.** Mannitol-specific carrier protein from the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system can be extracted as a dimer from the membrane. *Biochemistry*, 23(24), 5682-5685, PMID: 6441590
100. **Lolkema, J.S., Kuiper, H., ten Hoeve-Duurkens, R.H. and Robillard, G.T., 1993.** Mannitol-specific enzyme II of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Escherichia coli*: physical size of enzyme II^{mtl} and its domains IIBA and IIC in the active state. *Biochemistry*, 32(6), 1396-1400, PMID: 8431419
101. **Saier, M.H., Jr., Novotny, M.J., Comeau-Fuhrman, D., Osumi, T. and Desai, J.D., 1983.** Cooperative binding of the sugar substrates and allosteric regulatory protein (enzyme III^{Glc} of the phosphotransferase system) to the lactose and melibiose permeases in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 155(3), 1351-1357, PMID: 6350268
102. **Nelson, S.O., Wright, J.K. and Postma, P.W., 1983.** The mechanism of inducer exclusion. Direct interaction between purified III^{Glc} of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and the lactose carrier of *Escherichia coli*. *EMBO J*, 2(5), 715-720, PMID: 16453452
103. **Hoischen, C., Levin, J., Pitaknarongphorn, S., Reizer, J. and Saier, M.H., Jr., 1996.** Involvement of the central loop of the lactose permease of *Escherichia coli* in its allosteric regulation by the glucose-specific enzyme IIA of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *J Bacteriol*, 178(20), 6082-6086, PMID: 8830713
104. **Marger, M.D. and Saier, M.H., Jr., 1993.** A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci*, 18(1), 13-20, PMID: 8438231
105. **Aslanidis, C., Schmid, K. and Schmitt, R., 1989.** Nucleotide sequences and operon structure of plasmid-borne genes mediating uptake and utilization of raffinose in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 171(12), 6753-6763, PMID: 2556373
106. **Jahreis, K., Bentler, L., Bockmann, J., Hans, S., Meyer, A., Siepelmeyer, J. and Lengeler, J.W., 2002.** Adaptation of sucrose metabolism in the *Escherichia coli* wild-type strain EC3132. *J Bacteriol*, 184(19), 5307-5316, PMID: 12218016
107. **Titgemeyer, F., Mason, R.E. and Saier, M.H., Jr., 1994.** Regulation of the raffinose permease of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme IIA of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J Bacteriol*, 176(2), 543-546, PMID: 8288553

108. **Wang, R.J., Morse, H.G. and Morse, M.L., 1970.** Carbohydrate Accumulation and Metabolism in *Escherichia coli*: Characteristics of the Reversions of *ctr* Mutations. *J Bacteriol*, 104(3), 1318-1324, PMID: 16559110
109. **Siepelmeier, J., 1998.** Molekulargenetische Analysen zur Struktur, Funktion und Regulation der Sucrose-Permease CscB aus *Escherichia coli* EC3132. Universität Osnabrück, Diplomarbeit
110. **Meyer, A., 1998.** Molekularbiologische Analyse der Funktion und Regulation der Sucrose-Permease CscB aus *Escherichia coli* EC3132. Universität Osnabrück, Diplomarbeit
111. **Saka, K., Tadenuma, M., Nakade, S., Tanaka, N., Sugawara, H., Nishikawa, K., Ichiyoshi, N., Kitagawa, M., Mori, H., Ogasawara, N., et al., 2005.** A complete set of *Escherichia coli* open reading frames in mobile plasmids facilitating genetic studies. *DNA Res*, 12(1), 63-68, PMID: 16106753
112. **Goldenbaum, P.E. and Hall, G.A., 1979.** Transport of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate across *Escherichia coli* vesicle membranes. *J Bacteriol*, 140(2), 459-467, PMID: 227841
113. **Herzberg, C., Weidinger, L.A., Dorrbecker, B., Hubner, S., Stulke, J. and Commichau, F.M., 2007.** SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics*, 7(22), 4032-4035, PMID: 17994626
114. **Berlyn, M.K., 1998.** Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 10: the traditional map. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(3), 814-984, PMID: 9729611
115. **Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J., 1985.** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103-119, PMID: 2985470
116. **Sprenger, G.A. and Lengeler, J.W., 1984.** L-Sorbose metabolism in *Klebsiella pneumoniae* and Sor⁺ derivatives of *Escherichia coli* K-12 and chemotaxis toward sorbose. *J Bacteriol*, 157(1), 39-45, PMID: 6361004
117. **Dmitrova, M., Younes-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M. and Granger-Schnarr, M., 1998.** A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 257(2), 205-212, PMID: 9491079
118. **Siepelmeier, J., 2003.** Entwicklung von Systemen zur quantitativen Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration und der *in vivo* Aktivität der Adenylatcyclase CyaA in einer isogenen Stammreihe von *Escherichia coli* K-12. Universität Osnabrück, Dissertation
119. **Haferkamp, S., 2002.** Etablierung und Charakterisierung eines auf den Reportermolekülen β -Galaktosidase und Gfp beruhenden *in-vivo* Meßsystems für das Alarmon cAMP in *Escherichia coli* K-12. Universität Osnabrück, Diplomarbeit

120. **Wilson, C.G., Magliery, T.J. and Regan, L., 2004.** Detecting protein-protein interactions with GFP-fragment reassembly. *Nat Methods*, 1(3), 255-262, PMID: 16145770
121. **Muus, J.-E., 2006.** Molekularbiologische Untersuchungen der Funktionsweise des hochkonservierten bakteriellen Proteins YeeI aus verschiedenen Enterobakterien. Universität Osnabrück, Diplomarbeit
122. **Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S., 1996.** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173(1 Spec No), 33-38, PMID: 8707053
123. **Kleckner, N., Bender, J. and Gottesman, S., 1991.** Uses of transposons with emphasis on Tn10. *Methods Enzymol*, 204, 139-180, PMID: 1658561
124. **Ames, P., Zhou, Q. and Parkinson, J.S., 2008.** Mutational analysis of the connector segment in the HAMP domain of Tsr, the *Escherichia coli* serine chemoreceptor. *J Bacteriol*, 190(20), 6676-6685, PMID: 18621896
125. **Bartolome, B., Jubete, Y., Martinez, E. and de la Cruz, F., 1991.** Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene*, 102(1), 75-78, PMID: 1840539
126. **Morrison, T.B. and Parkinson, J.S., 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(12), 5485-5489, PMID: 8202513
127. **Staab, A., 2007.** Molekularbiologische Charakterisierung des Glukose-Phosphotransferase-System Regulators MtfA aus *Escherichia coli* K-12. Universität Osnabrück, Dissertation
128. **Heuel, H., Shakeri-Garakani, A., Turgut, S. and Lengeler, J.W., 1998.** Genes for D-arabinitol and ribitol catabolism from *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*, 144 (Pt 6), 1631-1639, PMID: 9639934
129. **Saier, M.H., Jr. and McCaldon, P., 1988.** Statistical and functional analyses of viral and cellular proteins with N-terminal amphipathic alpha-helices with large hydrophobic moments: importance to macromolecular recognition and organelle targeting. *J Bacteriol*, 170(5), 2296-2300, PMID: 3360744
130. **Roberts, R.J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A.S., Bickle, T.A., Bitinaite, J., Blumenthal, R.M., Degtyarev, S., Dryden, D.T., Dybvig, K., et al., 2003.** A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res*, 31(7), 1805-1812, PMID: 12654995
131. **Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685, PMID: 5432063
132. **Blum, 1987** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, in *Electrophoresis*

133. **Bogdanov, M., Heacock, P.N. and Dowhan, W., 2010.** Study of polytopic membrane protein topological organization as a function of membrane lipid composition. *Methods Mol Biol*, 619, 79-101, PMID: 20419405
134. **Ren, X., Kasir, J. and Rahamimoff, H., 2001.** The transport activity of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger NCX1 expressed in HEK 293 cells is sensitive to covalent modification of intracellular cysteine residues by sulfhydryl reagents. *J Biol Chem*, 276(12), 9572-9579, PMID: 11134012
135. **Notley-McRobb, L. and Ferenci, T., 2000.** Substrate specificity and signal transduction pathways in the glucose-specific enzyme II (EII^{Glc}) component of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *Journal of Bacteriology*, 182(16), 4437, PMID: 10913076
136. **Vasilescu, J., Guo, X. and Kast, J., 2004.** Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics*, 4(12), 3845-3854, PMID: 15540166
137. **Hall, D.B. and Struhl, K., 2002.** The VP16 activation domain interacts with multiple transcriptional components as determined by protein-protein cross-linking in vivo. *J Biol Chem*, 277(48), 46043-46050, PMID: 12297514
138. **Gemmecker, G., Eberstadt, M., Buhr, A., Lanz, R., Grdadolnik, S.G., Kessler, H. and Erni, B., 1997.** Glucose transporter of *Escherichia coli*: NMR characterization of the phosphocysteine form of the IIB^{Glc} domain and its binding interface with the IIA^{Glc} subunit. *Biochemistry*, 36(24), 7408-7417, PMID: 9200688
139. **Dean, D.A., Reizer, J., Nikaido, H. and Saier, M.H., Jr., 1990.** Regulation of the maltose transport system of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme III of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. Characterization of inducer exclusion-resistant mutants and reconstitution of inducer exclusion in proteoliposomes. *J Biol Chem*, 265(34), 21005-21010, PMID: 2250006
140. **Hurley, J.H., Faber, H.R., Worthylake, D., Meadow, N.D., Roseman, S., Pettigrew, D.W. and Remington, S.J., 1993.** Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* III^{Glc} with glycerol kinase. *Science*, 259(5095), 673-677, PMID: 8430315
141. **Kerppola, T.K., 2008.** Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys*, 37, 465-487, PMID: 18573091
142. **Magliery, T.J., Wilson, C.G., Pan, W., Mishler, D., Ghosh, I., Hamilton, A.D. and Regan, L., 2005.** Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *J Am Chem Soc*, 127(1), 146-157, PMID: 15631464
143. **Sun, Q. and Margolin, W., 1998.** FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol*, 180(8), 2050-2056, PMID: 9555885

144. **Daley, D.O., Rapp, M., Granseth, E., Melen, K., Drew, D. and von Heijne, G., 2005.** Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science*, 308(5726), 1321-1323, PMID: 15919996
145. **Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L., 2001.** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305(3), 567-580, PMID: 11152613
146. **Saier, M.H., Jr., Yamada, M., Erni, B., Suda, K., Lengeler, J., Ebner, R., Argos, P., Rak, B., Schnetz, K., Lee, C.A., et al., 1988.** Sugar permeases of the bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: sequence comparisons. *FASEB J*, 2(3), 199-208, PMID: 2832233
147. **Straede, A., 2002.** Wechselwirkung von Struktur und Funktionen des Glukosetransporters EIICB^{Glc} aus *Escherichia coli* K-12. Universität Osnabrück, Diplomarbeit
148. **Weng, Q.P. and Jacobson, G.R., 1993.** Role of a conserved histidine residue, His-195, in the activities of the *Escherichia coli* mannitol permease. *Biochemistry*, 32(41), 11211-11216, PMID: 8218185
149. **Worthylake, D., Meadow, N.D., Roseman, S., Liao, D.I., Herzberg, O. and Remington, S.J., 1991.** Three-dimensional structure of the *Escherichia coli* phosphocarrier protein III^{glc}. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(23), 10382-10386, PMID: 1961703
150. **Gutknecht, R., Flukiger, K., Lanz, R. and Erni, B., 1999.** Mechanism of phosphoryl transfer in the dimeric IIAB^{Man} subunit of the *Escherichia coli* mannose transporter. *J Biol Chem*, 274(10), 6091-6096, PMID: 10037691
151. **Ferenci, T., 1996.** Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. *FEMS Microbiol Rev*, 18(4), 301-317, PMID: 8703508
152. **Lengeler, J., 1975.** Mutations affecting transport of the hexitols D-mannitol, D-glucitol, and galactitol in *Escherichia coli* K-12: isolation and mapping. *J Bacteriol*, 124(1), 26-38, PMID: 1100602

8 DANKSAGUNG

Mein großer Dank geht an PD Dr. Knut Jahreis, der mich als mein Doktorvater stets fachlich und moralisch unterstützt hat. Vielen Dank, dass ich meine Dissertation in Deinem Labor schreiben durfte.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. Karl-Heinz Altendorf für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. Jürgen J. Heinisch für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Stefan Walter für die Hilfe bei massenspektrometrischen Anwendungen, bei Herrn Dr. Hans-Peter Schmitz für die Hilfestellung in technischen Belangen und die Unterstützung bei den FACS-Versuchen, sowie bei Herrn Dr. Kurt Schmidt für hilfreiche Gespräche und die verlässliche Prise Humor. Weiterer Dank gilt auch Bernadette Sander, die meine Fragen immer geduldig beantwortet hat, sowie Lucille Schmieding, auf die vor allem bei sprachlichen Problemen stets Verlass war.

Ich danke Anne, Anna, und Katrin, die sowohl in zwischenmenschlicher als auch in fachlicher Hinsicht eine große Stütze für mich waren. Bessere „Doktorschwestern“ hätte ich mir nicht wünschen können! Des Weiteren bedanke ich bei den „Hefen“ Janina, Arne und Ulf dafür, dass sie meine sportliche Seite (wieder) entdeckt haben, sei es in der Halle oder auf der Osttribüne. Ich bedanke mich auch bei allen anderen Kollegen der Südseite, insbesondere aber bei Katja und Sascha, bei denen ich mich immer willkommen gefühlt habe und bei Nele, die oft mehr als nur meinen Musikgeschmack mit mir gemeinsam hat.

Ich danke meinem Mann Daniel für die uneingeschränkte Unterstützung und das Verständnis, dass er mir während meiner Promotion entgegen gebracht hat.

Großer Dank gilt auch meiner Familie, allen voran meiner Mutter, dafür, dass sie immer an mich geglaubt hat. Ich danke auch den Duderstädtern für die moralische und insbesondere Dr. Karl-Heinz-Best auch für die tatkräftige Unterstützung.

Last but not least gebührt folgenden Personen mein Dank: die Osnabrücker Clique (Judith Str., Britta, Thorsten, Björn, Sabine, Itze, Andrea und Bert) dafür, dass ihr in allen Lebenslagen für mich da seid; die Siedler, inklusive Klaus, für die bestmöglichen Montagabende; noch einmal Anne fürs Zuhören und für die Erweiterung meines Spektrums an ausnahmslos großartigen Freizeitbeschäftigungen und Ariane für regelmäßige und verlässlich lustige Besuche. Ich kann nicht oft genug Danke sagen!

9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir nachstehend aufgeführte Personen in der beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

Im Rahmen der Abschlussarbeiten, die von mir während dieses Projektes betreut wurden, wurde ein Teil der hier präsentierten Ergebnisse gemeinsam mit Studenten erarbeitet. Dabei ist Abbildung 3.12 in Zusammenarbeit mit Maren Oude-Lansink entstanden.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)