

Dynamik und Regulation der metabolischen Balance in
Escherichia coli K-12: Molekularbiologische
Charakterisierung peripherer und artifizierlicher
Regulationsmechanismen des
Glukose-Phosphotransferase-Systems

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt beim
Fachbereich Chemie/Biologie
in der Arbeitsgruppe Genetik
der Universität Osnabrück

Anne Kosfeld

Osnabrück, Oktober 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 2008 bis zum Oktober 2011 in der Abteilung Genetik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Heinisch an der Universität Osnabrück in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. K. Jahreis durchgeführt.

Erstgutachter: PD Dr. Knut Jahreis

Abteilung Genetik, Universität Osnabrück

Zweitgutachter: Prof. Dr. Roland Brandt

Abteilung Neurobiologie, Universität Osnabrück

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Modellorganismus <i>Escherichia coli</i> K-12	1
1.2	Phosphotransferase-Systeme	2
1.3	Das Glukose-PTS	4
1.3.1	Aufbau des Glukose-Transportproteins EIICB ^{Glc}	6
1.3.2	Die Regulation des Glukose-PTS	10
1.4	Das SgrRST-System	12
2	Zielsetzung	19
3	Material	21
3.1	Bakterienstämme, Phagen und Hefestämme	21
3.1.1	Bakterienstämme	21
3.1.2	Phagen	22
3.1.3	Hefestämme	22
3.2	Plasmide und Oligonukleotide	23
3.2.1	Plasmide	23
3.2.1.1	„Shuttle“-Vektoren <i>E.coli</i> und <i>S.cerevisiae</i>	25
3.2.2	Oligonukleotide	25
3.3	Chemikalien	28
3.4	Medien	28
3.4.1	Minimalmedium (MM)	28
3.4.2	Vollmedien (LB ₀ , LB, 2 x TY)	28
3.4.3	MacConkey-Indikatorplatten (McC)	28
3.4.4	Indikatorplatten für die α -Komplementation	29
3.4.5	Medien für Glycerinkulturen (Slant, Slant 50 : 50)	29
3.4.6	P1-Weichagar (P1-WA)	29
3.4.7	Hefe Medien	29
3.4.7.1	Synthetisches Komplettmedium (SC)	29
3.4.7.2	Vollmedium (YEPD)	29
3.5	Zusätze für Medien	29
3.5.1	Zuckerlösungen	30
3.5.2	Antibiotika	30
3.5.3	Aminosäurelösungen und Casamino Acids	30
3.5.4	Vitamin B1	30
3.5.5	IPTG	30
3.5.6	X-Gal	30
3.6	Gelstandard	31
3.7	Puffer und Stocklösungen	31
3.8	Verwendete Antikörper	34
3.9	Radioaktiv markierte α -Methyl-Glukose	34

3.10	Restriktionsenzyme, Polymerasen und Ligasen	34
3.11	Kits für molekulargenetische Anwendungen	35
3.12	Geräte und Verbrauchsmaterial	36
3.13	Software, Datenbanken und Internetrecherche	36
4	Methoden	38
4.1	Anzucht und Wachstum von Bakterien	38
4.1.1	Bakterienanzucht und Bestimmung der Zellzahl	38
4.1.2	Wachstumsanalysen und Bestimmung der Generationszeit	38
4.1.3	Wachstumskurven mit zwei Kohlenstoffquellen (Diauxie)	39
4.1.4	Wachstumskompetitionsversuche	39
4.1.5	Glyzerinkulturen	40
4.2	Genetische Methoden	40
4.2.1	Klonierung von Plasmiden	40
4.2.2	Stammkonstruktion	40
4.2.3	Erstellung einer Deletionsmutante	41
4.2.4	P1-Transduktion	42
4.2.4.1	Herstellung des P1-Plattenlysates	42
4.2.4.2	Titerbestimmung des Phagenlysates	43
4.2.4.3	P1-Transduktion	43
4.2.5	Kompetente Zellen und Transformation	43
4.2.5.1	Präparation chemisch kompetenter Zellen	44
4.2.5.2	DNA Transformation chemisch kompetenter Zellen	44
4.2.6	Kompetente Zellen und Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
4.2.6.1	Kompetente <i>S.cerevisiae</i> -Zellen („Freeze Methode“)	44
4.2.6.2	Transformation <i>S.cerevisiae</i> („Freeze Methode“)	44
4.2.7	Blau-Weiß-„Screen“	45
4.2.8	Markertest	45
4.3	Gelelektrophoresen	45
4.3.1	Agarosegelelektrophoresen	45
4.3.1.1	Analytische Agarosegelelektrophorese	45
4.3.1.2	Präparative Agarosegelelektrophorese	46
4.3.2	SDS-PAGE	46
4.4	DNA- und RNA-Methoden	47
4.4.1	Isolierung extrachromosomaler DNA	47
4.4.2	Isolierung chromosomaler DNA	47
4.4.2.1	Isolierung chromosomaler DNA mit der „Mikrowellen-Methode“	47
4.4.2.2	Isolierung chromosomaler DNA mit der Phenol/Chloroform Methode	47
4.4.2.3	Isolierung chromosomaler DNA mit dem Kit von Qiagen	48
4.4.3	Isolierung von RNA und DNA	48
4.4.4	DNase Verdau	48

4.4.5	Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration	48
4.4.5.1	DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit-Fluorometer.....	48
4.4.5.2	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer	48
4.4.6	cDNA-Synthese	49
4.4.7	DNA-Restriktion	49
4.4.8	Antarktische Phosphatase Behandlung	49
4.4.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	49
4.4.10	pGEMT-Vektor-System.....	50
4.4.11	DNA-Sequenzierung.....	50
4.4.12	„Primer annealing“	50
4.4.13	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	51
4.4.13.1	PCR zur Amplifikation von definierten Genabschnitten.....	51
4.4.13.2	Ortsgerichtete Mutagenese	52
4.4.13.3	Real Time-PCR (RT-PCR)	53
4.4.13.4	PCR-Produkt Reinigung	55
4.4.14	Ethanol-fällung	55
4.4.15	Southernblot	55
4.5	Methoden zur Analyse von Proteinen.....	57
4.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	57
4.5.2	Western- und Immunoblot	58
4.5.3	Silberfärbung.....	58
4.5.4	β -Galaktosidase Aktivitätstest	59
4.5.5	Bakterielles „Two-Hybrid“ System.....	60
4.5.6	Hefe „Two-Hybrid“ System	60
4.5.7	Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (BiFC).....	61
4.5.8	„Crosslinking“ von Proteinkomplexen mit Paraformaldehyd	63
4.5.9	Solubilisierung von Membranproteinen	63
4.5.10	Proteinreinigung mit Ni-NTA-Agarose	64
4.5.11	Co-Immunopräzipitation (CoIP)	65
4.5.12	Proteinreinigung über Ni-NTA Säulen.....	65
4.5.13	Proteinreinigung über die ÄKTA.....	65
4.5.14	Dialyse	66
4.6	Biochemische Methoden.....	66
4.6.1	Acetat/Glukose/Laktose-Bestimmung	66
4.6.2	Bestimmung der spezifischen Transportaktivität	66
4.7	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	67
4.7.1	Probenvorbereitung für die fluoreszenzmikroskopische Analyse	67
4.7.2	Fluoreszenzmikroskopische Analyse.....	67
4.7.3	Bildbearbeitung und Dekonvolution.....	68
4.8	Bioinformatische Analysen.....	68

5 Ergebnisse	69
5.1 Die Regulation von Phosphotransferase-Systemen durch das SgrRST-System	69
5.1.1 Bisherige Ergebnisse	69
5.1.1.1 Klonierung von SgrT-Derivaten und Konstruktion eines <i>sgrRST</i> -Deletionsstammes	69
5.1.1.2 Wachstumsanalysen zur Funktionalität von SgrT unter verschiedenen Bedingungen	70
5.1.2 Einfluss von SgrT auf weitere Kohlenhydrat-Aufnahmesysteme	74
5.1.3 Proteinreinigung von SgrTec und SgrTkpn	76
5.1.4 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen EIICB ^{Glc} und SgrT	82
5.1.4.1 Bakteriell „Two-Hybrid“ zur Wechselwirkung zwischen EIIB ^{Glc} und SgrTec	83
5.1.4.2 Hefe „Two-Hybrid“ zur Wechselwirkung von EIIB ^{Glc} und SgrTec	85
5.1.4.3 Klonierung von SgrTec3HA	86
5.1.4.4 Co-Immunopräzipitation zur Wechselwirkung von EIICB ^{Glc} und SgrTec	88
5.1.4.5 „Crosslinking“ mit Paraformaldehyd zur Wechselwirkung von EIICB ^{Glc} und SgrTec	90
5.1.4.6 Analyse der möglichen Beteiligung von EIIA ^{Glc} und Mlc an der Wechselwirkung zwischen EIICB ^{Glc} und SgrT durch „Crosslinking“	93
5.1.4.7 BiFC zur Untersuchung der Wechselwirkung von EIICB ^{Glc} bzw. der Domänen von EIICB ^{Glc} und SgrTec	94
5.1.4.8 „Crosslinking“ zur Untersuchung der Wechselwirkung von SgrTec mit den Domänen von EIICB ^{Glc}	98
5.1.5 Essentielle Aminosäuren für die Interaktion mit SgrT auf Seiten des EIICB ^{Glc}	99
5.1.5.1 „Crosslinking“ Experimente zur Analyse der Wechselwirkung von SgrT mit verschiedenen EIICB ^{Glc} -Mutanten	99
5.1.5.2 Wachstumsanalysen zur Funktionalität von SgrT in verschiedenen relaxed Mutanten von EIICB ^{Glc}	103
5.1.5.3 BiFC Analyse zur Wechselwirkung von EIICB ^{Glc} -P384R und SgrT	107
5.1.5.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von EIICB ^{Glc} und SgrTec-GFP	108
5.1.5.5 Untersuchung des Einflusses der EIIC ^{Glc} -Domäne auf die Wechselwirkung zu SgrT	115
5.1.5.6 „Crosslinking“-Versuche zur Wechselwirkung von SgrT mit EIICB ^{Glc} -Mutanten des KTPGRED-Motives	116
5.1.6 Essentielle Aminosäuren für die Interaktion mit EIICB ^{Glc} auf Seiten des SgrT	117
5.1.7 Untersuchungen zur Auswirkung einer <i>sgrRST</i> -Deletion auf den „Overflow“-Metabolismus	119
5.1.7.1 Analysen von Batch-Kulturen	119
5.1.7.2 Analysen von kontinuierlichen Kulturen im Fermenter mit Glukose-6-Phosphat Puls	121
5.2 Stammkonstruktion zur Untersuchung des Expressionslevels von chromosomal kodiertem EIICB ^{Glc} -His	125
5.2.1 Konstruktion von Stämmen mit chromosomal kodiertem EIICB ^{Glc} -His	125
5.2.1.1 Stammkonstruktion von JKA4	125
5.2.1.2 Überprüfung der EIICB ^{Glc} -His Expression und Wachstumsanalysen von JKA4	127
5.2.1.3 Stammkonstruktion von JKA10 und JKA11	130
5.2.1.4 Überprüfung der EIICB ^{Glc} -His Expression und Wachstumsanalysen von JKA11	131
5.2.1.5 Isolierung einer Suppressionsmutante von JKA11	133

5.2.1.6	Expression von EIICB ^{Glc} -His und Wachstumsanalysen von JKA11 und der Suppressionsmutante JKA11*	133
5.2.2	Analyse der Phäno- und Genotypen von JKA4, JKA11 und JKA11*	136
5.2.2.1	Sequenzanalysen von JKA4, JKA11 und JKA11*	136
5.2.2.2	Überprüfung der Transduzierbarkeit des Phänotyps von JKA11 und JKA11*	136
5.2.2.3	Konstruktion von JKA23, einem chromosomal kodierten EIICB ^{Glc} -Derivat unter der Kontrolle des <i>tac_{PO}</i>	137
5.2.2.4	Überprüfung des „His-Tags“ im Bezug auf unterschiedliche Phänotypen des EIICB ^{Glc}	138
5.2.2.5	Analyse der <i>ptsG</i> -Genregion von JKA11, JKA11* und JKA23 im Southernblot	139
5.2.2.6	Überprüfung des LacI Repressors in JKA11 und JKA11*	141
5.2.2.7	Überprüfung der <i>ptsG</i> -mRNA in JKA4, JKA11 und JKA11*	142
5.2.2.8	Bestimmung der spezifischen Transportaktivität verschiedener EIICB ^{Glc} -Derivate	147
5.2.3	Erstellung von Glukose-Laktose Diauxiekurven	151
6	Diskussion	160
6.1	Regulation der EIICB ^{Glc} -Aktivität durch das kleine Protein SgrT	160
6.1.1	SgrT wird von einer sRNA kodiert und stellt einen völlig neuartigen Mechanismus der Glukose-Regulation dar	160
6.1.2	SgrT reguliert die Transportaktivität von EIICB ^{Glc} durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung	162
6.1.3	SgrT bindet in der hoch konservierten Linkerregion des EIICB ^{Glc}	164
6.1.4	SgrT inhibiert durch EIICB ^{Glc} -Bindung die Translokation und Phosphorylierung der Glukose	167
6.1.5	Eine <i>sgrRST</i> -Deletion hat nur einen geringen Einfluss auf den Glukose-Metabolismus	169
6.1.6	Zusammenfassung und Outlook zur Regulation von EIICB ^{Glc} durch SgrT	170
6.2	Konstruktion von Stämmen mit chromosomal kodiertem EIICB ^{Glc} -His	171
6.2.1	Erfolgreiche Konstruktion von chromosomal kodiertem EIICB ^{Glc} -His unter Kontrolle des natürlichen Promotors	171
6.2.2	Chromosomal kodiertes EIICB ^{Glc} -His unter der Kontrolle eines <i>tac_{PO}</i> zeigt Wachstumsdefizite in Minimalmedium mit Glukose	172
6.2.3	Eine Suppressionsmutante von JKA11 zeigt kein Wachstumsdefizit in Minimalmedium mit Glukose	173
6.2.4	Zusammenfassung und Ausblick zur Stammkonstruktion	173
6.3	Bewertung der Ergebnisse im Hinblick auf die Stammoptimierung zur Produktivitätsmaximierung von <i>E.coli</i> -Stämmen	174
7	Zusammenfassung	175
8	Summary	176
9	Abkürzungsverzeichnis	177
10	Literaturverzeichnis	179
11	Danksagung	188
12	Eidesstattliche Erklärung	189

1 Einleitung

1.1 Der Modellorganismus *Escherichia coli* K-12

Eines der am besten untersuchten und häufig eingesetzten prokaryotischen Modellorganismen der molekularbiologischen Forschung ist das Bakterium *Escherichia coli* K-12 (*E.coli*). Es wurde 1885 vom deutschen Kinderarzt und Bakteriologen Theodor Escherich entdeckt und nach ihm benannt [Neuaufgabe in (Escherich, 1989)].

E.coli gehört zu den gramnegativen und fakultativ anaerob lebenden Enterobakterien und kommt sowohl im Darm von Säugetieren und Vögeln (griech. „enteron“ = Darm), als auch frei lebend in der Umwelt vor. Die meisten *E.coli*-Stämme sind harmlos, jedoch häufig opportunistisch pathogen und können Infektionen in immunsupprimierten Wirten auslösen. Zudem sind pathogene Serotypen bekannt, die schwere Magen-Darm-Infektionen in Menschen hervorrufen (z.B. EHEC (Welinder-Olsson und Kaijser, 2005)).

Die Zellen sind stäbchenförmig, mit einer durchschnittlichen Länge von 2 µm und einem Durchmesser von 0,5 µm. Sie sind zudem peritrich begeißelt und können sich durch Rotation der Flagellen schwimmend im Medium fortbewegen (Berg und Anderson, 1973). Dabei zeigen sie die Fähigkeit zur Chemotaxis (Berg und Brown, 1972). *E.coli* kann auf einer großen Menge verschiedener Substrate wachsen, z.B. auf verschiedenen Zuckern oder Aminosäuren. Die beste Temperatur für ein optimales *E.coli*-Wachstum liegt bei 37°C. Unter diesen Bedingungen kann es eine Generationszeit von 20 min erreichen.

E.coli ist auf Grund seines schnellen Wachstums und der einfachen Kultivierung im großen Maßstab ein weit verbreiteter Organismus in biotechnologischen Verfahren und in der industriellen Mikrobiologie. Die Produktion von heterologen und rekombinanten Proteinen in industriellen Fermentationsprozessen wird häufig angewandt. Eine der ersten Anwendungen der rekombinanten DNA Technologie war die gentechnische Manipulation von *E.coli* zur Produktion von humanem Insulin (Ladisch und Kohlmann, 1992). Modifizierte *E.coli*-Stämme werden zudem zur Impfstoffentwicklung und Produktion von Aminosäuren, Hormonen und Enzymen eingesetzt sowie für mikrobiologische Sanierungen und Dekontaminationen. Die Maximierung der Produktivität, d.h. der Produktausbeute bezogen auf die Prozessdauer und die eingesetzten Kosten, ist für biotechnologische Prozesse von wirtschaftlicher Relevanz und somit ein Ziel biotechnologischer Forschung.

Bereits 1969 gelang J. Beckwith als Erstem die Isolierung eines einzelnen Gens aus *E.coli* K-12 (Shapiro et al., 1969). Die vollständige Sequenzierung des zirkulären Chromosoms folgte 1997 und ergab eine Gesamtgröße des Genoms von $4,65 \times 10^6$ Basenpaaren (bp), mit etwa 4.400 Genen (Blattner et al., 1997). Zahlreiche Studien mit einer Vielfalt an globalen Ansätzen haben zudem mehr als 80 so genannte kleine regulatorische RNAs (sRNA) im Genom von *E.coli* K-12 identifiziert. Diese sind meistens an der posttranskriptionellen Regulation durch Hfq-abhängige Basenpaarung mit ihren Zielgenen beteiligt (Gorke und Vogel, 2008; Horler und Vanderpool, 2009). Des Weiteren wurden viele mobile Elemente im Genom entdeckt, z.B. Transposoninsertionen oder Prophagen. *E.coli* und verwandte Bakterien haben die Fähigkeit, DNA über bakterielle Konjugation, Transduktion und Transformation aufzunehmen oder an andere Bakterien weiter zu

geben, was den horizontalen Gentransfer innerhalb einer Population ermöglicht (Zhaxybayeva und Doolittle, 2011).

Durch intensive Forschung konnte bisher Aufschluss über die Funktion und Regulation von mehr als der Hälfte aller Gene gewonnen werden. Dennoch sind viele Gene und deren kodierte Proteine nicht oder nur unzureichend charakterisiert und bieten immer neue Ansätze zur weiteren Forschung. Besonders die vielfältige Regulation hoch komplexer Netzwerke stellt die Wissenschaft vor neue Herausforderungen. Hierbei helfen neuartige systembiologische Ansätze, die den gesamten Metabolismus der Zelle umfassend betrachten.

Ein Beispiel dieser komplexen Netzwerke, deren Regulation noch nicht vollständig aufgeklärt ist, stellt das Phosphotransferase-System (PTS) zur Aufnahme von Kohlenhydraten aus dem Medium dar (Deutscher et al., 2006). Dabei ist besonders die Regulation des Glukose-PTS zur Aufnahme extrazellulärer Glukose einer starken Regulation durch viele Faktoren unterworfen [Review in (Jahreis et al., 2008)]. Obwohl bereits viele der an der Regulation beteiligten Proteine bekannt sind, wurde erst im Jahr 2007 ein neues kleines regulatorisches Protein (SgrT) des Glukose-PTS entdeckt, welches von einer sRNA (*sgrS*) kodiert wird (Wadler und Vanderpool, 2007). Dies verdeutlicht, dass selbst in *E.coli* noch lange nicht alle Regulationsmechanismen bekannt und vollständig aufgeklärt sind. Auch bezüglich bereits charakterisierter regulatorischer Proteine sind viele Fragen offen, z.B. zur genauen Wechselwirkung oder Funktion.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Charakterisierung einiger der peripheren Regulationsmechanismen des Glukose-PTS durchgeführt. Dabei werden sowohl die Wechselwirkungen der PTS-Enzyme mit spezifischen Regulatoren als auch deren Bedeutung zur Aufrechterhaltung der metabolischen Balance im Vordergrund stehen.

1.2 Phosphotransferase-Systeme

Bakterien wie *E.coli* haben die Fähigkeit, eine Vielzahl von verschiedenen Nährstoffen zu nutzen. Dabei können sie sich schnell an veränderte Bedingungen in der Umgebung anpassen. In Umgebungen mit mehr als einer Kohlenhydratquelle zeigen *E.coli*-Zellen eine Präferenz für einen der angebotenen Zucker. Dieses Phänomen der so genannten Diauxie wurde erstmalig von Monod beschrieben, der zeigen konnte, dass *E.coli*, wenn es einem Medium mit D-Glukose und Sorbitol ausgesetzt wird, die Glukose präferiert und als erstes verstoffwechselt (Monod, 1942). Seitdem wird Glukose als „bevorzugte“ Kohlenhydratquelle für *E.coli* bezeichnet und ausgiebig erforscht, um die Mechanismen der Glukoseaufnahme und deren Regulation zu entschlüsseln [Review in (Gabor et al., 2011)].

Eine Barriere gegen die Umgebung stellen bei gramnegativen Bakterien die äußere Membran sowie die Cytoplasmamembran dar. Während in der äußeren Membran Poren (Porine), die keinen aktiven Transport benötigen, für den Stoffaustausch mit der Umgebung sorgen, findet über die Cytoplasmamembran, die Peri- und Cytoplasma voneinander trennt, ein aktiver Transport über verschiedene Transportsysteme statt. Dabei unterscheidet man zwischen unterschiedlichen Arten des aktiven Transportes. Eine wichtige Gruppe stellen Gruppentranslokationssysteme dar, bei denen das Substrat während des Transportes modifiziert wird. Dazu gehört auch das Hauptaufnahmesystem für Glukose (Erni, 2002).

Das Hauptaufnahme­system für Glukose wurde 1964 zum ersten Mal beschrieben, als das Glukose-spezifische Phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängige Phosphotransferase-System (PTS) identifiziert wurde (Kundig et al., 1964). Seit diesem Zeitpunkt wurden viele verschiedene PTS für die Aufnahme einer großen Zahl von Kohlenhydraten in gramnegativen und grampositiven Bakterien gefunden. Dabei stellte sich heraus, dass die PTS nicht nur zur Aufnahme von Kohlenhydraten dienen, sondern gleichzeitig hoch komplexe Sensor-Systeme darstellen, welche den Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus, die Chemotaxis und Biofilmbildung, sowie weitere bakterielle Antworten auf veränderte Umweltbedingungen regulieren [Review in (Deutscher et al., 2006; Lengeler und Jahreis, 2009)].

Je nach Bakterienart gibt es verschiedene PTS, im Fall von *E.coli* K-12 sind es 22, die nebeneinander in der Zelle existieren können (Tchieu et al., 2001). Sie sind jeweils für die Aufnahme spezifischer Kohlenhydrate verantwortlich und nach ihrem Hauptsubstrat benannt. Sie transportieren z.B. Hexosen (Glukose, Mannose, Fruktose) und Hexitole (Mannitol, Sorbitol und Galactitol) sowie modifizierte Hexosen (Glukosamin, N-Acetyl-Glukosamin) und Disaccharide (β -Glukoside, Sucrose) in die Zelle (Kotrba et al., 2001). Auf Grund von Sequenzvergleichen sind die PTS im Allgemeinen in fünf große Familien unterteilt, Glukose/Sucrose/ β -Glucosid, Mannose, Mannitol/Fruktose, Laktose/Chitobiose und andere (Deutscher et al., 2006; Erni, 2002).

Bei einem PTS werden die Kohlenhydrate, im Allgemeinen gekoppelt an die Aufnahme in die Zelle, gleichzeitig phosphoryliert. Dadurch werden sie für nachfolgende Stoffwechselwege wie die Glykolyse oder den Pentosephosphatweg zugänglich gemacht (Postma und Lengeler, 1985). Unabhängig von der Bakterienspezies oder dem aufgenommenen Kohlenhydrat wurden bisher alle PTS charakterisiert, den folgenden Prozess zu katalysieren, welcher zur Aufnahme des Substrates führt: $\text{PEP}_{(\text{innen})} + \text{Substrat}_{(\text{außen})} \rightarrow \text{Pyruvat}_{(\text{innen})} + \text{Substrat-Phosphat}_{(\text{innen})}$ (Postma und Lengeler, 1985). Die benötigte Phosphatgruppe stammt vom Phosphoenolpyruvat aus der Glykolyse und wird über eine Phosphorylierungskaskade auf die Kohlenhydrate übertragen. Die Phosphorylierungskaskade besteht aus den allgemeinen und substratspezifischen Komponenten Enzym I (EI, Gen *ptsI*, 63,5 kDa) und dem Histidin-Protein (HPr, Gen *ptsH*, 9,1 kDa), die mit Ausnahme des Fruktose-PTS in allen *E.coli* PTS vorkommen. Vom HPr wird die Phosphatgruppe dann auf den substratspezifischen Enzym II (EII)-Komplex übertragen (Postma und Lengeler, 1985). Dieser Komplex besteht je nach PTS aus drei (A, B und C) oder vier (A, B, C und D) funktionellen Domänen, die in einem großen Fusionsprotein vereint (z.B. Mannitol-PTS mit EIIABC^{Mtl}) oder nur teilweise gekoppelt (z.B. Glukose-PTS mit EIIA^{Glc} und EIICB^{Glc}) vorliegen können (Kotrba et al., 2001). Insgesamt besitzt *E.coli* 38 verschiedene PTS-Proteine, wovon 33 Transportprotein-Untereinheiten repräsentieren, die zu den 22 verschiedenen Transportern gehören (Siebold et al., 2001). Die Aufnahme von Kohlenhydraten durch ein PTS benötigt ein Molekül PEP als Energielieferant, welches als äquivalent zu einem Molekül ATP angesehen werden kann. Die Aufnahme von Zuckern über Nicht-PTS Transporter benötigt dagegen zusätzlich zur Energie für den Transport ein weiteres ATP für die Phosphorylierung des Zuckers durch eine Kinase. Daher kann das PTS als sehr effizientes Transport- und Regulationssystem bezeichnet werden (Kotrba et al., 2001).

Die Phosphotransferase Systeme wurden bisher nur in Bakterien nachgewiesen, d.h. nicht in Archeaen und Eukaryoten, was auf eine Entstehung der PTS nach der Trennung der drei Domänen des Lebens hindeutet. Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur-Analysen haben zudem ergeben,

dass die unterschiedlichen Enzyme und Untereinheiten der Proteine des PTS aus verschiedenen Quellen entstanden sind, d.h. vermutlich teilen nicht alle EI_IA und EI_IB Proteine bzw. Domänen einen evolutionären Ursprung (Reizer und Saier, 1997).

Zusätzlich zum Transport bilden die PTS-Enzyme ein Signaltransduktionssystem, welches eine Anzahl weiterer regulatorischer Funktionen in der Zelle übernimmt (Lengeler und Jahreis, 1996). Dieses System soll anhand des Glukose-PTS im nächsten Kapitel genauer behandelt werden.

1.3 Das Glukose-PTS

Glukose als bevorzugte Kohlenstoffquelle von *E. coli* wird durch 4 verschiedene Systeme in die Zelle aufgenommen. Neben dem Glukose-PTS erkennt auch das Mannose-PTS Glukose als Substrat mit einer hohen Affinität ($K_M = 15 \mu\text{M}$). Ebenfalls mit hoher Affinität wird Glukose über den ATP abhängigen ABC-Transporter des Mgl-Systems aufgenommen ($K_M = 15 \mu\text{M}$), wohingegen die Aufnahme über den Protonen-Symporter GalP nur mit geringer Affinität zur Glukose erfolgt ($K_M = 100 \mu\text{M}$). Der Transport von Glukose über GalP oder Mgl in die Zelle erfordert eine zusätzliche Phosphorylierung durch die Glucokinase (Jahreis et al., 2008). Das Hauptaufnahmesystem ist aber das Glukose-PTS, welches eine sehr hohe Affinität zur Glukose im Medium aufweist ($K_M = 5$ bis $20 \mu\text{M}$, je nach Laborstamm) (Postma et al., 1993). Zusätzlich zur Glukose zeigt dieses PTS eine hohe Affinität zu α - und β -(Methyl)-Glukosiden (α -MG) und 1-Thio-Glukose sowie eine geringe Affinität zu 2-Desoxy-Glukose und Mannose (Siebold et al., 2001).

Der erste Schritt in einer PTS-typischen Phosphorylierungskaskade wird durch EI katalysiert, eine PEP-abhängige Proteinkinase. Die Verwendung von PEP, einem Intermediat aus der Glykolyse, als Phosphat-Donor, koppelt Zuckertransport und Metabolismus sehr eng aneinander. Im Fall des Glukose-PTS wird die Phosphatgruppe schrittweise vom EI~P zum HPr, vom HPr~P zum ebenfalls cytosolischen EI_IA^{Glc} (Auch EI_IA^{Crr}, Gen *crr*, 18,1 kDa) und schließlich vom EI_IA^{Glc}~P zum Glukose-spezifischen Membranprotein EI_ICB^{Glc} (Gen *ptsG*, 50,7 kDa) übertragen, welches die Aufnahme und Phosphorylierung der Glukose katalysiert (s. Abbildung 1.1).

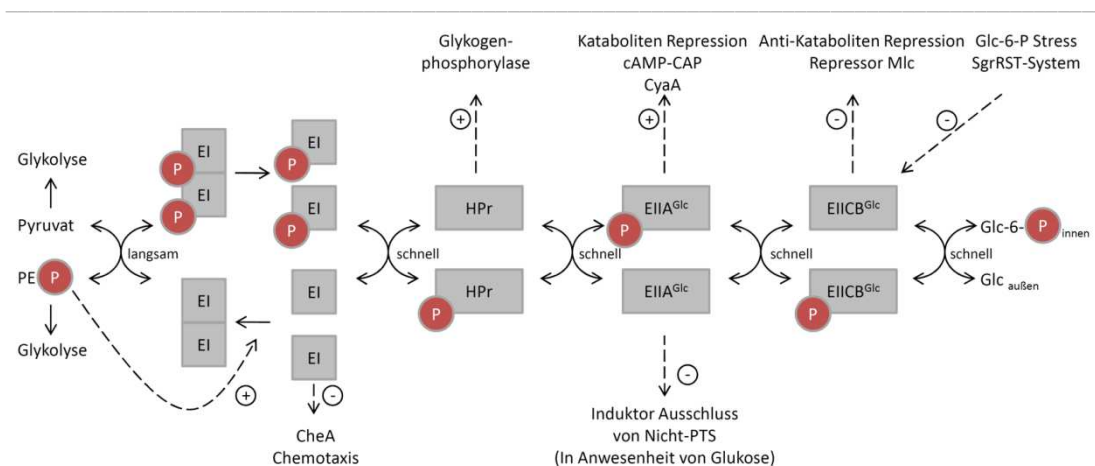


Abbildung 1.1: Das Glukose-Phosphotransferase-System

Darstellung des Glukose-PTS mit Phosphatgruppentransfer und Signaltransduktion. Die Phosphatgruppe wird ausgehend vom PEP über EI, HPr, EI_IA^{Glc} und EI_ICB^{Glc} auf die Glukose transferiert, welche dann als Glukose-6-Phosphat in die Zelle aufgenommen wird. Die einzelnen PTS-Enzyme haben je nach ihrem Phosphorylierungszustand Einfluss auf Induktorausschluss, Katabolitenrepression, Chemotaxis und andere Signalwege. Nähere Erläuterungen im Text [Nach (Gabor et al., 2011)].

Die Enzyme EI, HPr und EIIA^{Glc} werden an Histidinresten phosphoryliert, EIIB^{Glc} dagegen an einem Cysteinrest (Pas und Robillard, 1988). Die Phosphatübertragung erfolgt abwechselnd zwischen den Positionen Nε2 (EI und EIIA^{Glc}) und Nδ1 (HPr und EIIB^{Glc}) im Imidazolring. Die Oberflächen der wechselwirkenden Proteine sind komplementär in Form und Ladung zueinander, d.h. EI und EIIA^{Glc} zeigen eine konkave Oberfläche und sind Aspartat/Glutamat-reich, wohingegen HPr und EIIB^{Glc} konvex und Arginin-reich sind. Dies ermöglicht eine optimale Wechselwirkung der Proteine (Erni, 2002). Alle Phosphatgruppen-Transferreaktionen zwischen PEP und EIIB^{Glc} sind reversibel, nur der letzte Schritt, der Transfer der hoch energetischen Phosphatgruppe auf den Zucker, ist praktisch irreversibel (Gabor et al., 2011).

Zusätzlich zum Transport bilden die PTS-Enzyme ein Signaltransduktionssystem, welches eine Anzahl weiterer regulatorischer Funktionen in der Zelle übernimmt (Lengeler und Jahreis, 1996). Der Schlüssel zum Verständnis der Rolle des PTS in seiner regulatorischen Funktion liegt in der komplexen Phosphorylierung der Proteinkinase EI (Chauvin et al., 1996). Die Phosphorylierung des EI kann nur stattfinden, wenn das Enzym als Dimer vorliegt. Die C-terminale Domäne des EI beinhaltet eine PEP-Bindestelle und ist verantwortlich für die Dimerisierung. Vergleichbar zu anderen Proteinkinasen, autophosphoryliert EI in seiner dimeren Form in Anwesenheit seines Substrats PEP und Mg²⁺ an einem konservierten Histidinrest im N-terminalen Bereich des Proteins. Der N-terminale Abschnitt zeigt zudem die HPr-Bindestelle, die für die Phosphatübertragung vom EI auf das HPr benötigt wird. Nach der Übertragung der Phosphatgruppe auf das HPr zerfällt das EI wieder in seine Monomere (Lengeler und Jahreis, 2009).

Wenn die Genexpression aller PTS-Enzyme voll induziert ist (d.h. unter optimalen Glukose-Bedingungen), dann ist die Dimerisierung des EI der limitierende Schritt in der Umsetzungsrate des PTS, da die Assoziation/Dissoziation von EI sehr langsam im Vergleich zu anderen Proteinkinasen ist (Chauvin et al., 1996). In diesem Fall erhöht sich der Anteil an unphosphorylierten PTS-Proteinen, da das EI sein Phosphat schneller an das HPr abgibt, als es neu autophosphorylieren kann. Wenn dagegen die Expression von EIICB^{Glc} (*ptsG*) auf 50 % oder weniger reduziert wird, so wird der Transport limitierend, auch mit einem Überschuss an Glukose im Medium (Bettenbrock et al., 2007; Gabor et al., 2011). In diesem Fall liegen die PTS-Enzyme überwiegend im phosphorylierten Zustand vor, da das Phosphat nicht schnell genug an die Glukose übertragen werden kann. Dies bedeutet, dass auch geringe Unterschiede in der *ptsG* Expression (Faktor 2 bis 10) einen starken Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad der einzelnen Glukose-PTS Enzyme haben (Regulation des *ptsG*, siehe nächster Abschnitt) (Gabor et al., 2011).

Daraus lässt sich das folgende Modell ableiten. Alle funktionellen Untereinheiten des PTS können im phosphorylierten oder unphosphorylierten Zustand vorkommen, abhängig von der Zugänglichkeit von Nährstoffen und dem physiologischen Status der Zelle, was z.B. durch das PEP zu Pyruvat Verhältnis reflektiert wird. Das PTS „misst“ die Anwesenheit von Zuckern im Medium und den intrazellulären Energiestatus der Zelle und reguliert dann u.a. direkt Zuckeraufnahme, Kohlenstoff- und Energiemetabolismus sowie eine chemotaktisch gesteuerte Bewegung zum PTS-Zucker hin.

Das PEP zu Pyruvat Verhältnis in der Zelle und der so genannte Pyruvat-Knoten stellen zentrale Elemente im Kohlestoffmetabolismus dar und sind das Ziel des PTS als Sensorsystem. Der Pyruvat-Knoten verbindet die Glykolyse und Glukoneogenese mit dem Krebs-Zyklus in der Zelle. Aus

diesem Grunde lässt sich die Verwendung einer PEP- und nicht ATP-abhängigen Proteinkinase in Form des EI erklären, da auf diese Weise permanent das intrazelluläre PEP zu Pyruvat-Verhältnis gemessen und diese Information für die Regulation genutzt werden kann. Da die Phosphorylierungen zwischen EIIB und PEP reversibel sind, kosten sie praktisch keine Energie. Zudem werden für jedes eingesetzte PEP zwei gewonnen, sodass für die gesamte Regulation praktisch keine Energie benötigt wird (Lengeler und Jahreis, 2009).

Einige PTS-Enzyme spielen neben dem Transport auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion (s. Abbildung 1.1). Die regulatorische Aktivität variiert dabei mit dem Grad ihrer Phosphorylierung, welche wiederum vom Verhältnis der Zucker-abhängigen Dephosphorylierung und der PEP-abhängigen Rephosphorylierung bestimmt wird (Siebold et al., 2001). Wie bereits erwähnt, ist unter guten Bedingungen, d.h. es ist ausreichend Glukose im Medium vorhanden, der überwiegende Teil der PTS-Enzyme unphosphoryliert. *E.coli* nutzt diese Information und koppelt sie an verschiedene Regulatorproteine [Review in (Lengeler und Jahreis, 2009)]. Dabei spielt das $EIIA^{Glc}$ eine zentrale Rolle. Im unphosphorylierten Zustand (Glukoseüberschuss) inhibiert es direkt Nicht-PTS Aufnahmesysteme, z.B. die Laktose- oder Maltose-Permease, ein Prozess, der als Induktorausschluss bezeichnet wird (Postma et al., 1993). Im Gegensatz dazu aktiviert phosphoryliertes $EIIA^{Glc}$ (Glukosemangel) die Adenylatzyklase (Gen *cya*), welche dann den „Second messenger“ cAMP aus ATP produziert. Das so genannte „Hungersignal“ cAMP fungiert als Co-Aktivator, der die Aktivität des globalen Regulatorproteins CAP (engl. „cAMP activator protein“, auch CRP, Gen *crp*) moduliert. cAMP-CAP ist für die Aktivierung der Transkription einer großen Anzahl von Genen (*crp* Modulon) für den alternativen Kohlenhydratstoffwechsel verantwortlich. Dieser Prozess wird als Katabolitenrepression bezeichnet [Für einen Überblick über cAMP-Signalwege in Bakterien s. (Jahreis, 2010)]. Durch Induktorausschluss und Katabolitenrepression wird gewährleistet, dass zunächst die für die Zelle beste Kohlenstoffquelle, die Glukose, aufgenommen und verstoffwechselt wird.

Auch die anderen Enzyme der PTS-Kaskade sind an verschiedenen Regulationssystemen beteiligt. Unphosphoryliertes EI inhibiert die Autophosphorylierung der Sensorkinase CheA und hat damit einen direkten Einfluss auf die Chemotaxis von *E.coli* (Lux et al., 1995). Das bedeutet, dass gesteigerte Konzentrationen eines PTS-Zuckers im Medium eine positive Chemotaxis hervorrufen und die Phasen des Schwimmens auf den PTS-Zucker zu gegenüber Taumeln signifikant verlängert werden [Review in (Lengeler und Jahreis, 2009)]. Unphosphoryliertes HPr aktiviert die Glycogenphosphorylase, die durch den Abbau des Energiespeichers Glycogen den Übergang zwischen stationärer und logarithmischer Phase bei guten Nährstoffbedingungen erleichtert (Seok et al., 1997). Das Transportprotein $EIICB^{Glc}$ ist an der Anti-Katabolitenrepression und der Bindung des globalen Repressors Mlc beteiligt. Durch die Bindung von Mlc unter Bedingungen, in denen ausreichend Glukose im Medium vorhanden ist, wird eine Repression der Transkription des Gens für $EIICB^{Glc}$ (*ptsG*) durch Mlc verhindert (Tanaka, Y. et al., 2000; Zeppenfeld et al., 2000). Eine ausführliche Beschreibung zur Funktion von Mlc folgt in Kapitel 1.3.2.

1.3.1 Aufbau des Glukose-Transportproteins $EIICB^{Glc}$

Im Bezug auf die in dieser Arbeit behandelten Themen soll nachfolgend zunächst das Transportprotein $EIICB^{Glc}$ des Glukose-PTS im Detail betrachtet werden. Das Membranprotein $EIICB^{Glc}$ ist das Haupttransportprotein für Glukose in *E.coli* und ist sowohl für die Translokation als

auch für die Phosphorylierung der Glukose verantwortlich. Das EIICB^{Glc} wird von dem Gen *ptsG* bei 25,0 min im *E.coli*-Chromosom kodiert. Die anderen PTS-Enzyme (HPr, EI und EIIA^{Glc}) sind dagegen Teil des Operons *ptsHlcrr* bei 54,6 min im Chromosom (Erni, 2002). Alle Enterobakterien, deren Genom bisher untersucht und sequenziert wurde, besitzen ein *ptsG* Gen. Ein Vergleich der Proteinsequenz der unterschiedlichen EIICB^{Glc} zeigt in den meisten Fällen mehr als 90 % Übereinstimmung zum EIICB^{Glc} aus *E.coli* (Jahreis et al., 2008).

Das Protein EIICB^{Glc} (50,6 kDa, 477 AS) besteht aus zwei Domänen, der membrangebundenen EIIC^{Glc}-Domäne (41,1 kDa) und der cytoplasmatischen EIIB^{Glc}-Domäne (9,6 kDa), die über einen Linker miteinander verbunden sind. Die EIIC^{Glc}-Domäne bildet den membranintegralen eigentlichen Transporter mit einer Glukose-Bindestelle, während die EIIB^{Glc}-Domäne membranassoziiert vorliegt und für den Phosphatgruppentransfer auf die Glukose verantwortlich ist (Lengeler und Jahreis, 1996).

Während die Informationen über die Struktur der membranintegralen C-Domäne gering sind und kontrovers diskutiert werden [Zusammenfassung in (Gabor, 2011)], sind die Strukturen von EIIB^{Glc} und EIIA^{Glc} aufgeklärt (Eberstadt et al., 1996; Gemmecker et al., 1997; Worthylake et al., 1991). Die EIIB^{Glc}-Domäne besteht aus vier antiparallelen β -Faltblattstrukturen und drei Helices. Der aktive Cysteinrest C421, der für die Phosphatgruppenübertragung auf die Glukose verantwortlich ist, liegt im Loop zwischen β 1 und β 2 im hoch konservierten DACITRLR-Motiv (Erni, 2002). Außerdem bindet unphosphoryliertes EIIB^{Glc} den Repressor Mlc und ist somit für die Titration von Mlc vom *ptsG* Operator unter glukosereichen Bedingungen verantwortlich, sofern es über einen Membrananker (EIIC^{Glc}) an die Cytoplasmamembran gebunden ist (Tanaka, Y. et al., 2000; Zeppenfeld et al., 2000).

Die EIIB^{Glc}-Domäne ist über einen flexiblen Linker mit der EIIC^{Glc}-Domäne verbunden. Dieser liegt oberflächenexponiert vor, da eine proteolytische Spaltung innerhalb des Linkers (Aminosäuren F409 und D392) möglich ist. Untersuchungen der Proteolyse konnten zeigen, dass eine Phosphorylierung von EIICB^{Glc} das Protein gegen eine Spaltung schützt, was eine Konformationsänderung des Proteins im Bereich des Linkers vermuten lässt (Erni, 2002). Die Linkerregion zeigt ein hoch konserviertes Motiv mit der Aminosäurenabfolge KTPGRED (Aminosäuren 382 bis 388), welches in allen PTS-Permeasen spezifisch für Glukose und N-Acetyl-Glukosamin vorkommt. Die Funktion dieser Sequenz ist bislang unklar (Jahreis et al., 2008). Frühere Arbeiten vermuteten eine Funktion in der Bindung von Mlc in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand von EIICB^{Glc} (Lee et al., 2000; Zeppenfeld et al., 2000), die sich jedoch nicht bestätigen ließ. Für die Transportaktivität des EIICB^{Glc} ist die Linkerregion nicht essentiell. Selbst wenn beide Domänen im Linker voneinander getrennt und einzeln exprimiert werden, zeigen sie Transport- und Phosphorylierungsaktivität (Buhr et al., 1994). Alaninmutationen im KTPGRED-Motiv haben entweder keinen Effekt, oder reduzieren die PTS-Aktivität auf Werte zwischen 10 % und 60 %. Nur eine Substitution des G385 zu Alanin, sowie die komplette Deletion des Motivs, reduzieren die Transport- und Phosphorylierungsaktivität auf unter 1 % der im Wildtyp gemessenen Aktivität (Siebold et al., 2001).

Von der EIIC^{Glc}-Domäne existieren zwei detaillierte Strukturmodelle (Buhr und Erni, 1993; Lengeler et al., 1994). Beide sagen eine Topologie mit acht transmembranen Helices voraus, wobei sowohl das carboxy- als auch das aminoternale Ende ins Cytosol orientiert sind. Trotzdem unterscheiden sich die beiden Modelle in mindestens drei der Helices, was deren Lage

und Region angeht. Eine detaillierte Beschreibung beider Modelle, sowie ein Versuch zur Verifikation eines der Modelle ist in Gabor et al. beschrieben (Gabor et al., 2011). Nach neueren Erkenntnissen wird zudem eine Struktur mit zehn transmembranen Helices diskutiert (Gabor, 2011). Dieses Modell lehnt sich an die Strukturaufklärung des zu EIICB^{Glc} homologen Proteins EIIC^{Chb} aus *Bacillus cereus* an (Cao et al., 2011). Nach dieser Struktur befindet sich das KTPGRED-Motiv des Linkers direkt im Anschluss an die letzte membranständige Helix der EIIC^{Glc}-Domäne und nicht, wie im Modell von Lengeler bzw. von Erni diskutiert, weiter von ihr entfernt. Das hoch konservierte GITE-Motiv (Aminosäuren 295 bis 298) innerhalb der EIIC^{Glc}-Domäne, welches in den Transportproteinen aller EII-Familien vorkommt, ist verantwortlich für die Kohlenhydrat-Bindung und liegt vermutlich in einem beweglichen Loop zwischen zwei Helices (Kotrba et al., 2001; Robillard und Broos, 1999).

Während der Aufnahme von Glukose durchläuft das EIICB^{Glc} verschiedene Konformationen, die in der Translokation der Glukose resultieren. Dabei haben vermutlich sowohl die Bindung der Glukose als auch die Phosphorylierung von EIIB^{Glc} einen Einfluss auf die Konformation (Lolkema et al., 1992). Zunächst wird das Substrat in einer zum Periplasma geöffneten Konformation hochaffin gebunden, woraufhin das EIICB^{Glc} in eine geschlossene Konformation überführt wird („locked-in“), in der die Glukose ganz vom Protein umschlossen ist. Durch die Phosphorylierung des Substrates wird die Affinität der Bindung herabgesetzt, die Konformation des EIICB^{Glc} ändert sich in eine zum Cytoplasma offenen Konformation und entlässt das Substrat (Lolkema et al., 1992). Möglicherweise ist auch der Linker an der Vermittlung der Konformationsänderung beteiligt (Erni, 2002). Es wurden bisher viele essentielle Aminosäuren im EIICB^{Glc} identifiziert. Neben dem phosphatbindenden Cysteinrest C421 in der EIIB^{Glc}-Domäne und der Kohlenhydrat-Bindestelle in der EIIC^{Glc}-Domäne (GITE) sind viele Aminosäuren bekannt, die einen starken Einfluss auf den Glukosetransport des EIICB^{Glc} haben. Eine Übersicht aller bisher identifizierten wichtigen Aminosäuren ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

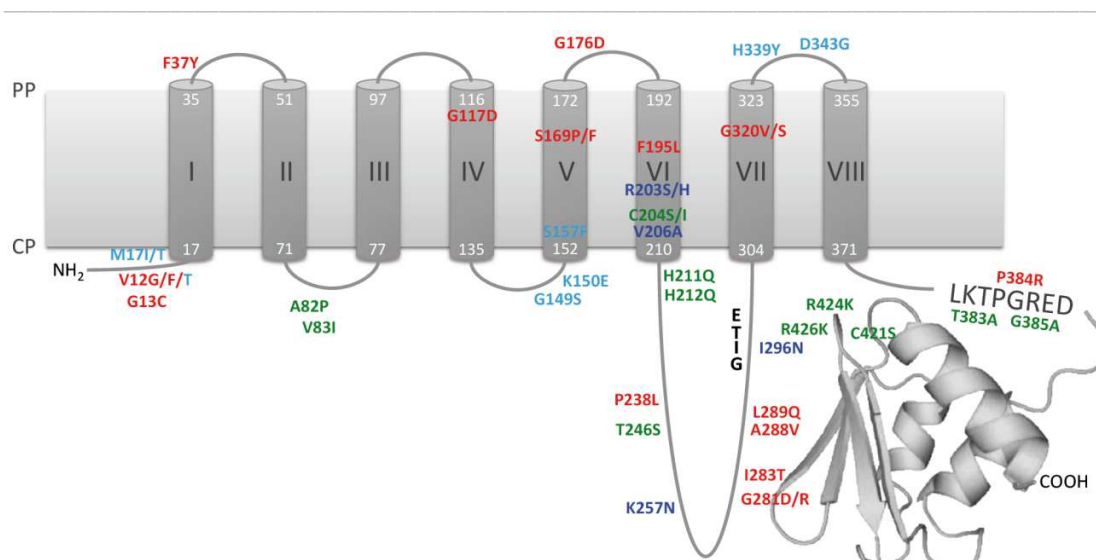


Abbildung 1.2: Strukturmodell EIICB^{Glc} nach Lengeler mit funktionellen Aminosäuren

Gezeigt ist ein Modell der EIICB^{Glc} Struktur nach Lengeler, in dem wichtige Aminosäuren gekennzeichnet sind, die die Transport- und Phosphorylierungseigenschaften des Proteins beeinflussen. Weiß: Aminosäuresequenz des Proteins, schwarz: Nummerierung der α -helicalen Bereiche, rot: „relaxed“-Mutationen, hellblau: „locked-in“-Mutationen, dunkelblau: Entkoppelnde Mutationen, grün: Mutationen mit eingeschränkter Transportaktivität [Entnommen aus (Gabor et al., 2011), Struktur der B-Domäne entnommen aus (Nam et al., 2008)].

Im Wesentlichen sind drei große Gruppen von Aminosäuresubstitutionen bekannt, welche die Transport- und Phosphorylierungseigenschaften des Glukose-Transporters beeinflussen. Die meisten Substitutionen lösen so genannte „relaxed“ Konformationen aus, die die Substratspezifität erweitern. Das bedeutet, dass die Proteine auch in der Lage sind, heterologe Kohlenhydrate zu transportieren und wahrscheinlich auch zu phosphorylieren, z.B. Mannose und Glukosamin (Notley-McRobb und Ferenci, 2000; Zeppenfeld et al., 2000), Fruktose (Kornberg et al., 2000), Ribose und Xylose (Oh et al., 1999), Mannitol (Begley et al., 1996), Ribitol und Arabinitol [Review in (Erni, 2002)]. Beispiele für Aminosäuremutationen, die eine „relaxed“-Konformation auslösen, sind V12F oder P384R. Dabei sind die konkreten Konformationsänderungen in den „relaxed“-Mutanten noch unbekannt. Für die Mutante V12F konnte aber gezeigt werden, dass das Protein im Vergleich zum Wildtyp anders in die Membran eingebaut wird und dadurch eine veränderte Konformation einnimmt. Dies bewirkt nicht nur ein erweitertes Substratspektrum sondern auch eine stärkere Bindung des Repressors Mlc und damit eine erhöhte Transportaktivität (Aboulwafa et al., 2003).

Eine zweite wichtige Gruppe von Mutanten sind die so genannten „entkoppelten“-Mutanten. Die Aminosäuresubstitutionen R203H (Gabor et al., 2011), R203S, V206A, K257N oder I296N (Ruijter et al., 1992) führen zu einer Entkopplung, d.h. zu einer Trennung von Transport und Phosphorylierung der Glukose. Obwohl für PTS-Transporter im Allgemeinen eine Kopplung von Transport und Phosphorylierung stattfindet, handelt es sich um zwei nacheinander ablaufende Prozesse (Lengeler und Jahreis, 1996; Postma et al., 1993). Bei den „entkoppelten“ Mutanten sind die beiden Reaktionen demnach funktionell getrennt, der Transporter katalysiert in einem Energie-unabhängigen Prozess die erleichterte Diffusion des Substrates über die Membran, ohne es zu phosphorylieren. Im Wildtyp stellen Transport und Phosphorylierung bei der Aufnahme hochaffiner Substrate allerdings scheinbar gekoppelte Prozesse dar, da hochaffine Substrate unphosphoryliert nicht in für das Wachstum ausreichender Menge in die Zelle aufgenommen werden (Postma und Stock, 1980). Niedrigaffine Substrate mit einem hohen K_M -Wert können dagegen phosphorylierungsunabhängig transportiert werden (Gabor et al., 2011; Otte et al., 2003). Auch bei „entkoppelten“ Mutanten lässt sich teilweise ein drastisch erhöhter K_M -Wert nachweisen. Sie zeigen also ebenfalls eine verringerte Affinität für das Substrat (Lengeler et al., 1994; Ruijter et al., 1992). Für „entkoppelte“ Mutanten wird ebenfalls eine Konformationsänderung des Transportproteins vermutet (Ruijter et al., 1992).

Die dritte Gruppe bilden die Mutanten mit „locked-in“ Konformationen. Sie zeigen eine verminderte Substrattranslokation, aber eine unveränderte Phosphorylierungsaktivität, was erneut zeigt, dass beide Funktionen voneinander getrennt werden können. Beispiele für entsprechende Aminosäuresubstitutionen sind M17I/T, G149S und K150E (Buhr et al., 1992). Für die beiden Aminosäuren K150 und G149 wurde postuliert, dass sie eine wichtige Rolle bei der Konformationsänderung des Proteins während der Glukoseaufnahme spielen, sodass Mutationen dieser Aminosäuren vermutlich eine Umlagerung des Proteins vom geschlossenen („locked-in“) in den zum Cytoplasma offenen Zustand verhindern (Buhr et al., 1992).

Die Mutationen der drei Gruppen finden sich nicht über das ganze Protein verteilt, sondern konzentrieren sich auf bestimmte Bereiche innerhalb der EIIC^{Glc}-Domäne und des Linkers. Bei der membranintegralen EIIC^{Glc}-Domäne sind besonders die transmembranen Helices TM_V bis TM_{VII} und der cytoplasmatische Loop zwischen TM_{VI} und TM_{VII} betroffen. Dies impliziert, dass im EIIC^{Glc}

wahrscheinlich zwei Klassen von Helices existieren. TM_I und TM_V bis TM_{VII} scheinen Funktionen in Substratbindung und Translokation zu übernehmen, wohingegen TM_{II} bis TM_{IV} sowie TM_{VIII} eher strukturelle Aufgaben haben (Gabor et al., 2011).

In der Membran liegt das EIICB^{Glc} als Homodimer vor [Review in (Erni, 2002)]. Dabei wurde gezeigt, dass sowohl die C-Domäne (Erni, 1986) als auch die B-Domäne (Gabor et al., 2011) die Bildung der dimeren Struktur bewirken können.

1.3.2 Die Regulation des Glukose-PTS

Die Regulation des Glukose-PTS und im Besonderen die Regulation des *ptsG*-Gens in *E.coli* ist sehr komplex und vielfältig und ist von der Glukosemenge im umgebenden Medium abhängig [Review in (Deutscher et al., 2006; Jahreis et al., 2008)]. Die Aufnahme von zu viel Glukose in die Zelle, z.B. durch Überproduktion von EIICB^{Glc}, führt zu einem so genannten „Overflow“-Metabolismus in *E.coli* und ist nachteilig für die Zelle (Hosono et al., 1995). Wenn die Zellen aerob mit hohen Wachstumsraten wachsen, bilden und akkumulieren sie große Mengen an Nebenprodukten (z.B. Acetat), vermutlich bedingt durch eine Enzymlimitierung im Krebs-Zyklus (Majewski und Domach, 1990). Dies hat einen negativen Einfluss auf die Biomassenbildung und Proteinproduktion und ist daher besonders in der industriellen Biotechnologie ein großer Nachteil (De Mey et al., 2007; Valgepea et al., 2010). In den letzten 20 Jahren wurden viele Möglichkeiten erforscht, die Acetatakkumulation von *E.coli* bei aerobem Wachstum auf Glukose zu minimieren [Review in (De Mey et al., 2007)]. Hier steht auch besonders die Regulation des Glukose-PTS im Fokus der Forschung (z.B. FORSYS-Partner Projekt zum Thema: „Dynamics and regulation of the metabolic balance in *Escherichia coli*“ (<http://www.forsys.hki-jena.de/>)).

Die Abbildung 1.3 zeigt einen Überblick über die wichtigsten bisher identifizierten Regulationsmechanismen des *ptsG*-Gens unter glukosearmen und glukosereichen Bedingungen.

Die Hauptregulation des *ptsG*-Gens findet durch den globalen Repressor Mlc (engl. „Making large colonies“, Gen *dgsA*) statt. Mlc gehört zu der Familie der ROK (engl. „Repressor, open reading frame, kinases“)-Repressoren und wird bei 35,6 min auf dem *E.coli*-Chromosom kodiert. Neben dem regulatorischen Einfluss auf das *ptsG*-Gen hat der Repressor weitere Zielgene und Operone, wie *manXYZ* (Mannose-PTS), *ptsHlcr* oder *araC* (Aktivator des Arabinose-Regulons), die von ihm negativ reguliert werden (Plumbridge, 2001). Die Mlc Regulation wird in Abwesenheit von Glukose im Medium induziert. Im Gegensatz zu anderen Repressoren ist die Mlc-Induktion nicht durch Bindung an Glukose oder einen anderen molekularen Induktor reguliert. Stattdessen kann das unphosphorylierte, membrangebundene EIICB^{Glc} Mlc binden. Das bedeutet, dass in der Abwesenheit von Glukose im Medium Mlc an der Promotor-Operator-Region des *ptsG* binden und seine Expression reprimieren kann, während bei Anwesenheit von Glukose das unphosphorylierte EIICB^{Glc} den Repressor durch Titration räumlich vom Operator trennt und eine erhöhte *ptsG* Expression ermöglicht (Tanaka, Y. et al., 2000; Zeppenfeld et al., 2000). Für die Regulation von *ptsG* durch Mlc wurden zwei Bindestellen im Promotor-Operator-Bereich des *ptsG*-Gens für Mlc identifiziert (Tanaka, Y. et al., 2000). Als weiteren regulierenden Faktor von Mlc konnte das offene Leseraster *mtfA* (früher *yeeI*) identifiziert werden (Becker et al., 2006). Es liegt bei 44,01 min auf dem *E.coli*-Chromosom und ist 798 bp lang. Das Gen *mtfA* kodiert für ein Protein MtfA („Mlc titration factor A“), das aus 265 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 30,13 kDa

aufweist. Dieses cytoplasmatische Protein bindet und inaktiviert Mlc und hat somit ebenfalls einen wichtigen Einfluss auf die Regulation von *ptsG* (Becker et al., 2006; Göhler, 2011).

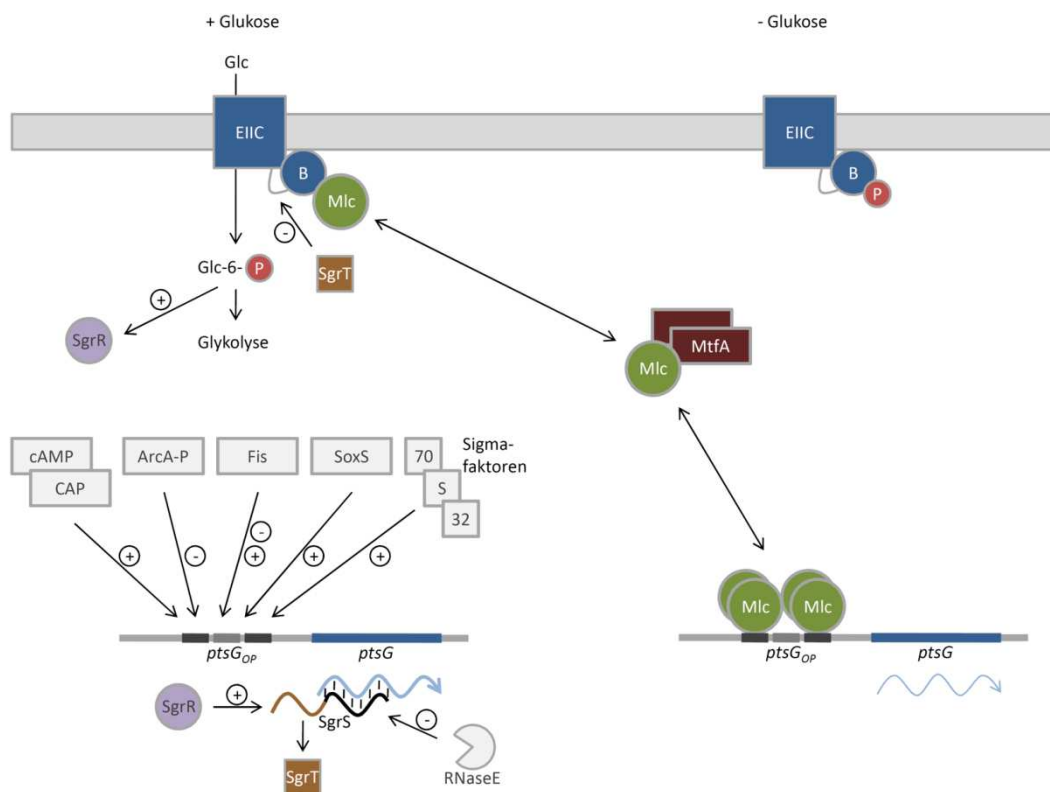


Abbildung 1.3: Die glukoseabhängige Regulation von *ptsG*

Die Abbildung zeigt die glukoseabhängige Regulation des *ptsG*-Gens, welches für den Glukose-Transporter EIIC^{Glc} kodiert. Unter glukosereichen Bedingungen findet eine Feinregulation der *ptsG* Expression durch cAMP-CAP, ArcA, Fis, SoxS und verschiedene Sigmafaktoren statt. Unter diesen Bedingungen ist Mlc an die unphosphorylierte B-Domäne gebunden. Bei Glukose-6-Phosphatstress findet eine zusätzliche Regulation durch das SgrRST-System statt. Unter Glukosemangel reprimiert Mlc die Expression von *ptsG* durch Blockieren des Promotor-Operator-Bereiches. Nähere Erläuterungen im Text [Nach (Gabor et al., 2011)].

Neben dem globalen Repressor Mlc wurden weitere globale Transkriptionsfaktoren identifiziert, welche die *ptsG*-Expression direkt beeinflussen. Dazu gehört der cAMP-CAP Komplex, der die *ptsG*-Transkription unter Kohlenhydratmangel induziert (Jahreis, 2010), ArcA, ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der den Wechsel zwischen aerobem und anaerobem Wachstum in *E.coli* kontrolliert (Jeong et al., 2004), SoxS, das für die *ptsG*-Expression unter oxidativem Stress verantwortlich ist (Rungrassamee et al., 2008), zwei alternative Sigmafaktoren für die Hitzeschockantwort σ^{32} (Shin et al., 2001) und σ^S für die Genexpression in der stationären Wachstumsphase (Seeto et al., 2004), sowie das kleine DNA-bindende Protein Fis (Shin et al., 2003). Neben dieser Regulation von *ptsG* auf transkriptioneller Ebene wurde auch ein posttranskriptionelles Regulationssystem identifiziert, welches sowohl die *ptsG*-mRNA-Stabilität als auch die Transportaktivität von EIIC^{Glc} reguliert, das so genannte SgrRST-System (Morita et al., 2003). Da sich ein großer Teil dieser Arbeit auf das kleine Protein SgrT konzentriert, soll dieses Regulationssystem im nächsten Abschnitt ausführlich dargestellt werden.

1.4 Das SgrRST-System

Die Regulation der Aktivität des Glukose-PTS findet neben der oben beschriebenen transkriptionellen Regulation von *ptsG* durch Mlc und weitere Transkriptionsfaktoren auch auf posttranskriptioneller und Proteinebene durch das SgrRST-System statt. Der erste Hinweis auf dieses neue und ungewöhnliche Regulationssystem stammte von der Beobachtung, dass während Kohlenhydratstress die *ptsG*-mRNA spezifisch abgebaut wird. 2001 konnten Kimata et al. bereits zeigen, dass Mutationen in den Genen *pgi* (Phosphoglukoseisomerase) oder *pfkA* (Phosphofruktokinase), d.h. eine Blockade in den ersten Schritten der Glykolyse, zu einer 10-fach verminderten Stabilität der *ptsG*-mRNA durch RNaseE bedingten Abbau führt (Kimata et al., 2001; Morita et al., 2003). Anschließend konnte von der Gruppe Gottesman et al. gezeigt werden, dass die Akkumulation von Glukose-6-Phosphat oder Fruktose-6-Phosphat die Aktivität eines Transkriptionsaktivators namens SgrR aktiviert, welcher wiederum zur Synthese der kleinen regulatorischen RNA (sRNA) *sgrS* führt, die für den spezifischen Abbau der *ptsG*-mRNA verantwortlich ist (Vanderpool und Gottesman, 2004).

Metabolischer Stress entsteht für die Zellen u.a. durch die Anhäufung von intrazellulären Zuckerphosphaten. Dies kann z.B. durch Mutationen in den frühen Enzymen der Glykolyse oder durch eine anders bedingte, intrazelluläre Anhäufung von Glukose-6-Phosphat bei Wachstum auf Glukose ausgelöst werden. Ähnliche Bedingungen entstehen, wenn Wildtypzellen dem nicht verstoffwechselbaren Glukoseanalogon α -Methyl-Glukose ausgesetzt werden (Morita und Aiba, 2007). Sowohl Glukose als auch α -Methyl-Glukose werden durch den PTS-Glukosetransporter EIICB^{Glc} in die Zellen aufgenommen und phosphoryliert (Vanderpool und Gottesman, 2007). In jedem Fall wird das Zellwachstum stark inhibiert. Durch den spezifischen Abbau der *ptsG*-mRNA verhindern die Bakterien eine weitere Anhäufung des für die Zellen in hohen Konzentrationen toxischen Glukose-6-Phosphates (Morita und Aiba, 2007). Als verantwortlich für die Degeneration der *ptsG*-mRNA konnte die Hfq-abhängige kleine regulatorische RNA *sgrS* identifiziert werden (Vanderpool und Gottesman, 2004).

Kleine regulatorische RNAs, auch sRNAs oder nicht-kodierende-RNAs genannt, sind universell, d.h. sie konnten in Genomen von Organismen aus den drei Domänen des Lebens identifiziert werden. Sie sind an der Kontrolle diverser zellulärer Prozesse beteiligt (Horler und Vanderpool, 2009). In Eukaryoten sind hauptsächlich so genannte MikroRNAs oder „Short interfering RNAs“ präsent, in Bakterien bilden dagegen die Hfq-abhängigen sRNAs den Hauptanteil (Majdalani et al., 2005; Morita und Aiba, 2007). In *E.coli* sind mehr als 80 sRNAs bekannt, z.T. mit unbekannter Funktion, die in den meisten Fällen unter spezifischen Stressbedingungen verstärkt exprimiert werden. Die durchschnittliche Länge der sRNAs von *E.coli* liegt zwischen 50 und 400 Nukleotiden [Review in (Gottesman, 2005)]. Sie regulieren, häufig negativ, die Translation bzw. die Stabilität der Ziel-mRNAs durch vom Chaperon Hfq-abhängige Basenpaarung mit der mRNA im Bereich der Ribosomenbindestelle (Gottesman, 2005; Morita und Aiba, 2007). Mathematische Modelle und Simulationen konnten zeigen, dass die Verwendung nicht-kodierender RNAs als Regulatoren für die Zelle eine sehr energiesparende und schnelle Möglichkeit der Regulation von ganzen Stoffwechselwegen ist. Das bedeutet für Stimuli, die eine schnelle Antwort benötigen, ist die Regulation durch sRNAs am effektivsten, z.B. bei sich schnell ändernden Stressbedingungen. Der Vorteil der sRNAs liegt in der Tatsache, dass sie schnell an die mRNA binden können, da keine vorherige Translation erforderlich ist. Ein Nachteil der durch sRNAs gesteuerten Regulation ist die

Tatsache, dass vorher gebildete Ziel-Proteine durch die sRNA nicht beeinflusst werden können. Für diesen Fall erweisen sich Protein-Protein-Wechselwirkungen als effektiver und schneller (Shimoni et al., 2007).

Die sRNA *sgrS* (Der Name leitet sich ab von engl. „sugar stress sRNA“ oder „sugar transport-related sRNA“, Gen *sgrS*) wurde erstmalig in einem „Screen“ beschrieben, bei dem Hfq-bindende sRNAs durch Microarray-Analysen und Northernblots identifiziert wurden (Zhang et al., 2003). *sgrS*, früher *ryaA*, weist eine Länge von 227 Nukleotiden auf und liegt in der *sgrR* (früher *yabN*)-*setA* intergenen Region bei 1,65 min auf dem *E.coli*-Chromosom (s. Abbildung 1.4) (Zhang et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass *sgrS* verstärkt unter Glukose-6-Phosphatstress-Bedingungen synthetisiert wird (Morita und Aiba, 2007). Außerdem konnten Vanderpool und Gottesman 2004 zeigen, dass *sgrS* für den Abbau der *ptsG*-mRNA verantwortlich ist, und dass SgrR als Transkriptionsaktivator für *sgrS* fungiert (Vanderpool und Gottesman, 2004).

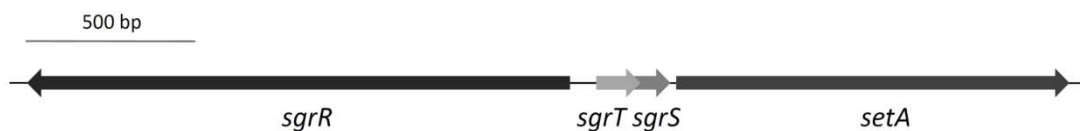


Abbildung 1.4: Genregion von SgrR, *sgrS*, SgrT und SetA im *E.coli* K-12 Genom

Dargestellt ist die Genregion bei 1,65 min auf dem *E.coli*-Chromosom, mit den Genen für SgrR, *sgrS*, SgrT und SetA [Nach (Vanderpool und Gottesman, 2004)].

SgrR (Gen *sgrR*, früher *yabN*) ist ein 551 Aminosäuren langes Protein mit einer molekularen Masse von 64 kDa. Es wird in der gleichen Region wie *sgrS* bei 1,65 min kodiert, allerdings in Gegenrichtung (Vanderpool und Gottesman, 2004). Die Interpro Datenbank (Mulder et al., 2003) zeigt zwei konservierte Motive in SgrR, die auf eine C-terminale Bindedomäne für einen molekularen Induktor und eine N-terminale DNA-Bindedomäne mit einem Helix-turn-Helix Motiv hindeuten, was seine Eigenschaften als Transkriptionsaktivator bestätigt (Vanderpool und Gottesman, 2004). Die Sequenz, an der SgrR während der Aktivierung von *sgrS* bindet, liegt in der konservierten Region zwischen -70 und -55 relativ zum Start von *sgrS* (Vanderpool und Gottesman, 2004). Dadurch reguliert SgrR allerdings nicht nur die *sgrS* Aktivität, sondern wirkt auch autoregulatorisch. Diese Autoregulation ist stressunabhängig, sodass vermutet wird, dass SgrR immer an den Bereich der DNA bindet und durch einen molekularen Induktor so verändert wird, dass erst bei Bindung des Induktors *sgrS* exprimiert wird. Der Induktor, der zur Aktivierung von SgrR führt, ist bisher unbekannt. Glukose-6-Phosphat als möglicher Induktor wurde zwar untersucht, konnte aber nicht bestätigt werden. Neben *sgrS* hat SgrR noch weitere Ziel-Gene, z.B. *alaC* (Glutamat-Pyruvat-Aminotransferase) (Vanderpool und Gottesman, 2007).

Das 3'-Ende der *sgrS* Sequenz ist komplementär zur 5'-nicht-translatierten-Region (engl. „Untranslated region“, UTR) der *ptsG*-mRNA und kann Hfq abhängige RNA-RNA-Hybride formen (Vanderpool und Gottesman, 2004). Hfq ist dafür bekannt, Basenpaarungen zwischen kleinen sRNAs und den spezifischen mRNAs zu stimulieren (Gottesman, 2004). Durch die Basenpaarung zwischen dem 3'-Ende von *sgrS* und Sequenzen in der 5'-UTR der *ptsG*-mRNA entsteht ein Komplex, der auf der einen Seite die Shine-Dalgarno-Sequenz der *ptsG*-mRNA blockiert und damit die weitere Translation unterbindet und zum anderen als Signal für den Abbau durch RNaseE fungiert (Kawamoto, 2005).

Die Endoribonuklease RNaseE ist ein Bestandteil des so genannten Degradosomen, welches zusätzlich aus der phosphatabhängigen Exoribonuklease Polynucleotid-Phosphorylase (PNPase), der DEAD-Box RNA Helicase B (RhlB) und dem glykolytischen Enzym Enolase besteht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die RNaseE als auch die Enolase essentiell für die posttranskriptionelle Regulation der *ptsG*-mRNA sind (Morita et al., 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die *ptsG*-mRNA bei der Translation an der inneren Membran lokalisiert vorliegt, gekoppelt an die Membraninsertion des neu gebildeten EIICB^{Glc} (Kawamoto, 2005; Nevo-Dinur et al., 2011; Vanderpool und Gottesman, 2005).

Die bisher beschriebenen Erkenntnisse sprechen für das folgende Modell. Durch Glukose-6-Phosphatstress im Zellinneren wird der Transkriptionsaktivator SgrR auf bisher unbekannte Weise aktiviert und induziert die Transkription der sRNA *sgrS*. Diese bindet die mRNA von *ptsG* und verhindert eine weitere Translation durch Blockieren der Ribosomenbindestelle und den spezifischen Abbau. Diese Komplexbildung wird durch Hfq stimuliert. Hfq stabilisiert gleichzeitig die sRNA und rekrutiert die RNaseE zum Komplex, welche dann den Komplex abbaut (Maki et al., 2008). Durch diesen Mechanismus werden die Zellen effektiv vor weiterer Anhäufung von Glukose-6-Phosphat in der Zelle geschützt (s. Abbildung 1.5).

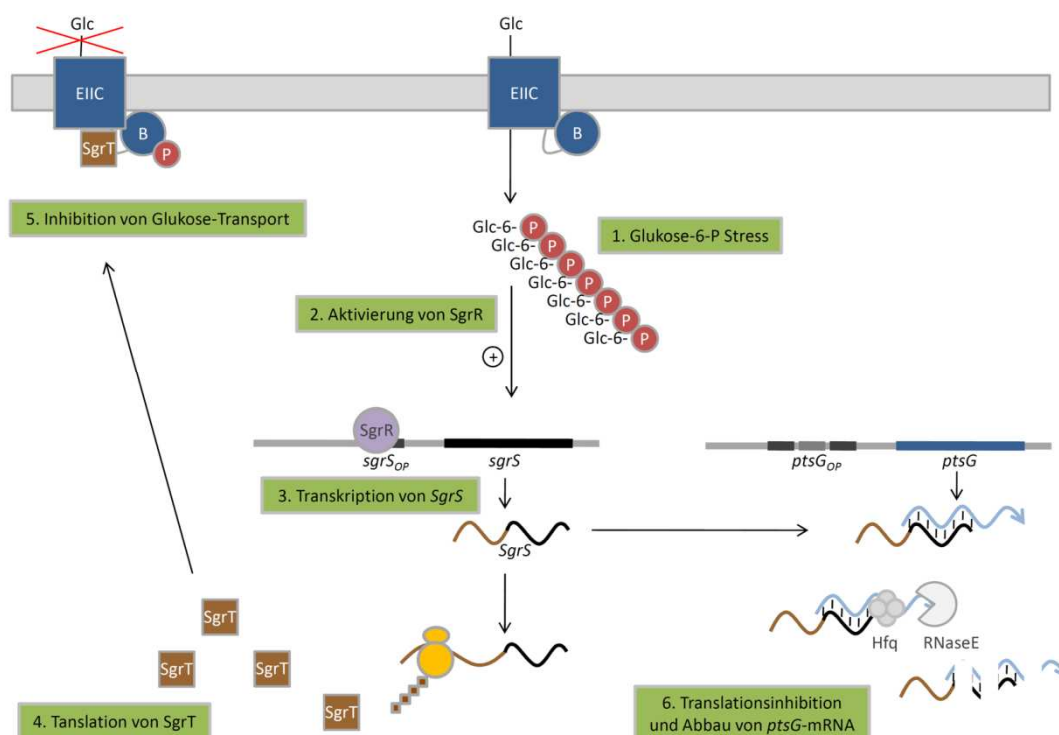


Abbildung 1.5: Modell zur Funktion des SgrRST-Systems unter Glukose-6-Phosphatstress

Bei Akkumulation von Glukose-6-Phosphat (1) in der Zelle wird SgrR durch einen unbekanntem Induktor induziert (2) und bewirkt die Transkription der sRNA *sgrS* (3). *sgrS* kodiert einerseits für das kleine regulatorische Protein SgrT, welches unter diesen Bedingungen translatiert wird (4) und den Glukose-Transport vermutlich über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen inhibiert (5). Andererseits führt die Bildung von Hfq-abhängigen RNA-RNA-Hybriden aus *sgrS* und der *ptsG*-mRNA zur Translationsinhibition von *ptsG* und einem Abbau des Komplexes durch RNaseE (6) [Nach (Morita und Aiba, 2007)].

WT-Zellen, die Glukose-6-Phosphatstress ausgesetzt sind, werden kurzzeitig im Wachstum gehemmt, wachsen dann aber wieder normal weiter. Zellen, denen die *sgrRS*-Genregion fehlt, werden dagegen stark gehemmt und wachsen nicht mehr (Vanderpool und Gottesman, 2004). *sgrS* hat nicht nur die *ptsG*-mRNA als Ziel, sondern sorgt auch für den spezifischen Abbau der *manXYZ*-mRNA, die für den Mannose-Transporter des Mannose PTS kodiert und auch Glukose in die Zelle aufnehmen kann (Rice und Vanderpool, 2011).

Die meisten bekannten sRNAs sind nur etwa 100 Nukleotide lang, wirken über Basenpaarung mit der Ziel-mRNA und kodieren nicht für Proteine. Eine Ausnahme bildet die 500 Nukleotide lange, von Hfq unabhängige RNAIII in *Staphylococcus aureus*. RNAIII ist ein Hauptregulator der Virulenz von *S.aureus*, die nicht nur als funktionelle RNA die Produktion extrazellulärer Toxine moduliert, sondern auch für das Protein δ -Hämolysin kodiert, welches seinerseits die Expression von verschiedenen Exotoxinen kontrolliert (Novick et al., 1993; Ulveling et al., 2011). In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* sind zwei Beispiele eukaryotischer RNAs bekannt, die eine bifunktionelle Funktion zeigen. Oskar (*D.melanogaster*) und VegT (*X.laevis*) gehören zur Klasse der ortsgebundenen mRNAs, die eine hohe Expression des kodierten Proteins an der benötigten Stelle im Organismus sichern und gleichzeitig eine Expression in anderen Regionen verhindern, in denen das Protein einen schädlichen Effekt auslösen könnte. Zudem zeigen beide mRNAs wichtige Protein-unabhängige Funktionen als strukturelle RNAs, sodass für einen normalen Zellphänotypen vermutlich beide Funktionen benötigt werden [Review in (Ulveling et al., 2011)]. Im Jahr 2007 konnte von der Arbeitsgruppe Vanderpool et al. auch *sgrS* als proteinkodierende sRNA (mRNA) identifiziert werden, womit *sgrS* die erste und bislang einzige identifizierte Hfq-abhängige sRNA ist, die ein regulatorisches Protein kodiert (Wadler und Vanderpool, 2007). Das Protein SgrT wird am 5'-Ende von *sgrS* kodiert und ist nur 43 Aminosäuren lang. Die Region von *sgrS*, die Basenpaarungen mit der *ptsG*-mRNA eingeht, befindet sich außerhalb der proteinkodierenden Region von SgrT am 3'-Ende (s. Abbildung 1.6).

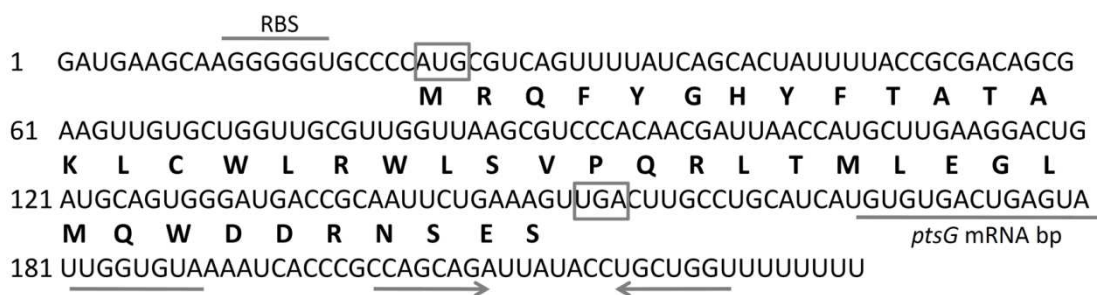


Abbildung 1.6: Nukleotidsequenz von *sgrS* und Proteinsequenz von SgrT

Dargestellt sind die Nukleotidsequenz der kleinen sRNA *sgrS* und das offene Leseraster von SgrT, welches von *sgrS* kodiert wird. Die Proteinsequenz von SgrT ist in fettgedruckten Buchstaben angegeben. Start- und Stoppkodon von SgrT sind durch Rechtecke markiert. Die putative Ribosomenbindestelle von SgrT ist durch RBS gekennzeichnet. Die Region von *sgrS*, die Basenpaare mit der *ptsG*-mRNA eingeht, ist markiert. Die Pfeile geben die ausgebildete Terminationsschleife von *sgrS* wieder [Nach (Wadler und Vanderpool, 2007)].

Sowohl *sgrS* als auch SgrT sind in der Lage, die Bakterienzellen vor Glukose-6-Phosphatstress zu schützen. Vanderpool et al. konnten zudem zeigen, dass die alleinige Expression eines der beiden Regulatoren ausreicht, um das Wachstum der Zellen in Gegenwart von α -Methyl-Glukose sicher zu stellen. Die Funktionen von *sgrS* und SgrT sind physiologisch redundant (Wadler und

Vanderpool, 2007). Es ist aber nicht bekannt, ob und wie sich mRNA und sRNA Funktionen von *sgrS* gegenseitig beeinflussen (Wadler und Vanderpool, 2009). Eine Deletion der *sgrRST*-Region führt zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber α -Methyl-Glukose. Die Überproduktion von SgrT alleine kann dagegen eine dramatische Reduktion des Zellwachstums in Minimalmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle auslösen, was auf einen negativen Effekt von SgrT auf das Glukose-PTS hindeutet (Wadler und Vanderpool, 2007).

SgrT wird unter Glukose-6-Phosphatstress in geringen Mengen exprimiert. Es beeinflusst die Menge an *ptsG*-mRNA im Gegensatz zu *sgrS* nicht, d.h. es sorgt nicht für den RNaseE-abhängigen Abbau von *ptsG*-mRNA und auch nicht für die Degeneration des Proteins EIICB^{Glc}. Stattdessen scheint es die Transport- oder Phosphorylierungsaktivität von EIICB^{Glc} durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zu beeinflussen (s. Abbildung 1.5). Einen ersten Hinweis darauf konnte ein Versuch geben, bei dem gezeigt wurde, dass SgrT indirekten Einfluss auf den Induktorausschluss hat. Hemmt SgrT nämlich EIICB^{Glc}, wird phosphoryliertes EIICB^{Glc} in der Zelle angehäuft und verhindert so einen Induktorausschluss (Morita und Aiba, 2007; Wadler und Vanderpool, 2007).

Eine Überproduktion von SgrT hemmt nicht nur das Wachstum der Zellen in Minimalmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle, sondern es tritt auch eine leichte Reprimierung des Wachstums in Minimalmedium mit Mannose und N-Acetyl-Glukosamin auf. Dagegen findet keine Hemmung des Wachstums in Minimalmedium mit Mannitol, Fruktose oder CAA statt. Dies entspricht den Ergebnissen, dass *sgrS* auch *manXYZ* reprimiert, den Haupttransporter für Mannose und N-Acetyl-Glukosamin (Wadler und Vanderpool, 2007).

Untersuchungen zum Vorkommen von *sgrS* und SgrT in anderen Organismen haben gezeigt, dass *sgrS*-Homologe in vielen Enterobakterien vorhanden sind (Wadler und Vanderpool, 2009). Die meisten *sgrS*-Homologe haben eine Größe von 200 bis 300 Nukleotiden, was deutlich länger ist, als die typische Hfq-abhängige sRNA und an der zusätzlichen Präsenz des *sgrT*-Gens liegt. Dabei zeigt sich, dass die Region von *sgrS* für die Basenpaarung mit der *ptsG*-mRNA in fast allen Organismen sehr stark konserviert ist. Die Sequenz von *sgrT* ist dagegen zwar häufig vorhanden, jedoch weniger konserviert. Einige Ausnahmen, wie z.B. *Yersinia pestis* zeigen zwar *sgrS* Orthologe, aber keine für SgrT kodierende Region. Bei anderen Organismen (*E. coli* O157:H7) ist das Startkodon von SgrT mutiert, sodass kein funktionelles Protein gebildet werden kann (Wadler und Vanderpool, 2007). Daraus lässt sich schließen, dass die mRNA-bindende und abbauende Funktion von *sgrS* wichtiger ist, als eine Blockade der Transportaktivität des PTS-Transporters durch SgrT. Des Weiteren zeigt sich, dass die *sgrRST*-Region nicht so verbreitet ist wie *ptsG*. Zudem ist die 5'-UTR von *ptsG* nur in den Organismen konserviert, in denen auch *sgrS* Homologe zu finden sind. Dies zeigt, dass Glukose-6-Phosphatstress entweder kein Problem aller Organismen ist, oder dass es noch einen anderen Mechanismus gibt, der dieses Problem lösen kann (Horler und Vanderpool, 2009).

Die SgrT-homologen Proteine haben eine Länge zwischen 40 und 57 Aminosäuren (s. Abbildung 1.7). Obwohl die Sequenz nicht sehr konserviert ist, existieren einige konservierte Leucin-Reste sowie ein sich wiederholendes Motiv aus einem polaren Rest gefolgt von einem aromatischen Rest, denen eine besondere Funktion in der Wechselwirkung mit dem Zielprotein zugesprochen wird (Horler und Vanderpool, 2009).

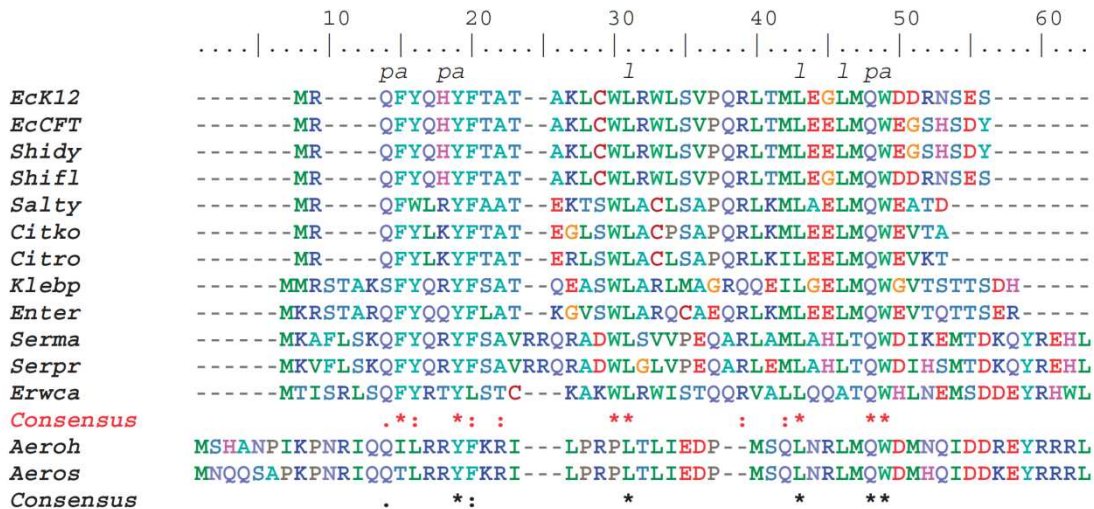


Abbildung 1.7: Alignment von homologen SgrT-Proteinen aus verschiedenen Enterobakterien

Mit: EcK12 = *Escherichia coli* K-12, EcCFT = *Escherichia coli* CFT073, Shidy = *Shigella dysenteriae*, Shifl = *Shigella flexneri*, Salty = *Salmonella typhimurium*, Citko = *Citrobacter koseri*, Citro = *Citrobacter rodentium*, Klebp = *Klebsiella pneumoniae*, Enter = *Enterobacter* sp. 638, Serma = *Serratia marcescens*, Serpr = *Serratia proteamaculans*, Erwca = *Erwinia carotovora*, Aeroh = *Aeromonas hydrophila*, Aeros = *Aeromonas salmonicida*. Gezeigt ist ein ClustalW-Alignment der 14 identifizierten SgrT-homologen Proteine. Die konservierten Leucinreste (l) sowie die sich wiederholende Abfolge aus polaren (p) und aromatischen (a) Aminosäuren ist oberhalb des Alignments markiert. Die rot gekennzeichnete Konsensussequenz markiert konservierte Aminosäuren von SgrT, wenn *Aeromonas* sp. nicht berücksichtigt werden, die schwarz markierte Konsensussequenz beinhaltet die *Aeromonas* sp. Sequenzen [Entnommen aus (Horler und Vanderpool, 2009)].

Eines der homologen Proteine von SgrT ist das Protein KPN 00069 (hier: SgrTkpn) aus *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*), mit dem in dieser Arbeit vergleichende Versuche durchgeführt wurden. *K.pneumoniae* ist ein gramnegatives, fakultativ anaerob lebendes Stäbchenbakterium, das wie *E.coli* zu den Enterobakterien zählt und ebenfalls im Magen-Darm-Trakt von Mensch und Tier zu finden ist. Obwohl *K.pneumoniae* Stämme Pathogenität aufweisen können, ist der in dieser Arbeit verwendete Stamm KAY2026 nicht pathogen. Das *K.pneumoniae* sgrS-Homolog ist ca. 400 Nukleotide lang und kodiert für ein 50 Aminosäuren langes SgrT. Damit ist dieses sgrS deutlich länger als alle anderen Homologe, die bei etwa 200 Nukleotiden liegen, wobei aber die Funktion der Verlängerung noch unklar ist (s. Abbildung 1.8) (Horler und Vanderpool, 2009). Die Basenpaarregion von sgrS ist hoch konserviert, während das SgrT eine 38%ige Aminosäure-Übereinstimmung mit dem SgrT von *E.coli* aufweist.

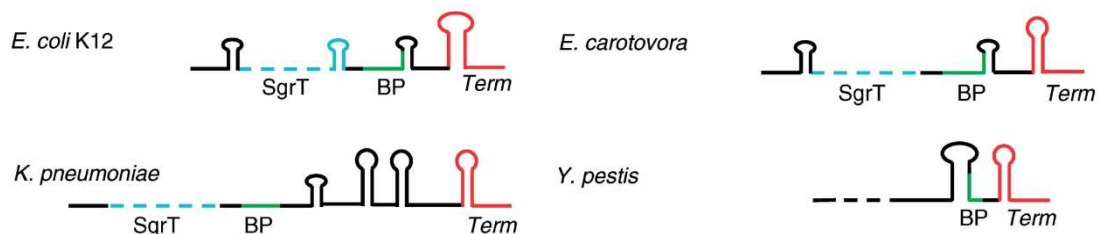


Abbildung 1.8: Sekundärstrukturen von sgrS Homologen

Gezeigt sind die vorhergesagten Sekundärstrukturen von sgrS Homologen aus verschiedenen Organismen. Das sgrT Leseraster ist in hellblau gekennzeichnet, die Basenpaar-bildende Region ist grün markiert, und die Terminationssequenz in rot. Nur die sgrS-Sequenz von *E.coli* und *E.carotovora* zeigen eine Haarnadelstruktur vor dem sgrT-Gen. [Verändert nach (Horler und Vanderpool, 2009)].

Die Expression von SgrT aus dem *E.coli* K-12 Stamm ist unter dem natürlichen Promotor nur sehr gering, auch wenn Glukose-6-Phosphatstress gegeben ist (Wadler und Vanderpool, 2009). In diesem Fall findet keine Repression des Wachstums in Minimalmedium mit Glukose statt, d.h. das SgrT wird entweder nicht oder nur gering exprimiert. Wird dagegen ein SgrT aus einem anderen Organismus unter seinem natürlichen Promotor in *E.coli* exprimiert (z.B. *K.pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* oder *Erwinia carotovora*), so findet eine Repression des Wachstums statt (Wadler und Vanderpool, 2009). Dies zeigt, dass die Funktion von SgrT in den verschiedenen Organismen konserviert ist, SgrT aber scheinbar unterschiedliche Bedeutung in den Organismen hat. In *E.coli* und *Yersinia pestis* (kein *sgrT* Gen vorhanden) scheint die Basenpaar-bildende Funktion von *sgrS* die Hauptaufgabe zu sein, während z.B. in den anderen drei Organismen auch SgrT eine wichtige Aufgabe zu übernehmen scheint (Wadler und Vanderpool, 2009).

Um zu analysieren, warum die Expression von SgrT aus *E.coli* so gering ist, wurden von Wadler et al. Vorhersagen über die Sekundärstruktur der *sgrS*-Homologe gemacht (s. Abbildung 1.8). Es zeigt sich, dass die *E.coli* K-12 *sgrS*-Sequenz eine kleine Haarnadelstruktur direkt vor dem *sgrT*-Gen ausbildet (5'-GGGGTGCCCC-3'). Diese Haarnadelstruktur blockiert die Ribosomen-Bindestelle und könnte so für eine Inhibition der SgrT-Translation verantwortlich sein. Für dieses Modell spricht die Tatsache, dass in fast keiner der anderen homologen *sgrS* sRNAs eine solche Struktur vorhanden ist. Dagegen spricht jedoch, dass die *sgrS*-Sequenz aus *Erwinia carotovora* ebenfalls eine ähnliche Struktur aufweist, jedoch auch eine höhere Expression von SgrT zeigt. Einziger Unterschied zur Haarnadelstruktur des *E.coli* *sgrS* sind zwei A:U Basenpaare, die die Stabilität der Haarnadelstruktur vermindern könnten (Horler und Vanderpool, 2009; Wadler und Vanderpool, 2009). Die Frage bleibt, ob diese Haarnadelstruktur gegebenenfalls reguliert werden kann und so eine spezifische Translation des *E.coli* SgrT unter Stressbedingungen induzieren kann, oder ob *E.coli* (und auch *Yersinia pestis*) die Notwendigkeit von SgrT verloren haben und nur noch die sRNA Funktion von *sgrS* nutzen (Wadler und Vanderpool, 2009).

Obwohl der Mechanismus der sRNA Funktion von *sgrS* in *E.coli* bereits sehr weit aufgeklärt ist, bleiben, besonders was das kleine regulatorische Protein SgrT angeht, noch immer viele Fragen offen. Zunächst konnte gezeigt werden, dass SgrT nur sehr gering exprimiert wird, was die Frage aufwirft, ob eine so geringe Expression überhaupt für eine schnelle Regulation unter Glukose-6-Phosphatstress ausreichend ist. Des Weiteren ist noch nicht klar, wie SgrT den Glukose-Transporter des Glukose PTS EIICB^{Glc} beeinflusst, welche Aminosäuren für die Wechselwirkung essentiell sind und ob andere PTS-Enzyme durch SgrT beeinflusst werden (Morita und Aiba, 2007).

2 Zielsetzung

Escherichia coli ist ein weit verbreiteter Organismus in biotechnologischen Verfahren und in der industriellen Mikrobiologie. Auf Grund seines schnellen Wachstums wird er für die Produktion von heterologen und rekombinanten Proteinen in Fermentationsprozessen häufig eingesetzt. Die Maximierung der Produktivität, d.h. der Produktausbeute bezogen auf die Prozessdauer und die Kosten, ist für derartige Prozesse von großer wirtschaftlicher Relevanz und somit ein Ziel biotechnologischer Forschung. Dabei stellt der so genannte „Overflow“-Metabolismus von *E.coli*, d.h. die Bildung und Akkumulation unerwünschter Nebenprodukte (z.B. Acetat) ein großes Problem dar. Bei aerober Anzucht auf Glukose kann das Wachstum der Zellen und die Produktion rekombinanter Proteine durch eine zu hohe Glukoseaufnahme stark eingeschränkt werden. Aus diesem Grund findet seit über 20 Jahren eine vermehrte Erforschung des „Overflow“-Metabolismus in *E.coli* statt, um die Akkumulation von Nebenprodukten zu vermindern und die Produktivität zu erhöhen (De Mey et al., 2007). Auch das FORSYS-Partner Projekt „Dynamics and regulation of the metabolic balance in *Escherichia coli*“, in dessen Rahmen diese Arbeit durchgeführt wurde, befasste sich mit diesem Thema. Dabei stand unter anderem die Stammoptimierung von *E.coli*-Derivaten für Produktionsverfahren im Vordergrund.

Das Hauptaufnahmesystem für Glukose, das Glukose-Phosphotransferase-System (PTS), spielt eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Balance in *E.coli*. Die Expression des Glukose-Transportproteins EIICB^{Glc} (Gen *ptsG*) und dessen Aktivität unterliegt deshalb einer Vielzahl verschiedener Regulationen. Besonders bei hohen Glukoseaufnahmeleistungen sind diese Mechanismen entscheidend für die Produktivität der Zellen. Durch die Charakterisierung peripherer und artifiziell hervorgerufener Regulationsmechanismen des Glukose-PTS sollte in dieser Arbeit ein Ansatz zur Stammoptimierung von *E.coli*-Derivaten aufgezeigt werden. Dabei wurde einerseits das so genannte SgrRST-System in Bezug auf die Regulation von EIICB^{Glc} näher charakterisiert und andererseits eine artifiziell hervorgerufene Regulation durch eine IPTG-induzierbare EIICB^{Glc}-Expression näher untersucht.

Neben der transkriptionellen Regulation von *ptsG* findet auch eine posttranskriptionelle Regulation des EIICB^{Glc}-Proteins statt. Dabei steht besonders das so genannte SgrRST-System bei der Regulation der Glukoseaufnahme während Glukosestresssituationen im Vordergrund. Ein Teilgebiet dieses relativ unerforschten Systems, die Regulation von EIICB^{Glc} durch das kleine regulatorische Protein SgrT, stellte einen Hauptaspekt in dieser Arbeit dar. Es konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass SgrT unter Glukose-6-Phosphatstress die Aktivität des Proteins EIICB^{Glc} herabsetzt. Dabei wurde eine direkte Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen vermutet, jedoch nicht eindeutig nachgewiesen (Wadler und Vanderpool, 2007). Unklar war daher bisher, wie die Regulation des EIICB^{Glc} durch SgrT erfolgt. Aus diesem Grund war ein Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung des völlig neuartigen Mechanismus der Wechselwirkung zwischen dem kleinen regulatorischen Protein SgrT und dem Membranprotein EIICB^{Glc}. Dabei stand nicht nur der Nachweis einer direkten Protein-Protein-Wechselwirkung beider Proteine im Fokus, sondern es sollten auch essentiell an der Wechselwirkung beteiligte Aminosäuren beider Proteine identifiziert werden. Dafür wurde zunächst ein Ansatz zur Eingrenzung der für die Wechselwirkung wichtigen Domänen auf Seiten des EIICB^{Glc} gewählt, bei dem auch die unterschiedlichen Phänotypen und Konformationen des Membranproteins einbezogen wurden. Des Weiteren sollten die Wachstumsbedingungen ermittelt werden, unter denen eine Interaktion

der Proteine begünstigt wird. Für die Erreichung dieser Ziele wurden verschiedene Verfahren angewandt, u.a. verschiedene „Two-Hybrid“ Ansätze, „Crosslinking“ von Proteinen mit Paraformaldehyd, Wachstumsanalysen oder fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Zudem sollte im Rahmen des FORSYS-Partner Projektes die Auswirkung des SgrRST-Systems auf die Aufrechterhaltung der metabolischen Balance von *E.coli* in Fermentationsversuchen betrachtet werden, um das System gegebenenfalls zur Stammoptimierung einsetzen zu können.

Ein zweites Projekt dieser Arbeit befasste sich mit der Auswirkung der Expression eines chromosomal kodierten EIICB^{Glc}-His auf das Wachstum verschiedener Stämme. Dafür sollte ein mit einem „His-Tag“ versehenes EIICB^{Glc} im Chromosom von *E.coli* stabil etabliert und in einem zweiten Stamm unter die Kontrolle eines mit IPTG induzierbaren *tac_{PO}* gestellt werden. In diesen Stämmen ist die Expression des EIICB^{Glc} nachweisbar und durch gezielte IPTG-Zugabe auf das gewünschte Expressionslevel einstellbar, sodass die Wachstumseigenschaften unter unterschiedlichen Bedingungen analysiert werden können. Diese artifiziell erzeugte Regulation des Glukose-PTS könnte eine zweite Möglichkeit zur Produktivitätssteigerung von *E.coli*-Stämmen darstellen. Außerdem erlaubt sie eine Untersuchung der Auswirkung des Glukose-PTS auf die metabolische Balance in *E.coli*.

3 Material

In diesem Abschnitt sind alle in den Experimenten verwendeten Materialien aufgelistet. Dazu gehören die untersuchten Bakterien- und Hefestämme, die benötigten Plasmide und Oligonukleotide, Antikörper und Medien, die verwendeten Puffer und Stocklösungen in ihrer jeweiligen Zusammensetzung sowie alle sonstigen Materialien und Geräte und die Software zur Auswertung der experimentell ermittelten Daten.

3.1 Bakterienstämme, Phagen und Hefestämme

In den folgenden Unterkapiteln sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme sowie die verwendeten Phagen aufgelistet. Genannt sind die für diese Arbeit relevanten Geno- und Phänotypen. Die Nomenklatur richtet sich nach Berlyn et al. (Berlyn et al., 1996), soweit nicht anders vermerkt.

3.1.1 Bakterienstämme

In der Tabelle 3.1 sind die verwendeten Bakterienstämme mit dem jeweiligen Geno- und Phänotyp aufgelistet, sowie einer Referenz zur Entwicklung der Stämme. Alle konstruierten Stämme wurden in Markertests auf die Richtigkeit des Phänotyps überprüft. Wenn notwendig wurden zudem Kontroll-PCRs und Sequenzierungen der relevanten Genbereiche vorgenommen.

Tabelle 3.1: Verwendete Bakterienstämme

Angegeben sind die verwendeten Bakterienstämme mit Angaben des Geno- und Phänotyps sowie einer Referenz.

Bezeichnung	Geno - / Phänotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
BL21 (λDE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	K. Jahreis, LKS
BW25113	<i>lacI^r rrrB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i>	(Datsenko und Wanner, 2000)
BW25113 ptsGHISkan	BW25113 <i>ΔptsG::ptsGHIS neo⁺ (Kan^R)</i>	Diese Arbeit
BW25113 ΔsgrRST::cat	BW25113 <i>ΔsgrRST::cat⁺ (Cam^R)</i>	(Kosfeld, 2008)
BW25113 ΔsgrRST::kan	BW25113 <i>ΔsgrRST::neo⁺ (Kan^R)</i>	Diese Arbeit
CSH36	<i>Δ(lac-pro) supE thi-1 / F' lacI pro A⁺B⁺</i>	(Miller, 1972)
ECB1	<i>F csc⁺ Csc⁺ cscB1 Csc3</i>	(Jahreis et al., 2002)
JFG1	LR2-175 <i>ΔptsG::cat⁺ (Cam^R)</i>	E. Gabor Diss.
JFG2	JFG1 <i>ΔmanXYZ::Tn10tet⁺ (Tet^R)</i>	E. Gabor Diss.
JKA1	LJ110 <i>ΔsgrRST::cat⁺ (Cam^R)</i>	(Kosfeld, 2008)
JKA10	JFG2 <i>ΔptsG::tac_{po}ptsGHIS neo⁺ (Kan^R)</i>	Diese Arbeit
JKA11	LJ130 <i>ΔptsG::tac_{po}ptsGHIS neo⁺ (Kan^R)</i>	Diese Arbeit
JKA11*	LJ130 <i>ΔptsG::tac_{po}ptsGHIS neo⁺ (Kan^R)</i>	Diese Arbeit
JKA12	LJ120 <i>ΔsgrRST::neo⁺ (Kan^R)</i>	Diese Arbeit
JKA13	LJ120 <i>ΔptsG::tac_{po}ptsGHIS neo⁺ (Kan^R)</i> (P1-Transduktion mit Lysat aus JKA11)	Diese Arbeit
JKA14	LJ120 <i>ΔptsG::tac_{po}ptsGHIS neo⁺ (Kan^R)</i> (P1-Transduktion mit Lysat aus JKA 11*)	Diese Arbeit
JKA15	LJ130 <i>ΔptsG::tac_{po}ptsGHIS neo⁺ (Kan^R)</i> (P1-Transduktion mit Lysat aus JKA 11)	Diese Arbeit
JKA16	LJ130 <i>ΔptsG::tac_{po}ptsGHIS neo⁺ (Kan^R)</i> (P1-Transduktion mit Lysat aus JKA 11*)	Diese Arbeit
JKA17	BL21 (λDE3) <i>ΔptsG::cat⁺ (Cam^R)</i>	Diese Arbeit
JKA18	LJB5 <i>ΔsgrRST::neo⁺ (Kan^R)</i>	Diese Arbeit

JKA19	LJB9 Δ sgrRST::neo ⁺ (Kan ^R)	Diese Arbeit
JKA23	LJ130 Δ ptsG::tac _{po} ptsG neo ⁺ (Kan ^R)	Diese Arbeit
JKA4	LJ110 Δ ptsG::ptsGHis neo ⁺ (Kan ^R)	Diese Arbeit
JKA5	LJ120 Δ ptsG::ptsGHis neo ⁺ (Kan ^R)	Diese Arbeit
JKA6	LJ121 Δ ptsG::ptsGHis neo ⁺ (Kan ^R)	Diese Arbeit
JKA7	JFG2 Δ ptsG::ptsGHis neo ⁺ (Kan ^R)	Diese Arbeit
JKA8	LJ110 Δ ptsG::ptsGHis neo ⁺ (Kan ^R) Δ dgsA::cat ⁺ (Cam ^R)	Diese Arbeit
JKA9	LJ200 Δ dgsA::cat ⁺ (Cam ^R)	Diese Arbeit
JM109	thi-1 Δ (lac-proA,B)U169 gyrA1,96 recA1 endA1 relA1 hsdR17 supE44/F' traD36 proA ⁺ B ⁺ lacI ^d lacZ Δ M15	(Yanisch-Perron et al., 1985)
K-12	Wildtyp	K. Jahreis, LKS
L17	F' lacI, Z Maf Mtf Xyl rpsL Gal ⁺ Sm ^R λ ^R	J.W. Lengeler, DSMZ
LJ110	W3110 Fnr+	(Zeppenfeld et al., 2000)
LJ110 Δ dgsA::cat	LJ110 Δ dgsA::cat ⁺ (Cam ^R)	(Göhler, 2011)
LJ120	LJ110 Δ ptsG::cat ⁺ (Cam ^R)	(Zeppenfeld et al., 2000)
LJ121	LJ110 Δ ptsG::cat ⁺ (Cam ^R) man-8 zea-225::Tn10tet ⁺ (Tet ^R)	(Zeppenfeld et al., 2000)
LJ130	LJ110 Δ manXYZ::cat ⁺ (Cam ^R)	(Zeppenfeld et al., 2000)
LJ140	LJ110 Δ ptsHlcr::neo ⁺ (Kan ^R)	(Zeppenfeld et al., 2000)
LJ141	LJ110 Δ ptsHlcr::neo ⁺ (Kan ^R) mgl-500::Tn10tet ⁺ (Tet ^R) galP::cat ⁺ (Cam ^R)	(Zeppenfeld et al., 2000)
LJ154	LJ110 Δ ptsM::cat ⁺ (Cam ^R) mgl500::Tn10tet ⁺ (Tet ^R) galP::neo ⁺ (Kan ^R)	K. Jahreis, LKS
LJ200	LJ110 csc ⁺ cscB1 Csc3 ⁺	(Stein et al., 2002)
LJ231	LJ110 Δ manXYZ::cat csc ⁺	K. Jahreis, LKS
LJB3	LJ231 ptsG _{S169P} Tn10tet ⁺ (Tet ^R)	(Becker, 2000)
LJB5	LJ231 ptsG _{P384R} Tn10tet ⁺ (Tet ^R)	(Becker, 2000)
LJB6	LJ231 ptsG _{G117D} Tn10tet ⁺ (Tet ^R)	(Becker, 2000)
LJB7	LJ231 ptsG _{L289Q} Tn10tet ⁺ (Tet ^R)	(Becker, 2000)
LJB9	LJ231 ptsG _{G281R} Tn10tet ⁺ (Tet ^R)	(Becker, 2000)
LR2-175	galP63 manI161 manA162 (ptsM) nagE167 ptsG168 fru-174	(Sprenger und Lengeler, 1984)
MG1655	F, λ , rph-1	Yale <i>E. coli</i> StockCenter
SU202	lexA71::TNS su1A211 sulA::lacZ Δ (lacIPOZYA) 169 F' lacIq lacZ Δ M15::Tn9	(Dmitrova et al., 1998)
W3110	F λ IN(rrnD-rrnE)1 rph-1	Yale <i>E. coli</i> StockCenter
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacF' proAB lacIqZDM15 Tn10tet ⁺ (Tet ^R)	Stratagene
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
KAY2026	F Arg ⁻ Gua ⁻ P1 ^S Amp ^R	K. Jahreis, LKS

3.1.2 Phagen

Bei dem verwendeten Phagen für die P1-Transduktion handelt es sich um den ausschließlich lysogenen Phagen P1kc (Lennox, 1955).

3.1.3 Hefestämme

Bei dem verwendeten *Saccharomyces cerevisiae* Stamm für den Two-Hybrid Versuch (s. Kapitel 4.5.6) handelt es sich um den Stamm PJ69-4 α (s. Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Verwendeter *Saccharomyces cerevisiae* Stamm

Angegeben ist der verwendete *S. cerevisiae* Stamm mit Angaben des Geno- und Phänotyps sowie einer Referenz.

Bezeichnung	Geno - / Phänotyp	Referenz
PJ69-4 α	MAT α trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ LYS::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ	(James et al., 1996)

3.2 Plasmide und Oligonukleotide

In den nachfolgenden Unterkapiteln sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Oligonukleotide aufgelistet.

3.2.1 Plasmide

Alle verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 dargestellt. Ihre besonderen Eigenschaften und Verwendungen werden im Ergebnisteil dieser Arbeit näher erläutert. Alle konstruierten Plasmide wurden durch Kontrollrestriktion und Sequenzierungen auf die Richtigkeit der Sequenz überprüft.

Tabelle 3.3: Verwendete Plasmide

Angegeben sind die verwendeten Plasmide mit ihrem Resistenzmarker, den besonderen Eigenschaften sowie der Referenz.

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften und Verwendung	Referenz
F'::(ptsG _{OP} -lacZ)	Spec	F' Plasmid	(Zeppenfeld et al., 2000)
pACYC184	Tet	Klonierungsvektor	(Chang und Cohen, 1978)
pACYC184cscB-linker-BHis	Tet	CscB-ktpgred-EIIB ^{Glc} , Fluoreszenzmikroskopie	Diese Arbeit
pACYC184sgrTec3HA	Tet	SgrTec3HA unter tac _{po} , u.a. „Crosslinking“	Diese Arbeit
pBAD24	Amp	Klonierungsvektor	(Guzman et al., 1995)
pBLP2	Amp	pBAD24 mit EIICB ^{Glc} -GFP, Fluoreszenzmikroskopie	(Siepelmeyer, 2003)
pBluescriptKSII+	Amp	Klonierungsvektor	K. Jahreis, LKS
pDL801	Amp	LexA408-Jun, BTH	(Dmitrova et al., 1998)
pDL801BHis	Amp	LexA408-EIIB ^{Glc} -His, BTH	Diese Arbeit
pDL801Bktpgred	Amp	LexA408-EIIB ^{Glc} -ktpgred, BTH	Diese Arbeit
pDL801sgrTec	Amp	LexA408-SgrTec, BTH	(Göhler, 2011)
pEQA0	Amp	pRR48 mit EIICB ^{Glc} -I296N-His	(Gabor, 2011)
pET11a-sgrTec-NGFP	Amp	NGFP-SgrTec, BiFC	Diese Arbeit
pET11a-Z-NGFP	Amp	NGFP-Leucinzipper, BiFC	Diese Arbeit
pGEMT	Amp	Klonierungsvektor	Promega
pHex3	Cam	Klonierungsvektor	(Heuel, 1997)
pHex3ptsGHis	Cam	Klonierung von JKA4/JKA10	Diese Arbeit
pHex3ptsGHis-neo	Cam	Klonierung von JKA4/JKA10	Diese Arbeit
pHex3ptsGHis-neo-fhuE	Cam	Klonierung von JKA4/JKA10	Diese Arbeit
pHex3ycfH-tac _{po} ptsGHis-neo-fhuE	Cam	Klonierung von JKA10	Diese Arbeit
pHex3ycfH-tac _{po} ptsG-neo-fhuE	Cam	Klonierung von JKA23	Diese Arbeit
pJoe535	Kan, Amp	Klonierung von JKA4/JKA10	K. Jahreis, LKS
pKD3	Amp, Cam	Cat-Resistenzkassette, chr. Deletion nach Wanner	(Datsenko und Wanner, 2000)
pKD4	Amp, Kan	Kan-Resistenzkassette, chr. Deletion nach Wanner	(Datsenko und Wanner, 2000)
pKD46	Amp	Lambda - red - System, chr. Deletion nach Wanner	(Datsenko und Wanner, 2000)
pMRBAD-B-CGFP	Kan	EIIB ^{Glc} -CGFP, BiFC	Diese Arbeit
pMRBAD-B-ktpgred-CGFP	Kan	EIIB ^{Glc} -ktpgred-CGFP, BiFC	Diese Arbeit
pMRBAD-B-ktpgred-P384R-CGFP	Kan	EIIB ^{Glc} -ktrgred-CGFP, BiFC	Diese Arbeit
pMRBAD-C-CGFP	Kan	EIIC ^{Glc} -CGFP, BiFC	Diese Arbeit
pMRBAD-C-ktpgred-CGFP	Kan	EIIC ^{Glc} -ktpgred-CGFP, BiFC	Diese Arbeit
pMRBAD-C-ktpgred-P384R-CGFP	Kan	EIIC ^{Glc} -ktrgred-CGFP, BiFC	Diese Arbeit
pMRBAD-ptsG-CGFP	Kan	EIICB ^{Glc} -CGFP, BiFC	Diese Arbeit
pMRBAD-Z-CGFP	Kan	Leucinzipper-CGFP, BiFC	Diese Arbeit
pMS604	Tet	LexA-Fos, BTH	(Dmitrova et al., 1998)
pMS604BHis	Tet	LexA-EIIB ^{Glc} -His, BTH	Diese Arbeit
pMS604Bktpgred	Tet	LexA-EIIB ^{Glc} -ktpgred, BTH	Diese Arbeit
pMS604sgrTec	Tet	LexA-SgrTec, BTH	(Göhler, 2011)
pRR48	Amp	Klonierungsvektor	Parkinson, LKS

pRR48C-1296N-His	Amp	EIIC ^{GIC} -1296N	Diese Arbeit
pRR48C-1296N-ktpgred-His	Amp	EIIC ^{GIC} -1296N-Linker	Diese Arbeit
pRR48GH	Amp	EIICB ^{GIC} -5His, u.a. „Crosslinking“	(Gabor, 2011)
pRR48GH-D388A	Amp	EIICB ^{GIC} - D388A-5His, „Crosslinking“	Diese Arbeit
pRR48GH-E387A	Amp	EIICB ^{GIC} - E387A-5His, „Crosslinking“	Diese Arbeit
pRR48GH-G385A	Amp	EIICB ^{GIC} - G385A-5His, „Crosslinking“	Diese Arbeit
pRR48GH-I296N	Amp	EIICB ^{GIC} - I296N-5His, „Crosslinking“	Diese Arbeit
pRR48GH-K150E	Amp	EIICB ^{GIC} - K150E-5His, „Crosslinking“	Diese Arbeit
pRR48GH-K382A	Amp	EIICB ^{GIC} - K382A-5His, „Crosslinking“	Diese Arbeit
pRR48GH-P384A	Amp	EIICB ^{GIC} -P384A-5His, „Crosslinking“	Diese Arbeit
pRR48GH-P384R	Amp	EIICB ^{GIC} -P384R-5His, „Crosslinking“	Diese Arbeit
pRR48GH-R386A	Amp	EIICB ^{GIC} - R386A-5His, „Crosslinking“	Diese Arbeit
pRR48GH-T383A	Amp	EIICB ^{GIC} - T383A-5His, „Crosslinking“	Diese Arbeit
pRR48GH-V12F	Amp	EIICB ^{GIC} - V12F-5His, „Crosslinking“	Diese Arbeit
pRR48ptsG	Amp	EIICB ^{GIC}	(Gabor, 2011)
pSU18	Cam	Klonierungsvektor	(Bartolome et al., 1991)
pSU19	Cam	Klonierungsvektor	(Martinez et al., 1988)
pTM30	Amp	Klonierungsvektor	(Morrison und Parkinson, 1994)
pTM302xFlag-sgrTec	Amp	2FLAG-SgrTec, Proteinreinigung	Diese Arbeit
pTM30BHis	Amp	EIIB ^{GIC} -5His, u.a. CoIP	(Staab, 2007)
pTM30Flag-sgrTec	Amp	FLAG-SgrTec, Proteinreinigung	Diese Arbeit
pTM30gfpHis	Amp	GFP-5His, Fluoreszenzmikroskopie	(Heckmann, 2009)
pTM30GH	Amp	EIICB ^{GIC} -His	Diese Arbeit
pTM30sgrTec	Amp	SgrTec, Klonierung	(Kosfeld, 2008)
pTM30sgrTec10His	Amp	SgrTec-10His, Proteinreinigung	Diese Arbeit
pTM30sgrTec3HA	Amp	SgrTec-3HA, u.a. Westernblot	Diese Arbeit
pTM30sgrTec3HA-Y8A	Amp	SgrTec-Y8A, Wachstumsanalyse	Diese Arbeit
pTM30sgrTec3HA-Y8S	Amp	SgrTec-Y8S, Wachstumsanalyse	Diese Arbeit
pTM30sgrTec-F4Y	Amp	SgrTec-F4Y, Wachstumsanalyse	Diese Arbeit
pTM30sgrTec-gfp	Amp	SgrTec-GFP, Fluoreszenzmikroskopie	Diese Arbeit
pTM30sgrTecHis	Amp	SgrTec-5His	Diese Arbeit
pTM30sgrTec-Q3E	Amp	SgrTec-Q3E, Wachstumsanalyse	Diese Arbeit
pTM30sgrTec-W36T	Amp	SgrTec-W36T, Wachstumsanalyse	Diese Arbeit
pTM30sgrTkpn	Amp	SgrTkpn	(Kosfeld, 2008)
pTM30sgrTkpn-His	Amp	SgrTkpn-5His, Proteinreinigung	Diese Arbeit
pUC18	Amp	Klonierungsvektor	Jahreis, LKS
pUR400	Amp	R'-Plasmid scr ⁺ tet ^R	(Schmid et al., 1982)

3.2.1.1 „Shuttle“-Vektoren *E.coli* und *S.cerevisiae*

Für den Hefe-“Two-Hybrid“ Versuch (s. 4.5.6) wurden Vektoren verwendet, die sowohl in *E.coli* als auch in *S.cerevisiae* stabil etabliert sind.

Tabelle 3.4: „Shuttle“-Vektoren für *E.coli* und *S.cerevisiae*

Angegeben sind die verwendeten Plasmide mit ihrem Resistenzmarker, den besonderen Eigenschaften sowie der Referenz.

Bezeichnung	Resistenz	Eigenschaften	Referenz
pFA6a-3HAKanMX6	Amp, KanMX6	3HA-Kassette, Klonierung	(Longtine et al., 1998)
pGAD424A	Amp, LEU2	2µm, Transkriptionsaktivierungsdomäne des Gal4-Proteins unter der Kontrolle des <i>ADH1</i> - Promotors, HTH	(Bartel et al., 1993)
pGAD424A-EIIB	Amp, LEU2	EIIB ^{Glc} -Aktivierungsdomäne, HTH	Diese Arbeit
pGAD424A-linker-EIIB	Amp, LEU2	Linker-EIIB ^{Glc} -Aktivierungsdomäne, HTH	Diese Arbeit
pGAD424A-sgrTec	Amp, LEU2	SgrT-Aktivierungsdomäne, HTH	Diese Arbeit
pGBDC1	Amp, TRP1	2µm, DNA-Bindedomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors unter der Kontrolle des <i>ADH1</i> -Promotors, HTH	(James et al., 1996)
pGBD-C1-EIIB	Amp, TRP1	EIIB ^{Glc} -Bindedomäne, HTH	Diese Arbeit
pGBD-C1-linker-EIIB	Amp, TRP1	Linker-EIIB ^{Glc} -Bindedomäne, HTH	Diese Arbeit
pGBD-C1-sgrTec	Amp, TRP1	SgrT-Bindedomäne, HTH	Diese Arbeit
pJJH1202	Amp, LEU2	2µm, simian Virus 40 T-Antigen(84-708)-Gal4-Aktivierungsdomänenfusion, HTH	J.J. Heinisch, LKS
pVA3	Amp, TRP1	2µm, p53(72- 390)-Gal4-DNA-Bindedomänenfusion, HTH	(Iwabuchi et al., 1993)

3.2.2 Oligonukleotide

Die benötigten Oligonukleotide wurden bei der Firma Thermo Fisher Scientific (Ulm) bestellt. Die Sequenzen sind in der Tabelle 3.5 angegeben. Die Darstellung erfolgt immer in 5'-3' Richtung.

Tabelle 3.5: Oligonukleotide

Angegeben sind die verwendeten Oligonukleotide mit der Sequenz und der Verwendung in dieser Arbeit.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
2xFlag-SgrTec+	GGG CTG CAG GAT TAT AAG GAT GAC GAT GAC AAG GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA TCG	Klonierung SgrTec2xFlag
B-ktpgred-P384R-SphI+	CAT GCA TGC GGA TCT GAA AAC GCG GGG TCG	BiFC
B-ktpgred-SphI+	CAT GCA TGC GGA TCT GAA AAC GCC	BiFC
C-His-BamHI-	CCC GGA TCC TTA GTG GTG GTG GTG CAG ATC CAG TGC TTT AAT C	Klonierung EIIC-His
C-ktpgred-AatII-	GGG GAC GTC GTC GCT TTT GCA TCT TCA GTC	BiFC
C-ktpgred-His-BamHI-	CCC GGA TCC TTA GTG GTG GTG GTG GTC TTC ACG ACC CGG CG	Klonierung EIIC-His
C-ktpgred-P384R-AatII-	GAT GAC GTC GCG TCT TCA CGA CCC CGC GTT TTC	BiFC
CR-Sall+	AGA CGT TGG GTC GAC TAA GGC AGC C	Klonierung JKA4/JKA10
CR-XhoI-	CGA CCT ACT CGA GCT ATA CCT CTA T	Klonierung JKA4/JKA10
CscB-EcoRI+	CAT GAA TTC GAG GCC GCT CTT ATC	Klonierung CscB
CscB-NcoI-	GGG CCA TGG TAT TGC TGA AGG TAC AGG	Klonierung CscB
FhuE-Anfang-	GCT GCC ACT CGT GTC	Klonierung JKA4/JKA10
Flag-SgrTec- Neu+	GGG CTG CAG GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA TCG ATT CTG CAA CAG TTT TAT CAG CAC	Klonierung SgrTecFlag
Gfp+	AAC TCT GCA GTC TAG AAA AGG AGA AGA ACT TTT CAC	Klonierung GfpHis
Gfp-EcoRV-	CGC GAT ATC TTT GTA GAG CTC ATC CAT GCC	Klonierung SgrT-gfp

Gfp-His-	GCG GGT ACC GTG GTG GTG GTG CAT ATC TTT GTA GAG CTC ATC C	Klonierung GfpHis
Gfp-linker-KpnI+	GAT GGT ACC GCC GCG CCA GCA CCC G	Klonierung SgrT-gfp
Glk-	TCA TTT CGG CAA TTG AGA AC	RT-PCR
Glk+	ATA TTG CCA GTG GTG AAA TC	RT-PCR
HA-Tag-HindIII+	GGG AGG CTT TAC CCA TAC GAT GTT CC	Klonierung SgrT-HA
HA-Tag-KpnI-	CGG GTA CCA GCG TAA TCT GGA ACG	Klonierung SgrT-HA
His-Tag-	CAT GAT GAT GAT GAT GAT GT	Klonierung „His-Tag“
His-Tag+	AGC TAC ATC ATC ATC ATC ATC ATG GTA C	Klonierung „His-Tag“
HolB-Ende+	CTA CCG GTT CCT CAT C	Sequenzierung
pDL-B-BglII-	GGG AGA TCT TTA GTG GTT ACG GAT	BTH
pDL-B-ktpgred-XhoI+	GGG CTC GAG GAT CTG AAA ACG CCG GGT CG	BTH
pDL-B-XhoI+	GGG CTC GAG CAC GCT AGC CAC CAC	BTH
pET11a+	GCT AGT TAT TGC TCA G	Sequenzierung
pMRBAD+	GTT TCT CCA TAC CCG	Sequenzierung
pMS-B-BstEII+	GCG GGT GAC CCT GCA CGC TAG CCA C	BTH
pMS-B-ktpgred-AgeI+	GGG ACC GGT GGA TCT GAA AAC GCC GGG TCG	BTH
pMS-B-XhoI-	GGG CTC GAG TTA GTG GTT ACG GAT	BTH
pRR48+	CTG CAT GTG TCA GAG GTT TTC	Sequenzierung
pTM30-	GGA GAA AAT ACC GCA TCA GG	Sequenzierung
pTM30+	TCA TCG GCT CGT ATA ATG TA	Sequenzierung
PtsG+	AAC TGC AGG TGT TTA AGA ATG CAT TTG CT	Klonierung EIICB ^{Glc}
PtsG7	AAC CAT GGC CGT GGT TGC GCC	BiFC/Southernblot
PtsG8	GCC TGG TAC CGT TTG GTC TGC ACC	Sequenzierung
PtsG-AatII-	CGC GAC GTC GGG TTA CGG ATG TAC TC	BiFC
PtsG-BamHI-	GCG GGA TCC GTT ACG GAT GTA CTC	HTH
PtsG-BamHI+	CGC GGA TCC TTT AAG AAT GCA TTT GCT AAC	Klonierung EIICB ^{Glc}
PtsG-BHis-Scal-	CCC AGT ACT TTA GTG GTG GTG GTG GTG AAT G	Klonierung EIIB-His
ptsG-B-SphI+	CAT GCA TGC GCG ACT GAA GAT GC	BiFC
ptsG-C-AatII-	GCG GAC GTC AGA TCC AGT GCT TTA ATC	BiFC
PtsG-C-Scal-	GTG AGT ACT CAG ATC CAG TGC	Klonierung EIICB ^{Glc}
PtsG-D388A(NEB)+	AAC GCC GGG TCG TGA AGC CGC GAC TGA AG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-E387A(NEB)+	AAC GCC GGG TCG TGC AGA CGC GAC TGA AG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-EcoRI-	CAC GAA TTC GCT TTG ACG ATG CGG	Klonierung EIICB ^{Glc}
PtsG-EcoRI-	CCC GAA TTC TCT TAC GGA TTA GTG G	Klonierung EIICB ^{Glc}
PtsG-EIIB-EcoRI+	GTA GAA TTC ATG GCA CCG GCT CTG	HTH
PtsG-G385A(NEB)+	TGG ATC TGA AAA CGC CGG CTC GTG AAG ACG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-His+	CGG CTG CAG GTG CAC CAT CAC CAT TTT AAG AAT G	Klonierung EIICB ^{Glc}
PtsG-I296N(NEB)-	GAG GTC AGC GCC GCG GAG ATC ATA ATA C	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-I296N(NEB)+	GTT CCT GAC CGG TAA CAC CGA GCC GAT C	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-K150E(NEB)-	CAA GAT ACT CAG GCA GCT TAA TAC GGT AG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-K150E(NEB)+	GCT TCT TTG CCG GTG AAC GCT TTG TGC C	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-K382A(NEB)+	TGG ATC TGG CAA CGC CGG GTC GTG AAG ACG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-ktpg(NEB)-	GTG CTT TAA TCA GCA CGC GGA AGA TGG TG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-linker-BamHI-	GAT GGA TCC TTC GCT GGT ACC TG	HTH/Southernblot
PtsG-linker-BamHI-	GAT GGA TCC TTC GCT GGT ACC TG	HTH
PtsG-linker-EcoRI+	GCC GAA TTC CGC GTG CTG ATT AAA G	HTH
PtsG-linker-NcoI+	GGG CCA TGG TTC CGC GTG CTG ATT AAA G	Klonierung EIICB ^{Glc}
PtsG-NdeI-	TAA CAT ATG TAA AAA AGG CAG	Klonierung EIICB ^{Glc}
PtsG-NdeI+	CCG CAT ATG CTA TCT GGC ACT CTG C	Klonierung EIICB ^{Glc}

PtsG-P384A(NEB)+	TGG ATC TGA AAA CGG CGG GTC GTG AAG ACG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-P384R(NEB)+	TGG ATC TGA AAA CGC GGG GTC GTG AAG ACG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsGpo-BamHI+	CCC GGA TCC AGC TCG TAA TTA ATG GC	Klonierung <i>ptsG_{po}</i>
PtsGpoHindIII-	GGG AAG CTT AAA CAT AAT TGA GAG TGC	Klonierung <i>ptsG_{po}</i>
PtsG-PstI-	CGA CTG CAG CGC CGC GGA GAT CAT A	Klonierung EIICB ^{Glc}
PtsG-PstI+	AGT TGC TGC AGA TGG CAT CAT GG	Klonierung EIICB ^{Glc}
PtsG-R386A(NEB)+	AAC GCC GGG TGC TGA AGA CGC GAC TGA AG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-red(NEB)-	TTCAGATCCAGTGCTTTAATCAGCACGCG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-SphI+	CCC GCA TGC TTT AAG AAT GCA TTT GC	BiFC
PtsG-T383A(NEB)+	TGG ATC TGA AAG CGC CGG GTC GTG AAG ACG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-V12F(NEB)-	CAA ATG CAT TCT TAA ACT GCA GCA TAT G	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-V12F(NEB)+	CTA ACC TGC AAA AGT TCG GTA AAT CGC TG	5' Phosph. Mutagenese EIICB ^{Glc}
PtsG-XhoI+	GGG CTC GAG GGT GTT TAA GAA TGC	BiFC
Pts-RT-	AAT ACC TGC GAT AGG CAG TA	RT-PCR
Pts-RT+	CAT ACT CAG GAG CAC TCT CAA	RT-PCR
Pts-RT2-	CGG GCA GCC AGC TGA AAT TC	RT-PCR
Pts-RT2+	GCT AAC CTG CAA AAG GTC GG	RT-PCR
Rev-Primer	GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA	Sequenzierung
Rne1+	ACC GAA GCG TTA ACG	Sequenzierung
Rne2+	GAC CGA GCA ACC AGC	Sequenzierung
Rne3+	GCG CGC CAG TTG TTG	Sequenzierung
Rne-KpnI-	GAT GGT ACC CTC AAC AGG TTG CGG	Sequenzierung
Rne-PstI+	GGG CTG CAG AAA AGA ATG TTA ATC	Sequenzierung
SgrRST-	GAG CCA TCG TCA TTA TCC AGA TC	Klonierung JKA1
SgrRST+	GTT GAG AAC GGC GTT AGT GTA GT	Klonierung JKA1
SgrS-wanner-	AGC AGG TAT AAT CTG CTG GCG GGT GAT TTT ACA CCA ATA CTC AGT CAC ACC ATA TGA ATA TCC TCC TTA	Klonierung JKA12
SgrT-	AGG CAA GCT TAC TTT CAG AAT TGC GGT	Klonierung SgrTec
SgrT+neu	CCC CTG CAG CAG TTT TAT CAG CAC TAT TTT ACC	Klonierung SgrTec
SgrTec-10xHis-	GCC AAG CTT ATG ATG ATG ATG ATG GTG GTG GTG GTG AC	Klonierung SgrTec
SgrTec-AatII-	GCG GAC GTC CCA CTT TCA GAA TTG CGG	BiFC
SgrTec-BamHI-	GCG GGA TCC ACT TTC AGA ATT GCG G	BiFC
SgrTec-EcoRI+	GCC GAA TTC CGT CAG TTT TAT CAG	HTH
SgrTec-His-	GGG AAG CTT GTG GTG GTG GTG ACT TTC AGA ATT GCG GTC	Klonierung SgrTec
SgrTec-NcoI+	GCG CCA TGG GGC AGT TTT ATC AGC AC	BiFC
SgrTec-XhoI+	CGC CTC GAG GCA GTT TTA TCA GC	BiFC
SgrT-F4Y+	CCC CTG CAG CAG TAT TAT CAG CAC TAT TTT ACC	Mutationen SgrTec
SgrT-Kpn-	TGC AAG CTT ATG ATC AGA GGT CGT TGA CGT C	Klonierung SgrTkpn
SgrT-Kpn+	GAA TCT GCA GAG GTC TAC CGC AAA ATC GTT C	Klonierung SgrTkpn
SgrT-kpnI-	CGC GGT ACC AAG CTT ACT TTC	Klonierung SgrTec
SgrT-pDL-	GAT GCA GAG ATC TCA ACT TTC	BTH
SgrT-pDL+	AGG GGG TGC CCC GGG CGT CAG	BTH
SgrT-pMS-	GAT GCA CTC GAG TCA CTT TC	BTH
SgrT-pMS+	AGG GGG TGA CCG GTG CGT CAG	BTH
SgrT-Q3E+	CCC CTG CAG GAG TTT TAT CAG CAC TAT TTT ACC	Mutationen SgrTec
SgrT-W36T-	CCC AAG CTT ACT TTC AGA ATT GCG GTC ATC GGT CTG CAT C	Mutationen SgrTec
SgrT-Y8A+	CGG CTG CAG CAG TTT TAT CAG CAC GCT TTT ACC GC	Mutationen SgrTec
SgrT-Y8S+	CGG CTG CAG CAG TTT TAT CAG CAC TCT TTT ACC GC	Mutationen SgrTec
SrgR-wanner+	GGT GGC GCA AAC CAC GCT GAT TTA AAA TCG AAC CAG CCG AGG GTA TTC ATG TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG	Klonierung JKA1
TacPO-BamHI-	GGG GGA TCC CAT TTC ACA CTC CT	Klonierung JKA10

TacPO-PtsG-ScaI+	CAC AGT ACT CTA TCG CTA CGT GAC	<i>tac_{PO}</i> pTM30
TacPO-XbaI+	GGG TCT AGA CGC TTA CAG ACA AGC	Klonierung JKA10
Univ-Primer	TGT GGA ATT GTG AGC GGA TAA CA	Sequenzierung
Wanner c1	TTA TAC GCA AGG CGA CAA GG	Wanner Methode
Wanner c2	GAT CTT CCG TCA CAG GTA GG	Wanner Methode
Wanner k1	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT	Wanner Methode
Wanner k2	CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC	Wanner Methode
Wanner kt	CGG CCA CAG TCG ATG AAT CC	Wanner Methode
YcfH-Ende-HindIII+	CTT CAA GCT TTC CGT TGA ATG AG	Klonierung JKA4/JKA10
YcfH-NotI-	GGG GCG GCC GCT CAA CGG ATG GAT TG	Klonierung JKA4/JKA10
YcfH-SacI+	GGG GAG CTC TTT TTA GTC GAC TCA C	Klonierung JKA4/JKA10

3.3 Chemikalien

Handelsübliche Chemikalien, Detergenzien, Lösungsmittel, Kohlenhydrate und Antibiotika wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen GE Healthcare (Freiburg), Invitrogen (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze), Roche (Grenzach-Wyhlen), Serva (Heidelberg), Sigma (Steinheim), Applichem (Darmstadt) und Omnilab (Bremen) bezogen.

3.4 Medien

3.4.1 Minimalmedium (MM)

Als Minimalmedium wurde ein Standard-Phosphatmedium nach Tanaka et al. (Tanaka, S. et al., 1967) verwendet. Die benötigte Kohlenstoffquelle wurde nach dem Autoklavieren steril in einer Endkonzentration von 0,2 % (w/v) zugegeben. Nach Bedarf wurden dem Medium die benötigten Vitamine (B1, Endkonzentration 5 mg/l) bzw. L-Aminosäuren (Methionin 40 mg/l, Arginin 20 mg/l und Histidin 20 mg/l) zugesetzt. Minimalmedium Platten enthielten darüber hinaus 15 g/l Agar (Invitrogen).

3.4.2 Vollmedien (LB₀, LB, 2 x TY)

Für flüssiges LB₀ (Luria Bertani) Medium wurden 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt und 5 g/l Natriumchlorid abgewogen, mit ddH₂O auf 1 l auf gefüllt und autoklaviert. Vollmediumplatten wurde zusätzlich 15 g/l Agar zugesetzt. Zur Herstellung von LB Medium, welches für die P1-Transduktion verwendet wurde, wurde dem LB₀ Medium nach dem Autoklavieren Glukose in einer Endkonzentration von 0,2 % und CaCl₂ in einer Endkonzentration von 2,5 mM steril zugegeben. Flüssiges 2 x TY Medium bestand aus 16 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefe-Extrakt und 5 g/l NaCl. Die Bestandteile wurden mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt und ebenfalls autoklaviert. Dieses Medium ist besonders nährstoffreich und wurde unter anderem für die Anzucht von Bakterien für die Miniplasmidisolierung verwendet.

3.4.3 MacConkey-Indikatorplatten (McC)

Vollmediumplatten nach MacConkey (Macconkey, 1905) wurden als Indikatorplatten für die Verstoffwechslung einzelner Kohlenstoffquellen verwendet. Bei Verstoffwechslung der eingesetzten Kohlenstoffquelle durch die Bakterien bilden diese eine Säure, die durch die pH-Änderung einen Indikator (Neutralrot) im Medium rot färbt und rote Kolonien hervorruft. Wird der Zucker dagegen nicht verstoffwechselt, bleiben die Kolonien weiß. Es kann zwischen verschiedenen starken Weiß- bzw. Rotfärbungen unterschieden werden (s. auch Markertest, Kapitel 4.2.8). Die Platten enthielten 40 g/l MacConkey Agar Base in 1 l ddH₂O. Die zu testende Kohlenstoffquelle wurde nach dem Autoklavieren mit

einer Endkonzentration von 1 % (w/v) steril zugegeben (Ausnahme Mannose: 0,5 % (w/v) Endkonzentration).

3.4.4 Indikatorplatten für die α -Komplementation

Als Indikatorplatten für die α -Komplementation der β -Galaktosidase im so genannten Blau-Weiß-„Screen“ wurden LB₀ Platten verwendet, die neben dem benötigten Antibiotikum zusätzlich mit 0,02 % X-Gal und 1 mM IPTG versetzt waren.

3.4.5 Medien für Glycerinkulturen (Slant, Slant 50 : 50)

Zur Herstellung von Dauerkulturen für die Stammsammlung wurden zwei salzarme Medien mit Glycerin verwendet. Für die Anzucht der Zellen wurde ein so genanntes Slant-Medium verwendet, welches sich aus 20 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefeextrakt und 0,2 % (v/v) Glycerin in 1 l ddH₂O zusammensetzte. Das Medium Slant 50 : 50 für die Aufbewahrung der Kulturen bei -20 °C bestand aus 5 g/l Bacto-Trypton 2,5 g/l Hefeextrakt und 43,5 % (v/v) Glycerin in 1 l ddH₂O.

3.4.6 P1-Weichagar (P1-WA)

Der P1-Weichagar wurde für die Herstellung und Titration von P1-Lysaten benötigt. Er bestand aus 8 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l NaCl und 6 g/l Agar pro 1 l ddH₂O und wurde vor Verwendung autoklaviert.

3.4.7 Hefe Medien

3.4.7.1 Synthetisches Komplettmedium (SC)

Synthetisches Komplettmedium (SC) für *S.cerevisiae* bestand aus 0,67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (YNB) und gewünschten Aminosäuren, welche als Aminosäuremix wie folgt nach Tabelle 3.6 zugegeben wurden (Zimmermann, 1975). Der pH-Wert des Mediums wurde auf 6,3 eingestellt. Zur Herstellung von Platten wurde dem Medium 1,5 % Difco Agar zugefügt.

Tabelle 3.6: Aminosäurekonzentrationen in synthetischem Komplettmedium

Die Tabelle gibt die gewünschten Endkonzentrationen in mg/l von allen für synthetisches Komplettmedium verwendeten Aminosäuren an.

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

3.4.7.2 Vollmedium (YEPD)

Vollmedium (YEPD) für die Anzucht von *S.cerevisiae* bestand aus 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton und 2 % Glukose als Kohlenstoffquelle. Für Platten wurde dem Medium zusätzlich 1,5 % Difco Agar zugesetzt.

3.5 Zusätze für Medien

Zu einigen Nährmedien wurden Antibiotika- bzw. Zuckerlösungen gegeben, um eine selektive Anzucht der Bakterien zu ermöglichen. Einige Stämme benötigen bei Wachstum in Minimalmedium neben einer Kohlenstoffquelle zusätzliche Aminosäuren und Vitamine. Zur Induktion von Zellen wurde IPTG oder

Arabinose verwendet. Für einen Blau-Weiß-„Screen“ (s. Kapitel 4.2.7) wurde zudem X-Gal verwendet. Die Medienzusätze sind nachfolgend angegeben.

3.5.1 Zuckertlösungen

Zuckertlösungen für die Medien wurden in der Regel als 20 %ige Stocklösungen in ddH₂O angesetzt und sterilfiltriert. Sie wurden in den unter Kapitel 3.4 angegebenen Konzentrationen nach dem Autoklavieren den Medien zugegeben.

3.5.2 Antibiotika

Die Antibiotika wurden in einer 100-fachen Stammlösung angesetzt und dann in einfacher Konzentration zu den Medien gegeben. Die jeweiligen Endkonzentrationen lassen sich der Tabelle 3.7 entnehmen. Vor der Verwendung wurden die Stocklösungen sterilfiltriert. Die Lagerung der in 50 % Ethanol gelösten Antibiotika erfolgte bei -20 °C, die Lagerung der in ddH₂O gelösten Antibiotika bei 4 °C.

Tabelle 3.7: Antibiotikazusätze

Angegeben sind die Antibiotika Stocklösungen mit Angabe des Lösungsmittels und der gewünschten Endkonzentration.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin	50 % Ethanol	100 µg/ml
Chloramphenicol	50 % Ethanol	25 µg/ml
Kanamycin	ddH ₂ O	25 µg/ml
Spectinomycin	ddH ₂ O	100 µg/ml
Streptomycin	ddH ₂ O	50 µg/ml
Tetracyclin	50 % Ethanol	10 µg/ml

3.5.3 Aminosäurelösungen und Casamino Acids

Auxotrophe Bakterienstämme benötigen in Minimalmedium neben einer Kohlenstoffquelle zusätzlich Aminosäuren, die sie nicht selber synthetisieren können. Die eingesetzten Endkonzentrationen für fast alle Aminosäuren betragen 20 mg/l. Ausnahmen bildeten L-Methionin und L-Lysin mit 40 mg/l. Die Aminosäuren werden in ddH₂O angesetzt, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Für einige Anzuchten wurde zudem ein Aminosäuremix, so genannte Casamino acids, verwendet. Die eingesetzte Endkonzentration betrug hier 0,1 %.

3.5.4 Vitamin B1

Das Vitamin B1 wurde zu allen Minimalmedien in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zugegeben. Es wurde in ddH₂O angesetzt, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

3.5.5 IPTG

IPTG („Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid“) wurde im Blau-Weiß-„Screen“ und zur Induktion bestimmter Vektorsysteme verwendet. Es wurde als 100 mM Stocklösung in ddH₂O angesetzt. Für den Blau-Weiß-„Screen“ wurde 1 mM IPTG in die Platte eingespatelt, die Induktion der Vektorsysteme erfolgte variabel zwischen 10 µM und 1 mM (jeweils angegeben im Ergebnisteil).

3.5.6 X-Gal

X-Gal („5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-D-Galactopyranosid“) wurde ebenfalls für Blau-Weiß-„Screens“ verwendet. Es wurde als 2 %ige Stocklösung in Dimethylformamid (DMF) angesetzt.

3.6 Gelstandard

Als Größenstandard für Agarosegele wurde der „100 bp DNA Ladder“ bzw. „1 kb DNA Ladder“ Standard von New England Biolabs (Schwalbach) verwendet, außerdem der „GeneRuler DNA Ladder Mix“ von Fermentas (St. Leon-Rot), für SDS Gele der Proteinstandard von Bio-Rad (München).

Für den Southernblot wurde ein EcoRI/HindIII geschnittener Lambda-Standard verwendet. Der Standard wurde nach folgendem Protokoll angesetzt. Zunächst wurde die Lambda-DNA mit EcoRI und HindIII geschnitten (s. Tabelle 3.8). Die Inkubation der Restriktion erfolgte bei 37°C über Nacht. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit 280 µl ddH₂O und 120 µl GLB versetzt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 3.8: Restriktionsansatz für den Lambda Standard

Angegeben ist der Restriktionsansatz für einen Lambda-DNA Standard, verwendet im Southernblot.

Komponente	Menge
Lambda DNA	100 µl
Restriktionspuffer	40 µl
EcoRI	4 µl
HindIII	4 µl
ddH ₂ O	252 µl
Gesamtvolumen	400 µl

3.7 Puffer und Stocklösungen

In der folgenden Tabelle 3.9 sind häufig verwendete Puffer aufgelistet.

Tabelle 3.9: Häufig verwendete Puffer und Stocklösungen

In dieser Tabelle sind häufig verwendete Puffer und Stocklösungen mit Angabe der Verwendung, der Einzelkomponenten und deren Konzentration aufgelistet.

Verwendung	Bezeichnung	Komponente / Endkonzentration	Bemerkung	
Agarosegel-Ladepuffer	GLB 5 x	Glyzerin	50 %	
		TBE	0,5 x	
		Bromphenolblau	0,25 %	
		Xylencyanolblau	0,25 %	
β-Galaktosidase Test	PP1	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄	50 mM 50 mM	Mischen bis pH 7,2 eingestellt ist
BiFC	Lysispuffer	Tris HCl pH8,0	50 mM	
		NaCl	300 mM	
		Imidazol	10 mM	
		Triton X-100	0,1 %	
		Lysozym	1 mg/ml	
		CaCl ₂	0,5 mM	
		MgCl ₂	5 mM	
„Crosslinking“	Formaldehyd-Lösung	Paraformaldehyd	4 %	In PBS ansetzen
Dialyse	Dialysepuffer	Tris-Puffer	20 mM	pH 8,0
DNA Isolierung mit Phenol/ Chloroform	Extraktionspuffer	NaCl	0,1 M	
		Tris HCl pH 8,0	0,2 M	
		EDTA pH 8,0	0,05 M	
		SDS	0,5 %	
Kompetente Zellen (<i>E. coli</i>)	Lösung A	RbCl	10 mM	
		MOPS pH 7,0	10 mM	
	Lösung B	RbCl	10 mM	
		CaCl ₂ MOPS pH 6,5	50 mM 100 mM	
Kompetente Zellen (<i>S. cerevisiae</i>)	Lösung A	Sorbitol	1 M	
		Ethylenglycol	3 %	
		Bicin pH 8,35	10 mM	
Minimalmedium	Lösung A	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,34 M	
		K ₂ HPO ₄	0,66 M	
		(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 M	

	Lösung B	HCl FeSO ₄ MgSO ₄ ZnCl ₂ CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,001 N 0,1 mM 0,03 M 0,1 mM 1 M	Steril filtrieren
P1-Transduktion	Citrat Saline	NaCl Na-Citrat	8,5 g/l 14,7 g/l	
Protease-Inhibitor	AEBSF	AEBSF	100 mM	
Bestimmung der Protein-Konzentration	Bradfordreagenz	Coomassie Brilliant Blue G250 95% Ethanol 85% Phosphorsäure	0,1 g/l 50 ml/l 100 ml/l	Filtrieren, Dunkel lagern
Protein-Reinigung (u.a. Ni-NTA-Agarose)	Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol pH 8,0	50 mM 300 mM 250 mM	
	Lysispuffer	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol pH 8,0	50 mM 300 mM 10 mM	
	Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol pH 8,0	50 mM 300 mM 20 mM	
Protein-Reinigung (FPLC)	Puffer A1	Na-P-Puffer pH 8,0 NaCl Imidazol	50 mM 300 mM 20 mM	Entgasen
	Puffer A2	KPi pH 6,5 Glycerin NaCl β-Mercaptoethanol	100 mM 10 % 300 mM 2 mM	Entgasen
	Puffer B1	Na-P-Puffer pH 8,0 NaCl Imidazol ZnCl ₂	50 mM 300 mM 500 mM 200 μM	Entgasen
	Puffer B2	KPi Glycerin NaCl β-Mercaptoethanol Imidazol	100 mM 10 % 300 mM 2 mM 300 mM	Entgasen
Puffer	Kalium Phosphatpuffer	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄		Stocklösungen gewünschter Konzentration mischen bis pH eingestellt ist
	Natrium Phosphatpuffer	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄		Stocklösungen gewünschter Konzentration mischen bis pH eingestellt ist
	PBS Puffer 1 x	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄	136 mM 2,7 mM 1,8 mM 10 mM	pH 6,5
	TBE 10 x	Tris Borsäure EDTA	890 mM 890 mM 20 mM	pH 8,3
	TE 1 x	Tris-HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0	10 mM 1 mM	Autoklavieren
SDS-PAGE	Laufpuffer 10 x	Tris Glycin SDS	250 mM 1,92 M 35 mM	pH 8,2-8,3 nicht einstellen

	SDS Probenpuffer 2 x	SDS Glycerin Tris pH 6,76 Bromphenolblau β -Mercaptoethanol	4 % 20 % 250 mM 0,02 % 10 %	
Silberfärbung	Fixierer	Methanol Essigsäure Formaldehydlösung ad 1000 ml	500 ml 120 ml 0,5 ml	
	Thiosulfatlösung	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ad 200 ml	0,04 g	
	Imprägnierlösung	AgNO_3 37 % Formaldehyd ad 200 ml	0,4 g 150 μl	
	Entwicklerlösung	Na_2CO_3 Thiosulfatlösung 37% Formaldehyd ad 200 ml	12 g 4 ml 100 μl	
	Stopplösung	Na_2EDTA (Titriplex-III) ad 1000 ml	23 g	
Southernblot	Denaturierungs- Lösung	NaCl NaOH	1,5 M 0,5 M	
	SSC 20 x	NaCl Na-Citrat	3 M 0,3 M	
	Hybridisierungs- Lösung	SSC N-Laurosylsarkosin (pH7,0) SDS Blocking-Reagenz	5 x 0,1 % 0,02 % 1 %	
	Waschpuffer I	SSC SDS	2 x 0,1 %	
	Waschpuffer II	SSC SDS	0,1 x 0,1 %	
	Entwicklungspuffer 1	Maleinsäure NaCl	0,1 M 0,15 M	pH 7,5
	Waschpuffer 1	Entwicklungspuffer 1 Tween	0,3 %	
	Entwicklungspuffer 2	Entwicklungspuffer 1 Blocking-Reagenz	1 %	
	Entwicklungspuffer 3	Tris-HCl NaCl MgCl_2	0,1 M 0,1 M 50 mM	pH 9,5
	NBT	Nitroblau Tetrazolium DMF	100 mg/ml 70 %	Lichtempfindlich
	BCIP	5'Bromo4'Indolyl- phosphat Toluidin Salz DMF	50 mg/ml 100 %	Lichtempfindlich
	Transformation (<i>S. cerevisiae</i>)	Lösung B	PEG 1000 Bicin pH 8,35	40 % (w/v) 200 mM
RFII		MOPS RbCl $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ Glycerin	10 mM 10 mM 75 mM 15 %	Autoklavieren
Westernblot	Blotpuffer 1 x	Tris Glycin Methanol	29 mM 192 mM 20 %	
	Coomassie	Serva Blue Essigsäure Methanol	0,1 % 10 % 25 %	
	Ponceau S	Ponceau S TCA	0,2 % 3 %	

	TBS 1 x	Tris-HCl pH 7,5 NaCl	10 mM 150 mM	
	TNT 1 x	Tris-HCl pH 7,5 NaCl Tween 20	20 mM 500 mM 0,05 %	
Zellyse	Lysozym	Lysozym	4 mg/ml	Steril filtrieren

3.8 Verwendete Antikörper

Die für die Versuche verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 3.10 dargestellt. Angegeben sind neben der Bezeichnung des Antikörpers die Spezies aus der der Antikörper gewonnen wurde, die verwendete Verdünnung für den Immunoblot sowie die Quelle, über die der Antikörper bezogen wurde.

Tabelle 3.10: Verwendete Antikörper

Angegeben sind die verwendeten Antikörper mit der Spezies aus der sie gewonnen wurden, der in dieser Arbeit eingesetzten Verdünnung, der Wellenlänge, mit der die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt wurden sowie der Bezugsquelle.

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti Crr	Kaninchen	1 : 1.000	Dr. Pineda Antikörperservice
Anti Flag	Kaninchen	1 : 2.000	Rockland
Anti GFP	Maus (monoklonal)	1 : 2.000	Roche
Anti GFP	Kaninchen (polyklonal)	1 : 1.000	Roche
Anti HA	Maus	1 : 1.000	Anja Lorberg
Anti HA	Ratte	1 : 2.000	Roche
Anti Maus (780/680)	Ziege	1 : 5.000	LI-COR
Anti Penta His	Maus (monoklonal)	1 : 2.000	Qiagen
Anti Ratte (780)	Ziege	1 : 5.000	Rockland
Anti Kaninchen (680)	Ziege	1 : 5.000	LI-COR

3.9 Radioaktiv markierte α -Methyl-Glukose

Für einen Transporttest wurde im Rahmen dieser Arbeit ^{14}C markierte α -Methyl-Glukose verwendet (α -MG, s. Kapitel 4.6.2). Sie wurde von PerkinElmer (Rodgau) bezogen. Die wichtigsten Eigenschaften sind nachfolgend angegeben. Als Arbeitslösung wurde in der Regel eine 1 : 30 Verdünnung der Stocklösung verwendet.

Tabelle 3.11: Radioaktiv markierte α -Methyl-Glukose

Angegeben sind die Eigenschaften der von PerkinElmer bezogenen und in dieser Arbeit verwendeten ^{14}C -markierten α -Methyl-Glukose. Alle Angaben beziehen sich auf die Stocklösung.

Bezeichnung	Eigenschaft
Name	Pyranoside, Methyl (α -D-Glukose) [$\text{U-}^{14}\text{C}$]
Bezugsquelle	PerkinElmer (Rodgau) / Hartmann Analytic
Radioaktiv markiertes Isotop	^{14}C
Molekulargewicht	195,8 g/l
Konzentration	2 mM
Radioaktive Zerfallsrate	0,1 mCi/ml = $2,22 \times 10^8$ cpm/ml (lt. Herstellerangaben) Bzw. $3,2 \times 10^8$ cpm/ml (Nachgemessen)
Reinheit	99,4%
Spezifische Aktivität	50,0 mCi/mmol (lt. Herstellerangaben) 3,7 MBq/500 μ l (lt. Herstellerangaben) Bzw. 1050 kBq/500 μ l (Nachgemessen)
Lagerung	-20 °C

3.10 Restriktionsenzyme, Polymerasen und Ligasen

Von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main) und der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) wurden Restriktionsenzyme verwendet. Die Nomenklatur der Restriktionsenzyme richtet sich nach Roberts et al. (Roberts et al., 2003). Polymerasekettenreaktionen wurden mit „HotStarTaq Plus DNA Polymerasen“

von Qiagen (Düsseldorf) oder der „Immolase“ von Bioline (Luckenwalde) durchgeführt. Für die Mutagenese-PCR wurde eine Polymerase aus dem „Phusion Hot Start“ Kit von NEB oder aus dem „QuickChange Site-Directed Mutagenesis“ Kit von Agilent Technologies benutzt. Für Ligationen wurde die „T4 DNA Ligase“ von Fermentas (St. Leon - Rot) eingesetzt.

3.11 Kits für molekulargenetische Anwendungen

Für verschiedene Methoden wurden Kits der Firmen Qiagen (Düsseldorf), Promega (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot), NEB (Frankfurt am Main), r-Biopharm (Darmstadt), Biorad (München), Ambion (Darmstadt), Milteny Biotec (Bergisch Gladbach), Roche (Grenzach-Wyhlen), Agilent Technologies (Waldbronn) und Invitrogen (Darmstadt) verwendet. Die Kits sind in Tabelle 3.12 angegeben.

Tabelle 3.12: Verwendete Kits für molekulargenetische Anwendungen

Angegeben sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits mit Angabe des Herstellers und der Verwendung in dieser Arbeit.

Kit	Hersteller	Verwendung
μMACS His Tagged Protein Isolation Kit, human	MACs Molecular/ Milteny Biotec	Co-Immunopräzipitation
2 x Biorad iQ SYBR Green Supermix	Biorad	RT-PCR
D-Glukose UV-Test zur Bestimmung von D-Glukose in Lebensmitteln und anderen Probematerialien	r-Biopharm/ Boehringer Mannheim	Glukose-Bestimmung
DNeasy Blood & Tissue (Purification of total DNA from animal blood or cells, spin column)	Qiagen	Isolierung von chromosomaler DNA
Essigsäure (Acetat) UV-Test zur Bestimmung von Essigsäure in Lebensmitteln und anderen Probematerialien	r-Biopharm/ Boehringer Mannheim	Acetatbestimmung
GeneJET PCR Purification Kit	Fermentas	Reinigung von PCR-Fragmenten
Labeling Kit	Roche	Markieren der Sonde für Southernblot
Laktose/D-Glukose UV-Test zur Bestimmung von Laktose und D-Glukose in Lebensmitteln und anderen Probematerialien	r-Biopharm/ Boehringer Mannheim	Glukose- und Laktose-Bestimmung
Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2 x)	Fermentas	RT-PCR
MinElute Gel Extraction	Qiagen	Reinigung von DNA aus Gelfragmenten
Ni-NTA Spin Columns	Qiagen	Proteinreinigung
pGEM-T Vector System	Promega	pGEM-T Klonierung
Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit	NEB	Mutagenese PCR
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen	Isolierung von Plasmiden
Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (*2-1000 ng*)	Invitrogen	DNA-Konzentrations-Bestimmungen
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Agilent Technologies	Mutagenese PCR
Revert Aid H Minus cDNA Synthesis Kit	Fermentas	cDNA Synthese
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Isolierung von gesamt RNA
Turbo DNA-free Kit	Ambion	DNase Verdau
Wizard PCR Preps DNA Purification System	Promega	Reinigung von PCR-Fragmenten

3.12 Geräte und Verbrauchsmaterial

Häufig verwendete Geräte sind in der nachfolgenden Tabelle 3.13 dargestellt.

Tabelle 3.13: Häufig verwendete Geräte

Aufgelistet sind die häufig verwendeten Geräte mit Angabe des jeweiligen Herstellers.

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammern und Zubehör (Agagel Maxi)	Biometra
Analyse-und Feinwaage	Sartorius
Automatische Pipette	Gilson, Eppendorf
Dialyseschlauch 20/32	Serva
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Fluorimeter Fluostar Optima	BMG
Fotokammer für Agarosegele	LTF-Labortechnik
Heizrührer, Magnetrührer	Heidolph
High performance chemiluminescence Film	GE Healthcare
Hypercasette TM	Amersham pharmacia biotech
Kamin für Transporttests	Eigenbau
Kühl-Brutschrank	WTC Binder
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0	Thermo Scientific
Membranfilter für Transporttest, 65µm Porengröße	Millipore
MilliQ-Anlage	Millipore
Odyssey Scanner (Infrared Imaging System)	LI-COR
PCR-Gerät (T-Personal und T-Gradient)	Biometra
Pipetboy	Integra Biosciences
Power supply	Biometra, Bio-Rad
Qubit Fluorometer	Invitrogen
Röntgenfilm Entwicklermaschine Konica SRX-101A	Konica
RT-PCR-Gerät Icycler	Biorad
Schüttelwasserbad (Gyrotory Water bath shaker)	New Brunswick Scientific
Schüttler (Duomax 1030)	Heidolph
SDS - Gelkammern und Zubehör	Bio-Rad
Spektralphotometer UV-Vis	Shimadzu
Szintillationszähler (Liquid Scintillation Analyzer 1600TR) und Szintillationsflüssigkeit	Canberra Packard (Illinois)
Thermoblock	Eppendorf
Tischzentrifuge Hettich SL80	Jürgens
Tischzentrifuge Pico17	Thermo Electron Corp.
Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell	Bio-Rad
Ultrazentrifuge Optima MAX-XP	Beckman
Vortex-Genie 2	Jürgens
Zentrifuge Allegra X-22R	Beckman Coulter
Zentrifuge Sorvall Evolution RC	Thermo Scientific

Verbrauchsmaterialien wie Glaswaren wurden u.a. von Schott (Mainz) bezogen. „Falcontubes“ und Pipettenspitzen wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) verwendet. Eppendorfprobengefäße stammten u.a. von Trefflab (Degersheim) und andere Plastikwaren u.a. von der Firma Brandt (Gießen). Weitere Verbrauchsmaterialien stammten u.a. von Greiner Bio-one (Solingen), Süd-Laborbedarf (Gauting), Neolab (Heidelberg), Invitrogen (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Li-cor (Bad Homburg), Merck (Darmstadt), GE Healthcare (Freiburg), Serva (Heidelberg) und Omnilab (Bremen).

3.13 Software, Datenbanken und Internetrecherche

Zur Auswertung und Analyse der Versuche wurden einige Softwareprogramme (s. Tabelle 3.14) und Internetdatenbanken (s. Tabelle 3.15) verwendet. Die Wichtigsten sind in den beiden folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 3.14: Software

Angegeben ist die für die Auswertung und Bearbeitung der Versuche verwendete Software.

Software	Anbieter	Verwendung
BioCapt Color Version 99.03s for Windows (1999)	Vilber Lourmat	Geldokumentation
Chromas Version 2.13 (1998-2001)	Technelysium Pty Ltd	Sequenzanalyse
Clone manager 9 Professional Edition (1994-2007)	Scientific & Education Software	Virtuelle Klonierungen, Sequenzanalysen, etc.
Clustal X	http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/	Multiple Sequenzvergleiche
Corel Draw 12 Version 12.0.0.458 (2003)	Corel Corporation	Bildbearbeitung
Genedoc Version 2.5.000 (1999)	Karl Nicholas (www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml)	Multiple Sequenzvergleiche
Huygens Essential for Linux 3.7.Op3 (2001-2011)	Scientific Volume Imaging B.V.	Dekonvolution von Fluoreszenzbildern
Icycler	Biorad	RT-PCR Auswertung
Irfan View for Windows Version 4.27 (1996-2010)	Irfan Skiljan, Graduate of Vienna University of Technology	Bildbearbeitung
Metamorph Version 6.2r6 (1992-2004)	Universal Imaging Corp.	Fluoreszenzmikroskopie, Bildbearbeitung
Microsoft Office Paket 2007	Microsoft	Text-, Tabellen-, Präsentationsverarbeitung
Odyssey Application Software Version 2.1.12 (2003-2006)	LI-COR	Dokumentation, Analyse und Quantifizierung von Westernblotmembranen
Origin Version 6.1 (1991-2000)	OriginLab Corporation	Tabellenverarbeitung
QbasePLUS 2.0 (2008-2011)	Biogazelle	RT-PCR Auswertung

Tabelle 3.15: Datenbanken und Internetsoftware

Angegeben sind häufig verwendete Internetseiten und Internetprogramme, die für diese Arbeit relevant waren.

Bezeichnung	Internetseite	Verwendung
Clustal W	http://align.genome.jp/	Multiple Sequenzvergleiche
Ecocyc	http://www.ecocyc.com/	Datenbankrecherche <i>E.coli</i>
Graphical Codon Usage Analyzer	http://gcu.schoedl.de/	Vergleich der „Codon usage“
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Datenbankrecherche, Blast, Sequenzvergleiche
Proteincalculator	http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html	Proteinanalysen
SRD	http://www.srd-biotec.de/full-service-seq.php	Sequenzierungen
Thermo Scientific	http://www.thermo.com/com/cda/landingpage/0,10255,2628,00.html	Primer Bestellungen

4 Methoden

Im folgenden Abschnitt sind alle häufig verwendeten Methoden angegeben. Sie sind unterteilt nach allgemeinen Methoden zur Anzucht und zum Wachstum von Bakterien, nach genetischen und biochemischen Methoden. Außerdem sind Methoden zur Arbeit mit DNA und mit Proteinen angegeben sowie bioinformatische und fluoreszenzmikroskopische Analysen.

4.1 Anzucht und Wachstum von Bakterien

4.1.1 Bakterienanzucht und Bestimmung der Zellzahl

Soweit nicht anders angegeben wurden die verwendeten Bakterienstämme aerob bei 37 °C im Schüttelwasserbad oder auf einem Schüttler im Brutschrank kultiviert. Die Anzucht von Stämmen mit temperatursensitiven Vektoren erfolgte bei 30 °C auf einem Schüttler.

Die Bestimmung der Zellzahl im Flüssigmedium erfolgte durch photometrische Absorptionsmessung im Spektralphotometer. Die Messung wurde bei Verwendung von Vollmedium (LB₀) bei einer Wellenlänge von 650 nm durchgeführt. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 bei 650 nm (OD₆₅₀ = 1) einer Zelldichte von 1 x 10⁹ Bakterien/ml. Wurde ein Minimalmedium (MM) verwendet, erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 420 nm. In diesem Fall entspricht eine OD₄₂₀ = 1 einer Bakteriendichte von 5 x 10⁸ Bakterien/ml.

4.1.2 Wachstumsanalysen und Bestimmung der Generationszeit

Um Bakterienstämme mit unterschiedlichen Genotypen in ihrem Wachstumsverhalten unter bestimmten Bedingungen (z.B. limitierte Kohlenstoffquelle, Stressbedingungen) miteinander vergleichen zu können, wurden Wachstumskurven aufgestellt.

Wenn nicht anders angegeben, wurde für eine Wachstumskurve eine Vorkultur in 5 ml LB₀ mit entsprechenden Antibiotika angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für Wachstumskurven in Minimalmedium wurde die Vorkultur anschließend in 5 ml Minimalmedium mit entsprechender Kohlenstoffquelle überimpft und wiederum bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden dann in 10 ml frisches Medium (LB₀ oder Minimalmedium mit entsprechender Kohlenstoffquelle und Antibiotika) zu einer OD₆₅₀ = 0,1 (LB₀) bzw. OD₄₂₀ = 0,1 (MM) angeimpft. Die Inkubation wurde in einem Kolben (100 ml) bei 37 °C im Schüttelwasserbad durchgeführt. Nach einer Verdopplung (OD₆₅₀/OD₄₂₀ = 0,2) wurden die Kulturen, sofern nicht anders vermerkt, induziert (mit IPTG bzw. Arabinose), bzw. Stress ausgesetzt (mit α-Methyl-Glukose).

Die Bestimmung der Wachstumsrate erfolgte durch regelmäßige Messung der Absorption im Spektralphotometer für sechs bis acht Stunden. Die letzte Messung fand in der Regel nach Inkubation über Nacht statt. Zur Übersicht des Wachstumsverhaltens wurde in Wachstumskurven die optische Dichte halbbl logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Bestimmung der Generationszeit erfolgte nach Formel 4.1 und Formel 4.2 aus dem Bereich des exponentiellen Wachstums (lineare Kurve, nach Induktion bzw. Stress).

$$\text{Wachstumsrate } \mu = \frac{\log x_1 - \log x_0}{t_1 - t_0} \cdot 2,3 \text{ [h}^{-1}\text{]}$$

Formel 4.1: Berechnung der Wachstumsrate μ

Mit x_1 = OD höherer Wert in exponentieller Wachstumsphase (lineare Kurve), x_0 = OD niedrigerer Wert in exponentieller Wachstumsphase (lineare Kurve), t_1 = Zeitpunkt entsprechend zu x_1 , t_0 = Zeitpunkt entsprechend zu x_0 .

$$\text{Generationszeit } g = \frac{\ln 2}{\mu} \text{ [h]}$$

Formel 4.2: Berechnung der Generationszeit g

Mit μ = Wachstumsrate (s. Formel 4.1).

4.1.3 Wachstumskurven mit zwei Kohlenstoffquellen (Diauxie)

Das Wachstumsverhalten von verschiedenen Bakterienstämmen lässt sich besonders gut in Wachstumskurven untersuchen, wenn zwei verschiedene Kohlenstoffquellen angeboten werden. In diesem Fall nehmen die Zellen zunächst die für sie besser zu verstoffwechselnde Kohlenstoffquelle auf. Bei Wachstumskurven von Wildtypzellen in Minimalmedium mit Glukose und Laktose wird zunächst die Glukose verwendet und dann die Laktose. Der Stamm zeigt eine so genannte Diauxie. Wird dagegen erst die vermeintlich schlechtere Kohlenstoffquelle, die Laktose, aufgenommen, so spricht man von einer reversen Diauxie.

Für die Wachstumskurve wurde eine Übernachtkultur in Minimalmedium mit 0,2 % Glycerin angesetzt. Die Anzucht der Zellen für die Wachstumskurve erfolgte in 15 ml Minimalmedium mit 0,05 % Glukose und 0,05 % Laktose bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Wenn erforderlich erfolgte eine Induktion der Zellen mit IPTG zu Beginn der Wachstumskurve. Für die Bestimmung des Wachstums wurde jede Stunde die optische Dichte OD_{420} gemessen. Zur Bestimmung der verbrauchten Kohlenstoffe wurden zudem 300 μ l Probe entnommen, abzentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung des Glukose- und Laktose-Gehalts verwendet. Die Bestimmung erfolgte mit dem „Laktose/D-Glukose“ Kit von r-Biopharm nach Angaben des Herstellers, allerdings in einem Drittel der angegebenen Volumina.

Außerdem wurde jede Stunde der EIIA^{Glc}-Phosphorylierungsgehalt bestimmt. Dafür wurde ein kaltes Probengefäß mit 20 μ l NaOH (10 N) vorgelegt. Dazu wurden 200 μ l der Probe gegeben und die Zellen durch starkes Schütteln aufgeschlossen. 180 μ l Natriumacetat (3 M, pH 5,2) wurden ebenfalls zugegeben und erneut geschüttelt. Abschließend erfolgte eine Zugabe von 1 ml Ethanol (100 %) und die Probe wurde für mindestens 15 min bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurde die Probe wieder aufgetaut und abzentrifugiert (12.000 g, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 70 %igem Ethanol gewaschen und der Überstand abschließend vollständig abpipettiert. Für den anschließenden Westernblot wurde das Pellet in ddH₂O resuspendiert. Hier richtete sich die Menge nach der optischen Dichte der Kultur, bei der die Probe entnommen wurde (s. Formel 4.3). Die gleiche Menge 2 x SDS-Probenpuffer wurde zugegeben (s. Formel 4.3) und die Probe ohne Erhitzen für einen Westernblot eingesetzt. Der Immunoblot (s. Kapitel 4.5.2) erfolgte mit einem primären Anti-Crr Antikörper (1 : 1.000 Verdünnung) und einem sekundären Anti-Rabbit Antikörper (1 : 5.000).

$$\text{Resuspendierungsvolumen} = \frac{OD_{420} \cdot 150}{2} \text{ [\mu l]}$$

Formel 4.3: Berechnung des Volumens für die Resuspendierung

Berechnet wird das OD-abhängige Volumen, welches für die Resuspendierung in ddH₂O für einen Westernblot benötigt wird.

4.1.4 Wachstumskompetitionsversuche

In Wachstumskompetitionsversuchen kann das Wachstumsverhalten zweier Stämme direkt miteinander verglichen werden und so z.B. bestimmt werden, ob ein Stamm einem anderen gegenüber Wachstumsvor- oder Nachteile zeigt. Dafür wurden die beiden Stämme gemeinsam in einem Kolben angezogen. Die Unterscheidung der Stämme erfolgte, wie im Ergebnisteil (s. Kapitel 5.2) beschrieben, mit Hilfe von MacConkey Sucrose Platten.

Die beiden Stämme wurden zunächst getrennt voneinander in Voll- oder Minimalmedium mit Glycerin oder Glukose als Übernachtskultur angezogen. Sie wurden dann wiederum einzeln in den entsprechenden Medien zu einer $OD_{420}/OD_{650} = 0,05$ angeimpft. Davon ausgehend wurden 1 : 1 Mischungen der Stämme in den jeweiligen Medien hergestellt. Die Anzucht der Kulturen erfolgte über Nacht bei 37 °C im Schüttelkolben. Über mehrere Tage wurden die Kulturen jeden Tag in frisches Medium überimpft und erneut bei 37 °C über Nacht inkubiert. Außerdem wurden jeden Tag aus einer Teilkultur Verdünnungsreihen erstellt, von denen jeweils zweimal 100 µl der 10^{-5} (MM) bzw. der 10^{-6} (LB₀) Verdünnung auf den entsprechenden Selektionsplatten (McC Scr) ausplattiert wurden. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C konnten die roten und weißen Kolonien ausgezählt und das Verhältnis zueinander bestimmt werden.

4.1.5 Glycerinkulturen

Für die Stammsammlung im Labor wurden Dauerkulturen zur längeren Aufbewahrung angelegt. Dafür wurden die Zellen über Nacht in 10 ml Slant Medium (ggf. mit Antibiotikum) angezogen. Die gesamte Kultur wurde am nächsten Tag abzentrifugiert, das Pellet in 4 ml Slant 50 : 50 Medium resuspendiert und in zweimal 2 ml Portionen in getrennten Kühlschränken bei -20 °C aufbewahrt.

4.2 Genetische Methoden

4.2.1 Klonierung von Plasmiden

Die Klonierung von Plasmiden stellt eine essentielle Grundlage in der Genetik dar. Alle in dieser Arbeit klonierten und verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurde für die Klonierung eines Gens aus dem *E.coli*-Chromosom DNA aus LJ110 bzw. MG1655 mit Hilfe der Mikrowellen Methode gewonnen (s. 4.4.2.1) und für eine PCR (s. Kapitel 4.4.13) mit den entsprechenden Primern aus Tabelle 3.5 eingesetzt. Als Template-DNA konnte unter Umständen auch Plasmid-DNA verwendet werden. Im Anschluss an die PCR wurde das PCR-Produkt gereinigt (s. 4.4.13.4) und entweder direkt in pGEMT (s. 4.4.10) ligiert oder mit Restriktionsenzymen entsprechend der Klonierungsstrategie geschnitten (s. Kapitel 4.4.7). In diesem Fall wurde der gewünschte Vektor mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt. Geschnittenes PCR-Produkt und geschnittener Vektor wurden gegebenenfalls über eine präparative Agarosegelelektrophorese (s. 4.3.1.2) aufgetrennt und entsprechend aufgereinigt oder einer Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme unterzogen und direkt ligiert (s. 4.4.9). Die so gewonnenen Vektoren mit gewünschtem Insert (pGEMT-Insert oder Vektor-Insert) wurden dann in JM109 transformiert (s. 4.2.5.2). Von Einzelkolonien wurden Flüssigkulturen angesetzt und die Plasmide isoliert (s. Kapitel 4.4.1). Die Plasmide wurden erneut durch Restriktion und Vergleichen mit entsprechenden „Clonefiles“ sowie durch Sequenzierung (s. 4.4.11) kontrolliert. Die kontrollierten und fehlerfreien Plasmide wurden dann für verschiedene Versuche innerhalb dieser Arbeit eingesetzt.

4.2.2 Stammkonstruktion

Die Konstruktion von neuen Bakterienstämmen mit veränderten Geno- und Phänotypen ist eine weitere Grundlage der Genetik. In dieser Arbeit wurden verschiedene Stämme konstruiert, welche alle in Tabelle 3.1 angegeben sind. Die Konstruktion der Stämme bezog sich in der Regel auf die Erstellung von Deletionsmutanten (s. Kapitel 4.2.3) oder auf die Veränderung des Genotyps durch Einführen einer Kassetten aus einem anderen Stamm durch P1-Transduktion (s. Kapitel 4.2.4). Alle Stämme wurden durch Kontroll-PCRs, Sequenzierung und Markertests auf die Richtigkeit des Geno- und Phänotyps überprüft.

4.2.3 Erstellung einer Deletionsmutante

Ein Gen im *E.coli*-bChromosom durch eine Resistenzkassette oder ein anderes Gen zu ersetzen und damit gegebenenfalls zu deletieren, ist eine wichtige Methode, um die Funktion von Genen und den damit verbundenen Proteinen zu untersuchen. Im Jahr 2000 stellte die Arbeitsgruppe von B. Wanner eine Methode vor, die die Erstellung einer solchen Deletionsmutante ermöglicht (Datsenko und Wanner, 2000). Dafür wird ein mit Arabinose induzierbarer, temperatursensitiver Vektor verwendet, der das so genannte Lambda-Red-Rekombinasesystem kodiert (pKD46) und ein Stamm, der in der Lage ist, lineare DNA-Fragmente kurzzeitig in der Zelle zu halten (BW25113). Die grundlegende Strategie basiert auf dem Austausch einer chromosomalen Sequenz durch ein wählbares Antibiotika-Resistenzgen, welches durch PCR mit Primern generiert wurde, die ca. 36 Nukleotide lange, zum zu deletierenden Gen homologe, Verlängerungen an beiden Enden der Resistenzkassette erzeugten (H1 und H2, s. Abbildung 4.1). Durch Transformation dieses linearen PCR-Fragments und gleichzeitige Expression des Lambda-Red-Rekombinase-Systems kann die Resistenzkassette durch Lambda-Red vermittelte homologe Rekombination anstelle des zu deletierenden Gens ins Chromosom eingebracht werden (Datsenko und Wanner, 2000). Nach dem gleichen Prinzip kann ein Gen gegen ein anderes ausgetauscht werden.

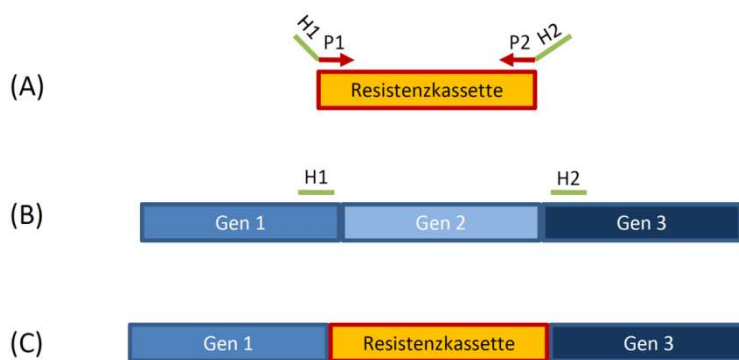


Abbildung 4.1: Konstruktion einer Deletionsmutante

Gezeigt ist die Konstruktion einer Deletionsmutante nach Wanner. Mit: (A) PCR Amplifikation der Resistenzkassette mit zum Chromosom homologen Sequenzen H1 und H2, (B) Chromosomaler Stammhintergrund mit dem zu deletierenden Gen 2 und den H1 und H2 Sequenzen für die Homologe Rekombination mit dem Lambda-Red-System, (C) Chromosomale Region nach Austausch von Gen 2 durch die Resistenzkassette mit Hilfe der Homologen Rekombination [Nach Datsenko et al. (Datsenko und Wanner, 2000)]

Die Erstellung einer Deletionsmutante erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Datsenko et al. (Datsenko und Wanner, 2000). Es wurden die in der Veröffentlichung angegebenen Stämme (BW25113/pKD46) und Plasmide (pKD4 und pKD3) verwendet. Zur Amplifikation der Resistenzkassette wurde eine PCR mit entsprechenden Primern und Ausgangsvektoren (pKD3 bzw. pKD4) durchgeführt. Dadurch wurde ein PCR-Fragment erhalten, das ein Resistenzgen sowie zum zu deletierenden Genabschnitt (u.a. *sgrRST*) komplementäre flankierende Bereiche trug.

Die Erstellung einer Mutante mit einem chromosomal kodierten $EIICB^{Glc}$ -His, bzw. einem *ptsGHis* unter der Kontrolle des *tac*-Promotors im Chromosom, erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Es wurde ein speziell für die homologe Rekombination gefertigtes Plasmid (s. Kapitel 5.2) verwendet.

Nach der PCR mit oben genannten Voraussetzungen wurde das erhaltene PCR-Produkt mit dem entsprechenden Kit von Promega bzw. Fermentas gereinigt, um Primer, Puffer, Polymerase etc. zu entfernen. Dann wurde ein DpnI-Verdau durchgeführt (PCR Ansatz + 1 μ l DpnI, Inkubation 1 Std. bei 37 °C), um die methylierte Ausgangs-DNA zu entfernen. Es folgte eine anschließende Hitzeinaktivierung des Enzyms durch Inkubation bei 80 °C für 20 min sowie eine Ethanolfällung zur Ankonzentration der DNA (s. Kapitel 4.4.14). Vor der Transformation wurde das Pellet in 8 μ l ddH₂O resuspendiert.

Für die Transformation der Resistenzkassette wurde der Stamm BW25113/pKD46 verwendet. Die Herstellung kompetenter Zellen dieses Stammes wurde im Wesentlichen nach der unter Kapitel 4.2.5 beschriebenen Anweisung für chemisch kompetente Zellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode durchgeführt. Einen Unterschied zum allgemeinen Protokoll stellte jedoch die Anzucht der Vorkultur und der kompetenten Zellen dar, die in LB₀ mit Ampicillin und 10 mM Arabinose bei 30 °C erfolgte (pKD46 ist temperatursensitiv, das Lambda-Red-Rekombinase-System durch Arabinose induzierbar).

Die Transformation der Resistenzkassette in die kompetenten Zellen erfolgte in Anlehnung an das Standardprotokoll (s. Kapitel 4.2.5). Transformiert wurden 3-8 µl der Resistenzkassette und der Schritt der phänotypischen Expression bei 37 °C erfolgte mit zusätzlicher Zugabe von 10 mM Arabinose. Abschließend wurden die Zellen abweichend zu dem in Kapitel 4.2.5 angegebenen Protokoll in 400 µl LB₀ resuspendiert. 200 µl davon wurden direkt auf eine Selektionsplatte mit Ampicillin ausplattiert, die übrigen 200 µl für 24 Stunden bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubiert und erst dann auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurden die Kolonien mittels Markertest und PCR auf die Deletion des Gens und Einführung der Resistenzkassette bzw. den Austausch gegen ein modifiziertes Gen überprüft. Um die Deletion des Gens in einen anderen Stammhintergrund zu übertragen, wurde die P1-Transduktion verwendet.

4.2.4 P1-Transduktion

Durch die Transduktion mit dem lytischen Bakteriophagen P1kc können selektionierbare Wirts-DNA-Sequenzen von einem Bakterienstamm in einen anderen übertragen werden. Man nutzt diese Methode, um z.B. eine Deletionskassette mit einer Antibiotikaresistenz in einen anderen Stammhintergrund zu übertragen. Dabei werden Genabschnitte von bis zu 100 kb transduziert, sodass auch benachbarte Genabschnitte von Resistenzkassetten weitergegeben werden. Nach der Infektion beginnt der Phage neben der Produktion neuer Phagenpartikel auch mit der Zerkleinerung des Wirtsgenoms. Durch zufällige (fehlerhafte) Verpackung bakterieller DNA-Fragmente (ca. 100 kb) in die neu entstehende Phagenhülle (in etwa 0,1 % der Fälle) entstehen so genannte transduzierende P1-Partikel, die noch infektiös sind, aber nicht mehr vermehrungsfähig. Solche P1-Partikel können die Bakterien-DNA nach Adsorption an einer anderen Bakterienzelle in diese injizieren, sodass es zu einer Duplikation des betreffenden Abschnitts des Wirtszellgenoms in der Rezipientenzelle kommt. Durch homologe Rekombination kann dieser Bereich ins Genom der Rezipientenzelle rekombinieren und den ursprünglichen Bereich ersetzen.

Die Durchführung der P1-Transduktion erfolgte nach einer von Lengeler (Lengeler, 1966) abgewandelten Methode nach Arber (Arber, 1960). Die gesamte P1-Transduktion gliedert sich in drei Abschnitte, die Erstellung eines Plattenlysates (Herstellung der transduzierenden P1-Partikel), die Titerbestimmung dieses Lysates (Bestimmung der Anzahl an Phagen pro Milliliter Lysat) und die abschließende eigentliche Transduktion (Übertragung der Deletionskassette bzw. des genetischen Markers in einen neuen Stammhintergrund). Die einzelnen Teilabschnitte sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.2.4.1 Herstellung des P1-Plattenlysates

Zur Herstellung des P1-Plattenlysates wurde zunächst eine Übernachtskultur in 5 ml LB Medium des Stammes angezogen, aus welchem das P1-Lysat gewonnen werden sollte, d.h. von dem Stamm mit der Deletionskassette bzw. dem genetischen Marker. 250 µl dieser Kultur wurden mit 2,5 ml P1-Weichagar und 200 µl eines Starterlysates (evtl. verdünnt auf 5×10^9 P1-Phagen/ml) in einem Zentrifugenröhrchen vermischt und auf eine vorgewärmte (37 °C) LB Platte geschichtet. Zusätzlich wurden zwei Kontrollen angefertigt, eine mit Weichagar und Bakterien und eine zweite mit Weichagar und Phagen. Die Platten wurden, ohne sie zu invertieren, bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis eine konfluente Lyse der Bakterien erreicht war (nach ca. 4-6 Std). Dann wurde die Platte mit 3 ml LB Flüssigmedium überschichtet. Zusammen mit dem Flüssigmedium wurde anschließend der Weichagar von der Platte abgenommen und in ein

Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 0,5 ml Chloroform (Trichlormethan) wurde das Phagengemisch für 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Dadurch bildeten sich drei Schichten im Zentrifugenröhrchen, unten das Chloroform, in der Mitte eine Schicht mit Weichagar und Bakterien und darüber das gewünschte Phagenlysate. Dieses wurde vorsichtig abpipettiert und im Pyrexröhrchen mit zwei bis drei Tropfen Chloroform zur Abtötung der restlichen Bakterien im Kühlschrank aufbewahrt.

4.2.4.2 Titerbestimmung des Phagenlysates

Für die Titerbestimmung des im vorigen Abschnitt beschriebenen Lysates wurde als erstes eine Übernachtskultur der zu transduzierenden Bakterien in 5 ml LB Medium angezogen. Diese wurde in einer 1 : 5 Verdünnung als Indikator zur Bestimmung des Phagentiters verwendet. Von dem Phagenlysate wurden eine 10^{-6} und eine 10^{-7} Verdünnung in LB Medium hergestellt. Hiervon wurden jeweils 100 μ l mit 250 μ l der Indikatorbakterien (1 : 5 vorverdünnt) und 2,5 ml Weichagar gemischt und auf eine vorgewärmte LB Platte geschichtet. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C und die entstandenen Plaques konnten am nächsten Tag ausgezählt werden. Die Anzahl der Phagen pro Milliliter im Lysate berechnete sich nach der Formel 4.4.

$$\frac{\text{Phagen}}{\text{ml}} = \text{Anzahl der Plaques} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 10$$

Formel 4.4: Berechnung der Phagen pro Milliliter

Die Formel gibt die Anzahl der Phagen pro Milliliter Phagenlysate an.

4.2.4.3 P1-Transduktion

Für die eigentliche P1-Transduktion wurde wiederum eine Übernachtskultur der zu transduzierenden Bakterien in LB Medium benötigt. Diese wurde 1 : 5 in LB Medium verdünnt (ca. 8×10^8 Bakterien/ml) und 800 μ l davon mit 200 μ l Phagenlysate (evtl. verdünnt auf 1×10^9 Phagen/ml) gemischt. Der MOI-Wert (engl. „multiplicity of infection“), d.h. die Anzahl der Phagen pro Bakterium, sollte für eine optimale Transduktion ungefähr bei 1 liegen. Als Kontrollen wurden zusätzlich Bakterien mit LB Medium (statt Phagen) und Phagen mit LB (statt Bakterien) gemischt und auf die gleiche Weise weiter behandelt. Die Gemische wurden bei 37 °C im Wasserbad genau 20 min ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zum Abstoppen der Reaktion zweimal in je 5 ml Citrat-Saline gewaschen. Citrat bindet Ca^{2+} Ionen und verhindert somit die Ca^{2+} abhängige (Re-)Adsorption der neuen Phagen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 200 μ l Citrat-Saline aufgenommen und auf Selektionsplatten (LB_0 mit Antibiotikum der Resistenzkassette) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die erhaltenen Transduktanten wurden gereinigt, einem Markertest unterzogen und mittels PCR auf die Deletion des gewünschten Gens überprüft.

4.2.5 Kompetente Zellen und Transformation

Die Transformation bezeichnet die Aufnahme freier DNA von einem Bakterium. In der Genetik wird die Transformation zum Einbringen fremder DNA in Bakterien genutzt. Dabei wird zunächst die negativ geladene fremde DNA durch positive Ionen in der Pufferlösung und Inkubation auf Eis an die ebenfalls negativ geladene Zellmembran der Bakterien angelagert. Durch einen kurzzeitigen Hitzeschock bei 42 °C wird die Zellmembran der Bakterien durchlässig für die fremde DNA. Bei der anschließenden so genannten phänotypischen Expression wird die aufgenommene fremde DNA in der Zelle etabliert. Für die Transformation von *E.coli*-Zellen ist es notwendig, die Aufnahmebereitschaft, die so genannte Kompetenz, der Bakterien für Fremd-DNA künstlich zu induzieren.

4.2.5.1 Präparation chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte mittels der Rubidium-Chlorid-Methode nach Hanahan (Hanahan, 1983). Hierzu wurde zunächst eine Vorkultur in 5 ml LB₀ Medium angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Zellen in 20 ml frisches LB₀ Medium überimpft (1 : 100 Verdünnung) und wieder bei 37 °C aerob inkubiert, bis eine OD₆₅₀ = 0,5 bis 0,8 erreicht war. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in der Hälfte des Ausgangsvolumens kalter Lösung A resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in einem halben Ausgangsvolumen kalter Lösung B resuspendiert und für 30 min auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte eine weitere Zentrifugation und das Resuspendieren des Pellets in 1/10 Ausgangsvolumen kalter Lösung B. Die Zellen wurden in 200 µl Portionen aliquotiert und nach Zugabe von 40 % Glycerin bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.5.2 DNA Transformation chemisch kompetenter Zellen

Für die Transformation chemisch kompetenter Zellen wurden 200 µl kompetente Zellen zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Die gesamte Zellsuspension wurde anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt und in der Regel mit 2-15 µl Plasmid-DNA bzw. einem kompletten Ligationsansatz (20 µl, s. Kapitel 4.4.9) versetzt. Für 1 Stunde erfolgten dann eine Inkubation auf Eis und ein anschließender, 90-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad. Eine erneute Inkubation auf Eis für 5 min folgte. Für die phänotypische Expression wurden 3 ml LB₀ Medium (ohne Antibiotika) zugegeben und die Zellen für 1 Stunde bei 37 °C im Roller inkubiert. Die abzentrifugierten und in 200 µl LB₀ Medium resuspendierten Zellen wurden abschließend auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann eine Reinigung der Zellen durch Einzelkoloniausstriche auf einer weiteren Selektionsplatte.

4.2.6 Kompetente Zellen und Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation bezeichnet auch bei *S.cerevisiae* die Aufnahme freier DNA. In der Genetik wird sie genutzt, um die Zellen zur Aufnahme von Plasmiden zu bringen. Damit die *S.cerevisiae*-Zellen die Plasmide aufnehmen können, ist auch hier eine Kompetenz der Zellen notwendig. Diese wird durch eine Behandlung der Zellen mit Sorbitol und Ethylenglycol erreicht.

4.2.6.1 Kompetente *S.cerevisiae*-Zellen („Freeze Methode“)

Für die Herstellung kompetenter *S.cerevisiae* wurden 10 ml YEPD Medium mit dem Hefestamm angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann frisch in 50 ml YEPD (mit 4-fach Adenin) auf eine OD₆₀₀ = 0,15 angeimpft. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 30 °C im Schüttelkolben bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6. Die Zellen wurden durch Abzentrifugieren (3 min, 4.000 rpm) geerntet und das Pellet in 5 ml Lösung A gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml Lösung A resuspendiert, in 200 µl Aliquots in kalten Cups aufgeteilt und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.6.2 Transformation *S.cerevisiae* („Freeze Methode“)

Für die Transformation von *S.cerevisiae* wurden zunächst 5 µl Heringssperma-DNA, 5 µl RFII und je 5 µl Plasmid-DNA gemischt (20 µl bei PCR-Produkten). Das Gemisch wurde dann direkt zu den 200 µl gefrorenen kompetenten Hefezellen gegeben und beides zusammen bei 37 °C im Thermoblock unter gelegentlichem Schütteln aufgetaut (mindestens 5 min). Dann erfolgte eine Zugabe von 1 ml Lösung B und eine Inkubation bei 37 °C für eine Stunde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1 min, 3.000 rpm) geerntet, 1 ml Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet im restlichen Überstand resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert.

4.2.7 Blau-Weiß-„Screen“

Einige der verwendeten Vektoren zeichnen sich durch die Fähigkeit zum Blau-Weiß-„Screen“ aus. Die „Multiple Cloning Site“ (MCS) dieser Vektoren liegt im *lacZ α* -Gen des Vektors, sodass eine Expression einer funktionellen β -Galaktosidase (α -Komplementation) durch Klonierung eines DNA-Fragments in die MCS unterbunden wird. Dies ermöglicht eine Unterscheidung zwischen Kolonien mit Vektoren, die das Insert tragen und solchen Kolonien, die einen Vektor ohne Insert etabliert haben.

Für den Blau-Weiß-„Screen“ wurden LB₀ Platten neben dem entsprechenden Antibiotikum zusätzlich mit 1 mM IPTG und 0,02 % X-Gal versehen. Die Expression der β -Galaktosidase wird durch das zugegebene IPTG induziert. Diese spaltet dann das farblose Substrat X-Gal, wodurch eine sichtbare Blaufärbung der gesamten Kolonie entsteht. Das bedeutet, dass Zellen, die einen Vektor ohne Insert besitzen, blaue Kolonien bilden, wohingegen die Kolonien der Zellen mit Vektor und Insert weiß bleiben.

4.2.8 Markertest

Die Konstruktion neuer Stämme und Plasmide erfordert immer eine Überprüfung des Geno- und Phänotyps. Da eine Sequenzierung des entsprechenden Bereichs häufig Zeit- und Kostenaufwändig ist, kann zunächst ein Markertest Aufschluss geben.

Für einen Markertest wurden Einzelkolonien der zu untersuchenden Stämme und geeigneter Kontrollstämmen auf Vollmediumplatten mit verschiedenen Antibiotika und MacConkey-Platten mit unterschiedlichen Zuckern gepatched und ggf. zu Einzelkolonien ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am folgenden Tag ausgewertet. Wachstum auf Antibiotika-Platten gibt einen Hinweis auf die entsprechende Resistenzkassette im Genom des Stammes oder auf einem Plasmid. Anhand der Weiß- bzw. Rotfärbung der Kolonien auf McC Platten kann auf die Verstoffwechslung verschiedener Kohlenstoffquellen geschlossen werden. Dabei wird unterschieden zwischen weißen, pinken (weißer Rand mit roter Papille) und drei verschiedenen roten Kolonien, 1+ (nur Kolonie rot mit leichtem weißen Rand) bis 3+ (rote Kolonie und Rotfärbung des umgebenden Mediums), wobei weiß keine Verstoffwechslung des entsprechenden Kohlenstoffes und 3+ rot eine sehr gute Verstoffwechslung bedeutet. Gegebenenfalls können auch Minimalmedium Platten für einen Markertest verwendet werden.

4.3 Gelelektrophoresen

4.3.1 Agarosegelelektrophoresen

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um DNA- oder RNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen DNA- bzw. RNA-Moleküle durch das Gel zur positiven Elektrode. Das Gel funktioniert dabei wie ein Sieb für die Moleküle, kleine Fragmente gelangen leichter durch die Maschen und wandern damit schneller und weiter als große Fragmente. Auch linearisierte Fragmente wandern schneller als zirkuläre gleicher Größe. Durch Vergleich mit Standardbanden bekannter Größe kann die Größe der aufgetrennten Fragmente bestimmt werden.

4.3.1.1 Analytische Agarosegelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die analytische Agarosegelelektrophorese vor allem zur Analyse von PCR-Produkten und durch Restriktionsenzyme geschnittene DNA-Fragmente verwendet. Bei kleinen Fragmenten wurden Agarosekonzentrationen von 1 % bis 1,5 % verwendet, bei großen Fragmenten 0,7 %ige Gele. Für die Gelelektrophorese wurden in der Regel 5 μ l Probe mit 1 μ l 5 x GLB (Endkonzentration 1 x) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Das im GLB enthaltene Glycerin diente zur Beschwerung der

Probe, zwei blaue Farbstoffe ermöglichten die Beobachtung des Laufverhaltens. Als Standard zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein 1 kb bzw. ein 100 bp Standard von NEB oder ein 100 bp bis 10 kb Standard von Fermentas verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einer dafür vorgesehenen Kammer mit 1 x TBE - Puffer bei ca. 150 V. Zum Sichtbarmachen der DNA-Fragmente wurde das Gel für ca. 8 min in einem Ethidiumbromidbad (0,001 % in 1 x TBE) gefärbt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, sodass sie mit Hilfe eines Geldokumentationssystems unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden konnte. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden die Banden mit definierten Standardbanden verglichen.

4.3.1.2 Präparative Agarosegelelektrophorese

Zur Isolation eines bestimmten Fragmentes aus einem Restriktionsansatz wurde u.a. ein präparatives Agarosegel zur Auftrennung verwendet. Die Auftrennung der Gelfragmente erfolgte in 0,7 %igen Agarosegelen mit bis zu 50 µl DNA pro Tasche. Die elektrophoretische Auftrennung wurde, wie im vorigen Kapitel beschrieben, durchgeführt.

Nach Färbung im Ethidiumbromidbad wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und dadurch sichtbar gemacht. Hierdurch sollte verhindert werden, dass energiereiche UV-Strahlung die DNA schädigt und Mutationen provoziert. Die Fragmente konnten während der UV-Bestrahlung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten werden. Anschließend wurde das Gel in der Geldokumentationskammer fotografiert, um durch einen Vergleich mit den Standardbanden die genaue Größe des ausgeschnittenen Fragmentes zu ermitteln. Die Extraktion der DNA-Fragmente aus dem ausgeschnittenen Gelstück erfolgte mit dem „MinElute Gel Extraction Kit (50)“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers (mit Ausnahme der Elution der DNA, die mit 20 µl ddH₂O erfolgte, um ein größeres Probenvolumen zu erhalten).

4.3.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE („SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese“) dient dem Nachweis von Proteinen, der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe und deren Molekulargewichtsbestimmung. SDS („Natriumdodecylsulfat“, engl.: „sodium dodecylsulfate“) ist ein anionisches Detergenz, welches bei Verwendung in der Gelelektrophorese die Eigenladung von Proteinen überdeckt, sodass Mizellen mit konstanter negativer Ladung entstehen. Durch reduzierende Thiolverbindungen (z.B. β-Mercaptoethanol) im Probenpuffer werden Quartärstrukturen, wie Disulfidbrücken, aufgebrochen. Erhitzen der Proben auf 95 °C sorgt zudem für ein Auflösen der Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine, wenn gewünscht. Auf diese Weise ist gewährleistet, dass einzig die molekulare Masse als Trennkriterium in der Gelelektrophorese auftritt.

Für die Vorbereitung der Proben wurde das Zellpellet der zu untersuchenden Proben zunächst in entsprechendem Puffer oder ddH₂O resuspendiert. Dann wurde die gleiche Menge 2 x SDS-Probenpuffer zugegeben und die Proben gegebenenfalls im Thermoblock für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970). Es wurde ein Gel mit Trenn- und Sammelgel mit unterschiedlichen Polyacrylamid-Bisacrylamid-Konzentrationen, je nach Größe der zu untersuchenden Proteine, verwendet. Die Zusammensetzung für ca. 10 Gele, die gleichzeitig in einer Kammer gegossen werden können, ist in der Tabelle 4.1 dargestellt.

Für die Durchführung der Elektrophorese wurde das BioRad „mini Protean 3 Cell“ System gewählt. Etwa 15-20 µl der vorbereiteten Proben wurden pro Tasche aufgetragen, als Standard für die Proteingrößen wurden 5 µl eines Proteinstandards verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem elektrischen Feld in 1 x SDS Laufpuffer, zunächst bei 100 V. Bei Eintritt der Proben in das Trenngel konnte die Spannung auf 150 V bis 200 V erhöht werden. Durch die angelegte Spannung wandern die Proteine auf Grund ihrer einheitlichen negativen Ladung mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zu ihrem

Molekulargewicht ist, durch das Gel, d.h. kleine Proteine wandern schneller und damit weiter durch das Gel als große Proteine. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde entweder ein Westernblot zur Detektion bestimmter Proteine angeschlossen (s. Kapitel 4.5.2), oder zum Nachweis aller Proteine das Gel 10 min in Coomassie inkubiert und danach in Wasser mit Zellstoff über Nacht entfärbt.

Tabelle 4.1: SDS-Gele

Ansatz für ca. 10 Gele mit einem 10 % bzw. 15 %igen SDS-Trenngel sowie einem 3 %igen SDS-Sammelgel.

Lösungen	Trenngel		Sammelgel 3 %
	10 %	15 %	
Polyacrylamid - Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	25 ml	37,5 ml	5 ml
ddH ₂ O	31,3 ml	18 ml	31,5 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	18,8 ml	18,8 ml	-
Tris 0,5 M pH 6,8	-	-	12,5 ml
SDS 10 %	750 µl	750 µl	500 µl
APS 10 %	500 µl	500 µl	325 µl
TEMED	62,5 µl	62,5 µl	40 µl
Gesamtvolumen	76,4 ml	75,6 ml	49,9 ml

4.4 DNA- und RNA-Methoden

4.4.1 Isolierung extrachromosomaler DNA

Die Isolierung von extrachromosomaler Plasmid DNA erfolgte mit Hilfe des Kits „QIAprep Spin Miniprep“ von Qiagen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 µl sterilem ddH₂O eluiert.

4.4.2 Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolierung chromosomaler DNA erfolgte nach drei unterschiedlichen Protokollen.

4.4.2.1 Isolierung chromosomaler DNA mit der „Mikrowellen-Methode“

In dieser Methode wurde in ein Eppendorfprobengefäß 50 µl 0,05 M NaOH-Lösung gegeben. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine große Menge einer Bakterienkolonie hinzu gegeben und das geschlossene Probengefäß bei maximaler Leistung für eine Minute in der Mikrowelle erhitzt. Abschließend wurde das Probengefäß für 5 min auf der Laborbank abgekühlt, die Probe gut durchmischt und Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt.

4.4.2.2 Isolierung chromosomaler DNA mit der Phenol/Chloroform Methode

Für die Isolierung von chromosomaler DNA mit einer deutlich höheren Reinheit und DNA Konzentration wurde die Phenol/Chloroform Methode verwendet (z.B. Southernblot, s. Kapitel 4.4.15). Von einer Übernachtskultur wurden 3 ml Zellen in einem Eppendorfprobengefäß abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml frisch angesetzttem Extraktionspuffer resuspendiert. Zusätzlich wurde den Proben 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und bei 56 °C für eine Stunde im Thermomixer unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Proben gut durchmischt. Es folgte die Zugabe von 0,5 ml Phenol/Chloroform Lösung (Roti-Phenol/C/I von Roth) und ein Schütteln der Proben für 5 min. Dann wurden die Proben eine Minute stehen gelassen und wieder für zwei Minuten geschüttelt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand (oberste Phase) wurde zu je 400 µl in vorbereitete Eppendorfprobengefäße überführt und mit je 800 µl kaltem Ethanol (100 %) versetzt. Die Proben wurden gut geschüttelt, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand

(gesamte Flüssigkeit) wurde verworfen und das Pellet in 1 ml kaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vollständig verworfen und das Pellet für 10-15 min trocknen gelassen. Die Resuspendierung der DNA erfolgte in 50 µl TE Puffer (versetzt mit 0,5 mg/ml RNaseA) und die Lagerung bei -20 °C.

4.4.2.3 Isolierung chromosomaler DNA mit dem Kit von Qiagen

In Ausnahmefällen erfolgte die Isolierung der chromosomalen DNA mit dem „DNeasy Blood & Tissue“ Kit von Qiagen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgte in 100 µl ddH₂O.

4.4.3 Isolierung von RNA und DNA

Die Isolierung von der gesamten RNA und DNA einer Zelle wurde mit Hilfe des „RNeasy Mini“ Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 30 µl RNase-freiem Wasser. Die Eluate können bei -80 °C gelagert werden.

4.4.4 DNase Verdau

Für den DNase Verdau von RNA/DNA Proben wurde das „Turbo DNA-free“ Kit von Ambion verwendet. Hierzu wurden 5 µl isolierte RNA/DNA (s. Kapitel 4.4.3) mit 25 µl RNase freiem H₂O, 3,5 µl Puffer und 1 µl DNase versetzt. Diese Mischung wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde erneut 1 µl DNase hinzugegeben und erneut 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 3,5 µl Inaktivierungsreagenz hinzugefügt und der gesamte Ansatz 2 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, in dem sich nun die DNA-freie RNA befand, wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei -80 °C eingefroren.

4.4.5 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Die Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen in verschiedenen Proben erfolgte über zwei verschiedene Methoden, mit dem Qubit Fluorometer von Invitrogen oder durch photometrische Analyse.

4.4.5.1 DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit-Fluorometer

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in einer Probe (z.B. nach einer Miniplasmidisolierung) wurde mit Hilfe des Qubit-Fluorometers (Invitrogen) durchgeführt. Das verwendete Kit „Quant-iT dsDNA BR Assay“ erlaubte eine Konzentrationsbestimmung von 2-1000 ng DNA in einer Probe. In der Regel fand die Bestimmung der Konzentration mit einer 1:10 Verdünnung der Probe statt. Die Konzentrationsbestimmung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.4.5.2 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer

Für die photometrische DNA- oder RNA-Konzentrationsbestimmung wurde die Probe in 100 µl H₂O 1:50 verdünnt und die OD₂₆₀ und OD₂₈₀ mit Hilfe einer Mini-Quarzküvette bestimmt. Die OD₂₆₀ = 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen und gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der jeweiligen Nukleinsäuren. Werte unter 1,5 deuten auf zu wenig RNA/DNA hin, Werte über 2,0 zeigen eine Verunreinigung der Probe an.

4.4.6 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem „Revert Aid H Minus cDNA Synthesis“ Kit von Fermentas nach Angaben des Herstellers. Für die RT-PCR (s. Kapitel 4.4.13.3) wurden 300 ng RNA eingesetzt. Für die komplette Umschrift der RNA in cDNA wurde der im Kit enthaltene „Random Hexamer Primer“ verwendet. Die erhaltene cDNA kann bei -20 °C gelagert werden.

4.4.7 DNA-Restriktion

Restriktionsenzyme ermöglichen das Zerschneiden doppelsträngiger DNA an definierten Stellen. Die Restriktionsenzyme wurden sowohl zur Klonierung als auch zur Überprüfung von Vektoren nach der Klonierung verwendet. Sie wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot) und NEB (Frankfurt am Main) bezogen. Je nach Zweck der Restriktion wurde einer der folgenden Ansätze (Tabelle 4.2) gewählt, wenn nicht anders vermerkt.

Tabelle 4.2: Pipettierschema eines Restriktionsansatzes

Angegeben sind die Pipettierschemata für eine Restriktion zur Kontrolle eines Plasmids sowie für eine Restriktion für ein präparatives Gel (Vektor und Insert).

Komponente	Plasmidkontrolle	Präparatives Gel	
		Vektor	Insert
DNA	5 µl	14 µl	30 µl
Restriktionsenzym I	1 µl	1 µl	3 µl
Restriktionsenzym II	1 µl	1 µl	3 µl
entsprechender Puffer	2 µl	2 µl	5 µl
BSA bzw. ddH ₂ O	1 µl	2 µl	5 µl
ddH ₂ O	-	-	4 µl
Gesamtvolumen	10 µl	30 µl	50 µl

Die Verwendung des Puffers und von BSA richtete sich nach den Restriktionsenzymen. Die Inkubation des Ansatzes bei 37 °C im Wasserbad lag bei ca. ein bis zwei Stunden. Im Fall von so genannten „Time-Saver“ oder „FastDigest“ Enzymen konnte die Inkubationszeit verkürzt werden. Nach der Restriktion wurde in der Regel eine Inaktivierung der Enzyme vorgenommen. Diese wurde nach Herstellerangaben und abhängig von den verwendeten Enzymen durchgeführt.

4.4.8 Antarktische Phosphatase Behandlung

Bei einer Restriktion von Vektor-DNA mit nur einem Restriktionsenzym kommt es häufig zur Religation, d.h. der Vektor wird wieder zusammen ligiert, ohne dass ein Insert integriert wird. Dies kann durch eine Phosphatase Behandlung unterbunden werden, da die Antarktische Phosphatase den Phosphatrest am 5'-Ende der Vektor-DNA entfernt und so nur eine Ligation mit einem Insert stattfinden kann, bei dem dieser Phosphatrest noch vorhanden ist. Die Phosphatase Behandlung wird demnach vor der Ligation von Vektor und Insert mit der Vektor-DNA durchgeführt.

Pro 20 µl gereinigter Vektor-DNA wurden 1 µl antarktische Phosphatase und 2 µl Phosphatase Puffer zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 15 min und eine abschließende Hitzeinaktivierung der Phosphatase bei 65 °C für 5 min. Anschließend konnte eine normale Ligation durchgeführt werden.

4.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt wurden, besitzen die gleichen Schnittstellen mit identischer Sequenz. Durch Ligation können die Fragmente neu miteinander verbunden werden. Die Ligation von Vektoren mit PCR-Fragmenten oder anderen DNA-Fragmenten (z.B. aus präparativen Agarosegelen isoliert) erfolgte mit der „T4 DNA Ligase“ von Fermentas. Sofern nicht anders

angegeben, wurde der folgende Ligationsansatz (Tabelle 4.3) sowohl für den Vektor und das Insert als auch für die beiden benötigten Kontrollen verwendet.

Tabelle 4.3: Pipettierschema eines Ligationsansatzes

Angegeben ist ein Pipettierschema für einen Ligationsansatz mit entsprechenden Kontrollen. Die Religationskontrolle gibt Aufschluss über die Häufigkeit einer Religation des Vektors, die Schnittkontrolle über die Effizienz der Restriktion.

Komponente	Vektor und Insert	Religationskontrolle	Schnittkontrolle
Vektor	1 µl	1 µl	1 µl
Insert	16 µl	-	-
10x Ligasepuffer	2 µl	2 µl	2 µl
ddH ₂ O	-	16 µl	17 µl
Ligase	1 µl	1 µl	-
Gesamtvolumen	20 µl	20 µl	20 µl

Die Inkubation der Ansätze wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt oder bei 22 °C für eine Stunde. Nach der Ligation erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Ligase für 10 min bei 65 °C im Thermoblock und anschließende Abkühlung auf Raumtemperatur.

4.4.10 pGEMT-Vektor-System

Die Klonierung von PCR Produkten in pGEMT kann als Zwischenschritt zur Klonierung in den Expressionsvektor verwendet werden. Dabei wird das bei der PCR gebildete überhängende A-Nukleotid am PCR Produkt für die Ligation mit einem überhängenden T von pGEMT ausgenutzt. Dafür wird das PCR Produkt gereinigt (s. Kapitel 4.4.13.4) und ohne Restriktion in den bereits linearisierten Vektor ligiert. Der Ligationsansatz ist in Tabelle 4.4 angegeben. Die Ligation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Der pGEM-T Vektor kann zum Blau-Weiß-„Screening“ verwendet werden.

Tabelle 4.4: Ligationsansatz für die Ligation von PCR Produkten in pGEM-T

Angegeben ist ein Ligationsansatz für die Ligation von gereinigten und ungeschnittenen PCR Produkten in bereits linearisiertem pGEM-T Vektor.

Komponente	Volumen
2x Rapid Ligation Buffer	5 µl
pGEM-T Vektor (50ng)	1 µl
PCR-Produkt (gereinigt)	3 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

4.4.11 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden bei Scientific Research and Development GmbH (SRD, Bad Homburg) in Auftrag gegeben. Für eine Sequenzierung mit eigenen Primern („Sneak Peak“) wurden 150-300 ng DNA mit 0,5 µl Primer versetzt und auf 7 µl mit ddH₂O aufgefüllt.

4.4.12 „Primer annealing“

Für die Synthese doppelsträngiger DNA-Bereiche wurden zwei spezifische und in definierten Bereichen komplementäre Primer zusammengelagert. Dafür wurden je 1 µl der Primer mit 8 µl „Annealing Buffer“ von Gipro (Karlsruhe) in einem Probengefäß gemischt. Für die Inkubation wurde Wasser in einem Becherglas zum Kochen gebracht und der Primeransatz darin inkubiert und langsam abgekühlt. Dadurch wurde eine Zusammenlagerung der Primer zu einem doppelsträngigen DNA-Abschnitt mit definierten Restriktionsenzym-Erkennungsstellen an den Enden erreicht.

4.4.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wird u.a. zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte verwendet oder zum Einfügen künstlicher und ortsgerichteter Mutationen. Dabei werden häufig Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen eingefügt.

4.4.13.1 PCR zur Amplifikation von definierten Genabschnitten

Die PCR-Reaktion wurde in einem PCR-Probengefäß angesetzt, das Pipettierschema ist in der Tabelle 4.5 dargestellt.

Tabelle 4.5: Pipettierschema für einen PCR Ansatz

Angegeben ist ein Pipettierschema für einen PCR Ansatz, bei dem ein von den beiden Primern flankierter Genabschnitt amplifiziert wird.

Komponente	Volumen
ddH ₂ O	24,5 µl
10x PCR Puffer (15 mM MgCl ₂)	5 µl
Primer + (10 pM)	5 µl
Primer - (10 pM)	5 µl
dNTPs	5 µl
Hot Start Taq (Plus) DNA-Polymerase	0,5 µl
DNA Template (chromosomale DNA 1 : 100 vorverdünnt, Plasmid DNA 1 : 10 vorverdünnt)	5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Für jede PCR wurden spezifische Primer konstruiert, die die gewünschten Genabschnitte amplifizieren. Dafür wurden mindestens 10 zur Sequenz homologe Basenpaare ausgewählt und eine für ein Restriktionsenzym erkennbare Sequenz sowie drei beliebige Basenpaare angefügt. Die Primer wurden bei Thermo Scientific (Ulm) bestellt und in einer 100 pM Stocklösung angesetzt. In der PCR wurden die Primer in einer 1 : 10 Verdünnung (10 pM) eingesetzt. Das DNA-Template wurde unverdünnt (chromosomale DNA) bzw. 1 : 100 vorverdünnt (Plasmid DNA, chromosomale DNA in Ausnahmefällen) verwendet. Neben den Proben wurde zusätzlich eine „No-template“ Kontrolle pipettiert, bei der ddH₂O statt eines DNA-Template verwendet wurde. Für die PCR wurden die Thermocycler T-Personal und T-Gradient von Biometra verwendet. Die Programmierung erfolgte in der Regel nach dem unten beschriebenen Protokoll (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Programm einer PCR zur Amplifikation von definierten Genabschnitten

Die Tabelle zeigt ein generelles Programm einer PCR zur Amplifikation von definierten Genabschnitten. Das Programm beinhaltet einen Hot Start zur Aktivierung der Polymerase, eine 35-fach wiederholte Schleife von Denaturierung, Primerannealing und Elongation sowie eine finale Elongation und eine Pause am Ende.

Programmpunkt	Temperatur	Zeit	Sonstige Einstellungen
Vorlauf ein, Heizdeckel	105 °C		
1. Hot Start	95 °C	7 min	
2. Denaturierung	94 °C	30 sek	
3. Primer-Annealing	50-65 °C	30 sek	Temperaturgradient möglich
4. Elongation	72 °C	30 sek bis 5 min	Zurück zu Schritt 2 35 Durchläufe
5. Finale Elongation	72 °C	5 min	
6. Pause	15 °C		

Die „Annealing“-Temperatur und die Dauer der Elongation richteten sich nach den verwendeten Primern und der Polymerase. In einigen Fällen wurde ein Temperaturgradient verwendet, um die optimale „Annealing“-Temperatur zu ermitteln (T-Gradient von Biometra). Im Anschluss an die PCR wurden 5 µl des PCR Ansatzes mit 1 µl 5x GLB gemischt und zur Überprüfung des PCR Produktes auf ein Agarosegel aufgetragen. Der PCR-Ansatz wurde über entsprechende Kits gereinigt (s. Kapitel 4.4.13.4).

4.4.13.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Die PCR kann auch zur ortsgerechten Mutagenese an definierten Stellen verwendet werden. Diese wurde mit dem „QuickChange Site-Directed Mutagenesis“ Kit von Agilent Technologies oder dem „Phusion Site-Directed Mutagenesis“ Kit von NEB durchgeführt.

Bei Verwendung des Agilent Technologies-Kits werden zwei Primer gewählt, welche komplementäre Sequenzen mit jeweils der gewünschten Mutation zeigen. Dadurch wird ein doppelsträngiges vollständiges Plasmid amplifiziert. Das Pipettierschema für diese Mutagenese-PCR ist in Tabelle 4.7 gezeigt. Das entsprechende Protokoll ist in Tabelle 4.8 angegeben.

Tabelle 4.7: Pipettierschema einer Mutagenese PCR (Agilent Technologies)

Angegeben ist das Pipettierschema eines Mutagenese PCR Ansatzes mit dem Agilent Technologies Kit.

Komponente	Volumen
ddH ₂ O	36,5 µl
PCR Puffer	5 µl
Primer + (1 : 10 vorverdünnt)	1,25 µl
Primer - (1 : 10 vorverdünnt)	1,25 µl
dNTPs	1 µl
Phusion Hot Start Polymerase	0,5 µl
DNA Template (1 : 100 vorverdünnt)	5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 4.8: Programm der Mutagenese PCR (Agilent Technologies)

Das Programm zur Mutagenese PCR mit dem Agilent Technologies Kit.

Programmpunkt	Temperatur	Zeit	Sonstige Einstellungen
Vorlauf ein, Heizdeckel	105 °C		
1. Hot Start	95 °C	30 sek	
2. Denaturierung	95 °C	30 sek	
3. Primer-Annealing	55-65 °C	1 min	
4. Elongation	68 °C	10 min	Zurück zu Schritt 2 18 Durchläufe
Pause	15 °C		

Das NEB-Kit verwendet am 5'-Ende phosphorylierte Primer, von denen einer die gewünschte Mutation trägt und der andere gegenläufig am Plasmid ansetzt. Der Pipettieransatz für eine Mutagenese PCR mit diesem Kit ist in Tabelle 4.9 dargestellt, das entsprechende Programm in Tabelle 4.10.

Tabelle 4.9: Pipettierschema einer Mutagenese PCR (NEB)

Angegeben ist das Pipettierschema eines Mutagenese PCR Ansatzes mit dem NEB Kit.

Komponente	Volumen
ddH ₂ O	23,5 µl
PCR Puffer	10 µl
Primer + (1 : 10 vorverdünnt)	5 µl
Primer - (1 : 10 vorverdünnt)	5 µl
dNTPs	1 µl
Phusion Hot Start Polymerase	0,5 µl
DNA Template (1 : 100 vorverdünnt)	5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 4.10: Programm der Mutagenese PCR (NEB)

Das Programm zur Mutagenese PCR mit dem NEB Kit.

Programmpunkt	Temperatur	Zeit	Sonstige Einstellungen
Vorlauf ein, Heizdeckel	105 °C		
1. Hot Start	95 °C	7 min	
2. Denaturierung	94 °C	30 sek	
3. Primer - Annealing	50 – 60 °C	30 sek	
4. Elongation	72 °C	5 min	Zurück zu Schritt 2 32 Durchläufe
Pause	15 °C		

Die „Annealing“-Temperatur konnte bei beiden Kits je nach verwendeten Primern variiert werden. Um den Erfolg der Mutagenese-PCR überprüfen zu können, wurde zunächst eine Agarosegelelektrophorese mit 5 µl PCR-Reaktionsansatz und 2 µl GLB durchgeführt, um ein PCR-Produkt nachweisen zu können. Um die eingebrachte Mutation sichtbar zu machen, mussten die Plasmide zusätzlich an den entsprechenden Stellen sequenziert werden.

Im Anschluss an die PCR-Reaktion musste beim NEB-Kit zusätzlich eine Ligation des Plasmids durchgeführt werden. Dafür wurde die ebenfalls im Kit enthaltene „Quick T4 DNA Ligase“ und der entsprechende Puffer verwendet. Der Ansatz erfolgte nach Tabelle 4.11. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 5-15 min bei 25 °C im Thermoblock. Anschließend konnten die Plasmide direkt in JM109 transformiert werden.

Tabelle 4.11: Ligationsansatz zur Mutagenese PCR

Angegeben ist ein Ligationsansatz, der im Anschluss an die Mutagenese PCR mit dem NEB Kit erfolgte.

Komponente	Volumen
PCR Produkt	5 µl
Quick Ligation Buffer	5 µl
Quick T4 DNA Ligase	0,5 µl
Gesamtvolumen	10,5 µl

4.4.13.3 Real Time-PCR (RT-PCR)

Die Real Time-PCR (RT-PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich die Quantifizierung der eingesetzten DNA. Erstmals beschrieben wurde die RT-PCR 1992 von Higuchi et al. (Higuchi et al., 1992). Vor der eigentlichen PCR wird ggf. RNA aus Zellen isoliert und in cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (deshalb auch oft „RT-PCR“) umgeschrieben. Diese cDNA kann dann in der PCR eingesetzt werden und die Menge der entstehenden PCR-Produkte während der PCR in Echtzeit („Real Time“) mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen bestimmt werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe (Hier: SYBR Green) interkalieren in doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Fluoreszenz nimmt daher proportional mit der Menge der entstehenden PCR-Produkte zu und kann am Ende der Elongation von jedem Zyklus bestimmt werden. So kann der Amplifikationszyklus ermittelt werden, in welchem die entstehende DNA-Menge einen gewissen Schwellenwert (Ct-Wert) überschreitet. Von diesem Wert kann durch Annahme einer gewissen Amplifikationseffizienz auf die Ausgangsmenge der eingesetzten RNA bzw. cDNA zurück geschlossen werden (Kubista et al., 2006).

Für die RT-PCR wurde zunächst eine Übernachtskultur der zu untersuchenden Zellen im entsprechenden Medium angesetzt. Die Zellen wurden dann in 10 ml frisches Medium auf eine $OD_{420/650} = 0,1$ angeimpft. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C im Schüttelkolben bis zu einer $OD_{420} = 1$ bzw. $OD_{650} = 0,8$. Dies entspricht $5-8 \times 10^8$ Zellen/ml und ist damit optimal für die Isolierung von RNA mit Hilfe des „RNeasy Mini“ Kits von Qiagen. Für die Ernte der Zellen wurden zweimal 1 ml Kultur im Cup abzentrifugiert (4 °C, 3 min, 13.000 rpm) und sofort bei -80 °C eingefroren. Die Zellen können so für mehrere Monate gelagert werden.

Im nächsten Schritt erfolgte die Isolierung von gesamter RNA und DNA mit Hilfe des „RNeasy Mini“ Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers (s. Kapitel 4.4.3). Vom Eluat wurden 5 µl (LB₀) bzw. 10 µl (MM) für die weiteren Versuche abgenommen und der Rest bei -80 °C eingefroren. Anschließend folgte ein DNase Verdau der Proben mit dem „Turbo DNA-free“ Kit von Ambion nach Angaben des Herstellers (s. 4.4.4). Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei -80 °C eingefroren. Um die Ausbeute der RNA zu ermitteln, folgte eine RNA Konzentrationsbestimmung (s. Kapitel 4.4.5). Für die cDNA Synthese wurden 300 ng RNA eingesetzt. Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem „Revert Aid H Minus cDNA Synthesis“ Kit von Fermentas nach Angaben des Herstellers (s. Kapitel 4.4.6). Die erhaltene cDNA kann bei -20 °C gelagert werden.

Für die RT-PCR wurde der „Icycler“ der Firma BioRad verwendet. Einen guten Überblick zur Konstruktion der Primer, Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe, Wahl des PCR-Programms sowie zur späteren Auswertung der Ergebnisse gibt die Veröffentlichung von Kubista et al. (Kubista et al., 2006). Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe des „2 x iQ™ SYBR Green Supermix“ von BioRad bzw. des „Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2 x)“ von Fermentas angesetzt. Hierbei wurde in beiden Fällen folgender PCR-Ansatz gewählt (s. Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: PCR Ansatz für RT-PCR

Angegeben ist der PCR Ansatz für eine RT-PCR mit den Kits von BioRad bzw. Fermentas.

Komponente	Volumen
SYBR Green Mix	12,5 µl
Primer I (10pmol/µl)	2,5 µl
Primer II (10pmol/µl)	2,5 µl
H ₂ O	6,5 µl
cDNA	1 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Von allen Proben wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Für die Berechnung der Effizienz der PCR wurde von den Proben zusätzlich eine Verdünnungsreihe als Standard angesetzt. Die Verdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁻⁴ wurden ebenfalls in der PCR eingesetzt. Als Leerwert wurde eine Probe mit Wasser angesetzt. Das PCR-Profil wurde je nach Art der Probe und der Primer neu optimiert. Für die in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare zur Amplifikation von *ptsG* und *glk* wurde das in Tabelle 4.13 beschriebene Protokoll verwendet.

Tabelle 4.13: PCR Protokoll für eine RT-PCR

Angegeben ist ein optimiertes Protokoll für die Amplifikation von *ptsG* und *glk* mit den entsprechenden Primern aus Tabelle 3.5.

Zyklus	Wiederholungen	Schritt	Temperatur	Zeit	Sonstige Einstellungen
1	1 x	1	95 °C	3 min	
2	35 x	1	95 °C	30 sek	
		2	58 °C	20 sek	Daten Kollektion
		3	72 °C	30 sek	Daten Kollektion und Real-Time Analyse
3	1 x	1	72 °C	3 min	
4	1 x	1	95 °C	1 min	
5	1 x	1	60 °C	1 min	
6	80 x	1	60 °C	10 sek	Temperatur jeden Zyklus um 0,5 °C erhöhen, Schmelzkurven Daten Kollektion und Analyse
7	1 x	1	15 °C	Hold	

Abschließend erfolgte eine Auswertung der RT-PCR mit der entsprechenden Software von Biorad und Biogazelle (s. Tabelle 3.14).

4.4.13.4 PCR-Produkt Reinigung

Nach der PCR-Reaktion wurde der komplette PCR-Ansatz in den meisten Fällen mit dem Kit „Wizard PCR Preps DNA Purification System“ von Promega bzw. dem „GeneJet PCR Purification“ Kit von Fermentas gereinigt, um überschüssige Primer, Pufferlösung etc. zu entfernen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben der Hersteller.

4.4.14 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung kann zur Reinigung und Ankonzentration von PCR-Produkten und Plasmiden genutzt werden. Dafür wurden zunächst der komplette PCR-Ansatz (50 µl) bzw. der komplette Plasmid-Ansatz (50 µl) mit 1/10 des Volumens Natriumacetat (3 M, pH 6) und mit dem 2,5 fachen des Ausgangsvolumens kalten Ethanols (100 %ig) versetzt. Der komplette Ansatz wurde gemischt und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurde der Ansatz zentrifugiert und das Pellet in 200 µl kaltem Ethanol (80 %ig) resuspendiert. Anschließend folgte eine erneute Zentrifugation und eine vollständige Trocknung des Pellets im offenen Probengefäß an der Luft. Abschließend konnte das Pellet in ddH₂O resuspendiert werden, 8 µl zum Ankonzentrieren von PCR-Ansätzen, 30 µl zum Reinigen von Plasmidisolierungen. Das gereinigte Endprodukt kann für Transformationen eingesetzt werden.

4.4.15 Southernblot

Die DNA/DNA-Hybridisierung nach E. Southern ist eine vielseitige Methode, mit der sich viele molekularbiologische Fragestellungen beantworten lassen (Southern, 1975). Das Prinzip beruht auf der irreversiblen Bindung denaturierter einzelsträngiger DNA an eine Membran und anschließender Hybridisierung mit einer definierten, markierten DNA Sonde. Wegen der hohen Empfindlichkeit eignet sich dieses Verfahren besonders gut zum Nachweis definierter genomischer Fragmente. Es lassen sich genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen bzw. Genotypen auf Grund von Restriktionspolymorphismen nachweisen, Sequenzen mit Verwandtschaft zur eingesetzten Sonde erkennen und die Existenz ähnlicher Sequenzen vorhersagen (Southern, 1975).

Für die Southernblot Analyse ist zunächst die Isolierung chromosomaler DNA mit einer hohen Reinheit erforderlich. Dies wurde mit der Phenol/Chloroform Methode durchgeführt (s. Kapitel 4.4.2.2). Im Anschluss an die Isolierung erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der DNA (s. Kapitel 4.4.5.2) und eine Restriktion nach dem folgenden Ansatz. Durch die Restriktion wird die gesamte genomische DNA in kleine Fragmente zerschnitten. Die Restriktion erfolgte in mehreren Ansätzen mit je unterschiedlichen Restriktionsenzymen.

Tabelle 4.14: Restriktion für Southernblot

Angegeben ist der Restriktionsansatz von chromosomaler DNA für einen Southernblot.

Komponente	Volumen
Genomische DNA	5 µg
Restriktionspuffer 10x	2 µl
Restriktionsenzym	2 µl
ddH ₂ O	Ad 20 µl

Die Restriktion wurde bei 37 °C über Nacht durchgeführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 0,7 %igem Agarosegel mit einem Lambda-Standard. Im Anschluss daran erfolgte der Transfer der DNA auf die Nylonmembran. Dafür wurde das Gel zunächst 5 min in 0,25 M HCl depurinisiert, anschließend zweimal 15 min in Denaturierungslösung (s. Tabelle 3.9, Puffer für Southernblot) denaturiert und dann zweimal 15 min in 1 M Ammoniumacetat neutralisiert. Dadurch wird erreicht, dass die DNA im Gel einzelsträngig vorliegt, um später eine spezifische Bindung der markierten DNA-Sonde zu ermöglichen. Der Transfer der

denaturierten DNA auf die Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blotting in 1 M Ammoniumacetat über Nacht. Der Aufbau des Blots ist in Abbildung 4.2 dargestellt und beschrieben.

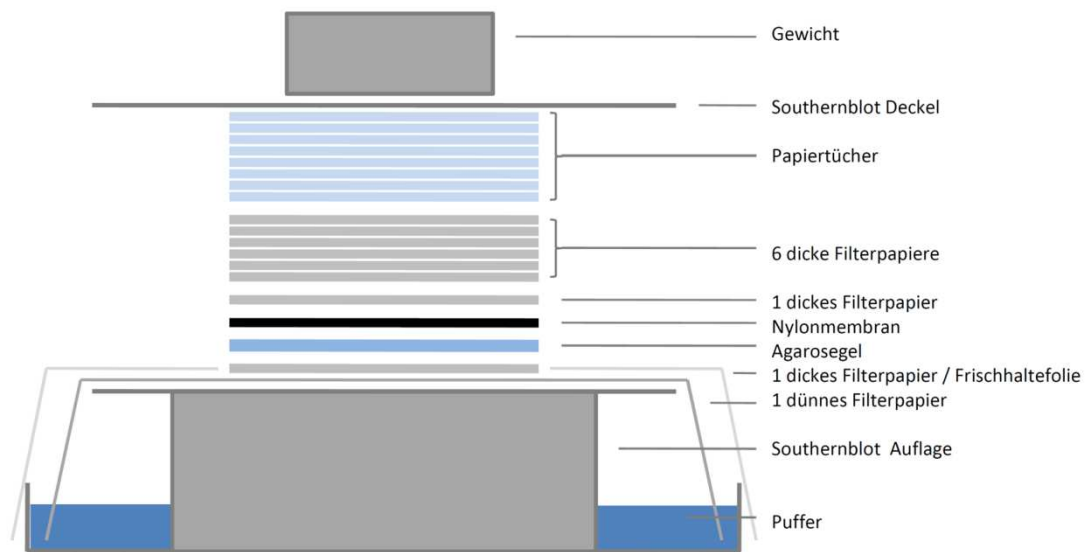


Abbildung 4.2: Aufbau eines Southernblots

Gezeigt ist der Aufbau eines Southernblots. Die Seitenkammern der Southernblot Auflage werden mit entsprechendem Puffer gefüllt. Als unterste Lage wird ein dünnes Whatman-Filterpapier so über die Auflage gelegt, dass es auf beiden Seiten in den Puffer hineinhängt. Darüber werden von unten nach oben ein dickes Whatman-Filterpapier, das Agarosegel, die Nylonmembran und ein weiteres dickes Filterpapier gestapelt und mit Puffer getränkt. Darüber folgen sechs dicke Filterpapiere und ein Stapel aus Papiertüchern, jeweils trocken. Den Abschluss bilden der Deckel des Southernblots sowie ein Gewicht zur Beschwerung. Die nicht vom Gel bedeckten Seiten und die Pufferkammern werden luftdicht mit Frischhaltefolie abgeschlossen.

Zum Fixieren der DNA wurde die Nylonmembran abschließend für eine Stunde bei 80 °C gebacken. Für die markierte Sonde wurde zunächst eine PCR mit entsprechenden Primern durchgeführt (s. Kapitel 4.4.13). Das PCR Produkt wurde anschließend gereinigt (s. Kapitel 4.4.13.4) und mit Hilfe des „Labeling“ Kits von Roche nach Angaben des Herstellers markiert. Dafür wurden 15 µl gereinigtes PCR Produkt durch Inkubation für 10 min bei 95 °C und anschließend 15 min in Eiswasser denaturiert und nach folgendem Ansatz bei 37 °C über Nacht gelabelt.

Tabelle 4.15: Labelingansatz für Southern Blot Sonde

Angegeben ist der Labelingansatz für eine Southernblot Sonde mit den Komponenten und der jeweiligen Menge in µl.

Komponente	Volumen
Denaturiertes PCR Produkt	15 µl
Hexanucleotid-Mix	2 µl
DIG-Labeling-Mix	2 µl
Klenow Polymerase	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Bei dieser Art des Labeling wird die DNA durch die Klenow-Polymerase in Gegenwart von Hexamer Primern und DIG-dUTP kopiert. Durchschnittlich alle 20 bis 25 Nukleotide wird ein DIG-gelabeltes-dUTP durch die Polymerase eingebaut. Daraus resultiert eine homogen gelabelte, sehr sensitive Hybridisierungssonde. Die Sonde wurde vor ihrem Einsatz gefällt. Dafür wurden 20 µl gelabelte Sonde mit 2 µl 0,2 M EDTA versetzt und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl 100 % Ethanol zugegeben und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die Probe wurde dann abzentrifugiert, das Pellet getrocknet und in 20 µl TE resuspendiert. Die Sonde konnte bei -20 °C weiter gelagert oder direkt verwendet werden.

Nach Fertigstellung der Sonde und der Nylonmembran mit der denaturierten DNA erfolgte die Hybridisierung. Zur Prähybridisierung wurde die getrocknete Nylonmembran mit 10 ml Hybridisierungslösung (s. Tabelle 3.9) in ein Gefäß mit verschließbarem Deckel gegeben (Biometra, Schott) und im Backofen bei 65 °C für 2 Stunden unter Drehen inkubiert. Anschließend wurde die markierte und frisch denaturierte Sonde (Einzelstränge für Hybridisierung notwendig) direkt in die Lösung gegeben. Dazu wurden 5 µl der markierten Sonde und 1 µl markierter Lambda DNA in 100 µl Hybridisierungslösung für 5 min gekocht und anschließend für 5 min auf Eis gegeben. Die Inkubation von Membran und Sonde erfolgte bei 65 °C über Nacht. Dadurch wird gewährleistet, dass die Sonde spezifisch an die Zielsequenz binden kann. Danach wurde die Membran von ungebundener Sonde gewaschen (Sonde kann aufgefangen und wiederverwendet werden), zweimal für 5 min bei RT mit Waschpuffer I und zweimal für 15 min bei 65 °C mit Waschpuffer II. Die Membran konnte sofort weiter behandelt oder luftgetrocknet aufbewahrt werden.

Zum Abschluss des Southernblots erfolgte der Chemilumineszenz Nachweis auf zwei unterschiedliche Weisen. Zunächst wurde die durch das Labeling mit DIG markierte Sonde von einem Anti-DIG-Antikörper spezifisch gebunden. An diesen Antikörper ist Alkalische Phosphatase gekoppelt, welche entweder durch NBT/BCIP spezifisch durch einen Farbumschlag nachgewiesen werden kann oder durch CDP-Star (Roche) und Chemilumineszenzfilmentwicklung sichtbar gemacht wird, wobei diese Methode deutlich sensitiver ist als der Nachweis durch NBT/BCIP. Für beide Detektionsmethoden wurden zunächst die gleichen Wasch- und Inkubationsschritte durchgeführt. Die nachfolgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur unter Schütteln. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Wasch- und Inkubationsschritte mit 100 bis 150 ml der entsprechenden Lösung (s. Tabelle 3.9) durchgeführt. Die Membran wurde für 1 min in Waschpuffer 1 gewaschen, dann für 30 min in Entwicklungspuffer 2 inkubiert. Das Anti-DIG-AP-Konjugat wurde frisch auf 75 mU/ml (1 : 5.000) in Entwicklungspuffer 2 verdünnt und die Membran für 30 min in 20 ml dieser Antikörper-Konjugat-Lösung inkubiert. Anschließend folgten zwei erneute Waschschrte in Waschpuffer 1 für je 15 min. Die Membran wurde dann für 2 min in Entwicklungspuffer 3 äquilibriert. Für den Nachweis mit NBT/BCIP wurden NBT und BCIP (s. Tabelle 3.9) 1 : 360 in 20 ml Entwicklungspuffer 3 verdünnt und die Membran so lange in dieser Lösung entwickelt, bis das Signal deutlich sichtbar war. Die Reaktion konnte mit Wasser abgestoppt werden. Für den Nachweis mit CDP-Star wurde die Membran mit einer Mischung aus 2,5 ml Puffer 3 und 7,5 µl CDP-Star (Roche) überschichtet und für 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung wieder abgezogen und die Membran in Folie eingeschweißt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Membran wurde dann luftblasenfrei zwischen zwei neue Folien gebracht und in die „Hypercassette“ gelegt. In der Dunkelkammer wurde dann ein Chemilumineszenzfilm auf die Membran gelegt, die Kassette geschlossen und für 1-5 min inkubiert. Die Entwicklung des Films wurde in der Entwicklermaschine von Konica durchgeführt.

4.5 Methoden zur Analyse von Proteinen

4.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Assay von M. M. Bradford (Bradford, 1976) ist eine photometrisch gestützte Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Er beruht auf der Komplexbildung zwischen dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 und den unpolaren Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung. Die ungebundene, rote Form des Farbstoffes hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung wird der Farbstoff in seiner blauen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum des Farbstoff-Protein-Komplexes verschiebt sich auf 595 nm (Compton und Jones, 1985). Die Zunahme der Blaufärbung durch die Bildung des Komplexes kann gegen das freie Farbreagens photometrisch bei 595 nm gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976) musste zunächst eine Eichgerade erstellt werden. Dafür wurden definierte Mengen BSA verwendet und die OD_{595} bestimmt. Von einer 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Stocklösung BSA wurden 0 μl , 2 μl , 4 μl , 6 μl , 8 μl und 10 μl (entsprechen 20 μg , 40 μg , 60 μg , 80 μg , 100 μg absolute Proteinmenge) in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und mit ddH₂O auf 100 μl aufgefüllt. Dazu kamen 2,5 ml Bradfordreagenz und der Ansatz wurde 2-60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die OD_{595} bestimmt und eine Eichgerade erstellt (OD_{595} wird gegen die absolute Proteinmenge aufgetragen). Von den zu bestimmenden Proben wurden je 10 μl Probe mit 90 μl ddH₂O und 2,5 ml Bradfordreagenz gemischt, bei RT inkubiert und ebenfalls die OD_{595} bestimmt. Die Proteinkonzentration konnte dann aus der Eichgerade abgelesen werden.

4.5.2 Western- und Immunoblot

Der Westernblot ist eine molekularbiologische Nachweismethode, bei der z.B. elektrophoretisch getrennte Proteingemische einer Gelschicht auf eine Membran übertragen werden. Erstmals beschrieben wurde der Transfer von Proteinen aus SDS-Gelelektrophorese auf Nitrocellulosemembranen von Towbin et al. 1979 (Towbin et al., 1979). Vor dem Westernblot wird ein Proteingemisch mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. Kapitel 4.3.2). Anschließend werden die Proteine durch ein zum Gel senkrecht angelegtes elektrisches Feld auf die Membran übertragen. An der Membran bleiben die Proteine auf Grund hydrophober Wechselwirkungen haften und behalten dabei das ursprüngliche Auftrennungsmuster bei.

In dieser Arbeit wurde das „Blotten“ nach dem so genannten Semidry-Verfahren durchgeführt. Dabei wurden das Gel (nach der SDS-PAGE) sowie eine Nitrocellulosemembran und 4 dicke Filterpapiere in 1 x Blotpuffer für 30 min äquiliibriert. Die Unterlage des Blotters stellte die Anode dar. Hier wurden zunächst zwei in Blotpuffer äquiliibrierte Filterpapiere übereinander gelegt. Darauf die Nitrocellulosemembran und das Gel. Abgeschlossen wurde der Blotaufbau mit zwei weiteren Filterpapieren und dem Gerätedeckel, der die Kathode darstellte. Anschließend wurde für 40 min bei konstanten 20 V geblottet. Im Anschluss an das „Blotten“ wurden die jetzt auf der Membran befindlichen Proteine ggf. für 10 min in Ponceau S angefärbt und fixiert. Danach wurde die Membran kurz mit ddH₂O abgespült und dann 10 min in 1 x TNT vollständig entfärbt. Das SDS-Gel wurde zur Überprüfung des Blotvorgangs und zum Nachweis der zurückgebliebenen Enzyme für 10 min in Coomassie angefärbt. Die Entfernung der Hintergrundfärbung erfolgte über Nacht in Wasser mit Zellstoff. Im Anschluss konnte das Gel zu Dokumentationszwecken getrocknet und auf einem Filterpapier fixiert werden.

Für den Immunoblot, d.h. die spezifische Anfärbung von Proteinen durch Primär- und Sekundärantikörper wurde die Membran zunächst zur Abdeckung unspezifischer Bindungspartner der Antikörper geblockt. Das Blocken (auch „Quenchen“) fand in 10 ml TBS mit 3 % BSA statt, für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend folgte ein Waschschrift für 10 min in TNT. Der primäre Antikörper wurde in 10 ml TBS mit 1 % BSA in der unter Tabelle 3.10 genannten Verdünnung angesetzt und die Membran damit für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgten drei Waschschrift für je 10 min in TNT. Der Sekundärantikörper wurde in 10 ml TBS mit 1 % BSA angesetzt, ebenfalls in der unter Tabelle 3.10 angegebenen Verdünnung. Auch hier betrug die Inkubationszeit 1 Stunde bei Raumtemperatur und es wurden drei Waschschrift in TNT angeschlossen. Abschließend wurde die Membran einmal für 10 min in TBS gewaschen. Alle Schritte konnten alternativ bei 4 °C über Nacht durchgeführt werden. Die Proteinbanden konnten mit Hilfe eines Infrarotscanners (Odyssey) von der Firma LI-COR sichtbar gemacht und mit der entsprechenden Software analysiert und ggf. quantifiziert werden.

4.5.3 Silberfärbung

Für die Silberfärbung von Proteinen im SDS-Gel wurde folgendes Protokoll verwendet. Zunächst wurden die SDS-Gele für eine Stunde in Fixierlösung äquiliibriert und anschließend dreimal für 20 min in 50 %

Ethanol gewaschen. Danach wurden die Gele eine Minute in Thiosulfatlösung zur Reduzierung der Proteine inkubiert und dreimal für 20 Sekunden in H₂O gewaschen. Nach einer 20 minütigen Inkubation in der Imprägnierlösung (welche sich an die reduzierten Proteine lagert) wurden die Gele wiederum dreimal für 20 Sekunden in H₂O gewaschen. Danach wurden die Banden mit Entwicklerlösung sichtbar gemacht (3 bis 10 min, je nach Braunfärbung), die Gele kurz mit H₂O gewaschen, und anschließend für 15 min mit Stopplösung inkubiert.

4.5.4 β -Galaktosidase Aktivitätstest

Diese Methode dient dem Nachweis der spezifischen Aktivität der β -Galaktosidase und wird u.a. zum indirekten Nachweis der Expression eines *lacZ*-Fusionsgens verwendet.

Für den Test wurde zunächst eine Übernachtskultur des zu testenden Stammes in 5 ml LB₀ mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Mit dieser wurde dann frisches Medium (10 ml LB₀ mit Antibiotikum) auf eine OD₆₅₀ = 0,05 angeimpft, pro Probe jeweils zwei Kolben. Die Inkubation erfolgte bis zu einer OD₆₅₀ = 0,1 bei 37 °C, dann wurde pro Probe je ein Kolben mit 500 μ M IPTG induziert. Bei einer OD₆₅₀ = 1 erfolgte die Ernte der Zellen. 1 ml Kultur wurde in ein Eppendorfprobengefäß gegeben, abzentrifugiert und das Pellet für ein SDS-Gel und anschließenden Westernblot (s. 4.3.2 bzw. 4.5.2) verwendet. Ein weiterer Milliliter der Kultur wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, ebenfalls abzentrifugiert und das Pellet für den β -Galaktosidase Aktivitätstest zweimal in 1 ml PP1 Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml PP1 resuspendiert. Davon wurde 1 ml zur OD₆₅₀-Bestimmung verwendet. Der zweite Milliliter wurde mit drei Tropfen Toluol versetzt (Leerwert mit Wasser statt Zellsuspension wurde gleich behandelt) und die Probe zum Aufschluss der Zellen mindestens 1 min stark geschüttelt (Vortex-Genie). Dann folgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis und anschließend 5 min im 37 °C Wasserbad, ohne Schütteln. Zum Start der Reaktion wurde den Proben 100 μ l 10 mM β -ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid) zugegeben und die Zeitmessung gestartet. Nach erfolgter Gelbfärbung (hier: zwischen 10 min und 4 Stunden) wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,5 ml 250 mM Na₂CO₃ abgestoppt und die Zeitmessung beendet. Nach Beenden der Reaktion erfolgte eine erneute Zentrifugation für 3 min und eine OD₄₂₀-Messung des Überstandes (der gleich behandelte Leerwert diente als Referenz). Die Berechnung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach Formel 4.5 und Formel 4.6.

$$\text{Enzymaktivität } U = \frac{c \cdot V_A}{\text{min}} = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \cdot V_A \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right]$$

Formel 4.5: Berechnung der Enzymaktivität U

Mit c (Konzentration) = $\frac{E}{\epsilon \cdot d} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right]$ (Nach Lambert-Beer), d (Schichtdicke der Küvette) = 1 [cm], E (Extinktion) = OD₄₂₀, ϵ (Extinktionskoeffizient für Ortho-Nitrophenolat) = 4,5 $\left[\frac{\text{cm}^2}{\mu\text{mol}} \right]$, V_A (Volumen des Reaktionsansatzes) = 2,6 [ml].

$$\text{spezifische Enzymaktivität } \frac{U}{\text{mg}} = \frac{V_A \cdot E}{\epsilon \cdot t \cdot V_P \cdot c_{\text{Protein}}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg Protein} \cdot \text{min}} \right]$$

Formel 4.6: Berechnung der spezifischen Enzymaktivität U/mg

Mit c_{Protein} (Proteinkonzentration) = OD₆₅₀ · 0,25 $\left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]$ (denn OD₆₅₀ = 1 = 0,25 $\frac{\text{mg Protein}}{\text{ml}}$), E (Extinktion) = OD₄₂₀, ϵ (Extinktionskoeffizient für Ortho-Nitrophenolat) = 4,5 $\left[\frac{\text{cm}^2}{\mu\text{mol}} \right]$, t (Reaktionszeit bis zum Abstoppen der Reaktion) = [min], V_A (Volumen des Reaktionsansatzes) = 2,6 [ml], V_P (Volumen der Probe) = [ml].

4.5.5 Bakteriellles „Two-Hybrid“ System

Ein System zur Untersuchung der Interaktion zweier Proteine ist das bakterielle „Two-Hybrid“ System (BTH). In dieser Arbeit wurde das LexA basierte bakterielle „Two-Hybrid“ System von Dmitrova et al. (Dmitrova et al., 1998) verwendet. LexA gehört zu der „winged helix-turn-helix“ Familie der Transkriptionsfaktoren. Das Protein besteht aus einer aminoterminalen DNA-Bindedomäne und einer carboxyterminalen Dimerisierungsdomäne. Da der von LexA reprimierte Promotor zwei benachbarte Bindestellen hat, kann der LexA Repressor nur als Dimer fungieren. Durch verschiedene Mutationen im LexA Repressor (LexA408) und Veränderungen in einer Hälfte der palindromischen Bindestelle im Operator (op408) kann eine Homodimerbildung von LexA ausgeschlossen werden, d.h. nur ein Heterodimer aus LexA und LexA408 kann an die Bindestellen binden. Durch Austausch der Dimerisierungsdomäne von LexA bzw. LexA408 durch die beiden zu untersuchenden Proteine, kann eine mögliche Wechselwirkung beider Proteine detektiert werden (Dmitrova et al., 1998).

Als Expressionsstamm wurde SU202 verwendet. Dieser Stamm hat ein *lacZ* Reportergen unter der Kontrolle des op408/op+ Promotor-Operator Bereichs, sodass die Expression eines funktionsfähigen LexA Repressors zur vollständigen Repression der Expression der β -Galaktosidase führt, was in einem β -Galaktosidase Test nachgewiesen werden kann. Als Kontrollen wurden die beiden Repressoren mit einem „Fos-Zipper“ (pMS604) bzw. einem „Jun-Zipper“ (pDL804) fusioniert. Hierbei handelt es sich um eukaryotische Proteine, die einen „Leuzin-Reißverschluss“ bilden. Bei einer Koexpression dieser Plasmide im SU202 Stammhintergrund wird unter Zugabe von 1 mM IPTG eine nahezu vollständige Repression des *lacZ* Reportergens erreicht, so dass im anschließenden β -Galaktosidase Test nur eine sehr geringe spezifische Aktivität der β -Galaktosidase nachgewiesen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um eine Interaktion von SgrT mit der EIIB^{Glc} Domäne von EIICB^{Glc} zu zeigen. Hierzu wurden die jeweiligen Motive des „Fos“- bzw. „Junzippers“ gegen die zu untersuchenden Proteine ausgetauscht und ebenfalls ein β -Galaktosidase Test zur Analyse und Quantifizierung dieser Wechselwirkung durchgeführt. Die Plasmide wurden in den Stamm SU202 kotransformiert (in verschiedenen Kombinationen und mit entsprechenden Kontrollen) und für eine Übernachtskultur unter selektiven Bedingungen in LB₀ Medium angezogen. Hierbei wurden jeweils zwei Übernachtskulturen parallel angezogen, wobei einer 1 mM IPTG zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden in 10 ml frisches Medium zu einer OD₆₅₀ = 0,05 angeimpft. Hierbei wurden der bereits induzierten Kultur wiederum 1 mM IPTG zugesetzt. Die Kulturen wurden bis zu einer OD₆₅₀ = 0,4 bis 0,6 inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Kultur abzentrifugiert und für den quantitativen β -Galaktosidase Test (s. Kapitel 4.5.4) eingesetzt. Eine hohe β -Galaktosidase Aktivität bedeutet in diesem Fall keine Wechselwirkung der beiden Proteine, wohingegen eine niedrige bzw. keine β -Galaktosidase Aktivität auf eine Interaktion hindeutet.

4.5.6 Hefe „Two-Hybrid“ System

Das Hefe „Two-Hybrid“ System (HTH) ist ein weiteres System, welches dazu genutzt werden kann, Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen. Dies kann sowohl mit hefeeigenen als auch mit Fremdproteinen, z.B. aus *E.coli* geschehen. Dafür werden Fusionsproteine der zu untersuchenden Interaktionspartner mit der DNA-Bindedomäne bzw. der Transkriptions-Aktivierungsdomäne des Gal4p Transkriptionsfaktors hergestellt. Beide Fusionsproteine besitzen eine Kernlokalisationssequenz. Findet eine Wechselwirkung zwischen den beiden Fusionsproteinen auf Grund der Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine statt, so entsteht ein funktionsfähiger Gal4p Transkriptionsfaktor, welcher die Transkription von drei verschiedenen Reportergenen (*lacZ*, *his*, *ade*) initiiert. Dies kann auf unterschiedlichen Selektionsplatten durch Wachstum (Histidin- oder Adeninmangelmedium) oder Blaufärbung (X-Gal Medium) der Zellen nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde das Protokoll nach James et al. sowie der *S.cerevisiae* Stamm PJ69-4 α (*his*, *trp*, *leu*, *ade*) verwendet (James et al., 1996). Die beiden Vektoren, mit deren Hilfe die Fusionsproteine der DNA-Binde- und Aktivierungsdomäne hergestellt wurden, heißen pGBDC1 bzw. pGAD424A. Bei beiden Vektoren handelt es sich um so genannte „Shuttle“-Vektoren, die sowohl in Hefe als auch in *E.coli* verwendet werden können. Für die Verwendung in *E.coli* besitzen sie einen *ori* und ein *bla* Gen zur Selektion auf ampicillinhaltigem Medium. Außerdem zeigen beide einen 2 μ m Replikationsursprung und ein LEU-2 Gen (pGAD424A) bzw. ein TRP-1 Gen (pGBDC1) für die Verwendung und zur Selektion in *S.cerevisiae*. Der Vektor pGAD424 kodiert für die Transkriptions-Aktivierungsdomäne des Gal4-Proteins unter der Kontrolle des ADH1-Promotors mit dem ADH1-Terminator. Der Vektor pGBDC1 kodiert für die DNA-Bindedomäne des Gal4-Proteins ebenfalls unter der Kontrolle des ADH1-Promotors mit ADH1-Terminator. Als Positivkontrollen wurden die beiden Vektoren pVA3 (p53₍₇₂₋₃₉₀₎-Gal4-DNA-Bindedomänenfusion) und pJH1202 (simian Virus 40 T-Antigen₍₈₄₋₇₀₈₎-Gal4-Aktivierungsdomänenfusion) verwendet. Die Stärke einer Protein-Protein-Wechselwirkung steht im Hefe „Two-Hybrid“ System im direkten Verhältnis zu dem Expressionsniveau der Reportergene. Eine schwache Wechselwirkung führt zu einem Wachstum der Zellen auf Histidinmangelmedium, wohingegen eine starke Wechselwirkung zudem ein Wachstum der Zellen auf Adeninmangelmedium verursacht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Hefe „Two-Hybrid“ System die Wechselwirkung von SgrT mit der EIIB^{Glc} Domäne von EIICB^{Glc} untersucht. Daher wurden die entsprechenden Genbereiche in die Vektoren pGAD424A und pGBD-C1 kloniert. Anschließend wurden die Vektoren mit verschiedenen Kontrollen und in verschiedener Kombination in den *S.cerevisiae* Stamm PJ69-4 α transformiert. Die Zellen wurden auf SC -leu, -trp, +4 x *ade* Medium ausplattiert und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Für den „Two-Hybrid“-Test wurden von jeder Platte jeweils drei Einzelkolonien in je 1 ml SC -leu, -trp, +4 x *ade* Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1 min, 3.000 rpm) geerntet und in sterilem ddH₂O gewaschen. Anschließend erfolgte eine Resuspension der Zellen in 2 ml sterilem ddH₂O. Von jeder Kultur wurde dann ein Tropfen (10 μ l) auf jeder der drei Selektionsplatten getropft. Die Platten wurden für 2 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend ausgewertet. Die Selektionsplatten waren:

SC ohne Leuzin, Tryptophan und mit 4 fach Adenin (Kontrollplatte)

SC ohne Leuzin, Tryptophan, Histidin und mit 4 fach Adenin (schwache Wechselwirkung)

SC ohne Leuzin, Tryptophan und Adenin (starke Wechselwirkung)

4.5.7 Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (BiFC)

Eine dritte Methode zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen *in vivo* stellt die Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (engl. „Bimolecular fluorescence complementation“, BiFC) dar. Dabei liegen die beiden zu untersuchenden Proteine jeweils an ein N-terminales bzw. C-terminales Fluoreszenzprotein-Fragment (z.B. GFP) fusioniert vor. Bei Wechselwirkung der beiden Proteine gelangen auch die Fluoreszenzprotein-Fragmente in räumliche Nähe und können ein fluoreszierendes Volllängenprotein ausbilden. Diese Komplexbildung ist in den meisten Fällen irreversibel, sodass eine stabile Fluoreszenz detektiert werden kann, was aber auch eine Real-Time Detektion der Komplexbildung ausschließt. Die erzeugte Fluoreszenz durch BiFC-Komplexe in lebenden Zellen zeigt nur etwa 10 % der Fluoreszenz, wie sie durch ein intaktes Volllängen-GFP produziert wird, was eine sensitive Methode zur Detektion erfordert. BiFC-Komplexe können in verschiedenen Zellkompartimenten und Zelltypen gebildet werden und ermöglichen so u.a. auch die Analyse der Wechselwirkung zwischen membranintegralen und cytoplasmatischen Proteinen in *E.coli* (Kerppola, 2008).

Im Jahr 2004 veröffentlichte die Gruppe L. Regan ein Protokoll zur BiFC-Analyse in *E.coli* (Magliery et al., 2005; Wilson et al., 2004). Sie stellten zwei kompatible Vektoren vor, welche sich für die BiFC Analyse mit GFP-Fragmenten in *E.coli* eignen (s. Abbildung 4.3).

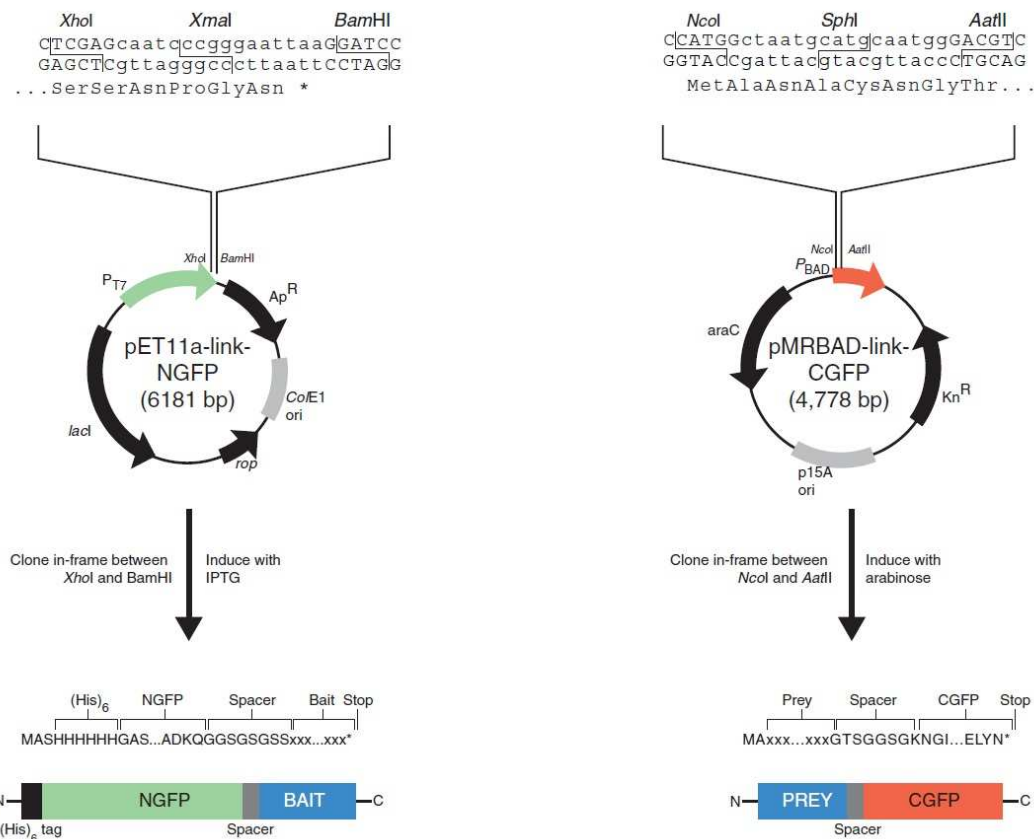


Abbildung 4.3: Verwendete Plasmide für BiFC-Analysen

Gezeigt sind die beiden in dieser Arbeit verwendeten Plasmide pET11a-link-NGFP und pMRBAD-link-CGFP, die von der Arbeitsgruppe L. Regan zur Verfügung gestellt wurden. Angegeben sind die Größen der Plasmide, Resistenzgene, Origins und weitere kodierte Gene, die „Multiple Cloning Site“ zum Einbringen des gewünschten Gens und weitere Informationen. Entnommen aus (Wilson et al., 2004).

Der Fusionsvektor mit N-terminalem GFP (AS 1-157) pET11a-link-NGFP besitzt einen ColE1-Origin, ein *bla* Gen für Ampicillinresistenz und einen T7-Promotor und Terminator. Durch die Restriktionsenzyme-Erkennungsstellen für *XhoI*, *XmaI* und *BamHI* kann das gewünschte Gen im Leseraster hinter das N-terminale GFP-Fragment kloniert werden. Ein zweiter kompatibler Vektor ist der pMRBAD-link-CGFP mit einem p15A-Origin, einer Kanamycin-Resistenzkassette und einem Arabinose-induzierbaren Promotor. Hier erfolgt die Klonierung des gewünschten Gens durch *NcoI*, *SphI* oder *AatII* vor das C-terminale GFP-Fragment (AS 158-238). Beide Vektoren können gemeinsam in einer Zelle exprimiert und durch Zugabe von IPTG bzw. Arabinose die Proteinexpression induziert werden. Des Weiteren wurden zwei Positivkontrollen konstruiert, bei denen optimierte Leuzin-Zipper an die C- bzw. N-terminalen Fragmente des GFP fusioniert wurden (pET11a-Z-NGFP und pMRBAD-Z-CGFP) (Magliery et al., 2005).

In dieser Arbeit wurden die Plasmide von der Arbeitsgruppe L. Regan von der Yale-University, New Haven, USA bezogen (pET11a-link-NGFP, pET11a-Z-NGFP, pMRBAD-link-CGFP und pMRBAD-Z-CGFP). Die Methode erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll dieser Arbeitsgruppe (Wilson et al., 2004).

Zunächst wurden die benötigten Plasmide nach dem Protokoll kloniert. Dafür wurden die Vektoren pET11a-link-NGFP und pMRBAD-link-CGFP verwendet. Die jeweilig zusammengehörigen Plasmide wurden dann in den Stamm BL21(λDE3) bzw. JKA17 kotransformiert. Hierbei wurden bis zu 20 µl Plasmid-DNA eingesetzt oder die Plasmide nacheinander transformiert, da beide Stämme eine sehr schlechte Transformationseffizienz zeigten. Von den Kolonien wurden Übernachtskulturen in Vollmedium mit entsprechenden Antibiotika angezogen und am nächsten Tag in 25 ml frisches LB₀ Medium mit Antibiotika überimpft. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C über Nacht im Schüttelkolben. Anschließend wurden den Kulturen

100 μM IPTG und 0,4 % Arabinose sowie ggf. 0,2 % Glukose zugesetzt und für drei Tage bei 25 °C im Schüttelkolben weiter inkubiert. Die niedrige Temperatur dient der optimalen Überproduktion der Fusionsproteine (Ausschluss von „Inclusionbodies“), die Glukose stellt optimale Bedingungen für eine Wechselwirkung von SgrT und EIICB^{Glc} dar. Nach drei Tagen wurde den Kulturen ggf. noch einmal 0,2 % Glukose zugegeben und für 5 Stunden weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in 1 ml Lysispuffer (s. Kapitel 3.7, Lysispuffer BiFC) bzw. Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle resuspendiert. Von den Kulturen wurde zudem die OD₄₂₀ bestimmt, um die gleiche Menge Zellen einsetzen zu können. Die Zellen wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet oder die Fluoreszenz im Fluorimeter bestimmt.

Für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung erfolgte die Resuspendierung in Minimalmedium. Die Suspension wurde dann auf einen mit Polylysin beschichteten Objektträger gegeben und unter dem Mikroskop betrachtet. Für die Bestimmung der Fluoreszenz im Fluorimeter wurden die Zellen in Lysispuffer resuspendiert, je 100 μl Zellen mit gleicher OD₄₂₀ eingesetzt und in schwarze Mikrotiterplatten gegeben. Die Fluoreszenz konnte im Fluorimeter bestimmt werden. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Leerwert diente der verwendete Puffer.

4.5.8 „Crosslinking“ von Proteinkomplexen mit Paraformaldehyd

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* kann das so genannte „Crosslinking“ von Proteinkomplexen verwendet werden. Eine Möglichkeit zum „Crosslinking“ der Proteine besteht in der Behandlung der Zellen mit Paraformaldehyd. Dafür werden die Zellen unter gewünschten Bedingungen angezogen und bei einer hohen Zelldichte mit Paraformaldehyd behandelt. Dieses bindet alle Proteine, die sich zum Zeitpunkt der Zugabe in räumlicher Nähe (2 Å) zueinander befinden, zu Komplexen aneinander. Durch anschließende Reinigung des gewünschten Proteins (d.h. des entstandenen Komplexes) und einem Western- und Immunoblot können die Proteine in einem Komplex nachgewiesen werden (Herzberg et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung von EIICB^{Glc} und SgrT untersucht. Die beiden Proteine wurden dafür mit „Tags“ versehen und auf kompatiblen Vektoren (pACYC184sgrTec3HA, pRR48GH) in einen gewünschten Stamm transformiert. Für das „Crosslinking“ Experiment wurde eine Übernachtskultur in LB₀ mit entsprechenden Antibiotika angezogen und in 200 ml frisches LB₀ Medium mit Antibiotika (und ggf. 0,2 % Glukose) auf eine OD₆₅₀ = 0,1 überimpft. Die Anzucht erfolgte im Schüttelkolben bei 37 °C bis zu einer OD₆₅₀ = 0,2. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Protein-Überexpression von EIICB^{Glc}-His und SgrTec3HA durch IPTG Zugabe induziert (in der Regel 1 mM). Bei einer OD₆₅₀ = 0,8 wurde den Zellen ggf. noch einmal 0,2 % Glukose zugegeben. Die Behandlung der Zellen mit Formaldehydlösung (Endkonzentration 0,3 %, s. Tabelle 3.9) erfolgte bei einer OD₆₅₀ = 1. Anschließend wurden die Kulturen für weitere 20 min bei 37 °C im Schüttelkolben inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 5.000 rpm) geerntet und in Lysispuffer für Proteinreinigung (s. Tabelle 3.9) gewaschen. Das Zellpellet konnte bei -20 °C gelagert oder zur Solubilisierung der Membranproteine und abschließender Proteinreinigung weiter verwendet werden (s. Kapitel 4.5.9 und 4.5.10).

4.5.9 Solubilisierung von Membranproteinen

Die Solubilisierung von Membranproteinen dient dem Herauslösen der Proteine aus der Membran. Durch ein Detergenz (für EIICB^{Glc} Triton X-100) werden Mizellen gebildet, welche die Membranproteine aufnehmen und so eine Membran ersetzen. Durch die Solubilisierung kann auch mit Membranproteinen eine Proteinreinigung durchgeführt werden, sodass sie z.B. der Proteinreinigung von EIICB^{Glc} mit Ni-NTA-Agarose vorgeschaltet wurde (s. Kapitel 4.5.10).

Vor der Solubilisierung wurden genügend Zellen (ca. 300 ml) unter den gewünschten Bedingungen bis zu einer $OD_{650} = 1$ angezogen und geerntet. Das Pellet wurde in Lysispuffer gewaschen und eingefroren oder direkt für die Solubilisierung weiter verwendet. Gegebenenfalls erfolgte die Anzucht der Zellen für „Crosslinking“-Experimente wie in Kapitel 4.5.8 beschrieben.

Für die Solubilisierung wurde das Zellpellet in 5 bis 10 ml Lysispuffer resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurden die Zellen mit Ultraschall beschallt. Er erfolgte je nach Volumen zwischen 5 und 10 min, je mit 10 Sekunden Schall/Pause Intervallen und einer Amplitude von 10 % (Branson Digital Sonifier Model 250-D). Um einem Abbau der Proteine vorzubeugen wurde die Zellsuspension mit 1 mM AEBSF versetzt. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (4 °C, 14.000 rpm, 10 min) und der Überstand in ein Becherglas gegeben. Diesem wurde unter Rühren bei Raumtemperatur tröpfchenweise das Detergenz Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 2 % zugegeben. Die Probe wurde anschließend 30 min weiter bei Raumtemperatur und unter Rühren inkubiert. Um die solubilisierten Proteine (und alle löslichen Proteine) von den Membranvesikeln zu trennen, wurde die Probe einer Ultrazentrifugation unterzogen, für eine Stunde bei 72.000 rpm und 4 °C. Nach der Zentrifugation konnte der Überstand abgenommen, bei 4 °C gelagert und z.B. für eine Proteinreinigung mit Ni-NTA-Agarose (s. Kapitel 4.5.10) oder über Co-Immunopräzipitation (s. Kapitel 4.5.11) genutzt werden.

4.5.10 Proteinreinigung mit Ni-NTA-Agarose

Zur Proteinreinigung des Membranproteins EIICB^{Glc} wurde Nickel-NTA-Agarose (Nickel-Nitrilotriessigsäure) von Qiagen verwendet. Diese Art der Reinigung beruht auf der hohen Affinität von „His-Tags“ an die Ni-NTA-Agarose und anschließende Elution durch Imidazol. Der Vorteil dieser Reinigung gegenüber einer Reinigung über Affinitätsäulen liegt in der hohen Mobilität von Ni-NTA-Agarose und Proteinsuspension sowie einer langen gemeinsamen Inkubationszeit von einer Stunde. Dadurch wird eine optimale Bindung von EIICB^{Glc}-His an die Ni-NTA-Agarose ermöglicht.

Für die Proteinreinigung über Ni-NTA-Agarose von Qiagen wurden zunächst genügend Zellen angezogen (ca. 300 ml) und entsprechend vorbehandelt. Unter Umständen konnte ein „Crosslinking“ von Proteinkomplexen vorgeschaltet werden (s. Kapitel 4.5.11). Der Proteinreinigung über Ni-NTA-Agarose geht im Fall von einer Reinigung von Membranproteinen (z.B. EIICB^{Glc}) eine Solubilisierung der Proben voraus (s. Kapitel 4.5.9). Die Ni-NTA-Agarose wurde im Kühlschrank aufbewahrt und musste vor Verwendung invertiert werden, bis keine Phasen mehr sichtbar waren. Pro Milliliter Probe wurden 250 µl Ni-NTA-Agarose in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen mit Deckel gegeben und entsprechend der Probengröße ddH₂O zugegeben. Das Röhrchen wurde ein paarmal invertiert und die Ni-NTA-Agarose bei 800 rpm für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und verworfen und die Ni-NTA-Agarose erneut in ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde die Agarose in einer entsprechenden Menge Lysispuffer äquilibriert. Die Probe (Überstand nach Ultrazentrifugation (s. 4.5.9) bzw. in Lysispuffer resuspendiertes Zellpellet) wurde der Ni-NTA-Agarose zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert. Durch dieses Vorgehen sollte eine möglichst hohe Flexibilität und Mobilität von Proteinen und Ni-NTA-Agarose erreicht werden, sodass die Proteine in hohen Mengen an die Ni-NTA-Agarose binden können. Die Ni-NTA-Agarose wurde anschließend zweimal mit Waschpuffer von ungebundenem Protein gereinigt. Als letztes wurde 1/8 des bisherigen Volumens Elutionspuffer zugegeben, um das spezifisch gebundene Protein von der Ni-NTA-Agarose mit einem Überschuss an Imidazol abzulösen. Dieser Schritt wurde bis zu dreimal wiederholt. Die Elutionsfraktionen wurden ggf. erneut mit AEBSF (1 mM) versetzt und konnten im Kühlschrank gelagert bzw. direkt für einen Western- und Immunoblot (s. Kapitel 4.5.2) verwendet werden. Wurden die Proben durch „Crosslinking“ Versuche gewonnen, erfolgte vor einem Westernblot in jedem Fall eine Denaturierung der Komplexe durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min.

4.5.11 Co-Immunopräzipitation (CoIP)

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen kann eine so genannte Co-Immunopräzipitation (CoIP) verwendet werden. Bei dieser Methode werden die beiden zu untersuchenden Proteine mit unterschiedlichen „Tags“ gekoppelt und gemeinsam in einer Zelle überexprimiert. Durch anschließende Reinigung eines der Proteine und Western- und Immunoblot mit Antikörpern gegen beide „Proteintags“, kann festgestellt werden, ob eine stabile Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen besteht. In diesem Fall sind Signale von beiden „Proteintags“ in der Elutionsprobe zu finden. Findet keine stabile Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen statt, lässt sich nur das gereinigte Protein nachweisen.

Für die CoIP wurden die Zellen, welche beide zu untersuchenden Proteine auf Plasmiden kodierten, für eine Übernachtskultur in LB₀ Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft. Von dieser Kultur wurde eine frische Kultur angeimpft, in 10 ml LB₀ mit Antibiotika zu einer OD₆₅₀ = 0,05. Nach einer Verdopplung der Zellen, bei OD₆₅₀ = 0,1 wurden die Zellen mit 100 µM bis 1 mM IPTG induziert und weiter bei 37 °C inkubiert, bis zu einer OD₆₅₀ = 1. Nach Erreichen der Ziel-OD wurde 1 ml der Zellen im Cup abzentrifugiert und in 1 ml Lysispuffer (Kit) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (3 min, je mit 10 Sekunden Schall/Pause Intervallen und einer Amplitude von 10 % (Branson Digital Sonifier Model 250-D)) und unter Zugabe von 1 mM Proteasehemmer (AEBSF). Die Zelltrümmer wurden für 10 min bei 4 °C und 9.050 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Cup überführt. Bei einer CoIP mit EIICB^{Glc}-His erfolgte zudem eine Solubilisierung (s. Kapitel 4.5.9) der Proben, um EIICB^{Glc} in Membranvesikeln besser reinigen zu können. Die eigentliche CoIP erfolgte mit dem Kit „Magnetic immunoprecipitation for subsequent analysis by SDS-PAGE“ und den „µMACS His Tagged Protein Isolation Kit, human“ von Macs Reagents (Milteny Biotec) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden von jedem Schritt die Proben in Cups aufgefangen und in einer anschließenden SDS-Page analysiert.

4.5.12 Proteinreinigung über Ni-NTA Säulen

Die Proteinreinigung über Ni-NTA Säulen erfolgte mit dem „Ni-NTA Spin Columns“ Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Zur Zellyse, Waschen und Elution der Zellen wurden die in Tabelle 3.9 als Lysispuffer, Waschpuffer und Elutionspuffer bezeichneten Puffer verwendet.

4.5.13 Proteinreinigung über die ÄKTA

Eine weitere Methode zur Reinigung von Proteinen ist die Reinigung mit Hilfe einer FPLC. Bei dieser Methode werden u.a. mit einem „His-Tag“ versehene Proteine über eine entsprechende Affinitätschromatographie-Säule gereinigt. Die Elution der Proteine erfolgt über eine ansteigende Konzentration von Imidazol.

Für die Proteinreinigung über die ÄKTA wurde zunächst eine ausreichende Menge an Zellen (mindestens 1 l) bei optimalen Bedingungen angezogen und zur Proteinüberproduktion induziert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 5.000 rpm und 4 °C in der Sorvall Evolution RC Centrifuge (Thermo scientific). Das Zellpellet wurde anschließend in 25 ml Puffer A (s. Tabelle 3.9, Puffer A für FPLC) gewaschen und in 2-8 ml resuspendiert. Zur weiteren Verarbeitung wurde die Zellsuspension ggf. in zwei Portionen aufgeteilt und die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen (5 min, 10 sek Schall, 10 sek Pause, Amplitude 10 %). Danach wurden die Proben in Cups umgefüllt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt (10 min, 12.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 mM AEBSF versehen und für die Proteinreinigung verwendet. Die komplette Gesamtproteinsuspension wurde anschließend in 2 ml Portionen über einen 2 ml Loop auf eine Affinitätschromatographie-Säule (HisTrapTM FF Säule von GE Healthcare) aufgetragen und mit der ÄKTA FPLC (GE Healthcare) gereinigt. Dazu wurde die Säule zunächst mit Puffer A bei einer Flussrate von 1 ml/min gespült, bis kein ungebundenes Protein mehr

herunter gewaschen wurde (UV Anzeige nahe 0). Anschließend wurde in einem linearen Gradienten innerhalb von 20 ml die Konzentration des Puffers B (s. Tabelle 3.9 Puffer B für FPLC) von 0 % auf 100 % erhöht, um spezifisch gebundenes Protein von der Säule zu waschen. Sobald Protein von der Säule gewaschen wurde (UV Anzeige steigt an), wurde der Gradient gestoppt („Hold“) und so lange mit der entsprechenden Mischung von Puffer A und B gespült, bis das gesamte Protein herunter gewaschen war (UV Anzeige wieder nahe 0) und erst dann mit dem Gradienten fortgefahren. Dies wurde bei jedem Anstieg der UV Anzeige wiederholt. Der Durchfluss der Säule wurde in 2 ml Fraktionen aufgefangen. Anhand des Elutionsprofils wurden die entsprechenden Protein-enhaltenden Fraktionen in einer SDS-Gelelektrophorese analysiert und ggf. vereinigt und dialysiert (s. 4.5.14).

4.5.14 Dialyse

Zur Umpufferung von Proteinen wurde die Methode der Dialyse verwendet. Dies erfolgte z.B. im Anschluss an die Proteinreinigung über die FPLC, um die Proteine vom Elutionspuffer zu trennen. Die Dialyse erfolgte in Dialysekassetten oder Dialyseschläuchen mit einer Porengröße von 25 Å (Mw: 12.000-14.000) in einem Liter des in Tabelle 3.9 angegebenen Dialysepuffers bei 4 °C über Nacht.

4.6 Biochemische Methoden

4.6.1 Acetat/Glukose/Laktose-Bestimmung

Zur Bestimmung von Acetat, Glukose oder Laktose im Medium wurde das „Essigsäure (Acetat)“ Kit, das „D-Glukose“ Kit oder das „Laktose/D-Glukose“ Kit von r-Biopharm verwendet. Die Anzucht der Zellen zur Bestimmung erfolgte in einer Wachstumskurve (s. Kapitel 4.1.2 und 4.1.3). Zu jeder Stunde wurden 300 µl Probe entnommen und abzentrifugiert. Der Überstand diente zur Acetat-, Glukose- bzw. Laktosebestimmung mit Hilfe der oben genannten Kits. Die Durchführung der Bestimmung erfolgte nach den Protokollen des Herstellers, allerdings wurde jeweils nur ein Viertel der angegebenen Mengen an Puffern und Proben eingesetzt.

4.6.2 Bestimmung der spezifischen Transportaktivität

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die spezifische Transportaktivität von verschiedenen EIICB^{Glc}-Derivaten unter unterschiedlichen Bedingungen bestimmt werden. Obwohl EIICB^{Glc} ein Glukose Transporter ist, wurde der Transporttest mit ¹⁴C-markierter α-Methyl-Glukose durchgeführt. Dies hat den Vorteil, dass α-Methyl-Glukose im Gegensatz zu Glukose spezifisch nur über EIICB^{Glc} von den Zellen aufgenommen und nicht verstoffwechselt wird.

Die Methode wurde im Wesentlichen nach Schmid et al. (Schmid et al., 1982) durchgeführt. Die Anzucht der Zellen erfolgte nach den im Ergebnisteil angegebenen Medien und Bedingungen (s. Kapitel 5.2.2.8). Für den Transporttest wurden aus der exponentiellen Wachstumsphase 3 ml mit je 1×10^9 Bakterien pro ml entnommen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal in Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen und anschließend im gleichen Medium (3 ml) resuspendiert. Ein Milliliter der Zellsuspension wurde zur Bestimmung der OD₆₅₀ verwendet. Von den restlichen Zellen wurden 740 µl in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und für 5 min bei 25 °C im Wasserbad inkubiert. Die Membranfilter (Porengröße 0,65 µm), über welche die Zellen abgesaugt werden sollten, wurden in Bidest eingeweicht und auf dem Kamin vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl radioaktiv markierter ¹⁴C α-Methyl-Glukose (Als Arbeitslösung wurde eine 1:30 in Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle verdünnte Stocklösung verwendet) gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten (in der Regel 30 sek, 60 sek, 90 sek) wurden jeweils 200 µl Probe aus dem Teströhrchen entnommen, sofort über einen Membranfilter abgesaugt und zweimal mit je 1 ml Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen. Die Filter wurden

anschließend vorsichtig mit einer Pinzette vom Kamin abgenommen, mit Stecknadeln schwebend auf einer Styroporunterlage befestigt und für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Filter in Szintillationsröhrchen gegeben, mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit überdeckt und die cpm-Rate im Szintillationszähler für je 5 min bestimmt. Als Leerwert wurde zudem ein Filter ohne Zellsuspension gemessen. Vier zeitabhängige Werte wurden dann graphisch aufgetragen und Δcpm aus dem linearen Teil der Kurve bestimmt. Die Berechnung der spezifischen Transportaktivität erfolgte nach der Formel 4.7.

$$\text{spezifische Transportaktivität } U = \frac{4 \cdot V_A \cdot \Delta\text{cpm} \cdot K \cdot 10^9}{\text{OD}_{650} \cdot t \cdot V_F \cdot Z \cdot V_B} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{min} \cdot \text{mg Protein}} \right]$$

Formel 4.7: Berechnung der spezifischen Transportaktivität

Mit: 4 (Umrechnungsfaktor für Proteingehalt, denn $\text{OD}_{650} = 1 = 0,25 \text{ mg Protein/ml}$), V_A (Endvolumen des Reaktionsansatzes) = 0,75 [ml], Δcpm (gezählte Impulse pro Minute abzüglich des Leerwertes), K (Substratkonzentration der radioaktiven Arbeitslösung (1:30 Verdünnung)) = $6 \times 10^{-5} \text{ [mol/l]}$, OD_{650} (gemessene optische Dichte), t (Umsetzung pro Minute) = 1 [min], V_F (Volumen der entnommenen Probe) = 0,2 [ml], Z (Radioaktive Zerfallsrate der Arbeitslösung(1:30 Verdünnung)) = 4.100.000 [cpm/ml], V_B (Volumen der eingesetzten Bakteriensuspension) = 0,74 [ml].

4.7 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine Möglichkeit zur Überprüfung der Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle dar. Dafür werden Fluoreszenzmarker wie das grün fluoreszierende GFP (engl. „green fluorescent protein“) an das entsprechende Protein gekoppelt und die Verteilung des Fluoreszenzmarkers unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

4.7.1 Probenvorbereitung für die fluoreszenzmikroskopische Analyse

Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen mit dem Fusionsprotein transformiert und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen angezogen. Dabei erfolgte eine Induktion des Vektors mit dem Fusionsprotein (i.d.R. mit 5 μM IPTG bzw. 100 mM Arabinose, je nach Vektor). Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Erfolgte die Anzucht in Vollmedium, wurden die Zellen zusätzlich in Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen, um Hintergrundfluoreszenz durch das Vollmedium zu vermeiden. Etwa 2 μl der Kultur wurden dann auf einen zuvor mit Polylysin behandelten Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Das Polylysin dient der Fixierung der Zellen auf dem Objektträger.

Für die Kontrollfärbung der Zellmembran wurden die Zellen mit FM4-64 inkubiert. Der Farbstoff wurde in einer Endkonzentration von 4 μM zu der Zellsuspension zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

4.7.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde das „Axioplan 2 imaging“-System der Firma Zeiss verwendet. Für die Aufnahmen wurden verschiedene Filter (Chroma, Rockingham, USA) und Belichtungseinstellungen verwendet. Als Objektiv wurde in der Regel ein „100 x/1.45 NA Oil DIC“ Objektiv (Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz) verwendet. Die Bilder wurden mit der „cool- SNAP HQ“-Kamera von Photometrics aufgenommen und anschließend mit dem Programm „Metamorph“ und „Huygens Essential“ bearbeitet. Die Bedienung des Mikroskops erfolgte ebenfalls mit dem Programm „Metamorph“ und einer „MAC200“ (LUDL, Hawthorne, USA) Kontrolleinheit.

4.7.3 Bildbearbeitung und Dekonvolution

Die Bearbeitung der Fluoreszenzbilder erfolgte mit dem Programm „Huygens Essential for Linux“. Um Hintergrundfluoreszenz und Unschärfe zu entfernen, wurde eine Dekonvolution der Bilder durchgeführt. Hierfür wurden in der Regel die in Tabelle 4.16 angegebenen Parameter verwendet. Zusätzlich wurde den Bildern ein Maßstab zugefügt, welcher eine Länge von 5 μm repräsentiert.

Tabelle 4.16: Bildbearbeitung und Dekonvolution

Angegeben sind die in der Regel eingestellten Parameter zur Dekonvolution von Fluoreszenzbildern.

Parameter	
Iterationen	5
Signal zu Rauschen Verhältnis	30
Numerische Apertur des Objektivs	1,45 (100 x)
Exzitation (GFP)	488 nm
Emission (GFP)	520 nm

4.8 Bioinformatische Analysen

Mit Hilfe verschiedener, frei zugänglicher Internetdatenbanken und Softwareprogramme sowie erworbener Software erfolgte die Recherche und Auswertung der durchgeführten Versuche. In Datenbanken wurden Informationen über Stämme, Gene, Proteine, Aminosäure- und Nukleotidsequenzen erhalten. Sequenzvergleiche und Multiple Alignments wurden mit den Programmen „Clustal W“ und der Datenbank von NCBI durchgeführt. Mit Hilfe von „Clonemanager“ konnten u.a. Plasmide und Primer erstellt werden sowie Sequenzen von Genen und Vektoren angezeigt werden. „Clonemanager“ diente ebenfalls zur Erstellung von multiplen Sequenzvergleichen und neben „Chromas“ zur Überprüfung von Sequenzierungen. „Origin“ diente zur Erstellung von Wachstumskurven und Balkendiagrammen. Die Fluoreszenzbilder wurden mit den Programmen „Metamorph“ und „Huygens Essential“ bearbeitet. Die Bildaufnahme und Bearbeitung von Agarosegelen und Immunoblots erfolgte mit den Programmen „Biocapt“ und „Odyssey Application Software“. Alle Programme und Internetseiten sind unter Kapitel 3.13 angegeben.

5 Ergebnisse

Im Rahmen des FORSYS-Partner Projektes sollten in dieser Arbeit zwei Regulationsmechanismen des Glukose-PTS genauer charakterisiert werden. Auf der einen Seite stand das natürlich vorkommende SgrRST-System im Fokus, auf der anderen Seite die artifizielle Regulation durch eine IPTG-induzierbare Expression des EIICB^{Glc}-Transportproteins. Der erste Abschnitt dieses Kapitels befasst sich daher mit der Regulation des Glukose-PTS durch das SgrRST-System. Dabei sollte besonders auf die Wechselwirkung zwischen SgrT und dem Membranprotein EIICB^{Glc} eingegangen und deren Interaktion genauer analysiert und charakterisiert werden. Im zweiten Abschnitt wird die Konstruktion und Optimierung von Stämmen dargestellt, die ein mit einem „His-Tag“ versehenes und ggf. mit IPTG induzierbares, chromosomal kodiertes EIICB^{Glc} exprimieren.

Alle gezeigten Ergebnisse beruhen auf mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die dargestellten Bilder und Diagramme zeigen entsprechende Mittelwerte oder repräsentative Ergebnisse.

5.1 Die Regulation von Phosphotransferase-Systemen durch das SgrRST-System

Das Ziel dieses Projektes war die Charakterisierung der Regulation von verschiedenen Phosphotransferase-Systemen durch das SgrRST-System. Dabei sollte im Besonderen die Wechselwirkung von SgrTec (*Escherichia coli*) bzw. SgrTkpn (*Klebsiella pneumoniae*) mit dem Glukose-PTS im Vordergrund stehen. SgrT konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen (Wadler und Vanderpool, 2007) als Glukose-PTS regulierendes Protein identifiziert werden. Im Rahmen einer Masterarbeit zu diesem Thema (Kosfeld, 2008) konnte die Regulation auf das Glukose transportierende Enzym EIICB^{Glc} spezifiziert werden. Dabei blieben jedoch Fragen zur genauen Wechselwirkung, z.B. essentielle Aminosäuren, offen. Diese Fragen sollten in den nachfolgenden Versuchen beantwortet und genauer beleuchtet werden. Dabei wurde in vielen Versuchen sowohl das SgrTec als auch SgrTkpn verwendet.

5.1.1 Bisherige Ergebnisse

In diesem Abschnitt sollen kurz die wichtigsten Aspekte der Masterarbeit zum Thema „Charakterisierung peripherer Regulationsmechanismen des PEP-abhängigen Glukose-Phosphotransferase-Systems in *Escherichia coli* K-12“ zusammengefasst werden, um einen besseren Überblick der bisherigen Erkenntnisse zu bekommen (Kosfeld, 2008). Zudem konnten einige der zuvor gewonnenen Erkenntnisse vertieft und bestätigt werden.

5.1.1.1 Klonierung von SgrT-Derivaten und Konstruktion eines *sgrRST*-Deletionsstammes

Zur Charakterisierung des kleinen Proteins SgrT und des SgrRST-Systems und zur Analyse ihres Einflusses auf die Regulation des Glukose-PTS wurden zunächst verschiedene Plasmide und Stämme konstruiert. Im Rahmen der oben genannten Masterarbeit wurden zwei Plasmide, pTM30sgrTec und pTM30sgrTkpn, kloniert. Die Gene wurden aus chromosomaler DNA aus LJ110 (*E.coli*) bzw. KAY2026 (*K.pneumoniae*) amplifiziert und über geeignete Schnittstellen in den

Expressionsvektor pTM30 eingebracht. Des Weiteren wurde eine *sgrRST*-Deletionsmutante in LJ110 hergestellt, deren gesamter chromosomaler Bereich der Gene *sgrR*, *sgrS* und *sgrT* mit Hilfe der homologen Rekombination nach Wanner et al. (Datsenko und Wanner, 2000) und einer P1-Transduktion ausgetauscht wurde. Der Stamm erhielt die Bezeichnung JKA1 (LJ110 Δ *sgrRST::cat*).

5.1.1.2 Wachstumsanalysen zur Funktionalität von SgrT unter verschiedenen Bedingungen

Um den Einfluss von SgrT auf den Metabolismus der *E.coli*-Zellen genauer beschreiben zu können, wurden verschiedene Wachstumsanalysen durchgeführt. Dafür wurden unterschiedliche Bedingungen und Bakterienstämme verwendet. Die Anzucht erfolgte in allen Fällen wie im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben (s. Kapitel 4.1.2).

Zur Überprüfung des Phänotyps von JKA1 wurde eine Wachstumsanalyse in Vollmedium unter Zugabe von α -Methyl-Glukose (α -MG) durchgeführt. Vorige Versuche von Wadler et al. konnten einen α -Methyl-Glukose sensitiven Phänotyp einer *sgrRST*-Deletionsmutante zeigen (Wadler und Vanderpool, 2007). Da in dieser Arbeit eine andere isogene wildtypnahe Stammserie verwendet wurde (LJ110), sollten die Ergebnisse von Wadler et al. mit der hier verwendeten Stammserie wiederholt und verifiziert werden. Die Wachstumskurve zeigt eine deutliche Sensitivität von JKA1 gegenüber α -Methyl-Glukose, welche beim Wildtyp (LJ110) nicht zu erkennen ist (Daten nicht gezeigt). Durch Transformation von pTM30*sgrTec* und pTM30*sgrTkpn* in JKA1 und Expression von SgrTec bzw. SgrTkpn durch Induktion mit 100 μ M IPTG lässt sich die Sensitivität gegenüber durch α -Methyl-Glukose ausgelösten Glukose-6-Phosphatstress aufheben (s. Abbildung 5.1).

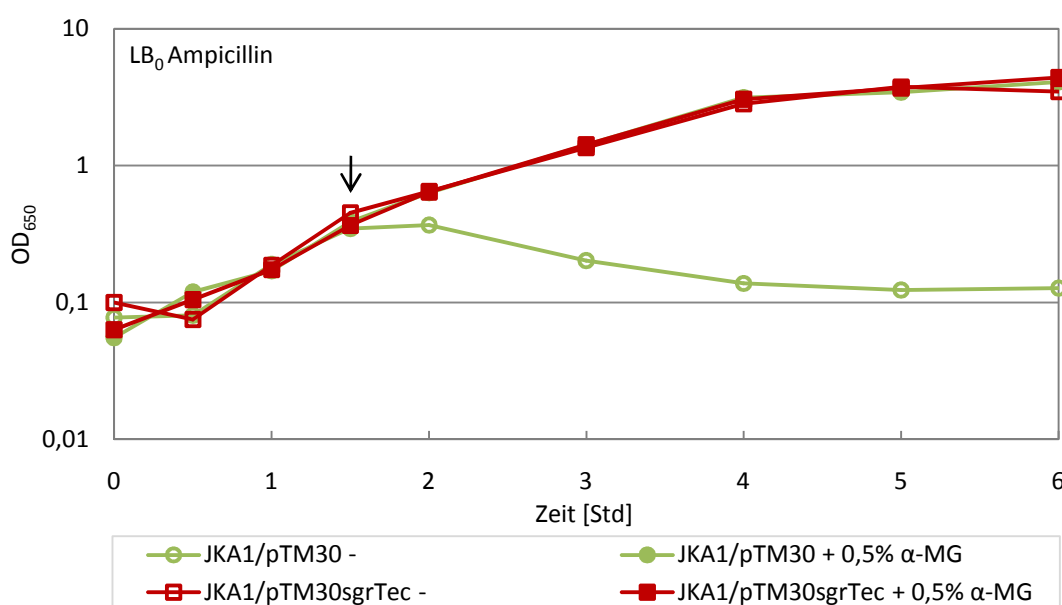


Abbildung 5.1: Komplementation des α -Methyl-Glukose sensitiven Phänotyps der *sgrRST*-Deletion in JKA1 durch SgrTec

Dargestellt ist eine Wachstumskurve, welche die Komplementation des α -Methyl-Glukose sensitiven Phänotyps der *sgrRST*-Deletion in JKA1 durch Expression von SgrTec zeigt. Als Kontrolle ist JKA1 mit dem Leervektor pTM30 aufgetragen. Die Anzucht der Kulturen erfolgte in LB₀ mit Ampicillin und 100 μ M IPTG. Die Zugabe von 0,5 % α -Methyl-Glukose erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer OD₆₅₀ = 0,2 (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 6 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: JKA1/pTM30- = kein Wachstum; JKA1/pTM30+ = 0,87; JKA1/pTM30sgrTec- = 0,94; JKA1/pTM30sgrTec+ = 0,89.

Es findet eine Komplementation der *sgrRST*-Deletion in JKA1 sowohl durch SgrTec als auch durch SgrTkpn (Daten nicht gezeigt) statt. SgrR und *sgrS* sind für die Komplementation in diesem Fall nicht notwendig. Dies bestätigt die von Wadler et al. postulierten Ergebnisse (Wadler und Vanderpool, 2007).

Weitere Versuche von Wadler et al. zeigten, dass ein Wildtypstamm durch Überexpression von SgrT in seinem Wachstum in Minimalmedium mit Glukose reprimiert wird (Wadler und Vanderpool, 2007). Die postulierten Ergebnisse ließen sich in einer Wachstumskurve in Minimalmedium mit Ampicillin und 0,2 % Glukose auch für die hier verwendete Stammserie bestätigen (s. Abbildung 5.2). Dabei zeigte sich, dass das Wachstum durch eine Überexpression von SgrTkpn deutlich stärker reprimiert wird als durch die Überexpression des SgrTec (Daten nicht gezeigt). Dagegen wurde das Wachstum in Minimalmedium mit Glyzerin als einziger Kohlenstoffquelle durch die Überproduktion von SgrT nicht negativ beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Dies schließt einen generellen Wachstumsdefekt der Zellen durch die Überproduktion des kleinen Proteins SgrT aus, woraus sich zunächst auf einen Glukose-spezifischen Effekt schließen lässt. Der Einfluss von SgrT auf weitere Kohlenhydrataufnahmesysteme wird in den nächsten Kapiteln vorgestellt.

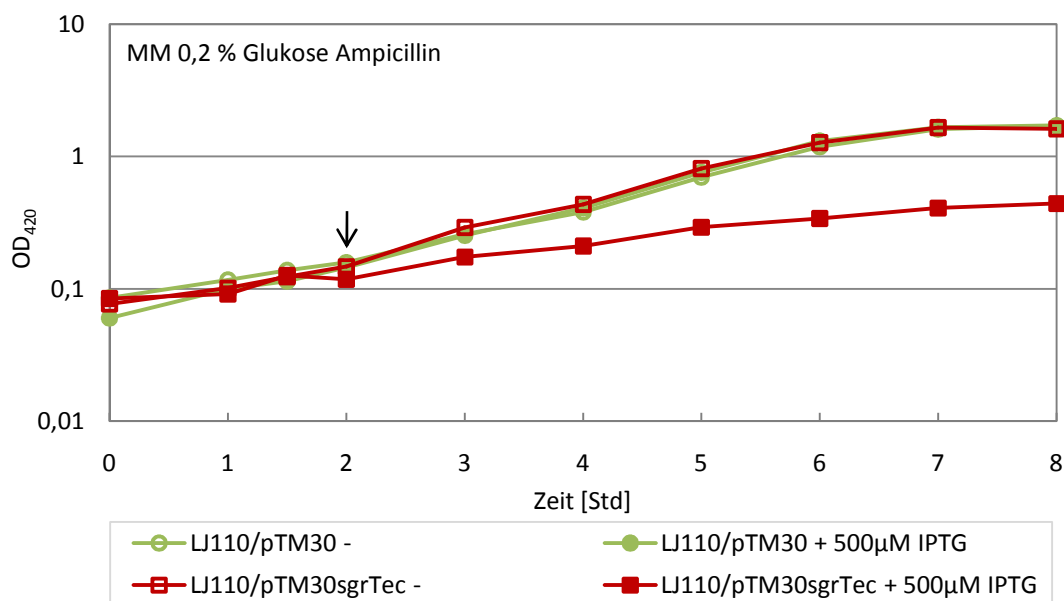


Abbildung 5.2: Repression des Wachstums von LJ110 in MM Glukose bei Überproduktion von SgrTec

Dargestellt ist die Repression des Wachstums eines Wildtypstammes (LJ110) bei Überproduktion von SgrTec in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose anhand einer Wachstumskurve. Als Kontrolle ist LJ110 mit dem Leervektor pTM30 aufgetragen. Die Zugabe von 500 µM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer $OD_{420} = 0,2$ (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 8 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: LJ110/pTM30- = 1,40; LJ110/pTM30+ = 1,25; LJ110/pTM30sgrTec- = 1,22; LJ110/pTM30sgrTec+ = 2,29.

Glukose kann nicht nur über das Glukose-PTS in die Zellen aufgenommen werden, sondern auch über andere Systeme, z.B. das Mannose-PTS. Um zu zeigen, dass das SgrT nur einen Einfluss auf das Glukose-PTS und keines der anderen Glukose aufnehmenden Systeme hat, wurden Wachstumskurven im LJ154 Stammhintergrund durchgeführt. Dieser Stamm besitzt kein anderes Glukose aufnehmendes System, außer dem Glukose-PTS. Die Annahme, dass SgrT nur das

Glukose-PTS und kein anderes System beeinflusst, konnte wie in Abbildung 5.3 gezeigt, bestätigt werden. Der reprimierende Einfluss von SgrT auf das Wachstum von LJ154 ist weiterhin gegeben und wird sogar noch verstärkt, sodass geschlussfolgert werden kann, dass der Einfluss von SgrT auf das Glukose-PTS stattfindet. Auch hier zeigt sich der deutlich stärkere Einfluss von SgrTkpn.

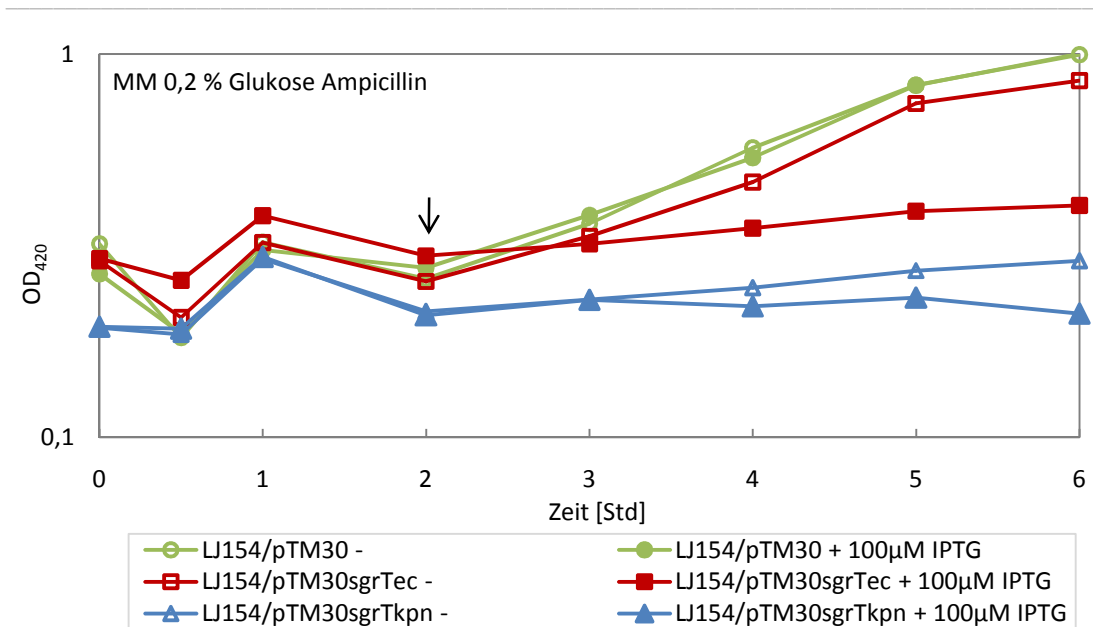


Abbildung 5.3: Auswirkung auf andere Glukose aufnehmende Systeme durch die Überproduktion von SgrT

Dargestellt ist eine Wachstumskurve zur Auswirkung einer SgrT-Überproduktion auf andere Glukose aufnehmende Systeme im Stamm LJ154. Als Kontrolle ist LJ154 mit dem Leervektor pTM30 aufgetragen. Die Anzucht der Kulturen erfolgte in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose und Ampicillin. Die Zugabe von 100 µM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer $OD_{420} = 0,1$ (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 6 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: LJ154/pTM30- = 1,79; LJ154/pTM30+ = 1,90; LJ154/pTM30sgrTec- = 1,95; LJ154/pTM30sgrTec+ = 7,81; LJ154/pTM30sgrTkpn- = 8,49; LJ154/pTM30sgrTkpn+ = 19,62.

Durch die bisher beschriebenen Wachstumskurven und weitere Versuche der Arbeitsgruppe Vanderpool et al. (Wadler und Vanderpool, 2007) konnte das Glukose-PTS als Wechselwirkungspartner von SgrT identifiziert werden. Das Glukose-PTS besteht aus mehreren Enzymen, EI, HPr, EIIGlc und EIICB^{Glc}, von denen durch die genannten Versuche bisher keines eindeutig als Wechselwirkungspartner von SgrT identifiziert werden konnte.

In weiterführenden Experimenten sollte überprüft werden, ob auch andere nicht Glukose aufnehmende PTS von SgrTec und SgrTkpn negativ beeinflusst werden. Dafür wurden zunächst die beiden nahen Verwandten des Glukose-PTS, das Sucrose- und das N-Acetyl-Glukosamin-PTS (Nag) untersucht. Im Gegensatz zu den postulierten Ergebnissen von Vanderpool et al. (Wadler und Vanderpool, 2007), welche einen relativ starken Einfluss von SgrTec auf das Wachstum von Wildtypzellen in Minimalmedium mit N-Acetyl-Glukosamin zeigen konnten, konnte in wiederholten Wachstumskurven in Minimalmedium mit 0,2 % N-Acetyl-Glukosamin lediglich eine minimale Repression des Wachstums des Wildtypstammes LJ110 durch SgrTec beobachtet werden, was möglicherweise auf die Verwendung einer anderen isogenen Stammserie zurückzuführen ist (s. Abbildung 5.4). Die Überproduktion von SgrTkpn führte dagegen zu einem

Wachstumsnachteil des Wildtypstammes in MM Nag. Dies lässt auf einen geringen Einfluss von SgrT auf das N-Acetyl-Glukosamin-PTS in *E.coli* (LJ110) schließen.

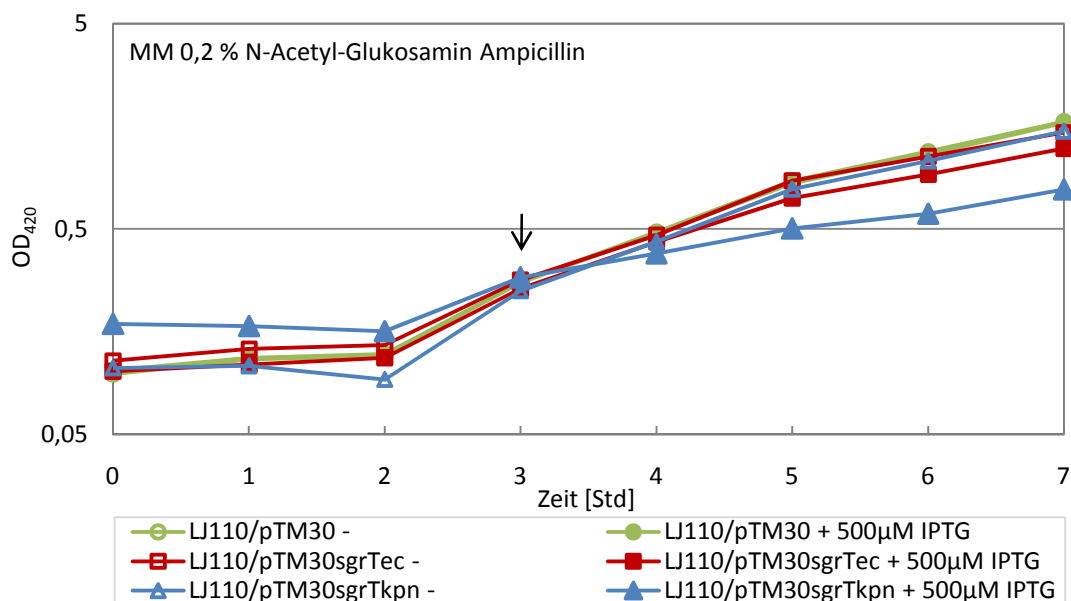


Abbildung 5.4: Wachstumsanalyse von LJ110 in MM N-Acetyl-Glukosamin bei Überproduktion von SgrT

Dargestellt ist die geringe Repression des Wachstums eines Wildtypstammes (LJ110) bei Überproduktion von SgrTec und SgrTkpn in Minimalmedium mit 0,2 % N-Acetyl-Glukosamin anhand einer Wachstumskurve. Als Kontrolle ist LJ110 mit dem Leervektor pTM30 aufgetragen. Die Zugabe von 500 µM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer $OD_{420} = 0,2$ (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std] = LJ110/pTM30- = 1,22; LJ110/pTM30+ = 1,25; LJ110/pTM30sgrTec- = 1,25; LJ110/pTM30sgrTec+ = 1,37; LJ110/pTM30sgrTkpn- = 1,22; LJ110/pTM30sgrTkpn+ = 2,53.

Die Untersuchung des Einflusses von SgrT auf das Sucrose-PTS erfolgte im K-12/pUR400 Stammhintergrund, einem Wildtypstamm mit plasmidkodiertem Sucrose-PTS. Die Wachstumskurve wurde in Minimalmedium mit 0,2 % Sucrose durchgeführt. Wie in Abbildung 5.5 dargestellt, zeigten weder SgrTec noch SgrTkpn einen negativen Einfluss auf das Wachstum von K-12/pUR400. Da das Glukose- und das Sucrose-PTS mit Ausnahme des Transporters (EIICB^{Glc} bzw. EIIBC^{Scr}) die gleichen PTS-Enzyme nutzen (HPr, EI, EIIA^{Glc}) (Wang et al., 2001), lässt sich aus diesem Ergebnis folgern, dass SgrT einen direkten Einfluss auf das Glukose-Transportprotein EIICB^{Glc} (*ptsG*) und kein anderes Enzym in diesem PTS hat.

Des Weiteren zeigt sich, dass die im Linkerbereich des EIICB^{Glc} und des NagE hoch konservierte KTPGRED-Sequenz möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung von SgrT mit den beiden Transportern zu spielen scheint, da diese Sequenz in den beiden genannten Transportproteinen vorkommt, nicht jedoch im EIIBC^{Scr}.

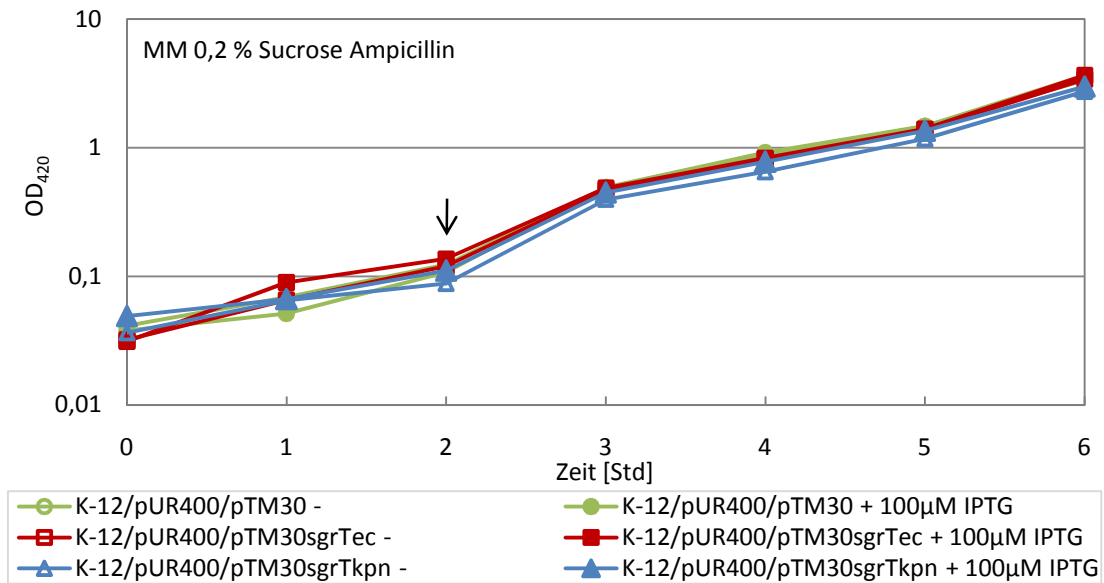


Abbildung 5.5: Wachstumsanalyse von LJ110 in MM Sucrose bei Überproduktion von SgrT

Dargestellt ist eine Wachstumsanalyse eines Sucrose⁺ Wildtypstammes (K-12/pUR400) bei Überproduktion von SgrTec und SgrTkpn in Minimalmedium mit 0,2 % Sucrose. Als Kontrolle ist K-12/pUR400 mit einem Leervektor pTM30 aufgetragen. Die Zugabe von 100 µM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer OD₄₂₀ = 0,1 (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 6 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: K-12/pUR400/pTM30- = 0,84; K-12/pUR400/pTM30+ = 0,79; K-12/pUR400/pTM30sgrTec- = 0,85; K-12/pUR400/pTM30sgrTec+ = 0,89; K-12/pUR400/pTM30sgrTkpn- = 0,80; K-12/pUR400/pTM30sgrTkpn+ = 0,83.

Zusammengenommen lassen die oben beschriebenen Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass sowohl SgrTec als auch SgrTkpn einen negativen Einfluss auf das Glukose-Transportprotein EIICB^{Glc} haben, wobei der Effekt von SgrTkpn deutlich stärker ist. Zudem zeigt sich ein geringer negativer Einfluss beider SgrT-Proteine auf das Nag-PTS, vermutlich auch hier auf den Transporter NagE. Eine Rolle für die Wechselwirkung scheint die KTPGRED-Sequenz im Linkerbereich der Transportproteine zu übernehmen. Des Weiteren konnten Vanderpool et al. zeigen, dass das *ptsG*-mRNA Level durch eine Überproduktion von SgrT nicht negativ beeinflusst wird. Es wird also angenommen, dass SgrT die Transportfähigkeit von EIICB^{Glc} durch Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflusst und hemmt (Wadler und Vanderpool, 2007). Diese Annahme sollte in weiterführenden Versuchen im Rahmen dieser Arbeit näher analysiert werden. Zudem soll die besondere Rolle des Linkers für diese Wechselwirkung betrachtet werden.

5.1.2 Einfluss von SgrT auf weitere Kohlenhydrat-Aufnahmesysteme

In den folgenden Kapiteln soll noch einmal auf den Einfluss von SgrT auf andere Phosphotransferase-Systeme und Nicht-PTS in *E.coli* eingegangen werden. Wie bereits genannt, konnte in vorigen Arbeiten (Wadler und Vanderpool, 2007) ein Einfluss von SgrT auf das Glukose-PTS und das N-Acetyl-Glukosamin-PTS in *E.coli* festgestellt werden. Des Weiteren wurde ein geringer Einfluss auf das Mannose-PTS postuliert (Wadler und Vanderpool, 2007). Das Sucrose-PTS konnte dagegen als Wechselwirkungspartner von SgrT ausgeschlossen werden (s. Abbildung 5.5), ebenso wie ein Einfluss von SgrT auf den Transport von Mannitol, Fruktose und CAA ausgeschlossen werden konnte (Wadler und Vanderpool, 2007). Um den Einfluss von SgrT auf

weitere PTS und Nicht-PTS zu analysieren, wurden verschiedene Wachstumskurven in Minimalmedium und bei Überproduktion von SgrT durchgeführt. Sollte SgrT einen Einfluss auf ein System haben, so sollte das Wachstum der Zellen in Minimalmedium mit der entsprechenden Kohlenstoffquelle deutlich durch die Überproduktion von SgrT gehemmt werden. Die Untersuchung wurde in Minimalmedien mit Glukose, Mannose, Mannitol, Maltose, Laktose oder Glycerin durchgeführt. Dafür wurden Wildtypzellen mit einem Leervektor bzw. mit pTM30sgrTec transformiert und auf ihr Wachstum in den genannten Minimalmedien untersucht. Die Expression von SgrT wurde durch Zugabe von 500 μM IPTG nach 3 Stunden induziert. Die Wachstumskurven sind in Abbildung 5.6 dargestellt (Kontrolle mit Leervektor nicht gezeigt).

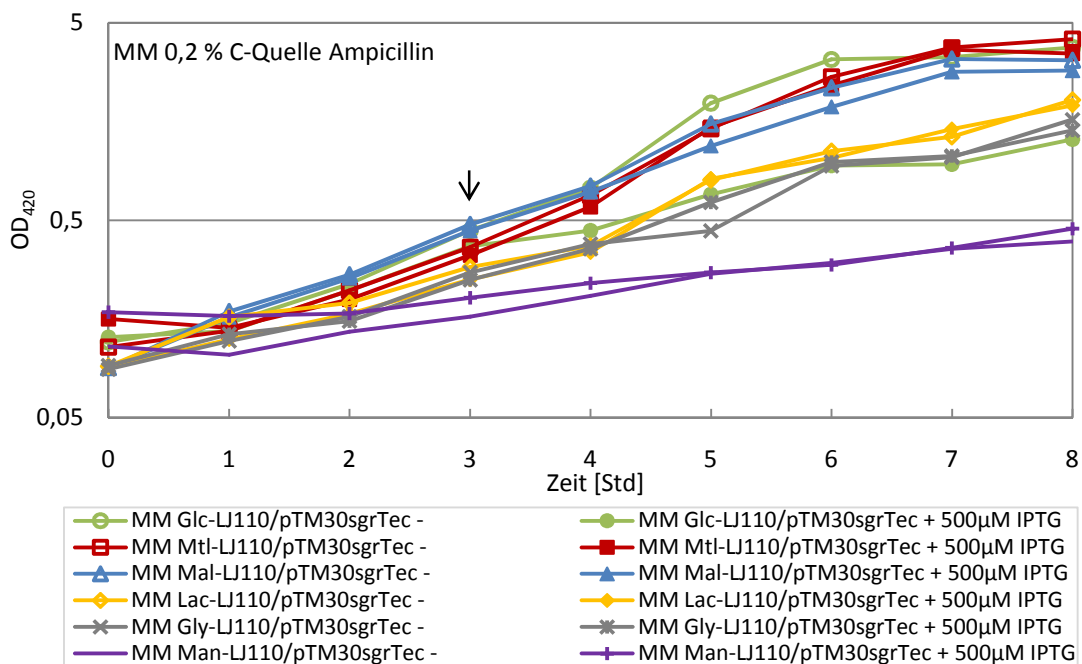


Abbildung 5.6: Wachstumskurve zur Überproduktion von SgrTec in MM mit verschiedenen C-Quellen

Dargestellt ist eine Wachstumsanalyse des Wildtypstammes bei Überproduktion von SgrTec3HA in unterschiedlichen Minimalmedien. Die Anzucht der Kulturen erfolgte in Minimalmedium mit 0,2 % der C-Quelle und Ampicillin. Die Zugabe von 500 μM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer $\text{OD}_{420} = 0,2$ (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 8 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: MM Glc- = 0,93; MM Glc+ = 2,29; MM Mtl- = 1,00; MM Mtl+ = 0,93; MM Mal- = 1,18; MM Mal+ = 1,40; MM Lac- = 1,36; MM Lac+ = 1,18; MM Gly- = 1,67; MM Gly+ = 1,53; MM Man- = 3,95; MM Man+ = 4,30.

Die Abbildung zeigt, dass lediglich in Minimalmedium mit Glukose eine deutliche Repression des Wachstums durch Überproduktion von SgrT stattfindet. In allen anderen verwendeten Medien ist kein Unterschied erkennbar. Dies bedeutet, dass SgrT ausschließlich einen Einfluss auf das Glukose-PTS sowie auf das N-Acetyl-Glukosamin-PTS hat. Ein Einfluss von SgrT auf das Mannose-PTS konnte nicht bestätigt werden. Dafür könnten auch in diesem Fall die unterschiedlichen Stammserien verantwortlich sein. Da ein starker Einfluss von SgrT zunächst nur auf das Glukose-PTS festgestellt werden konnte, soll sich im Folgenden auf die Wechselwirkung von SgrT und dem Glukose-PTS konzentriert werden. Einschränkend konnten bereits die Proteine EI, HPr und EIIA^{Glc} für die Wechselwirkung ausgeschlossen werden, sodass sich auf die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} beschränkt werden kann.

5.1.3 Proteinreinigung von SgrTec und SgrTkpn

Für verschiedene Versuche, z.B. zur Untersuchung der Wechselwirkung von SgrT und EIICB^{Glc} *in vitro*, war es notwendig SgrT und EIICB^{Glc} in großen Mengen zu reinigen und so von den anderen Proteinen der Zelle zu trennen. Ein gereinigtes SgrT könnte u.a. für CoIP Analysen mit ebenfalls gereinigtem EIICB^{Glc} genutzt werden. Immobilisiert an Säulen könnte es zudem zur Isolierung und Identifizierung von bisher unbekanntem Wechselwirkungspartnern verwendet werden. Außerdem würde die Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen SgrT den Verzicht auf einen „Tag“ zum Nachweis in Westernblots ermöglichen.

Ein optimiertes Protokoll zur Reinigung von EIICB^{Glc} über Ni-NTA-Agarose lag zu Beginn dieser Arbeit bereits vor (Gabor, 2011). Deshalb sollte zunächst eine Reinigung von SgrTec und SgrTkpn durchgeführt werden. Dafür wurde sowohl an das SgrTec als auch an das SgrTkpn jeweils ein 5 x „His-Tag“ kloniert. Die resultierenden Vektoren wurden pTM30sgrTecHis und pTM30sgrTkpnHis genannt. Um die Funktionalität von SgrTecHis und SgrTkpnHis im Vergleich zu SgrT ohne „His-Tag“ zu testen, wurden Wachstumskurven im Wildtypstamm LJ110 in Minimalmedium mit Glukose und Ampicillin durchgeführt. Die Überproduktion von SgrTec und SgrTecHis (Daten nicht gezeigt) bzw. SgrTkpn und SgrTkpnHis wurde durch Zugabe von 100 µM IPTG bei einer OD₄₂₀ = 0,2 induziert (s. Abbildung 5.7).

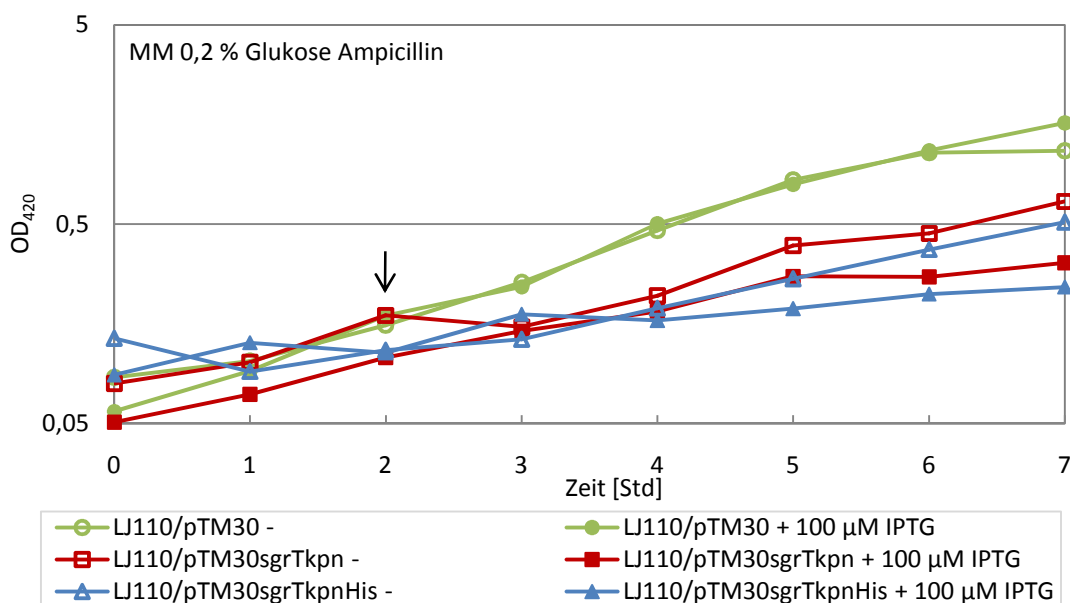


Abbildung 5.7: Repression des Wachstums von LJ110 in MM Glukose bei Überproduktion von SgrTkpnHis

Dargestellt ist die Repression des Wachstums eines Wildtypstammes (LJ110) bei Überproduktion von SgrTkpn und SgrTkpnHis in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose anhand einer Wachstumskurve. Als Kontrolle ist LJ110 mit dem Leervektor pTM30 aufgetragen. Die Zugabe von 100 µM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer OD₄₂₀ = 0,2 (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: LJ110/pTM30- = 1,24; LJ110/pTM30+ = 1,37; LJ110/pTM30sgrTkpn- = 2,59; LJ110/pTM30sgrTkpn+ = 2,21; LJ110/pTM30sgrTkpnHis- = 2,53; LJ110/pTM30sgrTkpnHis+ = 4,07.

Die Wachstumskurve zeigt, dass sowohl SgrT als auch SgrTHis das Wachstum eines Wildtypstammes in Minimalmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle bei Überproduktion reprimieren, die Funktionalität der Proteine ist durch den „Tag“ nicht beeinflusst.

In Minimalmedium mit Glycerin zeigte sich dagegen kein Wachstumsnachteil, sodass auch hier eine Glukose-spezifische Repression des Wachstums vorausgesetzt werden kann (Daten nicht gezeigt). Die Expression des SgrTHis Proteins wurde daraufhin in einem Westernblot überprüft. Dafür wurden die Plasmide in LJ110 transformiert und die Zellen in 10 ml LB₀ mit Ampicillin und 500 µM IPTG bis zu einer OD₆₅₀ = 1 angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in Lysispuffer resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Der Überstand wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt und in einem 15 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Darauf folgte ein Immunoblot mit einem primären Anti-Penta-His Antikörper und einem entsprechenden sekundären Anti-Maus Antikörper. Dabei zeigte sich, dass bei SgrTechis trotz überprüfter Sequenz und Funktionalität in Wachstumskurven kein Signal im Westernblot sichtbar war (Daten nicht gezeigt). Bei SgrTkpnHis wurde eine Bande im Westernblot, wie erwartet bei knapp 10 kDa detektiert (s. Abbildung 5.8). SgrTkpnHis konnte demnach für eine Reinigung verwendet werden.

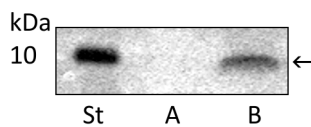


Abbildung 5.8: Westernblot zur Expression von SgrTkpn-His

Mit: St = Proteinstandard angegebenen Bandengrößen, A = LJ110/pTM30sgrTkpn und B = LJ110/pTM30sgrTkpn-His. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB₀ mit Ampicillin und 500 µM IPTG bis zu einer OD₆₅₀ = 1. Die Zellen wurden geerntet, in Lysispuffer resuspendiert, durch Ultraschall aufgeschlossen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 15 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dem Westernblot folgte ein Immunoblot mit Anti-Penta-His und einem sekundären Anti-Maus Antikörper.

Für die Reinigung von SgrTkpnHis über Affinitätschromatographie (FPLC) wurde eine Kultur mit LJ110/pTM30sgrTkpnHis in 1 l 2xTY Ampicillin Medium auf eine OD₆₅₀ = 0,1 angeimpft und mit 500 µM IPTG bei einer OD₆₅₀ = 0,2 induziert. Die Ernte der Probe wurde bei einer OD₆₅₀ = 1 durch Zentrifugation vorgenommen. Die Zellen wurden anschließend in 4 ml Puffer A für die FPLC-Reinigung resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Für die Reinigung wurde der Überstand verwendet. Die Reinigung erfolgte über eine „His-Trap“-Säule in der FPLC. Die verwendeten Puffer sind im Material- und Methodenteil in Tabelle 3.9 angegeben. Die Abbildung 5.9 zeigt das Chromatogramm der Reinigung. Während der Reinigung wurden alle Fraktionen in 2 ml Portionen automatisch aufgefangen und standen so zur späteren Analyse zur Verfügung. Bei der Reinigung über die FPLC wurde der Rohextrakt zunächst in 2 ml Portionen (rote Pfeile) auf die Säule aufgetragen, was sich durch ein Ansteigen der UV-Kurve (blaue Kurve) zeigt. Anschließend wurde die Säule von ungebundenem Protein gereinigt, indem sie mit dem Auftragungspuffer A gespült wurde. Erst wenn sich die UV-Kurve wieder bei dem Ausgangswert (nahe 0) befand, d.h. wenn kein ungebundenes Protein mehr von der Säule gewaschen wurde, wurde die Konzentration von Puffer B kontinuierlich gesteigert (grüne Kurve). Dabei wurde ein Gradient von 0 % Puffer B auf 100 % Puffer B in 20 ml eingestellt. Sobald Protein durch die steigenden Imidazolkonzentrationen durch Zugabe von Puffer B von der Säule eluiert wurde (Anstieg der UV-Kurve), konnte der Gradient gestoppt werden (grüne Pfeile), um keine Vermischung von Proteinelutionen bei unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen hervorzurufen. In diesem Fall

sind zwei Elutionspeaks erkennbar. Im Anschluss an die FPLC-Reinigung konnten die einzeln aufgefingenen Proben ggf. dialysiert und analysiert werden.

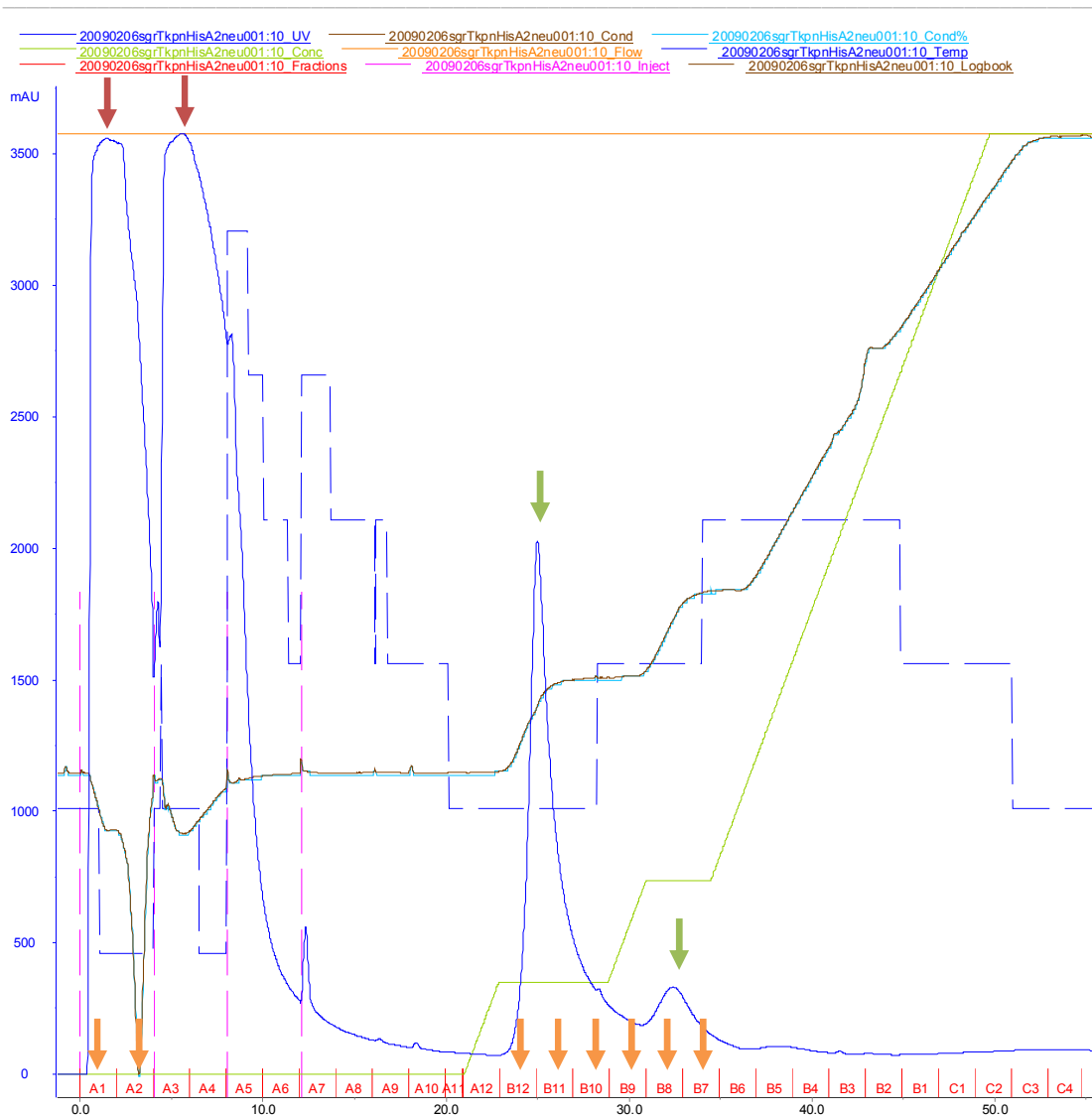


Abbildung 5.9: Chromatogramm der FPLC-Reinigung von SgrTkpnHis

Gezeigt ist ein Chromatogramm der FPLC-Reinigung von SgrTkpnHis. Angegeben sind u.a. die UV-Kurve (blau), die Konzentration von Puffer B (grün) und die einzeln aufgefingenen Fraktionen (rot). Die roten Pfeile zeigen die Auftragungspunkte der Probe an, die grünen Pfeile die Elutionspeaks und die gelben Pfeile die im Western- und Immunoblot analysierten Proben. Nähere Erläuterungen im Text.

Anhand des Chromatogramms wurden acht Proben ausgewählt (gelbe Pfeile, Abbildung 5.9), welche in einem Westernblot auf Vorkommen von SgrTkpnHis untersucht werden sollten. Sie wurden in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit einem Anti-Penta-His Antikörper sowie einem sekundären Anti-Maus Antikörper behandelt. Als zusätzliche Probe wurde der Rohextrakt aufgetragen. Das Ergebnis des Western- und Immunoblots ist in Abbildung 5.10 gezeigt. Das Ergebnis des Westernblots zeigt, dass im Rohextrakt der Anzucht ein deutliches Signal für SgrTkpnHis vorhanden ist (A). Dies bestätigt, dass die Anzucht der Zellen und die Überproduktion von SgrTkpnHis erfolgreich waren. Die beiden Proben aus dem Durchfluss der Säule zeigen ebenfalls starke Signale (B und C), wohingegen die

Signale bei den beiden Elutionspeaks fehlen (E bis I). Dies zeigt, dass SgrTkpnHis nicht an die Säule gebunden hat. Bei den Proteinen in den beiden Elutionspeaks handelt es sich vermutlich um unspezifisch gebundene Proteine mit einer hohen Affinität zur „His-Trap“-Säule. Zur Optimierung der Reinigung wurden neben einer anderen Grundzusammensetzung des Puffers (s. Tabelle 3.9) sowohl Salzgehalt (300 mM bis 100 mM NaCl) als auch pH (pH 6,5 bis pH 8) des Lysispuffers variiert. Allerdings konnte auch hier keine Bindung von SgrTkpnHis an die Säule erreicht werden. Auch die Zugabe von Detergenz (Triton X-100) oder bis zu 6 M Urea brachten keine Verbesserung der Bindung an die Säule.

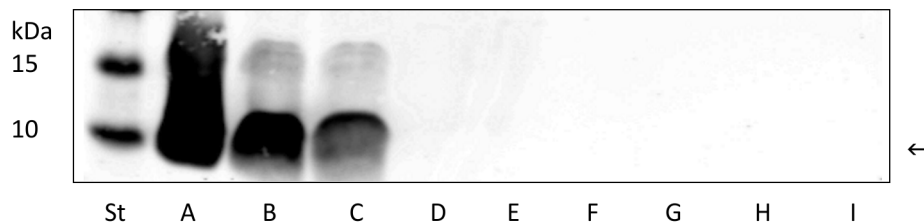


Abbildung 5.10: Westernblot zur Reinigung von SgrTkpnHis über eine FPLC

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = Rohextrakt, B = Fraktion A1, C = Fraktion A2, D = Fraktion B12, E = Fraktion B11, F = Fraktion B10, G = Fraktion B9, H = Fraktion B8, I = Fraktion B7. Die Fraktionen wurden getrennt voneinander aufgefangen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 15 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dem Westernblot folgte ein Immunoblot mit Anti-Penta-His und einem sekundären Anti-Maus Antikörper.

Alternativ wurden Reinigungen von SgrTkpnHis über Ni-NTA-Agarose (s. Abbildung 5.11), Ni-NTA-Säulen und CoIP-Säulen (Daten nicht gezeigt) getestet. Auch hier konnte durch Variation der Puffer (Imidazolkonzentrationen und pH-Werte) keine Bindung des Proteins an die jeweilige Matrix gezeigt werden.

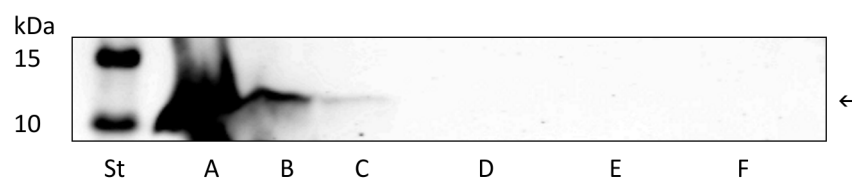


Abbildung 5.11: Westernblot zur Reinigung von SgrTkpnHis über Ni-NTA-Agarose

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = Rohextrakt, B = Überstand nach Ni-NTA-Agarose Behandlung, C = Waschschrift 1, D = Waschschrift 2, E = Elution 1, F = Elution 2. Bei jedem Schritt der Reinigung wurde eine Probe entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 15 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte eine Antikörperfärbung mit Anti-Penta-His und einem sekundären Anti-Maus Antikörper.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass SgrTkpnHis mit einem 5 x „His-Tag“ zwar funktionsfähig und auch im Westernblot nachweisbar war, eine Reinigung des Proteins unter den getesteten Bedingungen allerdings nicht möglich war. Sie konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden.

Da das SgrTecHis im Westernblot kein Signal gab (Daten nicht gezeigt), sollte hier eine Reinigung über einen alternativen „Tag“ möglich gemacht werden. SgrTec ist mit 43 Aminosäuren ein sehr kleines Protein, daher sollte ein kleiner „Tag“ verwendet werden, um die Funktionalität

von SgrTec möglichst wenig zu beeinflussen. Der hierfür verwendete „FLAG-Tag“ besteht aus einer Abfolge von acht Aminosäuren (DYKDDDDK), welche von spezifischen Antikörpern detektiert werden. Die Klonierung von pTM30Flag-sgrTec und pTM30-2xFlag-sgrTec (zweifacher „FLAG-Tag“, um die Bindung von spezifischen Antikörpern zu erhöhen) konnte erfolgreich durchgeführt werden. Allerdings konnte trotz richtiger Sequenz der Plasmide und Funktionalität der Proteine in Wachstumskurven unter keinen Bedingungen ein Signal von Flag-SgrTec bzw. 2 x Flag-SgrTec im Westernblot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ob dies an den verwendeten Antikörpern lag oder einen anderen Grund hatte, konnte abschließend nicht geklärt werden.

Alternativ wurde ein 10 x „His-Tag“ an SgrTec kloniert. Auch hier sollte eine Verlängerung des „Tags“ der verbesserten Bindung des spezifischen Antikörpers und der besseren Bindung des Proteins an eine Matrix zur Reinigung dienen. Als Grundlage für die Klonierung diente das Plasmid pTM30sgrTecHis. Die Klonierung von pTM30sgrTec10His konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Funktionalität des Proteins wurde in Wachstumskurven untersucht. Dafür wurde eine Kultur von JKA1/pTM30sgrTec10His in Minimalmedium mit Glukose angezogen und das Wachstum der Zellen aufgezeichnet. Die Überproduktion von SgrTec10His wurde durch Zugabe von 500 μ M IPTG bei einer $OD_{420} = 0,2$ induziert (s. Abbildung 5.12).

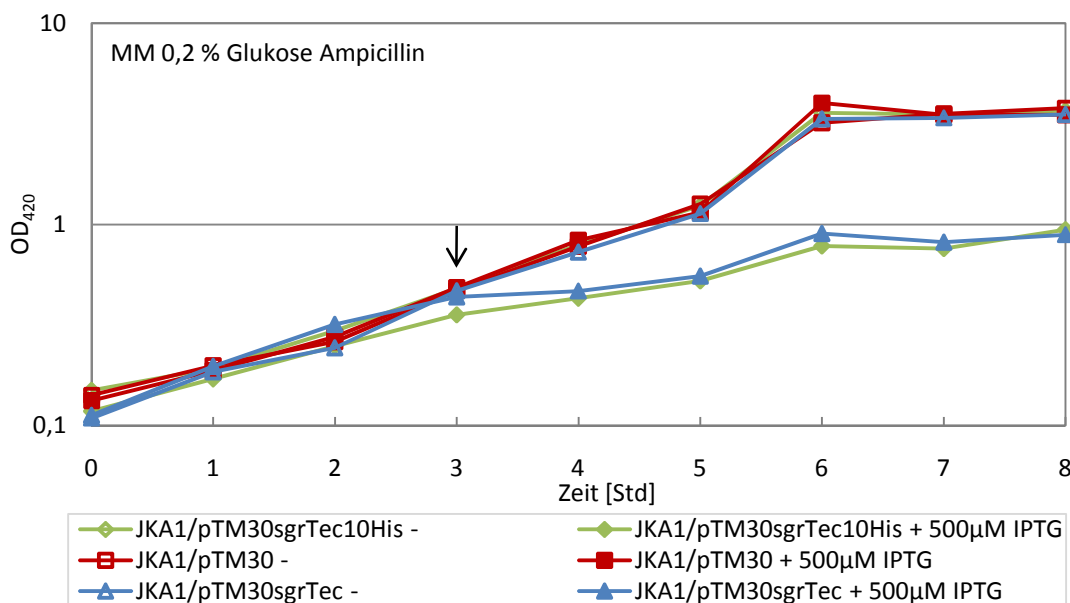


Abbildung 5.12: Repression des Wachstums von JKA1 in MM Glukose bei Überproduktion von SgrTec10His

Dargestellt ist die Repression des Wachstums von JKA1 bei Überproduktion von SgrTec10His und SgrTec bei Wachstum in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose Medium anhand einer Wachstumskurve. Als Kontrolle ist JKA1 mit dem Leervektor pTM30 aufgetragen. Die Zugabe von 500 μ M IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer $OD_{420} = 0,2$ (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: = JKA1/pTM30sgrTec10His- = 1,03; JKA1/pTM30sgrTec10His+ = 2,64; JKA1/pTM30- = 1,09; JKA1/pTM30+ = 0,98; JKA1/pTM30sgrTec- = 1,06; JKA1/pTM30sgrTec+ = 2,87.

Die Wachstumskurve zeigt, dass die Funktionalität von SgrTec durch den 10 x „His-Tag“ nicht beeinflusst ist. Im nächsten Schritt sollte der Nachweis des Proteins im Westernblot erbracht werden. Nach Anzucht von LJ110/pTM30sgrTec10His in Vollmedium und Induktion mit 500 μ M IPTG konnte im Westernblot ein Signal bei 10 kDa nachgewiesen werden (s. Abbildung 5.13).

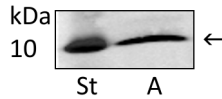


Abbildung 5.13: Westernblot zur Expression von SgrTec10His

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = LJ110/pTM30sgrTec10His. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB₀ mit Ampicillin und 500 µM IPTG bis zu einer OD₆₅₀ = 1. Die Zellen wurden geerntet, in Lysispuffer resuspendiert, durch Ultraschall aufgeschlossen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 15 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte eine Antikörperfärbung mit Anti-Penta-His und einem sekundären Anti-Maus Antikörper.

Die Reinigung von SgrTec10His erfolgte mit den gleichen Methoden und Bedingungen, wie sie bereits für die Reinigung von SgrTkpnHis beschrieben wurden. Auch bei diesem Protein ließ sich keine Reinigung über die FPLC (s. Abbildung 5.14 und Abbildung 5.15), Ni-NTA-Agarose, Ni-NTA-Säulen oder CoIP Säulen (Daten nicht gezeigt) erreichen.

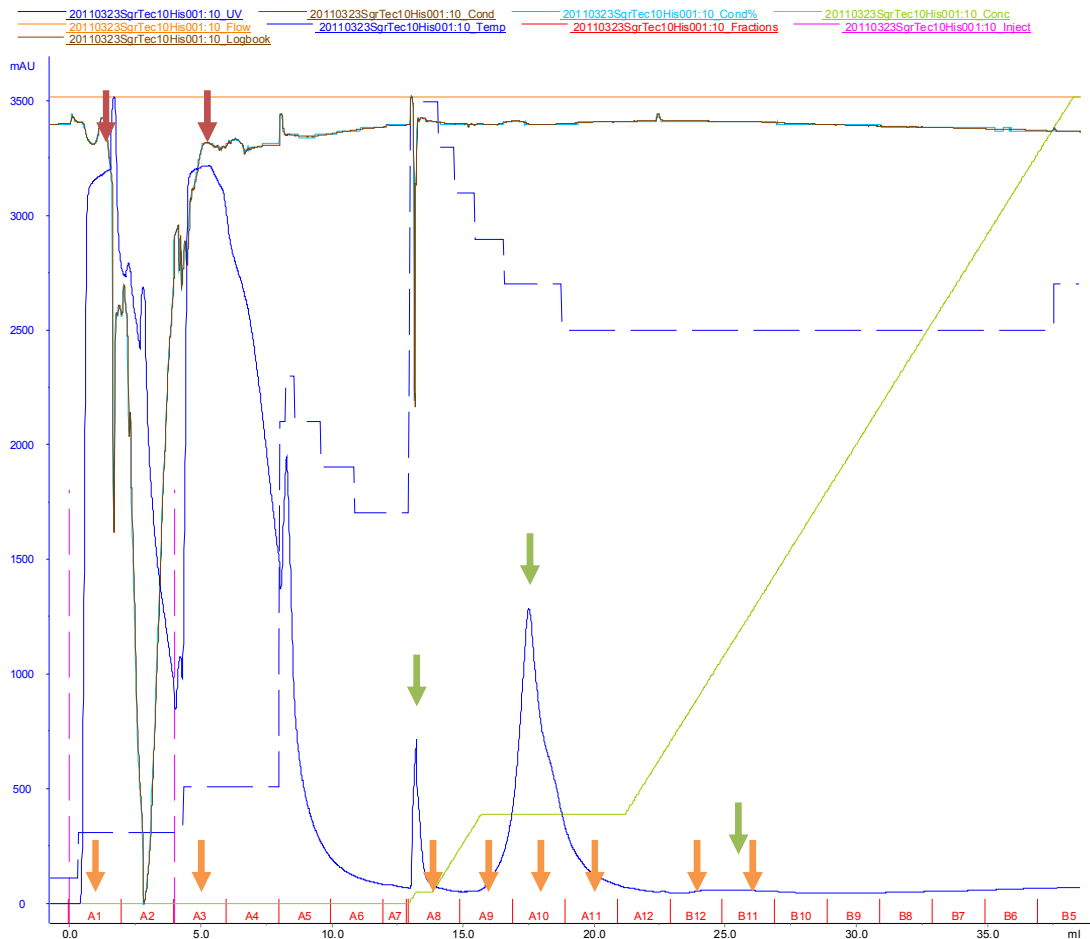


Abbildung 5.14: Chromatogramm zur SgrTec10His Reinigung über die FPLC

Gezeigt ist ein Chromatogramm der FPLC-Reinigung von SgrTec10His. Angegeben sind u.a. die UV-Kurve (blau), die Konzentration von Puffer B (grün) und die einzeln aufgefangenen Fraktionen (rot). Die roten Pfeile zeigen die Auftragungspunkte der Probe an, die grünen Pfeile die Elutionspeaks und die gelben Pfeile die im Western- und Immunoblot analysierten Proben.

Die Analyse der gereinigten Proben von SgrTec10His im Westernblot zeigt, dass das Protein nicht an die Matrix der Säule gebunden hatte, sondern mit dem Durchfluss wieder von der Säule herunter gespült wurde (s. Abbildung 5.15). Die Elutionspeaks sind vermutlich auf unspezifisch gebundene Proteine zurückzuführen. Eine Reinigung von SgrTec bzw. SgrTkpn war demnach nicht möglich. Trotz unterschiedlicher Bedingungen und Methoden konnte keine Bindung der Proteine an die jeweilige Matrix erreicht werden. Weitere Versuche konnten zur Reinigung von SgrT im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

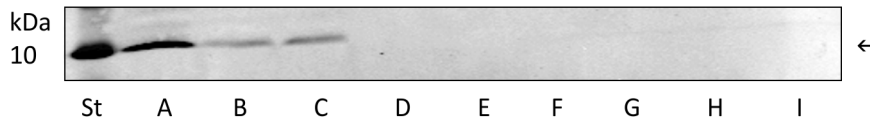


Abbildung 5.15: Westernblot zur Reinigung von SgrTec10His über die FPLC

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = Rohextrakt, B = Fraktion A1, C = Fraktion A3, D = Fraktion A8, E = Fraktion A9, F = Fraktion A10, G = Fraktion A11, H = Fraktion B12, I = Fraktion B11. Die Fraktionen wurden getrennt voneinander aufgefangen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 15 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte eine Antikörperfärbung mit Anti-Penta-His und einem sekundären Anti-Maus Antikörper.

5.1.4 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen EIICB^{Glc} und SgrT

Bereits in anderen Arbeitsgruppen und vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass SgrT die Transportfähigkeit von EIICB^{Glc} vermutlich durch Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflusst und hemmt (Wadler und Vanderpool, 2007). Diese Tatsache sollte hier näher analysiert und verifiziert werden. Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen eignen sich verschiedene Methoden, von denen einige in dieser Arbeit Anwendung fanden. Das bakterielle „Two-Hybrid“ Prinzip erlaubt die Analyse der Wechselwirkung zwischen zwei cytoplasmatischen Proteinen. Dabei können eine Vielzahl von Proben parallel analysiert werden, was ein schnelles „Screening“ vieler Mutanten ermöglicht. Die Beteiligung weiterer bakterieller Proteine an der Wechselwirkung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Hefe „Two-Hybrid“ Methode verläuft nach einem ähnlichen Prinzip, ermöglicht aber den Ausschluss weiterer bakterieller Proteine. Zur Analyse der Wechselwirkung zwischen membranständigen und cytoplasmatischen Proteinen eignen sich die Co-Immunopräzipitation, das „Crosslinking“ mit Paraformaldehyd und die Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (BiFC). Auch Co-Lokalisationsstudien in fluoreszenzmikroskopischen Analysen und Wachstumsbestimmungen mit verschiedenen Mutanten können Aufschluss über die Wechselwirkung von Proteinen geben.

In den nachfolgenden Unterkapiteln soll die Wechselwirkung von SgrT mit EIICB^{Glc} anhand der aufgeführten Methoden näher analysiert werden. Dabei stand zunächst der Nachweis einer direkten Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen im Fokus, es sollte aber bereits eine Eingrenzung der Wechselwirkungsregion auf Seiten des EIICB^{Glc} auf die B-, die C- oder die Linkerdomäne stattfinden. Die Identifizierung essentieller Aminosäuren auf Seiten des EIICB^{Glc} und des SgrT für eine Wechselwirkung wird in anschließenden Kapiteln behandelt.

5.1.4.1 Bakteriell „Two-Hybrid“ zur Wechselwirkung zwischen EIIB^{Glc} und SgrTec

Das LexA basierte bakterielle „Two-Hybrid“ System (Dmitrova et al., 1998) wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen SgrT und der cytoplasmatischen B-Domäne bzw. der Linkerregion des EIICB^{Glc} verwendet. Der Vorteil des „Two-Hybrid“ Systems liegt in der Möglichkeit, wenn das System funktioniert, schnell und einfach eine große Anzahl an Proteinen und verschiedenen Mutanten zu testen. Dadurch wären verschiedene „Screens“ denkbar, die nicht nur die Identifizierung potentieller weiterer Wechselwirkungspartner von SgrT ermöglichen würden, sondern auch schnell wichtige Domänen und essentielle Aminosäuren dieser Wechselwirkungen aufzeigen könnten. Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen zwei bakteriellen Proteinen bietet sich zunächst das bakterielle „Two-Hybrid“ an.

Dieses System basiert auf der Bildung von Heterodimeren der an LexA bzw. LexA408 fusionierten, zu untersuchenden Proteine. Im SU202 Stammhintergrund bindet dieser Komplex bei Wechselwirkung der beiden Proteine an den entsprechenden *lexA*-Operator und verhindert so die Expression des nachgeschalteten *lacZ*-Gens. Dadurch lässt sich im β -Galaktosidase Test nur eine geringe Enzymaktivität nachweisen, im Gegensatz zu Kontrollen ohne wechselwirkende Proteine, bei denen kein funktioneller Repressor gebildet wird (s. Abbildung 5.16).

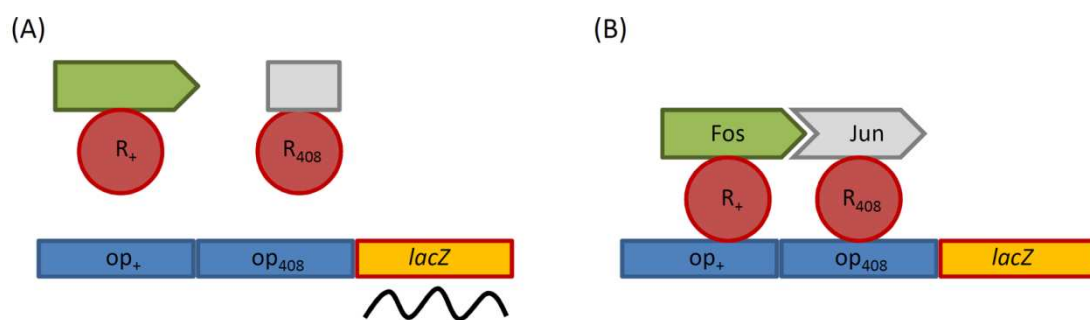


Abbildung 5.16: Modell des bakteriellen „Two-Hybrid“ Systems

Dargestellt ist ein Modell zur Funktionsweise des bakteriellen „Two-Hybrid“ Versuchs. (A) Keine Wechselwirkung zwischen den beiden Fusionsproteinen. Es kann kein funktioneller LexA-Repressor gebildet werden und die Expression des Reportergens *lacZ* findet statt. (B) Wechselwirkung zwischen den beiden Fusionsproteinen. Es wird ein funktioneller Repressor gebildet, der die Expression des Reportergens *lacZ* inhibiert [Nach (Dmitrova et al., 1998)].

Da der Komplex als Repressor fungieren muss, kann eine Wechselwirkung von SgrT mit dem membranständigen Volllängenprotein EIICB^{Glc} bzw. der C-Domäne nicht mit dem bakteriellen „Two-Hybrid“ System untersucht werden. Die Analyse der Wechselwirkung zwischen SgrT und der B-Domäne, bzw. SgrT und dem cytoplasmatischen Linker in Verbindung mit der B-Domäne, kann aber schon erste Hinweise auf eine mögliche Wechselwirkung mit dem Volllängenprotein geben und möglicherweise die Domäne der Wechselwirkung auf Seiten des EIICB^{Glc} identifizieren.

Für die Untersuchung der Wechselwirkung von SgrT und der EIIB^{Glc}-Domäne (AS 388-477) bzw. der B-Domäne und der Linkerregion (AS 380-477) wurden zunächst die entsprechenden Plasmide kloniert. Hierzu wurden die jeweiligen Motive des Fos- bzw. Junzippers der Plasmide pDL801 und pMS604 gegen die zu untersuchenden Proteine ausgetauscht. Dadurch wurden die folgenden Plasmide erhalten: pDL801sgrTec, pMS604sgrTec, pDL801BHis, pMS604BHis, pDL801Bktpgred und pMS604Bktpgred. Die Expression der Fusionsproteine wurde mit Westernblot Analysen (BHis)

und Wachstumskurven (SgrT) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Plasmide wurden in allen möglichen Kombinationen in SU202 transformiert und im β -Galaktosidase Aktivitätstest auf eine Wechselwirkung der resultierenden Proteine untersucht. Die Induktion erfolgte jeweils mit 1 mM IPTG. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten die Plasmide pDL801 und pMS604, induziert und uninduziert. Zusätzlich wurden die Plasmide jeweils alleine in den Stamm transformiert und analysiert, um eine alleinige Wechselwirkung des Fusionsproteins mit dem Promotor-Operator ausschließen zu können. Die Anzucht und Durchführung des Versuches erfolgte wie im Methoden-Teil beschrieben (s. Kapitel 4.5.5). Das Ergebnis ist in Abbildung 5.17 dargestellt.

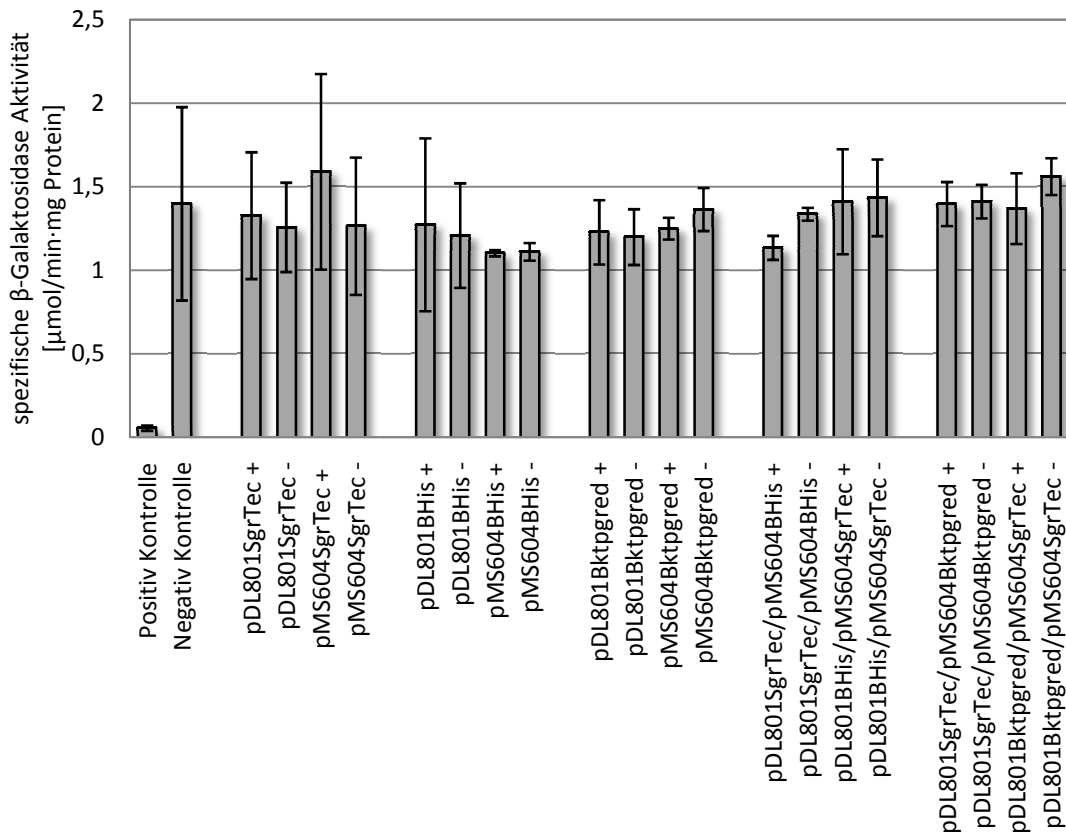


Abbildung 5.17: Auswertung des bakteriellen „Two-Hybrid“ Versuch zur Wechselwirkung von SgrT mit EIIB^{Glc} bzw. EIIB-Linker^{Glc}

Gezeigt ist ein Balkendiagramm zum bakteriellen „Two-Hybrid“ Versuch zur Wechselwirkung von SgrT mit der B-Domäne und der um den Linker verlängerten B-Domäne von EIIB^{Glc}. Die angegebenen Plasmide wurden in den Stamm SU202 transformiert und im β -Galaktosidase Aktivitätstest untersucht. Die mit (+) gekennzeichneten Proben wurden bei der Anzucht mit 1 mM IPTG induziert, die mit (-) gekennzeichneten Proben nicht. Als Positivkontrolle ist SU202/pDL801/pMS604 + gekennzeichnet, als Negativkontrolle SU202/pDL801/pMS604 -. Angegeben ist die spezifische β -Galaktosidase Aktivität in $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg Protein}$ als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie zu erwarten, zeigt die Positivkontrolle eine niedrige β -Galaktosidase Aktivität auf Grund der Wechselwirkung der beiden Proteine Fos und Jun. Die Negativkontrolle zeigt dagegen eine erhöhte Aktivität, da hier auf Grund der geringen Induktion der Plasmide keine Fusionsproteine und damit keine funktionsfähigen LexA-Repressoren gebildet werden können. Die Kulturen mit den jeweils alleine transformierten Plasmiden zeigen ebenfalls wie erwartet eine hohe β -

Galaktosidase Aktivität, eine Homodimerbindung des Repressors findet demnach wie gewünscht nicht statt. Das Diagramm zeigt zudem, dass sich keine Wechselwirkung zwischen SgrTec und der B-Domäne, bzw. zwischen SgrTec und der EIIB^{Glc}-Domäne mit dem Linker nachweisen lässt, da alle Proben eine hohe β -Galaktosidase Aktivität zeigen. Dieser Versuch lässt die Schlussfolgerung zu, dass keine Wechselwirkung zwischen SgrT und der EIIB^{Glc}-Domäne bzw. der um den Linker verlängerten B-Domäne stattfindet, eine mögliche Wechselwirkung mit diesem System nicht nachweisbar ist oder dass die C-Domäne essentiell an der Wechselwirkung beteiligt ist, was mit diesem Versuch nicht untersucht werden konnte. Der bakterielle „Two-Hybrid“ Versuch kann demnach zunächst keine weiteren Erkenntnisse bezüglich der Wechselwirkung von SgrTec und EIIB^{Glc} liefern.

5.1.4.2 Hefe „Two-Hybrid“ zur Wechselwirkung von EIIB^{Glc} und SgrTec

Eine andere Methode zur Überprüfung der direkten Wechselwirkung zwischen zwei cytoplasmatischen Proteinen ist das Hefe „Two-Hybrid“ Verfahren. Im Gegensatz zum bakteriellen „Two-Hybrid“ Ansatz können mit dieser Methode variable Nachweise unterschiedlich starker Wechselwirkungen zwischen zwei Proteine durchgeführt werden, sodass auch deutlich schwächere Interaktionen, wie sie hier möglicherweise vorliegen, detektiert werden können. Auch hier bietet ein funktionierendes System die Möglichkeit, schnell und einfach viele „Screens“ durchführen zu können. Zusätzlich lässt sich die Beteiligung dritter bakterieller Proteine ausschließen, da in einem *S.cerevisiae*-Stammhintergrund gearbeitet wird. Für den Hefe „Two-Hybrid“ Versuch werden Fusionsproteine der zu untersuchenden Proteine mit der DNA-Bindedomäne bzw. der Transkriptions-Aktivierungsdomäne des Gal4p Transkriptionsfaktors hergestellt. Findet eine Wechselwirkung zwischen den beiden Fusionsproteinen auf Grund der Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine statt, so entsteht ein funktionsfähiger Gal4p Transkriptionsfaktor, welcher die Transkription von verschiedenen Reporter genen (*his*, *ade*) initiiert (s. Abbildung 5.18). Dies kann auf unterschiedlichen Selektionsplatten durch Wachstum der Zellen nachgewiesen werden. Die Stärke einer Protein-Protein-Wechselwirkung steht im direkten Verhältnis zu dem Expressionsniveau der Reportergene. Eine schwache Wechselwirkung führt zu einem Wachstum der Zellen auf Histidin-Mangelmedium, wohingegen eine starke Wechselwirkung zudem ein Wachstum der Zellen auf Adenin-Mangelmedium verursacht.

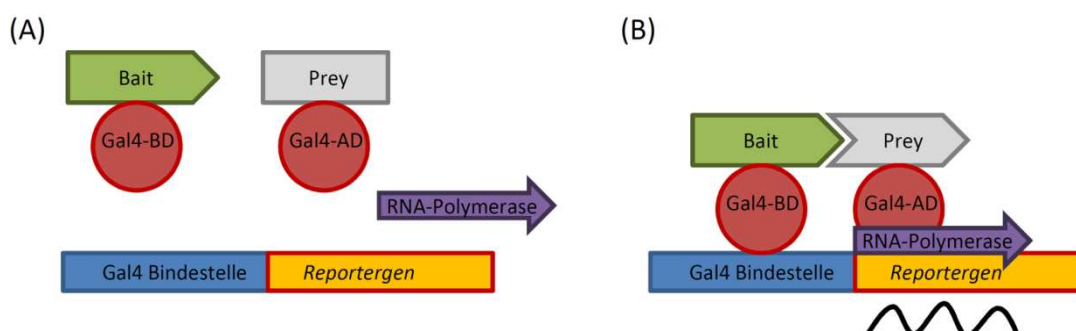


Abbildung 5.18: Modell des Hefe „Two-Hybrid“ Systems

Gezeigt ist ein Modell zur Funktionsweise des Hefe „Two-Hybrid“ Versuches. (A) Es findet keine Wechselwirkung zwischen den beiden Fusionsproteinen statt. Dadurch kann kein funktionsfähiger Gal4-Transkriptionsfaktor gebildet werden und die Expression des Reporter gens ist unterbunden. (B) Es findet eine Wechselwirkung zwischen den beiden Fusionsproteinen statt. Es wird ein funktionsfähiger Gal4-Transkriptionsfaktor gebildet, der die Expression des Reporter gens ermöglicht [Nach (James et al., 1996)].

Auch mit diesem Verfahren sollte die Wechselwirkung von SgrTec und der cytoplasmatischen EIIB^{Glc}-Domäne (AS 401-477) bzw. der um den Linker erweiterten B-Domäne des EIIB^{Glc} (AS 372-477) untersucht werden. Dafür wurden die drei Proteine jeweils an die Binde- bzw. Aktivierungsdomänen des Gal4 Transkriptionsfaktors fusioniert und im „Two-Hybrid“ Assay analysiert. Die Klonierung und Kontrolle der Vektoren fand in *E.coli* statt, erst danach wurden die Vektoren in entsprechenden Kombinationen in den *S.cerevisiae*-Stamm PJ69-4 α transformiert und für den „Two-Hybrid“ Assay eingesetzt. Als Positivkontrollen wurden die beiden Vektoren pVA3 (p53₍₇₂₋₃₉₀₎-Gal4-DNA-Bindedomänenfusion) und pJH1202 (simian Virus 40 T-Antigen₍₈₄₋₇₀₈₎-Gal4-Aktivierungsdomänenfusion) verwendet, als Negativkontrollen dienten die Leervektoren pGAD424A und pGBDC1. Alle Stämme wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander angezogen und auf die entsprechenden Platten aufgetropft. Das Ergebnis des Hefe „Two-Hybrid“ Assays ist in Abbildung 5.19 dargestellt.

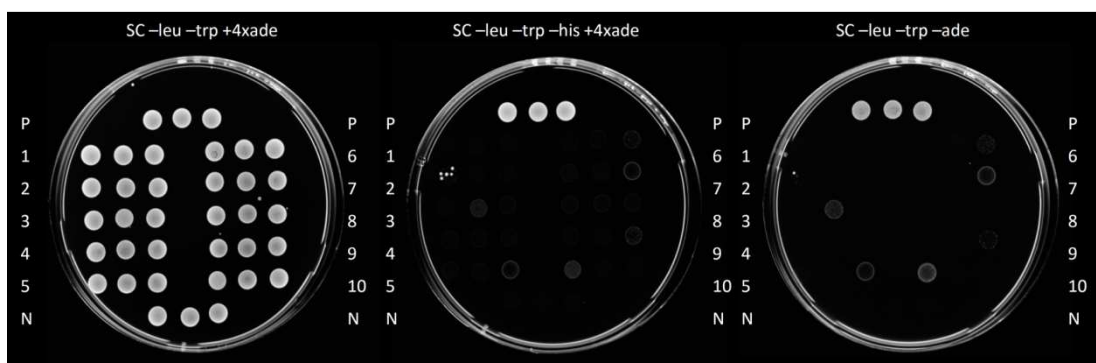


Abbildung 5.19: Auswertung des Hefe „Two-Hybrid“ Versuches zur Wechselwirkung von SgrTec und EIIB bzw. EIIB-Linker

Mit: P = Positivkontrolle (PJ69-4 α /pVA3/pJH1202), 1 = PJ69-4 α /pGAD424-sgrTec/pGBDC1-linker-EIIB, 2 = PJ69-4 α /pGAD424-sgrTec/pGBDC1-EIIB, 3 = PJ69-4 α /pGAD424-linker-EIIB/pGBDC1-sgrTec, 4 = PJ69-4 α /pGAD424-EIIB/pGBDC1-sgrTec, 5 = PJ69-4 α /pGAD424-sgrTec/pGBDC1, 6 = PJ69-4 α /pGAD424-EIIB/pGBDC1, 7 = PJ69-4 α /pGAD424-linker-EIIB/pGBDC1, 8 = PJ69-4 α /pGAD424/pGBDC1-sgrTec, 9 = PJ69-4 α /pGAD424/pGBDC1-EIIB, 10 = PJ69-4 α /pGAD424/pGBDC1-linker-EIIB, N = Negativkontrolle (PJ69-4 α /pGAD424/pGBDC1). Gezeigt ist das Ergebnis des Hefe „Two-Hybrid“ Versuches auf einer Kontrollplatte (links), einem Histidin-Mangelmedium (Mitte) und einem Adenin-Mangelmedium (rechts). Von allen Stämmen sind jeweils drei unabhängige Anzuchten nebeneinander aufgetropft.

Die Auswertung des Wachstums zeigt, dass sich auch mit dem Hefe „Two-Hybrid“ Versuch keine Wechselwirkung zwischen SgrT und der EIIB^{Glc}-Domäne, bzw. SgrT und der um den Linker erweiterten B-Domäne, nachweisen lässt. Auf keiner der beiden Mangelmediumplatten ist ein Wachstum der Zellen nachweisbar. Ein Nachweis der Expression der Proteine konnte auf Grund fehlender Antikörper leider nicht erbracht werden.

5.1.4.3 Klonierung von SgrTec3HA

Durch die beiden „Two-Hybrid“ Ansätze konnten keine weiteren Erkenntnisse zur Wechselwirkung von SgrTec und EIIB^{Glc} gewonnen werden. Möglicherweise ist die membranständige C-Domäne für die Wechselwirkung (mit-) verantwortlich, was in den beiden „Two-Hybrid“ Analysen bisher nicht untersucht werden konnte. In weiterführenden Versuchen zur Wechselwirkung von SgrT mit dem Volllängenprotein EIIB^{Glc} sollte diese Vermutung genauer untersucht werden. Da mit den einfachen genetischen Methoden der „Two-Hybrid“ Ansätze keine

Resultate erzielt werden konnten, wurden in weiterführenden Versuchen biochemische Ansätze zur Analyse der Wechselwirkung von SgrT und EIICB^{Glc} verwendet. Dafür ist es notwendig, die Proteine über einen „Tag“ im Westernblot nachweisen zu können.

Der Nachweis von EIICB^{Glc} erfolgt über einen „His-Tag“ am C-Terminus des Proteins. Ein entsprechender Vektor lag zu Beginn dieser Arbeit bereits vor (pRR48GH). Das exprimierte EIICB^{Glc}-His ist nicht in seiner Funktionsfähigkeit eingeschränkt und sowohl im Westernblot nachweisbar als auch über Ni-NTA-Agarose zu reinigen (Daten nicht gezeigt, (Gabor, 2011)). Für SgrT musste dagegen eine entsprechende Klonierung vorgenommen werden. Die Klonierungen von „5xHis“- und „FLAG-Tag“ an SgrT zeigten keine Signale im Westernblot, eine Verwendung eines „10xHis-Tag“ lies sich dagegen erfolgreich nachweisen (s. Kapitel 5.1.3). Da das SgrT jedoch unabhängig von EIICB^{Glc}-His nachgewiesen werden sollte, ist die Verwendung eines alternativen „Tags“ sinnvoll. Der so genannte „3HA-Tag“ (3 x Aminosäuren-Abfolge: YPYDVPDYAG) erlaubt die Überprüfung der Expression von SgrTec3HA in Immunoblots mit spezifischen Antikörpern. Ein System zur Reinigung von Proteinen mit einem „HA-Tag“ war in der Arbeitsgruppe jedoch nicht etabliert und wurde aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Durch die Verwendung von unterschiedlichen „Tag“-Fusionen an SgrTec und EIICB^{Glc} können beide Proteine gemeinsam in einer Zelle exprimiert (sofern die Plasmide kompatibel sind), aber durch unterschiedliche Antikörper nachgewiesen werden. Dies erlaubt zudem, auch bei paralleler Expression in einer Zelle, die Reinigung von EIICB^{Glc}-His, ohne eine gleichzeitige Reinigung von SgrTec3HA hervorzurufen.

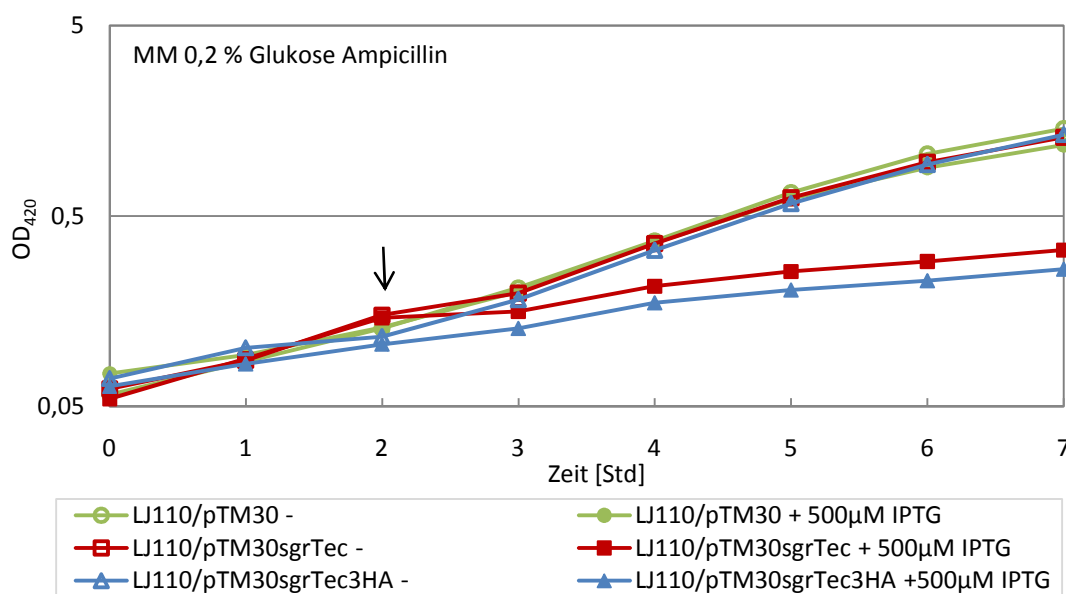


Abbildung 5.20: Repression des Wachstums von Wildtypzellen in MM Glukose bei Überproduktion von SgrTec3HA

Dargestellt ist die Repression des Wachstums von LJ110 bei Überproduktion von SgrTec3HA und SgrTec bei Wachstum in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose anhand einer Wachstumskurve. Als Kontrolle ist LJ110 mit dem Leervektor pTM30 aufgetragen. Die Zugabe von 500 μM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer OD₄₂₀ = 0,2 (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: LJ110/pTM30- = 1,21; LJ110/pTM30+ = 1,24; LJ110/pTM30sgrTec- = 1,20; LJ110/pTM30sgrTec+ = 2,88; LJ110/pTM30sgrTec3HA- = 1,19; LJ110/pTM30sgrTec3HA+ = 3,00.

Die Klonierung von pTM30sgrTec3HA erfolgte mit den beiden Vektoren pTM30sgrTec und pFA6a3HA und entsprechenden Primern. Da es sich bei einem „HA-Tag“ um einen relativ langen „Tag“ handelt, sollte in einem ersten Schritt untersucht werden, ob der „Tag“ die Funktionalität des sehr kleinen Proteins SgrTec beeinflusst. Dafür wurde der Vektor in LJ110 transformiert, Wachstumskurven in Minimal Glukose Medium durchgeführt und die Expression von SgrTec3HA durch Zugabe von 500 μ M IPTG induziert (s. Abbildung 5.20). Die Wachstumskurve zeigt, dass sowohl SgrTec als auch SgrTec3HA das Wachstum der Wildtypzellen LJ110 in Minimalmedium mit Glukose reprimieren. SgrTec3HA ist also durch den „HA-Tag“ nicht in seiner Funktion beeinträchtigt und kann für alle weiteren Versuche verwendet werden. Zur Kontrolle der Expression des Gens wurden die Zellen zusätzlich in Vollmedium mit Ampicillin und 500 μ M IPTG angezogen. Die Zellen wurden anschließend geerntet, in Lysispuffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Überstand in ddH₂O und SDS-Probenpuffer resuspendiert. Für den Westernblot wurde ein 15 %iges Gel verwendet. Der anschließende Immunoblot wurde mit Anti-HA Antikörpern und entsprechenden sekundären Antikörpern durchgeführt (s. Abbildung 5.21).

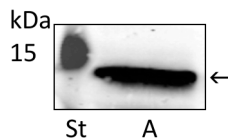


Abbildung 5.21: Westernblot zur Expression von SgrTec3HA

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = LJ110/pTM30sgrTec3HA + 500 μ M IPTG. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB₀ mit Ampicillin und 500 μ M IPTG bis zu einer OD₆₅₀ = 1. Die Zellen wurden geerntet, in Lysispuffer resuspendiert, durch Ultraschall aufgeschlossen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 15 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte ein Immunoblot mit einem Anti-HA Antikörper und einem sekundären Anti-Maus Antikörper.

Die Abbildung des Western- und Immunoblots zeigt eine deutliche Expression von SgrTec3HA durch eine Bande bei ca. 15 kDa. Zusätzlich zu pTM30sgrTec3HA wurde ein weiteres Plasmid, pACYC184sgrTec3HA, kloniert. Hier steht das *sgrT* Gen ebenfalls unter der Kontrolle des *tac*-Promotor-Operatorbereichs (*tac*_{po}) aus pTM30, das Plasmid ist jedoch kompatibel zu pTM30 und pRR48 und kann gemeinsam mit pRR48GH in einer Zelle etabliert werden. Die Analyse der Funktionalität und Expression von SgrTec3HA vom Plasmid pACYC184sgrTec3HA erbrachte die gleichen Ergebnisse wie das pTM30-Derivat (Daten nicht gezeigt).

5.1.4.4 Co-Immunopräzipitation zur Wechselwirkung von EIICB^{Glc} und SgrTec

Da die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen SgrT und der cytoplasmatischen B-Domäne von EIICB^{Glc} durch die bisher verwendeten Methoden keine Ergebnisse liefern konnte, sollte in einem nächsten Schritt die membranständige C-Domäne sowie das Volllängenprotein genauer betrachtet werden. Um die Wechselwirkung zwischen dem Volllängenprotein EIICB^{Glc} und SgrTec untersuchen zu können, wurden verschiedene Methoden verwendet, bei denen auch Membranproteine analysiert werden können. Eine einfache Methode ist die Co-Immunopräzipitation. Bei dieser Methode wird ein Protein mit einem „Tag“ über Antikörper an magnetische Kügelchen gebunden und über ein magnetisches Feld in einer Säule aufgereinigt. Dabei werden die Bedingungen so gewählt, dass alle Proteine, welche eine Wechselwirkung mit

diesem Protein eingehen, an diesem hängen bleiben und ebenfalls gereinigt werden. Die Interaktion der Proteine wird in keiner Weise gefestigt oder manipuliert, sodass die Co-Immunopräzipitation einerseits wenig unspezifische Bindungen aufzeigt, sich andererseits aber schwache Wechselwirkungen gegebenenfalls nicht detektieren lassen. In einem anschließenden Westernblot und einer Coomassiefärbung des Gels können diese Proteine dann sichtbar gemacht werden. Soll die Wechselwirkung zwischen zwei bekannten Proteinen untersucht werden, können beide mit unterschiedlichen „Tags“ markiert und gemeinsam in einer Zelle exprimiert werden. Anschließend wird eines der beiden Proteine mit Hilfe der magnetischen Kügelchen über ein magnetisches Feld gereinigt und im Immunoblot durch Verwendung von Antikörpern gegen beide verwendeten „Tags“ die Präsenz beider Proteine im Eluat untersucht. Lassen sich beide Proteine nachweisen, so spricht dies für eine Wechselwirkung der beiden untersuchten Proteine, wohingegen das Fehlen des nicht gereinigten Proteins eine Wechselwirkung unter den untersuchten Bedingungen ausschließt.

In dieser Arbeit wurde mit dieser Methode die Wechselwirkung von SgrTec und dem Volllängenprotein EIICB^{Glc} untersucht. Dafür wurden beide Proteine mit entsprechenden „Tags“ auf kompatible Vektoren kloniert und gemeinsam in einen geeigneten Deletionsstamm transformiert. Die verwendeten Plasmide waren pRR48GH, ein pRR48 Expressionsvektor mit EIICB^{Glc}-5His (Amp^R, colE1 ori, induzierbar mit IPTG) und pACYC184sgrTec3HA (Tet^R, p15A ori, IPTG induzierbar). Der verwendete Stamm JKA12 (LJ110 $\Delta ptsG::cat \Delta sgrRST::kan$) wies eine Deletion sowohl von *ptsG* als auch von *sgrRST* auf und entstand durch eine P1-Transduktion der $\Delta sgrRST::kan$ Kasette aus BW25113 $\Delta sgrRST::kan$ in LJ120 (LJ110 $\Delta ptsG::cat$). Die Deletion der chromosomalen Bereiche der zu untersuchenden Proteine war insofern erforderlich, als dass eine optimale Wechselwirkung von zwei markierten Proteinen erreicht werden konnte.

Die Zellen (JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA und entsprechende Kontrollen) wurden in Vollmedium mit und ohne 0,2 % Glukose und 1 mM IPTG angezogen und bei einer OD₆₅₀ = 3 durch Zentrifugation geerntet. Die Zugabe von Glukose erfolgte, da eine Wechselwirkung beider Proteine unter Glukose-6-Phosphatstress vorausgesagt wurde. Durch die Zugabe von IPTG wurde die Expression beider Proteine gleichermaßen induziert. Im Anschluss an die Zellernte erfolgte eine Solubilisierung der Membranproteine und Reinigung des EIICB^{Glc}-His Proteins über CoIP Säulen. Das Eluat wurde anschließend im Westernblot aufgetragen und sowohl mit Anti-Penta-His Antikörpern als auch mit Anti-HA Antikörpern behandelt. Das Ergebnis des Westernblots ist in Abbildung 5.22 dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass eine Reinigung von EIICB^{Glc} erfolgreich durchgeführt werden konnte. Es zeigt sich eine entsprechende Bande für EIICB^{Glc}-His zwischen 37 kDa und 50 kDa. Da hydrophobe Membranproteine wie EIICB^{Glc} mehr SDS einlagern als es für Proteine im Durchschnitt angegeben wird, tragen sie mehr negative Ladungen, laufen dadurch schneller im Gel und erscheinen kleiner, als sie eigentlich sind (Erni, 2002). Obwohl für EIICB^{Glc} eine höhere molekulare Masse von 50,6 kDa vorausgesagt wird, läuft es im SDS-Gel zwischen 37 kDa und 50 kDa. Zudem tritt eine unspezifische Bande bei 25 kDa auf, wie sie bei Verwendung von Anti-His Antikörpern erfahrungsgemäß häufig zu finden ist. Es handelt sich vermutlich um die Glyoxalase II (Gen *gloB*), die natürlicherweise eine Sequenz mit vier aufeinanderfolgenden Histidinen in der Nähe des N-Terminus und eine molekulare Masse von 28,44 kDa aufweist. Eine SgrT3HA Bande lässt sich dagegen in keiner Probe nachweisen.

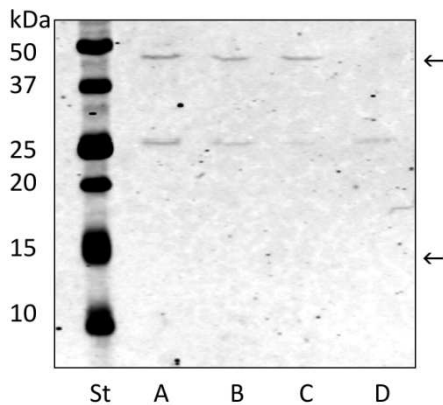


Abbildung 5.22: Westernblot zur CoIP von SgrTec und EIICB^{Glc}

Mit: Elutionsfraktionen aus folgenden Kulturen: A = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG, B = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose, C = JKA12/pRR48GH + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose, D = JKA12/pRR48/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose. Die Anzucht der Zellen erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Der Blot wurde mit Anti-HA und Anti-Penta-His Antikörpern sowie entsprechenden sekundären Antikörpern behandelt. Eine EIICB^{Glc}-His Bande ist zwischen 37 kDa und 50 kDa erkennbar, eine SgrTec3HA Bande sollte zwischen 10 kDa und 15 kDa liegen (Pfeile).

Dies bedeutet, dass unter den verwendeten Bedingungen keine Wechselwirkung der beiden Proteine mit dieser Methode nachweisbar ist. Sollte zwischen beiden Proteinen nur eine sehr schwache Wechselwirkung stattfinden, so lässt sie sich mit dieser Methode wahrscheinlich nicht zeigen, da schwache Wechselwirkungen mitunter zerstört wurden. Aus diesem Grund sollen in weiteren Versuchen Methoden verwendet werden, bei denen sich auch eine schwache Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen nachweisen lässt.

5.1.4.5 „Crosslinking“ mit Paraformaldehyd zur Wechselwirkung von EIICB^{Glc} und SgrTec

Eine Methode, mit der schwache Wechselwirkungen zwischen Proteinen gezeigt werden können, ist das „Crosslinking“ mit Paraformaldehyd. Durch die Behandlung mit Paraformaldehyd werden alle Proteine, welche sich zum Zeitpunkt der Zugabe in räumlicher Nähe zueinander befinden (etwa 2 Å), vernetzt und verbleiben in diesem Komplex (Herzberg et al., 2007). Durch die Reinigung eines der vernetzten Proteine werden alle Proteine in diesem Komplex ebenfalls eluiert und können anschließend untersucht werden. Soll die Wechselwirkung zweier bekannter Proteine untersucht werden, werden beide mit verschiedenen „Tags“ markiert und im Western- und Immunoblot spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen. Das „Crosslinking“ eignet sich auch für die Analyse der Wechselwirkung mit membranständigen Proteinen, sofern vor der Reinigung der Proteine eine Solubilisierung der Membranproteine durchgeführt wird. Dadurch wird erreicht, dass auch die Membranproteine löslich werden.

Für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} wurde der Δ sgrRST Δ ptsG-Doppeldeletionsstamm verwendet (JKA12). Des Weiteren wurden zwei Plasmide verwendet, welche kompatibel in einer Zelle exprimiert werden können und für ein EIICB^{Glc}-His (pRR48GH) bzw. SgrTec3HA (pACYC184sgrTec3HA) kodieren. Die Anzucht und Ernte der Zellen erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden in Vollmedium mit Ampicillin bei 37 °C inkubiert und nacheinander mit 1 mM IPTG, ggf. 0,2 % Glukose und 0,3 % Formaldehydlösung versetzt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, in Lysispuffer

resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Der Überstand wurde zunächst einer Solubilisierung der Membranproteine unterzogen und anschließend wurde der Komplex aus EIICB^{Glc}-His und den daran gebundenen Proteinen über Ni-NTA-Agarose gereinigt. Für die Anzucht wurden Bedingungen mit und ohne Zugabe von 0,2 % Glukose untersucht, da eine vom Glukose-6-Phosphatstress abhängige Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} vermutet wird. Vor dem Auftragen der Proben auf ein SDS-Gel wurden die Proben für kurze Zeit erhitzt, um die Komplexe zu trennen und die einzelnen Proteine besser nachweisen zu können, da sehr große Komplexe gegebenenfalls nicht in das SDS-Gel einlaufen können. Das Ergebnis des Western- und Immunoblots nach Inkubation mit Anti-Penta-His und Anti-HA Antikörpern sowie entsprechenden sekundären Antikörpern ist in Abbildung 5.23 gezeigt.

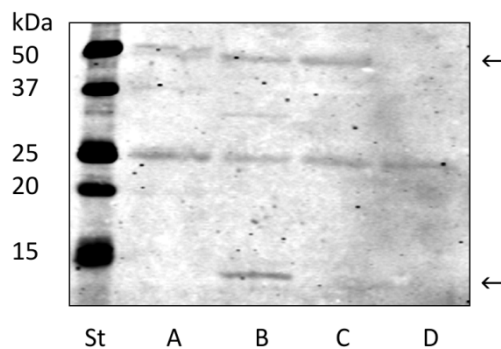


Abbildung 5.23: Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-His

Mit: A = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG, B = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose, C = JKA12/pRR48GH + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose, D = JKA12/pTM30/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose. Gezeigt ist ein Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-His. Die Membran wurde mit den primären Antikörpern Anti-Penta-His und Anti-HA, sowie entsprechenden sekundären Antikörpern behandelt. Die EIICB^{Glc}-His Bande ist zwischen 37 kDa und 50 kDa zu erkennen, die SgrTec3HA Bande liegt zwischen 10 kDa und 15 kDa. Bei 25 kDa ist zudem eine unspezifische Bande zu erkennen, die auf Grund des verwendeten Anti-Penta-His Antikörpers auftritt.

Der Immunoblot zeigt die jeweiligen ersten Elutionsproben aus vier verschiedenen Anzuchten. Die Bande zwischen 37 kDa und 50 kDa repräsentiert das mit einem „His-Tag“ versehene EIICB^{Glc}, bei ca. 25 kDa tritt eine unspezifische Bande auf (s. Kapitel 5.1.4.4), SgrTec3HA kann zwischen 10 kDa und 15 kDa detektiert werden. Durch das Kochen der Proben und das SDS im Gel werden die vorhandenen, durch Paraformaldehyd gebildeten, Komplexe aufgebrochen, sodass alle Proteine getrennt voneinander im Gel laufen. Die Auswertung des Blots zeigt, dass keine Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} stattfindet, wenn Glukose im Medium fehlt (A). Mit Glukose-Zugabe lässt sich dagegen eine SgrTec Bande detektieren, das heißt, es findet eine Wechselwirkung der beiden Proteine statt (B). Wird EIICB^{Glc}-His alleine exprimiert, tritt nur die entsprechende Bande auf (C), bei alleiniger Expression von SgrTec3HA, lässt sich keine Bande nachweisen, da eine Reinigung von Proteinen mit einem „His-Tag“ dem Immunoblot vorgeschaltet ist (D).

Durch die Vernetzung und anschließende Analyse spezifischer Proteine im Western- und Immunoblot kann eine Beteiligung dritter Proteine an dieser Wechselwirkung nicht ausgeschlossen werden, da alle bakteriellen Proteine in der Zelle vorhanden sind, im Immunoblot aber nur solche Proteine nachgewiesen werden, die durch die verwendeten Antikörper erkannt

werden. Im Coomassiegel lassen sich dagegen alle im Komplex gereinigten Proteine detektieren. Durch Unterschiede im Proteinmuster zwischen Proben, die eine Wechselwirkung von SgrTec und EIICB^{Glc} zeigen und solchen, in denen diese Wechselwirkung fehlt, könnten sich diese Proteine identifizieren lassen (s. Abbildung 5.24). Das Coomassiegel zeigt jedoch, dass trotz der Reinigung noch viele Nebenprodukte in der Elutionsprobe vorhanden sind, sodass keine eindeutigen Unterschiede zwischen den einzelnen Proben erkannt werden können.

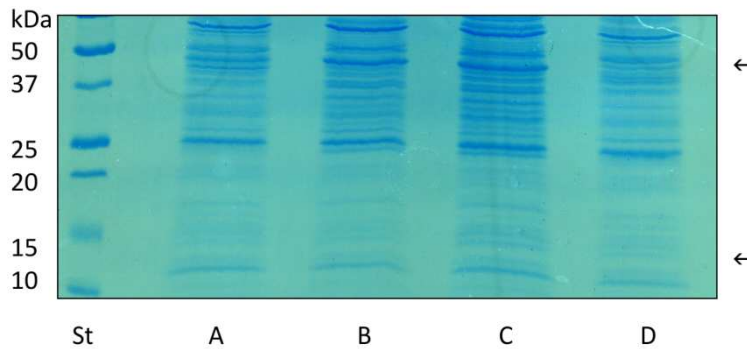


Abbildung 5.24: Coomassiegel zum „Crosslinking“ von SgrTec und EIICB^{Glc}

Mit: A = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG, B = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose, C = JKA12/pRR48GH + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose, D = JKA12/pTM30/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose. Gezeigt ist ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel. Die EIICB^{Glc} zwischen 37 kDa und 50 kDa, SgrT Bande zwischen 10 kDa und 15 kDa. Die Zuordnung der Banden erfolgte auf Grund ihrer bekannten Größe im SDS-Gel. Coomassie färbt alle Proteine unspezifisch an.

Mit Hilfe des „Crosslinking“ der Proteine durch Paraformaldehyd konnte eine Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} nachgewiesen werden. Zudem wurde gezeigt, dass diese Wechselwirkung scheinbar von der Anwesenheit von Glukose abhängig ist. Bei der Bindung von Glukose tritt vermutlich eine Konformationsänderung des EIICB^{Glc} auf, die auf der Translokation der Glukose beruht (Lolkema et al., 1992). Außerdem liegt das EIICB^{Glc} unter diesen Bedingungen überwiegend unphosphoryliert vor, da das Phosphat beim Transport der Glukose direkt auf diese übertragen und so abgegeben wird. Um zu untersuchen, ob die Wechselwirkung von SgrT mit EIICB^{Glc} von der Anwesenheit der Glukose und der damit verbundenen Konformationsänderung des EIICB^{Glc} zusammenhängt oder ob der Phosphorylierungszustand von EIICB^{Glc} die Wechselwirkung der beiden Proteine beeinflusst, wurde ein „Crosslinking“ Versuch in einem *ptsHlcr*-Deletionsstamm (LJ140) durchgeführt. Dieser Stamm trägt eine Deletion der Gene für die Proteine EI, HPr und EIIA^{Glc} und ist damit nicht mehr in der Lage, einen Phosphatgruppentransfer vom PEP auf die Glukose aufrecht zu erhalten. In diesem Stamm liegt das EIICB^{Glc} demnach immer in der unphosphorylierten Form vor. Dadurch ist das Protein zwar noch in der Lage, die Glukose im Periplasma zu binden und geht vermutlich in den „locked-in“ Zustand über, kann die Glukose aber nicht mehr in die Zelle hinein transportieren, da das Phosphat fehlt, welches eine Konformationsänderung in den zum Cytoplasma geöffneten Zustand erleichtert.

Für einen „Crosslinking“ Versuch wurde der Stamm LJ140 mit pRR48GH und pACYC184sgrTec3HA transformiert und wie zuvor beschrieben untersucht. Dabei wurde sowohl eine Anzucht mit als auch eine Anzucht ohne Glukose durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.25 zu sehen.

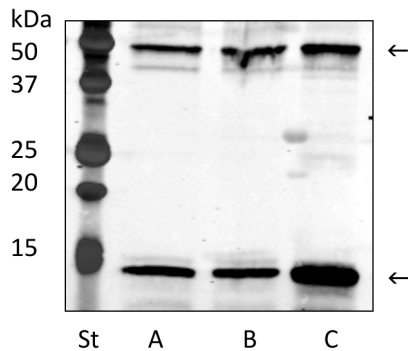


Abbildung 5.25: Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-His in LJ140

Mit: A = LJ140/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose, B = LJ140/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG, C = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose. Gezeigt ist ein Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-His im LJ140 Stammhintergrund. Die Membran wurde mit den primären Antikörpern Anti-Penta-His und Anti-HA, sowie entsprechenden sekundären Antikörpern behandelt. Die EIICB^{Glc}-His Bande ist zwischen 37 kDa und 50 kDa zu erkennen, die SgrTec3HA Bande liegt zwischen 10 kDa und 15 kDa.

Die Abbildung zeigt, dass im LJ140 Stammhintergrund eine Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} stattfindet, unabhängig von der Glukose-Zugabe. Dieses Ergebnis bedeutet, dass die Wechselwirkung der beiden Proteine nicht von der Glukose selber, d.h. der Bindung der Glukose durch EIICB^{Glc} und der damit verbundenen Konformationsänderung abhängig ist, sondern vom Phosphorylierungszustand des EIICB^{Glc}. Es scheint, als sei nur unphosphoryliertes EIICB^{Glc} in der Lage SgrT zu binden. Dies stimmt mit dem Modell überein, dass SgrT in Anwesenheit von Glukose-6-Phosphatstress an EIICB^{Glc} bindet, d.h. dann, wenn EIICB^{Glc} in unphosphoryliertem Zustand vorliegt.

Mit Hilfe der „Crosslinking“ Versuche konnte also eine Wechselwirkung zwischen dem unphosphorylierten EIICB^{Glc} und SgrT nachgewiesen werden. Eine Beteiligung weiterer Proteine an dieser Wechselwirkung konnte mit dieser Methode allerdings nicht ausgeschlossen werden. Zwei Proteine, die ebenfalls mit unphosphoryliertem EIICB^{Glc} in Kontakt treten, sind Mlc und EIIA^{Glc}. Daher war es naheliegend, diese beiden Proteine auf ihren möglichen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen EIICB^{Glc} und SgrT zu untersuchen. Dafür wurden ebenfalls „Crosslinking“ Versuche gewählt.

5.1.4.6 Analyse der möglichen Beteiligung von EIIA^{Glc} und Mlc an der Wechselwirkung zwischen EIICB^{Glc} und SgrT durch „Crosslinking“

Die beiden Proteine EIIA^{Glc} (Gen *crr*) und Mlc (Gen *dgsA*) binden wie SgrT ebenfalls an unphosphoryliertes EIICB^{Glc}. EIIA^{Glc} ist dabei für die Phosphatgruppenübertragung an EIIB^{Glc} verantwortlich, Mlc wird von der unphosphorylierten EIIB^{Glc}-Domäne während der Glukoseaufnahme gebunden und so vom Operator des *ptsG*-Gens titriert. Durch weitere „Crosslinking“ Versuche sollte herausgestellt werden, ob die beiden Proteine die Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} beeinflussen, d.h. ob sie gegebenenfalls direkt an der Interaktion beteiligt sind und sie vermitteln oder behindern.

In einem Δ *ptsH/crr* Stammhintergrund (LJ140) zeigte sich in „Crosslinking“ Versuchen eine normale Interaktion zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} (s. Abbildung 5.25). Aus diesem Versuch lässt

sich nicht nur auf die Bindung von SgrT an dephosphoryliertes EIICB^{Glc} schließen, sondern auch darauf, dass EIIA^{Glc} nicht als essentieller Wechselwirkungspartner zwischen EIICB^{Glc} und SgrT an deren Interaktion beteiligt ist. Eine Deletion von EIIA^{Glc} beeinflusst die Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} demnach nicht.

In einem $\Delta dgsA$ Stammhintergrund (LJ110 $\Delta dgsA$) ist ein ähnliches Ergebnis zu beobachten. Auch hier ist die Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} nicht durch fehlendes Mlc negativ beeinträchtigt, sodass auch hier davon ausgegangen werden kann, dass Mlc nicht an der Wechselwirkung der beiden Proteine beteiligt ist. Im Gegenteil scheint die Bindung von SgrT und EIICB^{Glc} in Abwesenheit von Mlc leicht erhöht zu sein, was darauf hindeutet, dass Mlc die Wechselwirkung beider Proteine eher behindert als fördert. Eine mehrfache Wiederholung dieses Versuches wäre notwendig, um dieses Ergebnis statistisch zu belegen (s. Abbildung 5.26).

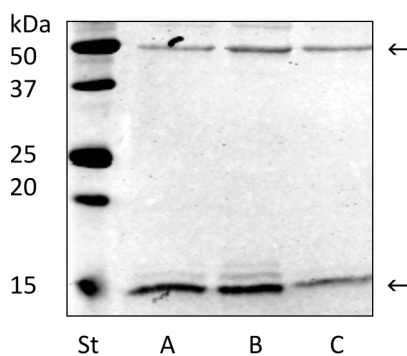


Abbildung 5.26: Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-His in LJ110 $\Delta dgsA$

Mit: A und B = LJ110 $\Delta dgsA$ /pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose, C = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose. Gezeigt ist ein Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-His im LJ110 $\Delta dgsA$ -Stammhintergrund. Die Membran wurde mit den primären Antikörpern Anti-Penta-His und Anti-HA, sowie entsprechenden sekundären Antikörpern behandelt. Die EIICB^{Glc}-His Bande ist zwischen 37 kDa und 50 kDa zu erkennen, die SgrTec3HA Bande liegt zwischen 10 kDa und 15 kDa.

Die beiden Proteine EIIA^{Glc} und Mlc, welche bekanntermaßen ebenfalls an EIICB^{Glc} binden, wenn dieses unphosphoryliert ist, konnten demnach als Interaktionspartner der Wechselwirkung zwischen EIICB^{Glc} und SgrTec ausgeschlossen werden. Bei den Proteinen scheinen unterschiedliche Bindestellen oder Bindungsmechanismen vorzuliegen. Beim „Crosslinking“ handelt es sich um eine biochemische Methode, die eine Wechselwirkung nur *in vitro* zeigen kann und zudem durch die unspezifische Proteinvernetzung sehr anfällig für Artefakte ist. Daher wurde in weiteren Ansätzen eine Methode für einen *in vivo* Nachweis der Wechselwirkung verwendet.

5.1.4.7 BiFC zur Untersuchung der Wechselwirkung von EIICB^{Glc} bzw. der Domänen von EIICB^{Glc} und SgrTec

Um ein anderes Nachweisverfahren zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen EIICB^{Glc} und SgrT *in vivo* aufzubauen, wurde die Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation, kurz BiFC oder Split-GFP, verwendet. Hier werden die beiden zu untersuchenden Proteine an eine N-terminale bzw. C-terminale Hälfte von GFP fusioniert und gemeinsam exprimiert. Wenn eine Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen stattfindet, gelangen auch die beiden fusionierten GFP-Hälften in räumliche Nähe zueinander und können ein funktionsfähiges, d.h. fluoreszierendes

GFP-Protein ausbilden (s. Abbildung 5.27). Diese Komplexbildung ist irreversibel und führt zu einer starken Fluoreszenz des Komplexes (Kerppola, 2008; Magliery et al., 2005). Dadurch wird erreicht, dass sich über die Zeit immer mehr fluoreszierende GFP-Moleküle ansammeln, sodass auch Proteinwechselwirkungen nachgewiesen werden können, die nur selten oder schwach auftreten.

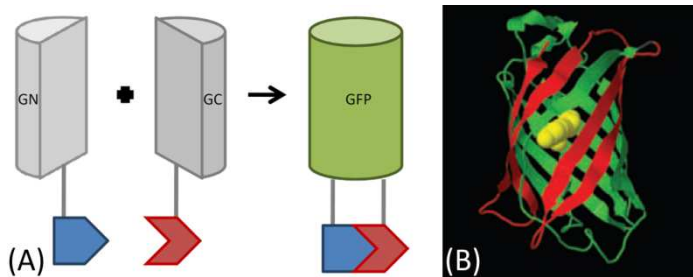


Abbildung 5.27: Modell zur Funktionsweise der Bimolekularen Fluoreszenz Komplementation (BiFC)

Dargestellt ist ein Modell zur BiFC Methode und ein dreidimensionales Modell des GFP-Fusionsproteins. (A) Zwei zu untersuchende Proteine werden an den nicht fluoreszierenden N- bzw. C-Terminus eines GFP-Proteins fusioniert und gemeinsam in einer Zelle exprimiert. Wenn die zu untersuchenden Proteine miteinander eine Wechselwirkung eingehen, gelangen auch die GFP-Hälften in räumliche Nähe zueinander und bilden ein fluoreszierendes Molekül. (B) Darstellung der dreidimensionalen Struktur des GFP-Proteins, bestehend aus den beiden Teilfragmenten (rot bzw. grün) [Nach (Kerppola, 2008)].

Für die BiFC Analyse wurde zunächst ein neuer Stamm konstruiert. Da das Plasmid pET11a-NGFP einen T7 Promotor aufweist, ist die Verwendung eines BL21(λ DE3) Stammes notwendig. Um die Interaktion der beiden mit GFP fusionierten Proteine zu erhöhen, wurde zusätzlich eine *ptsG*-Deletion in den Stamm eingebracht (JKA17 = BL21(λ DE3) Δ *ptsG::cat*). Für die Untersuchung der Wechselwirkung wurden verschiedene Plasmid-Konstrukte hergestellt. Die Ausgangsplasmide pET11a-link-NGFP und pMRBAD-link-CGFP sowie die Positivkontrollen pET11a-Z-NGFP und pMRBAD-Z-CGFP wurden von Prof. Dr. L. Regan (Yale Universität, USA) bereitgestellt. Des Weiteren wurde ein von dieser Arbeitsgruppe entwickeltes Protokoll als Grundlage des hier durchgeführten Versuches gewählt (Wilson et al., 2004). SgrTec wurde im pET11a-NGFP Vektor mit dem N-terminalen Bereich von GFP fusioniert (pET11a-SgrTec-NGFP). Um die Funktionalität des SgrTec zu überprüfen, wurde eine Wachstumskurve in Minimalmedium mit Glukose durchgeführt und eine Induktion mit unterschiedlichen IPTG Konzentrationen vorgenommen (s. Abbildung 5.28). Die Abbildung zeigt, dass SgrTec-NGFP ab einer Konzentration von 50 μ M IPTG das Wachstum eines BL21(DE3)-Stammes in Minimal Glukose Medium hemmt. Da eine deutliche Repression erst bei 100 μ M IPTG auftritt, wurde diese Menge für den nachfolgenden BiFC Assay verwendet (Abweichend von der Methode von Wilson et al. mit 10 μ M IPTG (Wilson et al., 2004)).

Des Weiteren wurden verschiedene EIICB^{Glc}-Konstrukte in pMRBAD-CGFP kloniert. Da dieses Protein membranständig ist, wurde auf eine N-terminale Fusion mit dem N-terminalen Bereich des GFP in pET11a-NGFP verzichtet, um die Membranintegration nicht zu stören. Außerdem wurden die Plasmide pET11a-Z-NGFP und pMRBAD-Z-CGFP als Positivkontrollen verwendet. Sie exprimieren zwei artifiziell konstruierte Leucin-Zipper, die eine starke Wechselwirkung miteinander eingehen (Magliery et al., 2005). Die Expression einiger Fusionsproteine wurde im Westernblot mit polyklonalem Anti-GFP Antikörper überprüft. Zudem konnte eine Komplementation des Glukose⁻ Phänotyps von LR2-175 durch EIICB^{Glc}-CGFP in einem Markertest gezeigt werden, was auf eine Funktionalität dieses Fusionsproteins deutet (Daten nicht gezeigt).

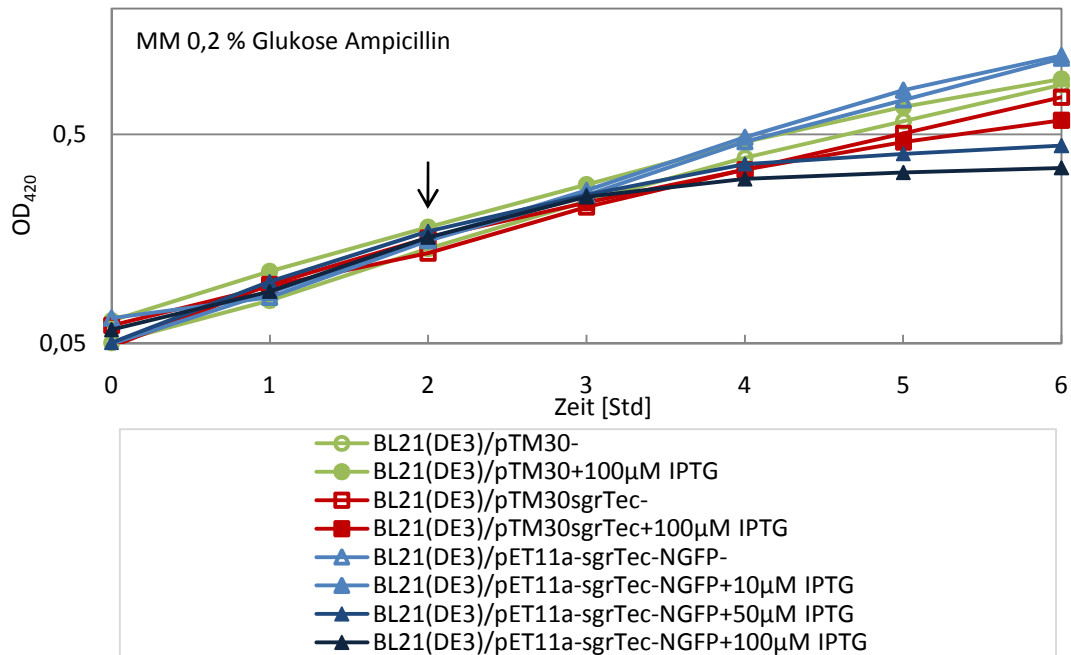


Abbildung 5.28: Wachstumskurve zum Funktionsnachweis von SgrTec-NGFP

Dargestellt ist die Repression des Wachstums von BL21(DE3) bei Überproduktion von SgrTec-NGFP und SgrTec in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose anhand einer Wachstumskurve. Als Kontrolle ist BL21(DE3) mit dem Leervektor pTM30 aufgetragen. Die Zugabe von 10 µM bis 100 µM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer $OD_{420} = 0,2$ (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 6 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: BL21/pTM30- = 1,62; BL21/pTM30+ = 1,79; BL21/pTM30sgrTec- = 1,72; BL21/pTM30sgrTec+ = 2,29; BL21/pET11a-sgrTec-NGFP- = 1,38; BL21/pET11a-sgrTec-NGFP+10 = 1,40; BL21/pET11a-sgrTec-NGFP+50 = 3,83; BL21/pET11a-sgrTec-NGFP+100 = 6,53.

Für die eigentliche BiFC Analyse wurden die Plasmide in entsprechenden Kombinationen in den JKA17-Stamm transformiert. Die Anzucht erfolgte unter Zugabe von 0,2 % Glukose, 0,4 % Arabinose und 100 µM IPTG in Vollmedium bei 25 °C über mehrere Tage. Zur Überprüfung der Wechselwirkung wurden die Zellen zunächst unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dafür wurden die Zellen geerntet, in Minimalmedium gewaschen und auf einen mit Polylysin beschichteten Objektträger gegeben. Die Betrachtung erfolgte zunächst nur für die Positivkontrolle mit Z-NGFP und Z-CGFP, einer Negativkontrolle mit Leervektoren und der Kombination SgrTec-NGFP und EIICB^{Glc}-CGFP. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.29 gezeigt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen ein deutliches GFP-Signal in den Zellen der Positivkontrolle. Hier findet eine starke Wechselwirkung zwischen den beiden Fusionsproteinen Z-NGFP und Z-CGFP statt. Bei der Negativkontrolle mit den Leervektoren ist dagegen kein Fluoreszenzsignal zu sehen. Auch die Probe mit SgrTec-NGFP und EIICB^{Glc}-CGFP zeigt kein Fluoreszenzsignal. Möglicherweise ist das Signal zu schwach, um im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden zu können. Bei den Positivkontrollen handelt es sich um artifiziiell konstruierte, cytoplasmatisch vorliegende Leucin-Zipper, welche für eine Interaktion optimiert wurden (Magliery et al., 2005). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Wechselwirkung zwischen dem Membranprotein EIICB^{Glc} und dem cytoplasmatischen Protein SgrTec deutlich geringer ist, wodurch ein deutlich vermindertes Fluoreszenzsignal von GFP zu erwarten ist.

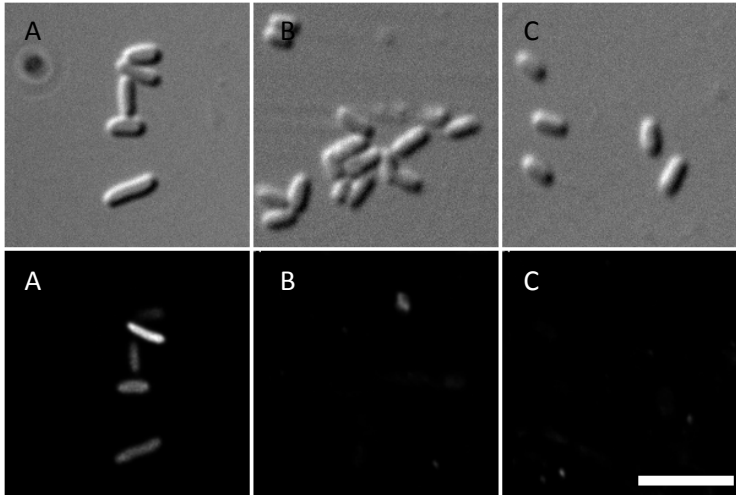


Abbildung 5.29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von BiFC-Kulturen

Mit: A = JKA17/pET11a-Z-NGFP/pMRBAD-Z-CGFP, B = JKA17/pET11a-linker-NGFP/pMRBAD-linker-CGFP, C = JKA17/pET11a-sgrTec-NGFP/pMRBAD-ptsG-CGFP. Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von drei BiFC-Kulturen. Die Aufnahmen wurden mit einem 100x Objektiv und einem FITC/GFP-Filter aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug im Hellfeld 20 ms, in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme 1.000 ms. Der Maßstab repräsentiert 5 µm.

Eine sensitivere Methode stellt die Fluoreszenzmessung mit dem Fluorimeter dar. Hier wird die Gesamtfluoreszenz in einer Zellsuspension bestimmt und in Zahlenwerten (quantifiziert) angegeben. Dadurch können auch deutlich geringere Fluoreszenzsignale und kleinere Unterschiede detektiert werden. Für die Fluoreszenzmessung mit dem Fluorimeter wurden die Kulturen wie im Methodenabschnitt beschrieben angezogen und geerntet. Die Zellen wurden in ca. 1 ml Lysispuffer resuspendiert, die OD_{420} der Suspension bestimmt und 100 µl mit gleicher Zellzahl in allen Proben für die Fluoreszenzmessung eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.30 dargestellt.

Die Abbildung zeigt eine sehr starke Wechselwirkung zwischen den beiden Positivkontrollen Z-NGFP und Z-CGFP, welche etwa zehnmal höher ist als die Hintergrundfluoreszenz der Negativkontrollen. Eine zu den Negativkontrollen signifikant höhere Fluoreszenz lässt sich auch bei den Kombinationen SgrTec-NGFP/EIICB^{Glc}-CGFP und SgrTec-NGFP/EIIC^{Glc}-ktpgred-CGFP feststellen. Dadurch zeigt sich eine Wechselwirkung zwischen SgrTec und dem Volllängenprotein EIICB^{Glc} sowie eine noch stärkere Wechselwirkung zwischen SgrTec und der um den Linker verlängerten C-Domäne des EIICB^{Glc} (AS 1-396). Durch das Verkürzen des Volllängenproteins direkt hinter der Linker-Region wird dieses Motiv vermutlich exponiert und scheint damit noch besser zugänglich für eine Wechselwirkung mit SgrTec. Keine Wechselwirkung lässt sich dagegen zwischen SgrTec und der C-Domäne (AS 1-381) alleine sowie der B-Domäne (AS 389-477) feststellen, auch nicht, wenn hier der Linker vorhanden (AS 380-477) ist.

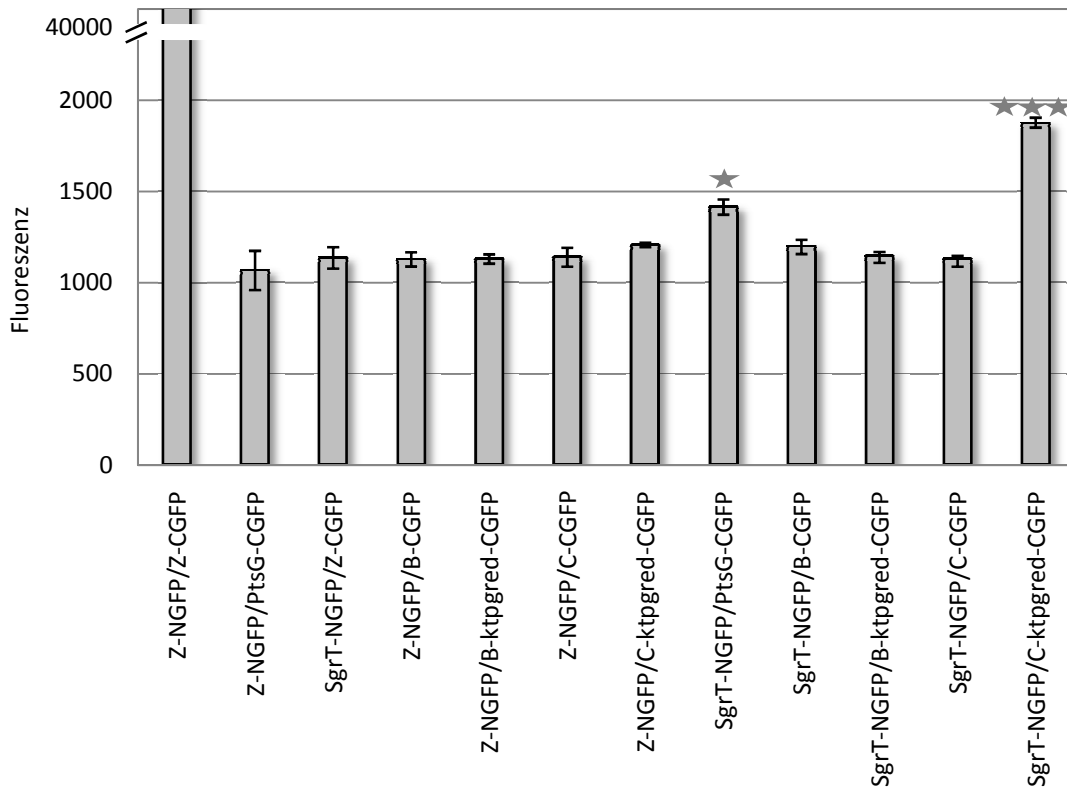


Abbildung 5.30: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} mittels BiFC

Gezeigt ist ein Balkendiagramm zur Fluoreszenzbestimmung mit dem Fluorimeter der BiFC-Kulturen. Die angegebenen Fusionsproteine wurden im JKA17-Stammhintergrund auf den Plasmiden pET11a-NGFP und pMRBAD-CGFP exprimiert. Die Anzucht erfolgte wie im Text beschrieben. Angegeben sind die mittleren Fluoreszenzwerte mit Standardabweichungen von jeweils drei unabhängig bestimmten Kulturen. Signifikanzlevel *p = 0,05, ** p = 0,01, *** p = 0,001

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Linker zwischen der B- und C-Domäne von EIICB^{Glc} in Kombination mit der C-Domäne bzw. die Membranständigkeit des Linkers durch die C-Domäne wichtig für die Wechselwirkung mit SgrT zu sein scheint. Dabei wird die Wechselwirkung durch eine Exposition des Linkers noch verstärkt. In diesem Versuch ließ sich ebenfalls keine Wechselwirkung zwischen SgrTec und der B-Domäne bzw. der um den Linker verlängerten B-Domäne nachweisen, was die Ergebnisse aus den „Two-Hybrid“ Analysen bestätigt. Mit dieser Methode konnte demnach auch *in vivo* eine Interaktion zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} nachgewiesen werden. Zudem konnte die B-Domäne für eine Wechselwirkung mit SgrTec ausgeschlossen werden, dagegen scheint der Linker, bzw. der Linker in Verbindung mit der membranständigen C-Domäne, wichtig zu sein. Eine Beteiligung dritter Proteine an der Wechselwirkung kann auch mit dieser Methode nicht ausgeschlossen werden, ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die beiden Proteine sehr nah in Kontakt kommen müssen, um ein fluoreszierendes GFP hervorzubringen.

5.1.4.8 „Crosslinking“ zur Untersuchung der Wechselwirkung von SgrTec mit den Domänen von EIICB^{Glc}

Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen SgrT und den einzelnen Domänen des EIICB^{Glc} sollte auch in „Crosslinking“ Versuchen bestätigt werden. Dafür wurde der Stamm JKA12 zunächst

mit den Plasmiden pACYC184sgrTec3HA und pTM30BHis (AS 388-477) transformiert und in einem „Crosslinking“ Experiment untersucht. Die Reinigung des BHis fand dabei wie beim Volllängenprotein, nur ohne den Schritt der Solubilisierung, statt. Eine Wechselwirkung zwischen SgrT und der B-Domäne konnte dabei ebenfalls ausgeschlossen werden, da im Westernblot kein SgrT-Signal nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigte sich, dass eine mit einem „His-Tag“ versehene C-Domäne (AS 1-381) im Westernblot nicht nachweisbar war. Auch eine um den Linker verlängerte C-Domäne (AS 1-388) mit daran gekoppelten „His-Tag“ zeigte kein Signal im Westernblot (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist der „His-Tag“ in das Protein eingefaltet und für die Antikörper nicht zugänglich oder das Protein selber ist instabil und wird abgebaut. Aus diesem Grund konnte keine Analyse der Wechselwirkung zwischen SgrT und der C-Domäne, bzw. der um den Linker verlängerten C-Domäne mit „Crosslinking“ Versuchen, durchgeführt werden.

Fasst man die Erkenntnisse dieses Kapitels zusammen, zeigt sich, dass eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem unphosphorylierten Glukose-Transportprotein EIICB^{Glc} und dem kleinen regulatorischen Protein SgrT sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eindeutig nachgewiesen werden konnte („Crosslinking“ und BiFC). Die Region der Wechselwirkung auf Seiten des EIICB^{Glc} konnte in weiteren Versuchen auf die membranständige C-Domäne und den Linkerbereich zwischen der C- und B-Domäne eingegrenzt werden (BiFC, „Two-Hybrid“). Das KTPGRED-Motiv des Linkers könnte hierbei eine entscheidende Rolle spielen.

5.1.5 Essentielle Aminosäuren für die Interaktion mit SgrT auf Seiten des EIICB^{Glc}

Die bisher gezeigten Methoden konnten eine Wechselwirkung zwischen SgrTec und dem unphosphorylierten EIICB^{Glc} nachweisen. Obwohl eine Eingrenzung der Region der Wechselwirkung auf die C-Domäne und den Linker (KTPGRED-Motiv) von EIICB^{Glc} vorgenommen werden konnte, konnte die Frage nach essentiellen Aminosäuren für diese Wechselwirkung noch nicht aufgeklärt werden und soll in den nachfolgenden Kapiteln genauer betrachtet werden. Dabei soll nicht nur herausgestellt werden, welche Aminosäuren auf Seiten des EIICB^{Glc} und des SgrT für die Wechselwirkung beider Proteine essentiell sind, sondern auch, welche Rolle die unterschiedlichen Phänotypen des EIICB^{Glc} („relaxed“, „entkoppelt“ und „locked-in“) und das hoch konservierte KTPGRED-Motiv im Linker des EIICB^{Glc} für die Wechselwirkung spielen.

5.1.5.1 „Crosslinking“ Experimente zur Analyse der Wechselwirkung von SgrT mit verschiedenen EIICB^{Glc}-Mutanten

Mit der „Crosslinking“ Methode konnte bereits die Wechselwirkung von unphosphoryliertem EIICB^{Glc} und SgrTec nachgewiesen werden. Daher wurden in einem nächsten Schritt, durch „Crosslinking“ Experimente von verschiedenen Mutationsstämmen, Mutationen in EIICB^{Glc} auf ihre Wechselwirkung mit SgrT untersucht, die unterschiedliche Phänotypen von EIICB^{Glc} hervorrufen. Diese Mutationen rufen nicht nur unterschiedliche Translokationsaktivitäten und Substratspektren des EIICB^{Glc} hervor, sondern zeichnen sich auch durch veränderte Konformationen und Phosphorylierungszustände aus, die einen wichtigen Einblick in den Mechanismus der Interaktion mit SgrT geben können.

Es gibt eine Vielzahl von EIICB^{Glc}-Mutanten, die unterschiedliche Phänotypen zeigen. Dazu gehören die „relaxed“ Mutanten mit einem erweiterten Substratspektrum, die „entkoppelten“ Mutanten, bei denen ein Transport der Glukose ohne Phosphorylierung ermöglicht wird und die „locked-in“ Mutanten, bei denen die Translokation der Glukose unterbunden ist (detaillierte Beschreibung in der Einleitung, Kapitel 1.3). Im Zusammenhang mit der Wechselwirkung von EIICB^{Glc} und SgrT erscheint insbesondere die „relaxed“ Konformationsmutante EIICB^{Glc}-P384R sehr interessant, da sich diese Mutation im hoch konservierten Linkermotiv KTPGRED zwischen der C- und B-Domäne des EIICB^{Glc} befindet. Die Funktion des Linkers ist bislang unklar, die vorigen Versuche zeigten jedoch, dass das KTPGRED-Motiv eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung zwischen SgrT^{ec} und EIICB^{Glc} zu spielen scheint. So konnte eine Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} sowie NagE gezeigt werden, die beide das KTPGRED-Motiv zeigen, nicht jedoch mit dem EIICB^{Scr}, welches das Motiv nicht aufweist. Zudem wurde in BiFC Analysen gezeigt, dass SgrT nur eine Wechselwirkung mit der um den Linker verlängerten C-Domäne des EIICB^{Glc} eingeht, nicht jedoch mit der C-Domäne alleine. Bei der Mutation V12F entsteht wie bei der P384R-Mutation ein „relaxed“ Phänotyp, obwohl diese Mutation in einer völlig anderen Region des Proteins liegt. Bei ihr wurde aber ein abweichender Einbau in die Cytoplasmamembran und damit eine veränderte Konformation des Proteins vermutet (Aboulwafa et al., 2003). Bei der Mutation K150E handelt es sich um eine so genannte „locked-in“ Mutante, die Zellen können die Glukose zwar noch binden, aber nicht mehr in die Zelle aufnehmen, wodurch das Protein dauerhaft phosphoryliert vorliegt (Buhr et al., 1992). Als Vertreter der „entkoppelten“ Mutanten sollte die Punktmutation I296N näher analysiert werden. Hier tritt eine Entkopplung von Transport und Phosphorylierung auf, die Zellen können also auch Glukose aufnehmen, ohne sie zu phosphorylieren (Ruijter et al., 1992).

Für die „Crosslinking“ Versuche wurden die Mutationen zunächst über ortsgerechte Mutagenese in das Plasmid pRR48GH eingebracht und durch Sequenzierung überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass bei der Mutagenese zur Aminosäuresubstitution von K150E auch eine V12F Mutation im *ptsGHis* des Plasmids entstanden war. Dies sollte aber keinen negativen Einfluss auf den „locked-in“ Phänotyp der Mutante haben, sodass dieses Plasmid in den Versuchen eingesetzt wurde. Aus zeitlichen Gründen konnte keine Untersuchung einer Einzelmutation erfolgen. Anschließend wurden die Plasmide jeweils zusammen mit pACYC184sgrT^{ec}3HA in JKA12 transformiert und in „Crosslinking“ Analysen untersucht. Die Zellen wurden in Vollmedium mit entsprechenden Antibiotika und 0,2 % Glukose angezogen. Die Zugabe von 1 mM IPTG erfolgte nach einer Stunde. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben. Das Ergebnis eines Westernblots zu den Mutanten V12F, K150E und I296N ist in Abbildung 5.31 gezeigt.

Die Abbildung zeigt, dass die Wechselwirkung von EIICB^{Glc} und SgrT durch die Mutation V12F im EIICB^{Glc} nicht beeinflusst wird. Der „relaxed“ Phänotyp und die mögliche veränderte Konformation des Proteins scheint hier zunächst keinen Einfluss auf die Wechselwirkung mit SgrT zu haben. Bei der Punktmutation K150E tritt dagegen eine deutlich verminderte Wechselwirkung der beiden Proteine auf. Das EIICB^{Glc}-K150E Protein liegt auf Grund seiner Unfähigkeit der Translokation der Glukose vollständig phosphoryliert vor, da das Phosphat nicht an die Glukose abgegeben werden kann. Das Ergebnis dieses Versuches bestätigt die Annahme, dass SgrT nur mit unphosphoryliertem EIICB^{Glc} wechselwirken kann.

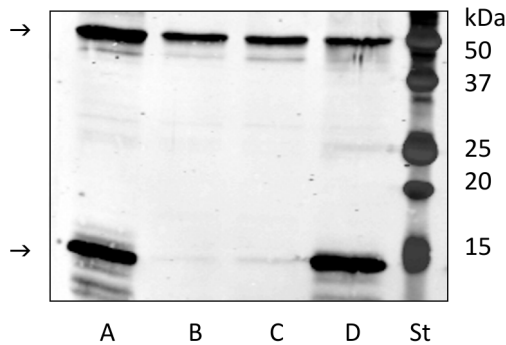


Abbildung 5.31: Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-His mit verschiedenen Mutationen

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = JKA12/pRR48GH-V12F/pACYC184sgrTec3HA, B = JKA12/pRR48GH-V12F-K150E/pACYC184sgrTec3HA, C = JKA12/pRR48GH-I296N/pACYC184sgrTec3HA, D = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA. Gezeigt ist ein Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und verschiedenen EIICB^{Glc}-His-Mutanten. Die Membran wurde mit den primären Antikörpern Anti-Penta-His und Anti-HA, sowie entsprechenden sekundären Antikörpern behandelt. Die EIICB^{Glc}-His Bande ist zwischen 37 kDa und 50 kDa zu erkennen, die SgrTec3HA Bande liegt zwischen 10 kDa und 15 kDa.

Bei der Mutation I296N tritt ebenfalls nur noch eine schwache Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} in JKA12 auf. Hier scheint möglicherweise eine Konformationsänderung des Proteins oder die unvollständige Dephosphorylierung auf Grund der Tatsache, dass die „entkoppelte“ Mutante auch unphosphorylierte Glukose transportiert, die Wechselwirkung mit SgrT zu vermindern. Um die beiden Möglichkeiten voneinander unterscheiden zu können, wurde ein weiteres „Crosslinking“ der Proteine SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-I296N-His in einem LJ140-Stammhintergrund durchgeführt. Hier findet auf Grund der *ptsHIcrr*-Deletion keine Phosphorylierung des EIICB^{Glc}-I296N-His mehr statt.

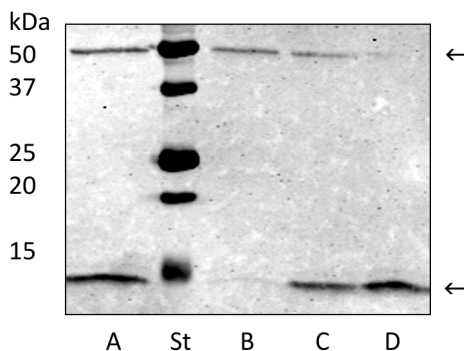


Abbildung 5.32: Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-I296N-His in LJ140

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose, B = JKA12/pRR48GH-I296N/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose, C = LJ140/pRR48GH-I296N/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG, D = LJ140/pRR48GH-I296N/pACYC184sgrTec3HA + 1 mM IPTG + 0,2 % Glukose. Gezeigt ist ein Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-I296N-His in JKA12 und LJ140. Die Membran wurde mit den primären Antikörpern Anti-Penta-His und Anti-HA, sowie entsprechenden sekundären Antikörpern behandelt. Die EIICB^{Glc}-His Bande ist zwischen 37 kDa und 50 kDa zu erkennen, die SgrTec3HA Bande liegt zwischen 10 kDa und 15 kDa.

Die Abbildung 5.32 zeigt, dass in diesem Stammhintergrund eine Wechselwirkung zwischen SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-I296N-His stattfindet. Dabei ist die Wechselwirkung nicht von

Glukosezugabe abhängig. Es lässt sich also zusammenfassen, dass eine Wechselwirkung zwischen SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-I296N-His stattfindet, sofern das Protein vollständig unphosphoryliert vorliegt. In einem *ptsHlcr*^{WT}-Stammhintergrund scheint dagegen keine vollständige Dephosphorylierung des EIICB^{Glc} beim Glukosetransport stattzufinden. Bereits Ruijter et al. hatten für die „entkoppelte“ Mutante EIICB^{Glc}-I296N eine schlechte Phosphorylierungsaktivität vorhergesagt (Ruijter et al., 1992), was den hier gezeigten Ergebnissen entspricht.

Als zusätzliche „relaxed“ Mutante wurde EIICB^{Glc}-P384R untersucht, da es sich hierbei um eine Mutation im hoch konservierten KTPGRED-Motiv des Linkers handelt, der bereits zuvor als möglicher Interaktionspartner von SgrT vorhergesagt wurde. Da es sich bei der Mutation des Prolins zu Arginin allerdings um einen wenig konservativen Austausch der Aminosäuren handelt, wurde zusätzlich eine P384A Mutation untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.33 dargestellt.

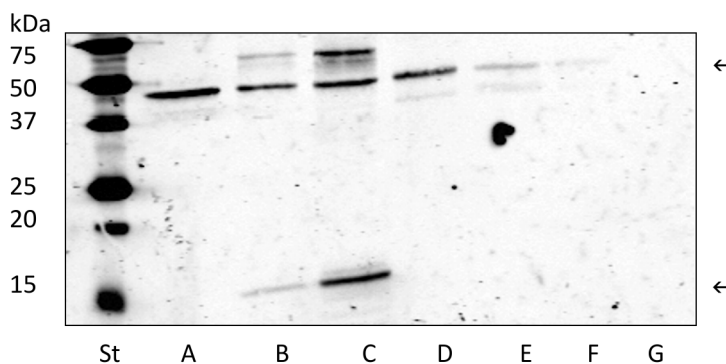


Abbildung 5.33: Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-His-P384A und EIICB^{Glc}-His-P384R, sowie Kontrollen

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = JKA12/pRR48GH-P384R/pACYC184sgrTec3HA, B = JKA12/pRR48GH-P384A/pACYC184sgrTec3HA, C = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA, D = JKA12/pRR48GH-P384R, E = JKA12/pRR48GH-P384A, F = JKA12/pRR48GH, G = JKA12/ pACYC184sgrTec3HA. Gezeigt ist ein Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und verschiedenen EIICB^{Glc}-His-Mutanten. Die Membran wurde mit den primären Antikörpern Anti-Penta-His und Anti-HA, sowie entsprechenden sekundären Antikörpern behandelt. Die EIICB^{Glc}-His Bande ist zwischen 37 kDa und 50 kDa zu erkennen, die SgrTec3HA Bande liegt zwischen 10 kDa und 15 kDa.

Die Abbildung zeigt eine eindeutige Wechselwirkung von SgrTec3HA und dem Wildtypprotein EIICB^{Glc} (C). Diese Wechselwirkung kann durch die Mutation der Aminosäure P384 zu Alanin eingeschränkt (B) und durch die Mutation derselben Aminosäure zu Arginin (A) vollständig aufgehoben werden. Die Kontrollen (D-G) zeigen die zu erwartenden Ergebnisse. Die hier verwendete „relaxed“ Mutante zeigt demnach ein anderes Verhalten als V12F, da sie keine bzw. nur noch eine verminderte Wechselwirkung mit SgrT eingeht. Es scheint daher weniger der „relaxed“ Phänotyp die Interaktion mit SgrT zu beeinflussen, als viel mehr die Aminosäure P384 im KTPGRED-Motiv des Linkers selber. Prolin ist eine kleine und ungeladene Aminosäure, die zudem wichtige strukturelle Funktionen übernimmt. Arginin dagegen ist eine sehr große und polare Aminosäure. Die Mutation zu Alanin, einer kleinen unpolaren und ungeladenen Aminosäure, kann die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen dagegen nur vermindern, aber nicht vollständig verhindern. Daher lässt sich vermuten, dass es sich bei der Aminosäure P384 zwar um eine wichtige Aminosäure im Bezug auf die Wechselwirkung von SgrTec und EIICB^{Glc} handelt, sie aber nicht alleine verantwortlich ist für die Wechselwirkung, sondern vielmehr

in einer für die Wechselwirkung wichtigen Region liegt. Eine große Aminosäure kann daher eine Wechselwirkung verhindern, vermutlich durch räumliche Behinderung, wohingegen eine kleine Aminosäure dies nicht kann.

Daher stellt sich die Frage, welche anderen Aminosäuren ebenfalls an der WW beteiligt sind, und welche Rolle die weiteren Aminosäuren des KTPGRED-Motivs im Linker spielen. Außerdem bleibt die Frage, wie sich andere „relaxed“ Mutanten im Bezug auf die Wechselwirkung mit SgrT verhalten, um die hier gezeigten Ergebnisse zu verifizieren. Daher soll in den folgenden Kapiteln zunächst die Interaktion zwischen SgrT und EIICB^{Glc}-P384R genauer analysiert und zu anderen „relaxed“-Mutanten in Vergleich gestellt werden. Erst wenn sich die hier gezeigten Ergebnisse auch *in vivo* bestätigen, ist eine genauere Untersuchung des KTPGRED-Motivs sinnvoll.

5.1.5.2 Wachstumsanalysen zur Funktionalität von SgrT in verschiedenen relaxed Mutanten von EIICB^{Glc}

Zunächst wurden verschiedene „relaxed“ Mutanten in Wachstumskurven auf ihre Wechselwirkung mit SgrT untersucht. Da in der Arbeitsgruppe bereits viele Arbeiten zum Glukose-PTS und dem EIICB^{Glc} durchgeführt wurden, lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits verschiedene chromosomal codierte *ptsG*-Mutanten vor, die einen „relaxed“ Phänotyp zeigen, u.a. ein Stamm mit einer Mutation des Prolins 384 im KTPGRED-Linker des EIICB^{Glc}. Bei diesem Stamm handelt es sich um LJB5 (Becker, 2003), einen LJ110 Stamm mit einer *manXYZ*-Deletion und einer chromosomal kodierten *ptsG*-Punktmutation, die zu einem Austausch der Aminosäure Prolin 384 zu Arginin im Protein führt. Im Rahmen der Arbeit von A.K-Becker wurde auf EIICB^{Glc}-Mutanten selektioniert, die diesen „relaxed“ Phänotyp zeigen. Diese Stämme nehmen neben Glukose auch Mannose und N-Acetyl-Glukosamin über das Glukose-PTS auf (Nähere Erläuterungen in der Einleitung, Kapitel 1.3.1). LJB5 sollte in Wachstumsanalysen auf eine Wechselwirkung mit SgrT untersucht werden, um die „Crosslinking“ Experimente *in vivo* zu verifizieren. Dafür wurde der Stamm mit dem Plasmid pTM30sgrTec3HA transformiert und in Wachstumskurven in Minimalmedium mit Glukose als einziger Kohlenhydratquelle auf sein Wachstumsverhalten bei der SgrTec-Überproduktion untersucht. Es zeigte sich, dass eine Überproduktion von SgrTec in Minimal Glukose Medium keine negative Auswirkung auf das Wachstum von LJB5 hatte, im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem eine deutliche Hemmung des Wachstums bei Überproduktion von SgrTec auftritt (s. Abbildung 5.34). Die hier gezeigte Wachstumskurve bestätigt die Ergebnisse der „Crosslinking“ Versuche. Die fehlende Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc}-P384R zeigt erneut, dass es sich bei dem KTPGRED-Motiv entweder um eine essentielle Region für die Wechselwirkung von SgrT und EIICB^{Glc} handelt, d.h. dass die Aminosäure P384 selber an der Interaktion beteiligt ist, oder dass der „relaxed“ Phänotyp dieser Mutante für eine Wechselwirkung notwendig ist. Wobei die Versuche mit der V12F Mutante gegen diese Theorie sprechen, da hier eine uneingeschränkte Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc}-V12F stattfindet.

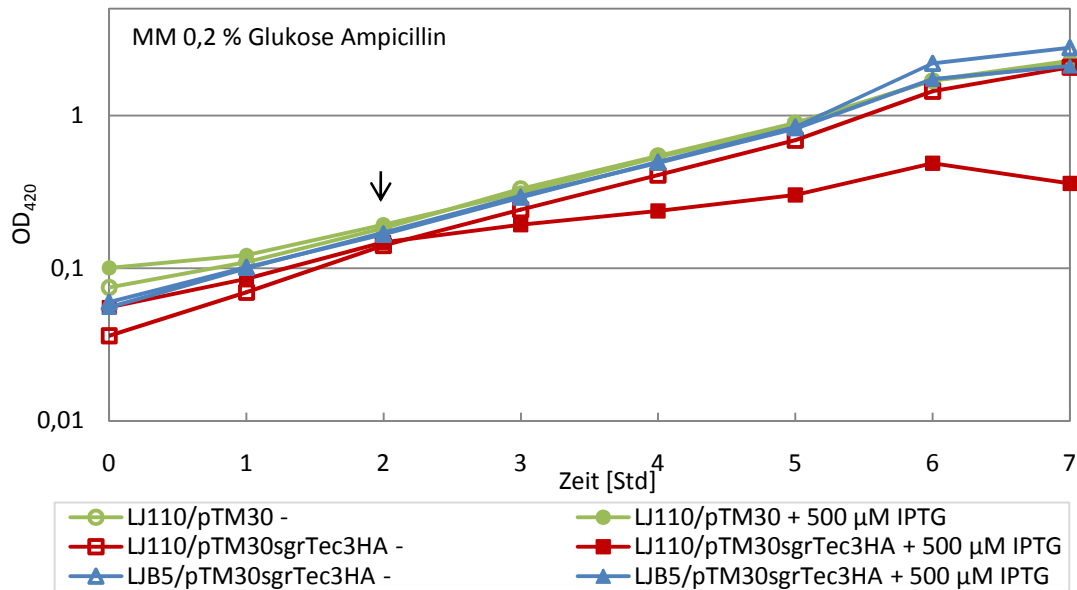


Abbildung 5.34: Überproduktion von SgrTec3HA zeigt in LJB5 keine Repression des Wachstums in MM Glukose

Die dargestellte Wachstumskurve zeigt, dass eine Überproduktion von SgrTec3HA keine Repression des Wachstums von LJB5 in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose hervorruft. Als Kontrolle ist ein Wildtypstamm LJ110 mit pTM30 bzw. pTM30sgrTec3HA gezeigt. Die Zugabe von 500 μ M IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer $OD_{420} = 0,2$ (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: LJ110/pTM30- = 1,31; LJ110/pTM30+ = 1,39; LJ110/pTM30sgrTec3HA- = 1,31; LJ110/pTM30sgrTec3HA+ = 2,93; LJB5/pTM30sgrTec3HA- = 1,29; LJB5/pTM30sgrTec3HA+ = 1,33.

Um zu untersuchen, ob die Aminosäure P384 für die Störung der Wechselwirkung mit SgrT verantwortlich ist oder ob diese Störung auch bei anderen „relaxed“ Mutanten auftritt, wurden weitere „relaxed“ Mutanten in Wachstumsanalysen untersucht. Diese Stämme zeigten Mutationen im $EIICB^{Glc}$ an den Positionen S169P (LJB3), G117D (LJB6), L289Q (LJB7) und G281R (LJB9). Es folgte eine Wachstumsanalyse in Minimal Glukose Medium. Die Überexpression von SgrTec3HA erfolgte durch Zugabe von 500 μ M IPTG nach zwei Stunden. Die Abbildung 5.35 zeigt die resultierende Wachstumskurve.

Wie in der oben gezeigten Abbildung zu sehen, zeigte die Überexpression von SgrTec3HA einen reprimierenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten von LJB3, LJB6, LJB7 und LJB9. Diese Stämme verhalten sich genau wie die Wildtypzellen LJ110 bei Überexpression von SgrT durch ein vermindertes Wachstum.

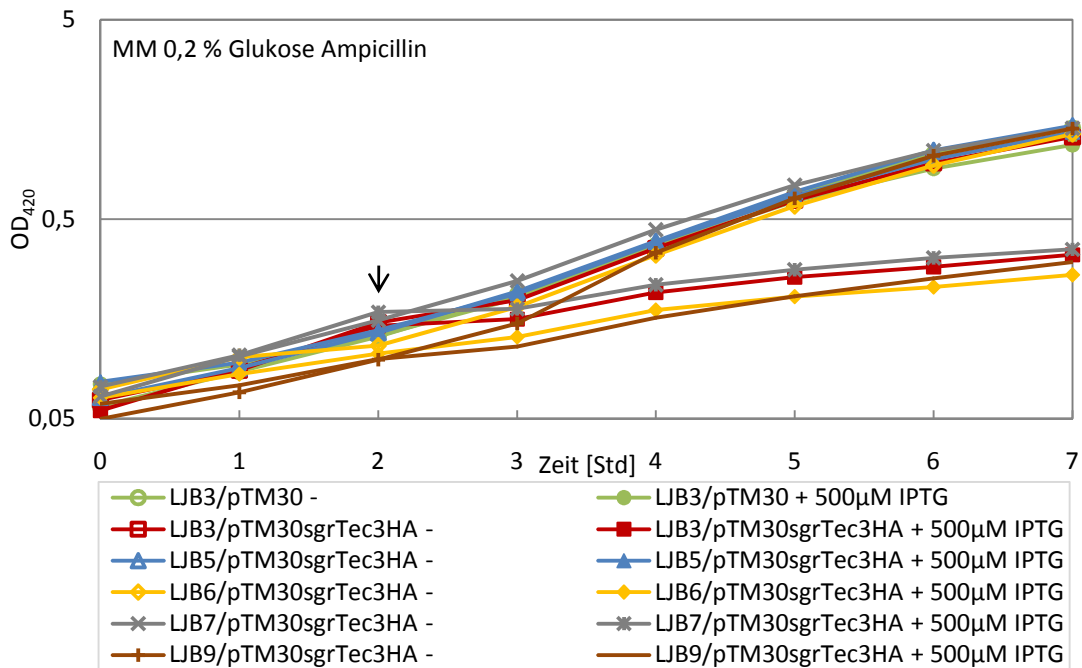


Abbildung 5.35: Wachstumskurve zur Messung des Einflusses von SgrTec auf das Wachstumsverhalten von „relaxed“ Mutanten

Dargestellt ist die Repression des Wachstums von verschiedenen „relaxed“ Mutanten bei der Überproduktion von SgrTec3HA beim Wachstum in MM 0,2 % Glukose. Als Kontrolle ist LJB3 mit dem Leervektor pTM30 aufgetragen, bzw. LJB5/pTM30sgrTec3HA, der keine Repression des Wachstums zeigt. Die Zugabe von 500 µM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer $OD_{420} = 0,2$ (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: LJB3/pTM30- = 1,29; LJB3/pTM30+ = 1,39; LJB3/pTM30sgrTec3HA- = 1,32; LJB3/pTM30sgrTec3HA+ = 3,46; LJB5- = 1,28; LJB5+ = 1,34; LJB6- = 1,27; LJB6+ = 3,61; LJB7- = 1,38; LJB7+ = 3,55; LJB9- = 1,08; LJB9+ = 2,65.

Zum Nachweis der Expression von SgrTec3HA in allen fünf Stämmen wurde ein Westernblot durchgeführt. Dafür wurden aus den Endkulturen der Wachstumskurven Proben genommen und für einen Western- und Immunoblot verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.36 gezeigt. In allen Stämmen findet eine starke Überproduktion von SgrTec3HA statt.

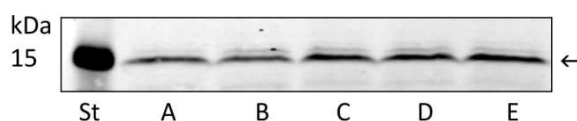


Abbildung 5.36: Westernblot zum Nachweis der Expression von SgrTec3HA in den „relaxed“ Mutanten

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = LJB3/pTM30sgrTec3HA + 500 µM IPTG, B = LJB5/pTM30sgrTec3HA + 500 µM, C = LJB6/pTM30sgrTec3HA + 500 µM, D = LJB7/pTM30sgrTec3HA + 500 µM, E = LJB9/pTM30sgrTec3HA + 500 µM. Die Anzucht der Zellen erfolgte in Minimalmedium mit Glukose, Ampicillin und 500 µM IPTG bis zu einer $OD_{650} = 1$. Die Zellen wurden geerntet, in Lysispuffer resuspendiert, durch Ultraschall aufgeschlossen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 15 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dem Westernblot folgte ein Immunoblot mit Anti-HA und einem sekundären Anti-Maus Antikörper.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Aminosäure P384 im KTPGRED-Motiv des Linkers von EIICB^{Glc} eine essentielle Rolle für die Wechselwirkung mit SgrT zu spielen scheint. Da die anderen „relaxed“ Mutanten ein normales Verhalten in Wachstumskurven gegenüber der

Überexpression von SgrT zeigen, lässt sich vermuten, dass die Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} in der KTPGRED-Sequenz des Linkers begründet liegt und nicht abhängig von Konformations- oder Strukturänderungen in „relaxed“ Mutanten ist. Dies bestätigt die Ergebnisse der „Crosslinking“ Experimente. Es ist jedoch nicht bekannt, ob und welche Konformations- und Strukturänderungen die unterschiedlichen „relaxed“ Mutanten durchlaufen und ob sie in allen „relaxed“ Mutanten gleich sind.

In einem weiteren Schritt sollte auch die Wechselwirkung von SgrTkpnHis mit den fünf „relaxed“ Mutanten untersucht werden. Die Identität der Aminosäuresequenz zwischen SgrTec und SgrTkpn beträgt nur 38 %. Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen EIICB^{Glc} und SgrTkpn könnte demnach Aufschluss über mögliche wichtige Aminosäuren auf Seiten des SgrT geben und die Eigenschaften der Wechselwirkung näher beleuchten. Auch das EIICB^{Glc} in *K.pneumoniae* zeigt das hoch konservierte KTPGRED-Motiv im Linker zwischen beiden Domänen. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie oben beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.37 dargestellt.

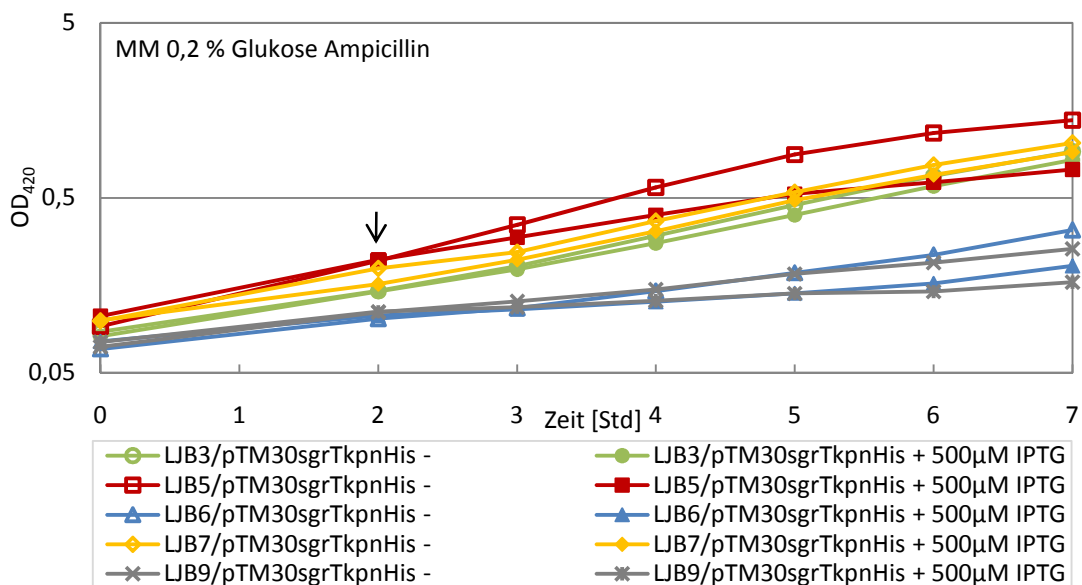


Abbildung 5.37: Wachstumskurve zur Überexpression von SgrTkpn in „relaxed“ Mutanten

Dargestellt ist die Repression des Wachstums von verschiedenen „relaxed“ Mutanten bei Überproduktion von SgrTkpnHis beim Wachstum in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose. Die Zugabe von 500 µM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer $OD_{420} = 0,2$ (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: LJB3- = 1,85; LJB3+ = 2,07; LJB5- = 1,49; LJB5+ = 2,40; LJB6- = 3,45; LJB6+ = 7,13; LJB7- = 2,08; LJB7+ = 1,89; LJB9- = 4,09; LJB9+ = 8,68.

Die Abbildung zeigt, dass hier ein völlig anderes Ergebnis auftritt. So scheint die Repression des Wachstums von LJB6 (G117D) und LJB9 (G281R) wie erwartet durch die Überproduktion von SgrTkpnHis sehr stark zu sein. Keine Hemmung des Wachstums zeigt sich dagegen in den Stämmen LJB3 (S169P) und LJB7 (L289Q), was nicht mit den Ergebnissen der Überproduktion von SgrTec übereinstimmt. Eine leichte Repression des Wachstums zeigt sich zudem bei LJB5 (P384R), was ebenfalls nicht zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen passt. Die veränderte Sequenz des SgrTkpn gegenüber dem SgrTec scheint für diese unterschiedliche Wechselwirkung beider

Proteine mit EIICB^{Glc} verantwortlich zu sein. SgrTkpn kann demnach als natürliche Suppressionsmutante von SgrTec angesehen werden, die eine Repression des Wachstums von Zellen erlaubt, die ein EIICB^{Glc}-P384R exprimieren. Aminosäuren, die sich zwischen den beiden SgrT-Derivaten unterscheiden, könnten demnach essentiell an der Wechselwirkung mit EIICB^{Glc} beteiligt sein. Eine weitere Untersuchung dieser Beobachtung konnte aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen werden. Ein Versuch zur Identifizierung essentieller Aminosäuren auf Seiten des SgrT für die Wechselwirkung mit EIICB^{Glc} folgt in Kapitel 5.1.6. Vorige Versuche zeigten bereits deutlich, dass SgrTkpn einen sehr viel stärkeren Einfluss auf die Aktivität von EIICB^{Glc} hat, als das homologe Protein aus *E.coli* (s. Kapitel 5.1.1). Je nach Bakterienart scheint zudem der Einfluss von SgrT oder *sgrS* auf den Glukose-Transport zu überwiegen (Horler und Vanderpool, 2009). Möglicherweise liegt hier ein anderer Mechanismus der Wechselwirkung vor, sodass die Mutationen und möglichen Konformationsänderungen in EIICB^{Glc} einen sehr viel stärkeren Einfluss auf die Wechselwirkung mit SgrTkpn haben.

5.1.5.3 BiFC Analyse zur Wechselwirkung von EIICB^{Glc}-P384R und SgrT

In einem nächsten Schritt sollte die Wechselwirkung zwischen EIICB^{Glc}-P384R und SgrTec mit *in vivo* Verfahren weiter analysiert werden. Dafür wurde zunächst die bereits erfolgreich eingesetzte BiFC Analyse verwendet. Mit Hilfe der BiFC Versuche konnte bereits eine Wechselwirkung von SgrTec mit der um den Linkerbereich verlängerten C-Domäne von EIICB^{Glc} nachgewiesen werden.

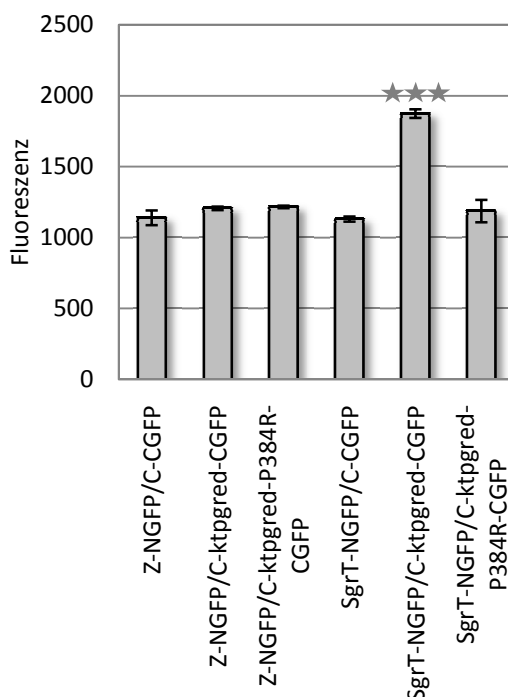


Abbildung 5.38: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc}-P384R mittels BiFC

Gezeigt ist ein Balkendiagramm zur Fluoreszenzbestimmung mit dem Fluorimeter der BiFC-Kulturen. Die angegebenen Fusionsproteine wurden im JKA17 Stammhintergrund auf den Plasmiden pET11a-NGFP und pMRBAD-CGFP exprimiert. Die Anzucht erfolgte wie im Text beschrieben. Angegeben sind die mittleren Fluoreszenzwerte mit Standardabweichung von jeweils drei unabhängig bestimmten Kulturen. Signifikanzlevel *p = 0,05, ** p = 0,01, *** p = 0,001.

Durch die Verwendung eines Plasmids mit der P384R Mutation im KTPGRED-Motiv des Linkers sollte überprüft werden, ob diese Wechselwirkung durch die Mutation unterbunden werden kann. Dafür wurde der oben beschriebene Versuch mit JKA17/pET11a-sgrTec-NGFP/pMRBAD-C-ktpgred-P384R-CGFP erneut durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.38 dargestellt (Kontrollen wie in Kapitel 5.1.4.7 beschrieben). Die Messung der Fluoreszenz zeigt deutlich, dass das signifikant höhere Fluoreszenzsignal, welches bei der Wechselwirkung von SgrTec mit der C-Linker-Domäne auftritt, durch die EIICB^{Glc}-P384R Mutation vollständig auf die Hintergrundfluoreszenz herabgesetzt wird. Dies bestätigt die zuvor beschriebene Vermutung, dass es sich bei der Aminosäure P384 um eine wichtige Aminosäure für die Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} handelt.

5.1.5.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von EIICB^{Glc} und SgrTec-GFP

Eine weitere *in vivo* Methode, die einen Hinweis auf Wechselwirkungen zwischen Proteinen geben kann, sind Co-Lokalisationsstudien in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Im Gegensatz zu den BiFC Analysen ermöglichen diese Untersuchungen nicht nur einen Nachweis der Interaktion zweier Proteine, sondern zeigen zudem die Lokalisation der Interaktion in der Zelle und geben gleichzeitig Aufschluss über die Morphologie der Zellen. Da es sich bei EIICB^{Glc} um ein Membranprotein handelt, zeigt dieses ein Fluoreszenzsignal in der Zellmembran. SgrT als cytoplasmatisches Protein ist dagegen in der ganzen Zelle verteilt. Die Frage bleibt, ob EIICB^{Glc} in der Lage ist, das SgrT unter bestimmten Bedingungen an die Plasmamembran zu titrieren und ob diese Wechselwirkung durch die P384R-Mutation im Linker des EIICB^{Glc} reduziert werden kann. Für diesen Versuch wurden zunächst zwei Stämme konstruiert, welche u.a. für die Lokalisationsstudien verwendet werden sollten. Da die vorigen Versuche bereits eine Auswirkung auf die Wechselwirkung mit SgrT der P384R Mutation in EIICB^{Glc} zeigten, sollte diese Mutante (LJB5) sowie eine zweite „relaxed“ Mutante (LJB9 mit G281R) auch in den Lokalisationsstudien genauer untersucht werden. Dafür wurde in die beiden Stämme LJB5 und LJB9 durch P1-Transduktion die *sgrRST*-Deletionskassette aus BW25113Δ*sgrRST::kan* eingebracht. Die beiden resultierenden Stämme zeigten folglich neben einer Mutation im *ptsG*, welche einen „relaxed“ Phänotyp im kodierten Protein hervorruft, und einer *manXYZ*-Deletion, eine Deletion des *sgrRST*-Genlokus, JKA18 = LJB5 (*ptsG*_{P384R}) Δ*sgrRST::kan*, JKA19 = LJB9 (*ptsG*_{G281R}) Δ*sgrRST::kan*.

Zusätzlich wurde ein Plasmid mit einer SgrTec-GFP Fusion konstruiert (pTM30sgrTec-gfp) und in Wachstumskurven auf Funktionalität in den Stämmen getestet, in denen auch die Lokalisationsstudien durchgeführt werden sollten (JKA1, JKA12, JKA18, JKA19). Das Ergebnis der Wachstumskurve ist in Abbildung 5.39 gezeigt. Die Funktionsanalyse von SgrTec-GFP zeigt in allen verwendeten Stämmen den erwarteten Phänotyp. Das Wachstum von JKA1 (LJ110Δ*sgrRST::cat*) und JKA19 (LJ231*ptsG*_{G281R}*tn10tet*^RΔ*sgrRST::cat*) wird durch Überproduktion von SgrTec-GFP reprimiert. Kein Einfluss der Überproduktion zeigt sich dagegen auf das Wachstum von JKA18 (LJ231*ptsG*_{P384R}*tn10tet*^RΔ*sgrRST::cat*). JKA12 (LJ110Δ*ptsG::cat*Δ*sgrRST::kan*) zeigt kein Wachstum in Minimal Glukose Medium, da eine *ptsG*-Deletion vorliegt. Die Expression von GFP alleine beeinflusst das Wachstum der Stämme nicht. Diese Ergebnisse stimmen mit den zuvor aufgestellten Beobachtungen überein, sodass von einer Funktionalität des SgrTec-GFP Fusionsproteins ausgegangen werden kann.

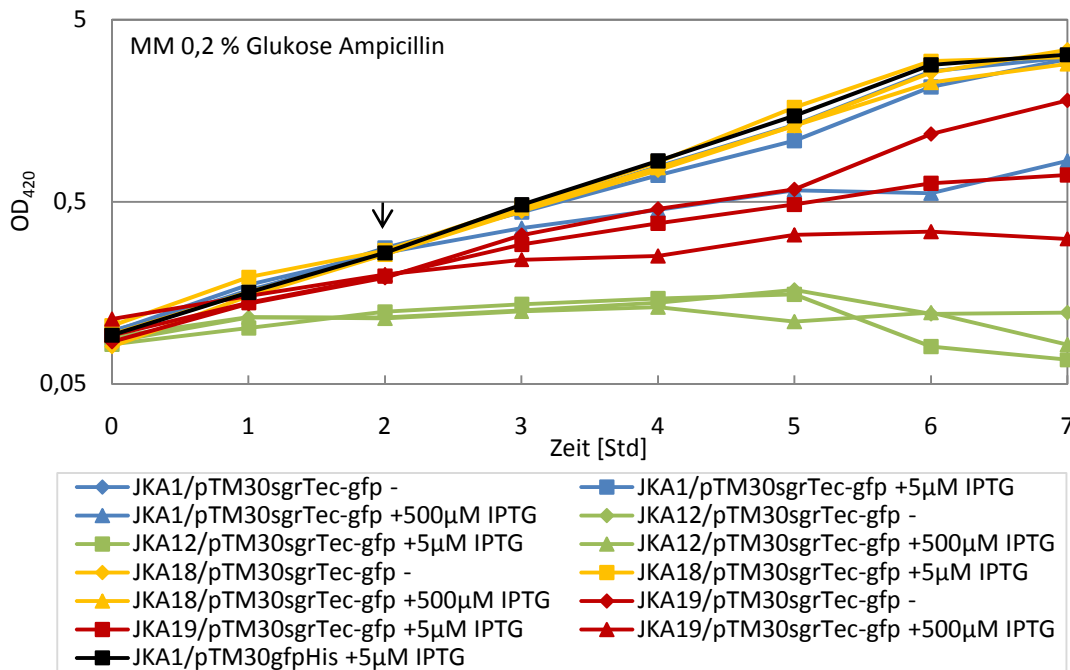


Abbildung 5.39: Wachstumskurve zur Funktionalität von SgrTec-GFP in verschiedenen Stämmen

Dargestellt ist die Repression des Wachstums von verschiedenen Stämmen bei Überproduktion von SgrTec-GFP beim Wachstum in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose. Die Zugabe von 5 μM bzw. 500 μM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer $\text{OD}_{420} = 0,2$ (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: JKA1- = 1,28; JKA1+5 = 1,54; JKA1+500 = 2,63; JKA12- = 6,01; JKA12+5 = 9,61; JKA12+500 = kein Wachstum; JKA18- = 1,28; JKA18+5 = 1,15; JKA18+500 = 1,28; JKA19- = 1,86; JKA19+5 = 2,29; JKA19+500 = 4,14; JKA1/pTM30gfpHis+5 = 1,20.

Um einen starken Einfluss auf das Wachstum der Zellen hervorzurufen, ist eine IPTG-Konzentration von 500 μM notwendig. Ein geringer Einfluss kann jedoch schon ab 5 μM beobachtet werden (s. Abbildung 5.39). Um eine zu starke Überproduktion von SgrTec-GFP und damit ein zu starkes Fluoreszenzsignal zu vermeiden, wurden für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nur 5 μM IPTG bei der Anzucht der Stämme verwendet. Für die Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen Bilder erfolgte zunächst eine Anzucht der Zellen in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose im Schüttelkolben. Die Induktion der SgrTec-GFP Überproduktion erfolgte nach 2 Stunden mit 5 μM IPTG. Nach weiteren zwei Stunden wurden aus den Schüttelkolben 2 μl Zellen entnommen und auf einen mit Polylysin behandelten Objektträger gegeben. Das Polylysin fixiert die Zellen auf der Glasoberfläche.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss mit dem 100 x Objektiv durchgeführt. Die Anregung des GFP-Signals erfolgte für 1.000 ms mit einem FITC/GFP-Filter, für Hellfeldaufnahmen wurden 20 ms Belichtungszeit genutzt. Von allen Kulturen wurden wenigstens 100 Zellen betrachtet, von denen hier jeweils repräsentative Beispiele gezeigt werden. Im Anschluss an die Aufnahmen wurden die Fluoreszenzbilder mit der Hygens-Dekonvolutionssoftware bearbeitet. Durch die Bearbeitung der Bilder wurden Unschärfe und Hintergrundfluoreszenz verringert, die Fluoreszenzverteilung der GFP-markierten Proteine jedoch nicht beeinflusst. Die Abbildung 5.40 zeigt JKA1 Zellen, welche GFP-His exprimieren. Die Zellen zeigen eine normale Morphologie, das Fluoreszenzsignal ist im gesamten Cytoplasma

verteilt. GFP alleine zeigt demnach keinerlei Membranassoziation und hat keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der Zellen.

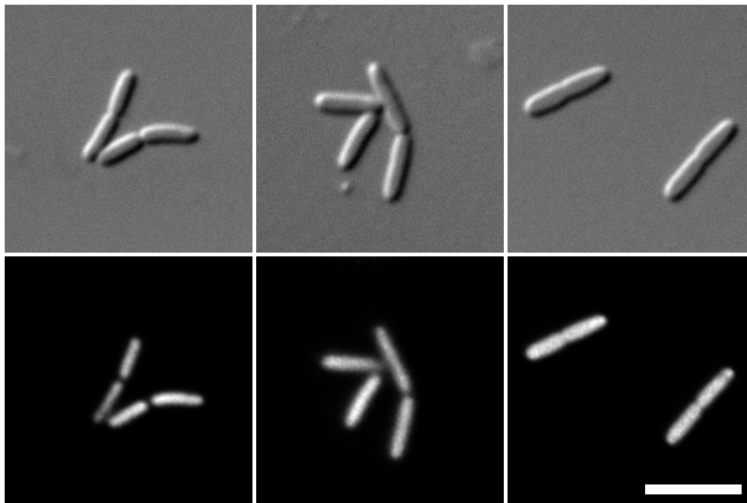


Abbildung 5.40: Untersuchung der Lokalisation von GFP-His in JKA1

Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von JKA1/pTM30gfp-His anhand von drei repräsentativen Bildern. Die Hellfeldaufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 20 ms, die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem FITC/GFP Filter für 1.000 ms belichtet. Es wurde ein 100x Objektiv verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte durch Dekonvolution. Der Maßstab repräsentiert 5 μ m.

Die Expression von EIICB^{Glc}-GFP in JKA12 Zellen zeigt, wie zu erwarten, eine membranassoziierte Verteilung des GFP Signals (Abbildung 5.41).

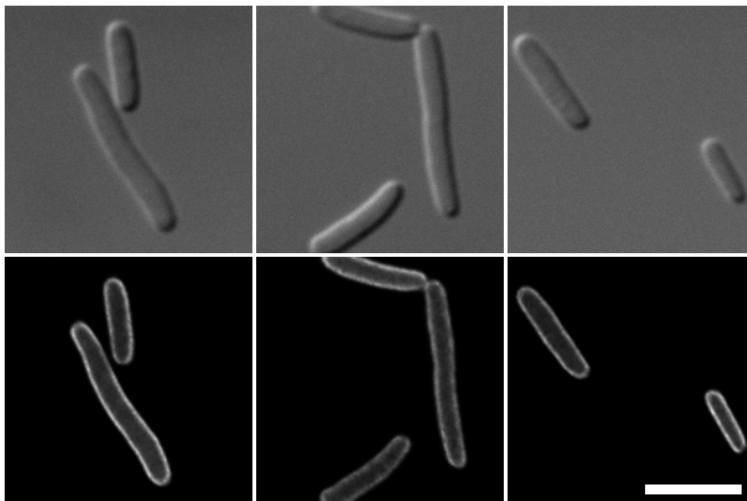


Abbildung 5.41: Untersuchung der Lokalisation von EIICB^{Glc}-GFP in JKA12

Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von JKA12/pBLP2 anhand von drei repräsentativen Bildern. Die Hellfeldaufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 20 ms, die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem FITC/GFP Filter für 1.000 ms belichtet. Es wurde ein 100x Objektiv verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte durch Dekonvolution. Der Maßstab repräsentiert 5 μ m.

Färbt man die Membran zusätzlich mit dem Membranfarbstoff FM4-64, lässt sich eine eindeutige Co-Lokalisation beider Signale im Overlay erkennen (Abbildung 5.42). EIICB^{Glc}-GFP ist

homogen über die gesamte Zellmembran verteilt. Da die Zellen (JKA12/pBLP2) ein gutes Wachstum zeigen, kann zudem davon ausgegangen werden, dass EIICB^{Glc}-GFP funktional ist und die Glukose Aufnahme in die Zelle ermöglicht.

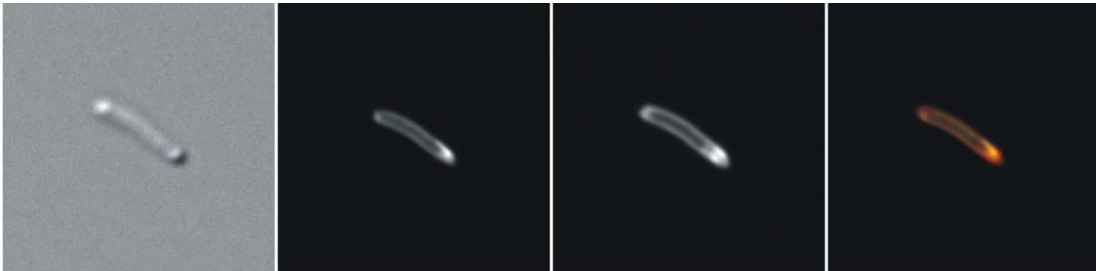


Abbildung 5.42: Untersuchung der Lokalisation von EIICB^{Glc}-GFP in JKA12 und FM4-64 Färbung der Membran

Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von JKA12/pBLP2 (B) und eine Färbung der Membran durch den Farbstoff FM4-64 (C). Im Overlay zeigt sich eine Co-Lokalisation der beiden Fluoreszenzsignale. Die Hellfeldaufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 20 ms, die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem FITC/GFP Filter für 1.000 ms belichtet. Es wurde ein 100x Objektiv verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte durch Dekonvolution.

Betrachtet man das Signal von SgrTec-GFP im JKA12 Stammhintergrund, d.h. in einer *ptsG*-Deletionsmutante, zeigt sich, dass das Fusionsprotein cytoplasmatisch über die gesamte Zelle verteilt ist (s. Abbildung 5.43). Die Zellen sind deutlich kleiner als solche, die EIICB^{Glc} exprimieren, da das Wachstum der Zellen in Minimalmedium mit Glukose ohne EIICB^{Glc} eingeschränkt ist. Dennoch lässt sich eine gleichmäßige Verteilung des cytoplasmatischen Proteins SgrTec-GFP über die gesamte Zelle erkennen, ohne eine Membranassoziation.

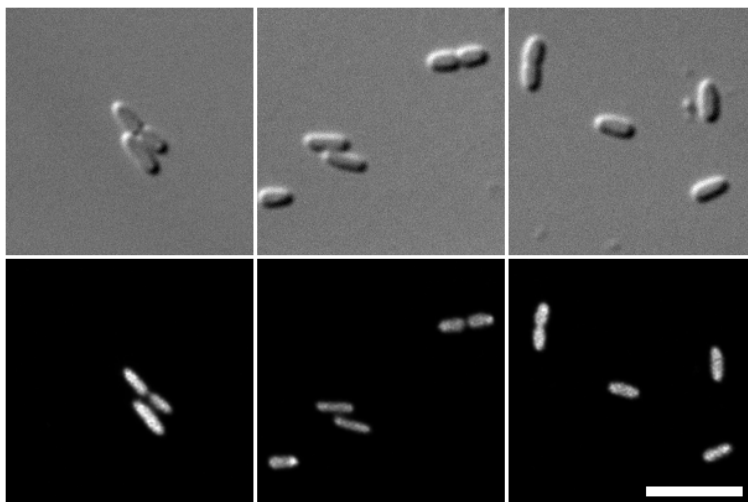


Abbildung 5.43: Untersuchung der Lokalisation von SgrTec-GFP in JKA12

Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von JKA12/pTM30sgrTec-gfp anhand von drei repräsentativen Bildern. Die Hellfeldaufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 20 ms, die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem FITC/GFP Filter für 1.000 ms belichtet. Es wurde ein 100x Objektiv verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte durch Dekonvolution. Der Maßstab repräsentiert 5 µm.

Betrachtet man dagegen die Verteilung von SgrTec-GFP im JKA1 Stammhintergrund, in dem ein EIICB^{Glc} mit Wildtypsequenz vorliegt, zeigt sich in Minimal Glukose Medium eine deutliche

membranassoziierte Lokalisation (Abbildung 5.44). Hier scheint das EIICB^{Glc} in der Lage zu sein, das SgrTec an die Membran zu rekrutieren, was zu einem membranassoziierten Signal in 90 % der Zellen führt.

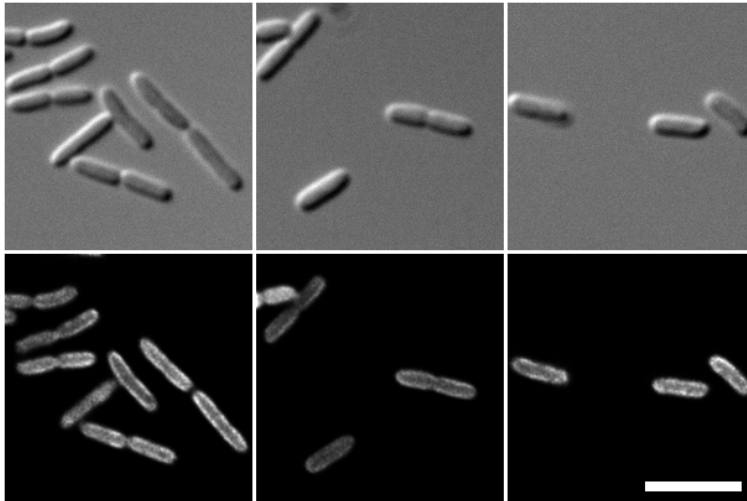


Abbildung 5.44: Untersuchung der Lokalisation von SgrTec-GFP in JKA1

Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von JKA1/pTM30sgrTec-gfp anhand von drei repräsentativen Bildern. Die Hellfeldaufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 20 ms, die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem FITC/GFP Filter für 1.000 ms belichtet. Es wurde ein 100x Objektiv verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte durch Dekonvolution. Der Maßstab repräsentiert 5 µm.

Durch die Beobachtung der Lokalisation von SgrTec-GFP in den Zellen lässt sich erneut eine Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} nachweisen, da das SgrTec nur in Gegenwart von EIICB^{Glc} an die Plasmamembran rekrutiert wird. Die Zellen zeigen dabei eine normale Morphologie. Durch die geringe Überproduktion des SgrT-GFP werden die Zellen nur wenig in ihrem Wachstum beeinflusst, sodass eine Betrachtung von artifiziell erzeugter Fluoreszenz durch schlechte Wachstumsbedingungen ausgeschlossen werden kann.

Ob die Rekrutierung von SgrTec-GFP an die Plasmamembran durch die bereits identifizierte Mutation EIICB^{Glc}-P384R wieder aufgehoben werden kann, soll durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von JKA18/pTM30sgrTec-gfp analysiert werden. Wurde die Aminosäure Prolin 384 im KTPGRED-Motiv des Linkers von EIICB^{Glc} zu Arginin mutiert, zeigte sich in Wachstumskurven, „Crosslinking“ Versuchen und BiFC Analysen, dass keine Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} mehr stattfindet. Dies kann durch die hier gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Analysen bestätigt werden. Im JKA18 Stamm, welcher die P384R Mutation im EIICB^{Glc} trägt, findet keine Rekrutierung von SgrTec-GFP an die Membran statt. In diesem Fall liegt das SgrTec-GFP zu 100 % cytoplasmatisch verteilt vor, wie es auch bei Abwesenheit von EIICB^{Glc} beobachtet werden konnte (Abbildung 5.45).

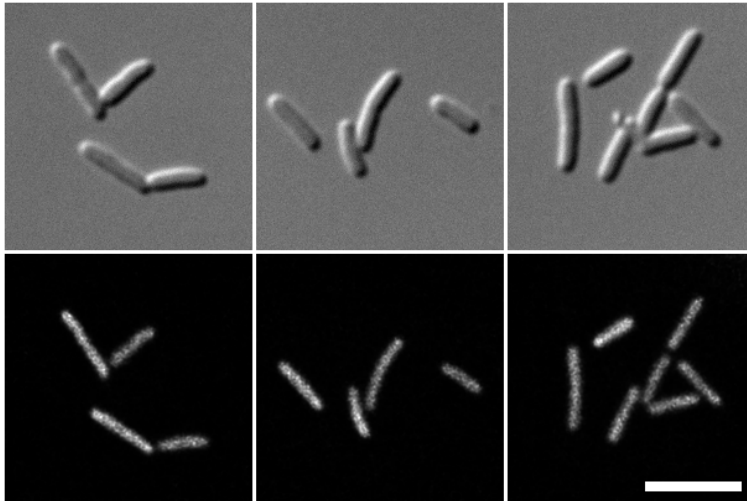


Abbildung 5.45: Untersuchung der Lokalisation von SgrTec-GFP in JKA18

Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von JKA18/pTM30sgrTec-gfp anhand von drei repräsentativen Bildern. Die Hellfeldaufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 20 ms, die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem FITC/GFP Filter für 1.000 ms belichtet. Es wurde ein 100x Objektiv verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte durch Dekonvolution. Der Maßstab repräsentiert 5 μm .

Da es sich bei der Mutation P384R um eine so genannte „relaxed“ Mutante handelt, bleibt die Frage, ob alleine diese Eigenschaft von EIICB^{Glc} die Bindung von SgrTec verhindern kann. Die Wachstumskurven und „Crosslinking“ Versuche deuteten darauf hin, dass dies nicht der Fall ist und diese Vermutung konnte in den hier gezeigten Fluoreszenzbildern bestätigt werden. In JKA19, einer „relaxed“ Mutante mit der G281R-Mutation, liegt SgrTec-GFP in 90 % der Zellen membranassoziiert vor (s. Abbildung 5.46).

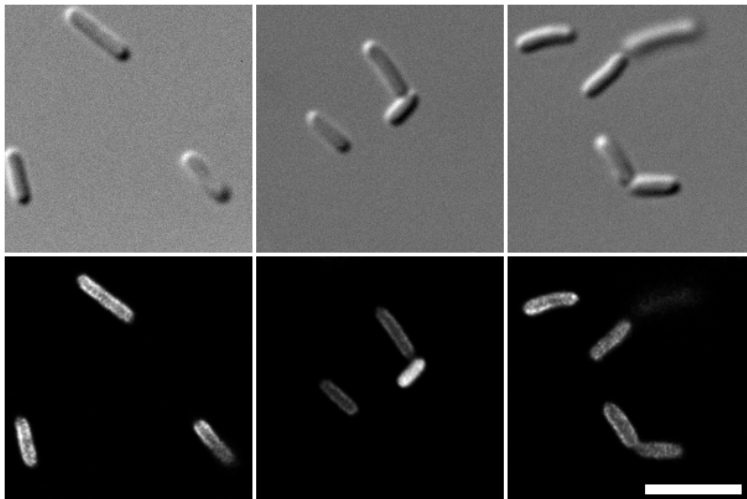


Abbildung 5.46: Untersuchung der Lokalisation von SgrTec-GFP in JKA19

Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von JKA19/pTM30sgrTec-gfp anhand von drei repräsentativen Bildern. Die Hellfeldaufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 20 ms, die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem FITC/GFP Filter für 1.000 ms belichtet. Es wurde ein 100x Objektiv verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte durch Dekonvolution. Der Maßstab repräsentiert 5 μm .

SgrT zeigt nicht nur einen Einfluss auf das Glukose-PTS, sondern auch auf das N-Acetyl-Glukosamin-PTS. Daher stellt sich die Frage, ob bei Wachstum in Minimalmedium mit N-Acetyl-Glukosamin auch das SgrTec-GFP an die Membran gebunden wird. Dafür wurde zunächst in einer Wachstumskurve das Wachstum von JKA1/pTM30sgrTec-gfp und JKA12/pTM30sgrTec-gfp untersucht (s. Abbildung 5.47). Die Wachstumskurve zeigt deutlich, dass nur eine geringe Repression des Wachstums in Minimalmedium mit N-Acetyl-Glukosamin von JKA1 bzw. JKA12 bei Überproduktion von SgrTec-gfp auftritt.

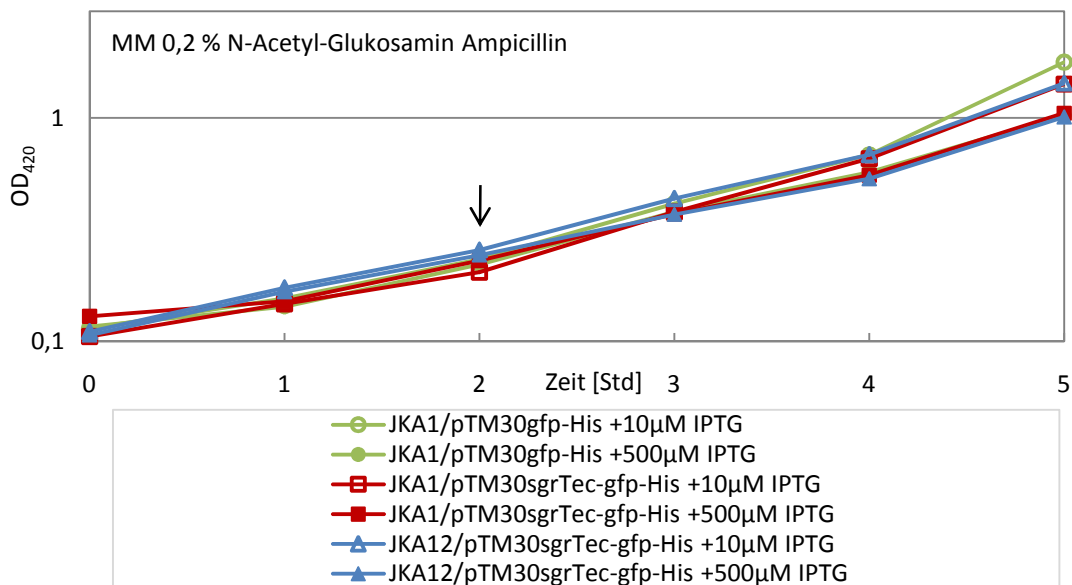


Abbildung 5.47: Wachstumskurve zur Überproduktion von SgrTec-GFP in JKA1 und JKA12 in MM N-Acetyl-Glukosamin

Dargestellt ist das Wachstum von JKA1 bei Überproduktion von SgrTec-GFP bei Wachstum in Minimalmedium mit 0,2 % N-Acetyl-Glukosamin und Ampicillin. Als Kontrolle ist JKA1 mit einem pTM30gfp-His aufgetragen. Die Zugabe von 10 µM bzw. 500 µM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer $OD_{420} = 0,2$ (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 5 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: JKA1/pTM30gfp-His+10 = 1,29; JKA1/pTM30gfp-His+500 = 1,47; JKA1/pTM30sgrTec-gfp-His+10 = 1,18; JKA1/pTM30sgrTec-gfp-His+500 = 1,57; JKA12/pTM30sgrTec-gfp-His+10 = 1,42; JKA12/pTM30sgrTec-gfp-His+500 = 1,77.

In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich bestätigt, dass vermutlich nur eine minimale Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen stattfindet, die sich in diesem Versuchsansatz nicht veranschaulichen lässt. Die Abbildung 5.48 zeigt, dass das Fluoreszenzsignal von SgrTec-GFP cytoplasmatisch verteilt bleibt und nicht an die Membran rekrutiert wird.

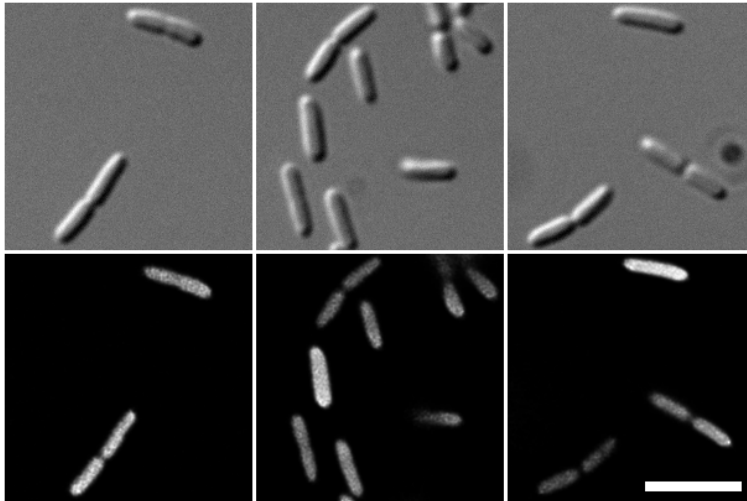


Abbildung 5.48: Untersuchung der Lokalisation von SgrTec-GFP in JKA1 in MM N-Acetyl-Glukosamin

Gezeigt sind die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von JKA1/pTM30sgrTec-gfp anhand von drei repräsentativen Bildern. Die Hellfeldaufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 20 ms, die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem FITC/GFP Filter für 1.000 ms belichtet. Es wurde ein 100x Objektiv verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte durch Dekonvolution. Der Maßstab repräsentiert 5 µm.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit diesen Versuchen die Annahme bestätigt werden konnte, dass SgrTec mit EIICB^{Glc} auf Proteinebene wechselwirkt, da EIICB^{Glc} in der Lage ist, SgrT an die Membran zu rekrutieren, was nur bei einer direkten Protein-Protein-Wechselwirkung zu erwarten ist. Die Aminosäure P384 scheint für diese Wechselwirkung essentiell zu sein, da eine Mutation des Prolins zu Arginin die Rekrutierung an die Membran aufheben kann. Ob weitere Proteine an der Wechselwirkung beteiligt sind, lässt sich durch diesen Versuch weder bestätigen noch widerlegen.

Die hier gezeigte Methode bietet sich auch an, um eine weitere Frage zu untersuchen, die im Laufe dieser Arbeit bereits aufgetreten ist, nämlich ob die Membranständigkeit des Linkers entscheidend ist für die Wechselwirkung mit SgrT, oder ob die C-Domäne essentiell daran beteiligt ist.

5.1.5.5 Untersuchung des Einflusses der EIIC^{Glc}-Domäne auf die Wechselwirkung zu SgrT

Vorige Versuche konnten zeigen, dass eine Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} nur dann stattfindet, wenn ein Volllängenprotein von EIICB^{Glc} vorliegt, oder der Linker membrangebunden an der C-Domäne exponiert wird. Wird der Linker cytoplasmatisch mit der B-Domäne exprimiert, findet dagegen keine Wechselwirkung mit SgrT statt (s. Abbildung 5.30). Dies wirft die Frage auf, ob die Membranständigkeit des Linkers entscheidend für die Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} ist, oder ob die C-Domäne ebenfalls essentiell an der Wechselwirkung beteiligt ist.

Um dies zu untersuchen, bieten sich fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsstudien an, bei denen die EIIC^{Glc}-Domäne gegen eine andere membranständige Domäne ausgetauscht wurde. In diesem Fall wurde eine Sucrosepermease (Gen *cscB*) als Membrananker für den Linker und die B-Domäne (AS 372-477) verwendet. Dafür wurde das Plasmid pACYC184cscB-linker-BHis kloniert, durch Sequenzierung überprüft und gemeinsam mit pTM30sgrTec-gfp in JKA12 exprimiert. Das Ergebnis der fluoreszenzmikroskopischen Analyse ist in Abbildung 5.49 gezeigt.

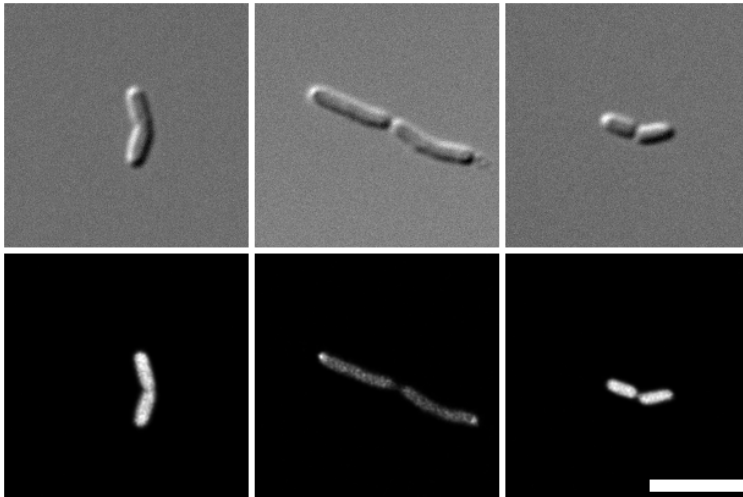


Abbildung 5.49: Untersuchung der Lokalisation von SgrTec-GFP in JKA12/pACYC184cscB-linker-BHis

Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von JKA12/pACYC184cscB-linker-BHis/pTM30sgrTec-gfp anhand von drei repräsentativen Bildern. Die Hellfeldaufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 20 ms, die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem FITC/GFP Filter für 1.000 ms belichtet. Es wurde ein 100x Objektiv verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte durch Dekonvolution. Der Maßstab repräsentiert 5 μm .

Die Lokalisation von SgrTec-GFP zeigt eine cytoplasmatische Verteilung. Dies deutet darauf hin, dass CscB-linker-BHis^{Glc} nicht in der Lage ist, SgrTec an die Cytoplasmamembran zu titrieren. Das würde bedeuten, dass die C-Domäne des EIICB^{Glc} essentiell an der Wechselwirkung mit SgrT beteiligt ist und der Linker alleine nicht ausreicht für eine Interaktion beider Proteine. Leider konnte die Expression und Lokalisation von CscB-linker-BHis an der Cytoplasmamembran nicht genauer untersucht werden, sodass zunächst weitere Analysen stattfinden müssen, um das hier gezeigte Ergebnis zu verifizieren.

5.1.5.6 „Crosslinking“-Versuche zur Wechselwirkung von SgrT mit EIICB^{Glc}-Mutanten des KTPGRED-Motives

Alle vorigen Versuche konnten zeigen, dass es sich bei der Aminosäure P384 um eine für die Wechselwirkung zu SgrT essentielle Aminosäure handelt. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass der „relaxed“ Phänotyp, der durch die Mutation P384R ausgelöst wird, die Wechselwirkung beeinflusst. Vielmehr wurde gezeigt, dass P384 in einer für die Wechselwirkung wichtigen Region liegt. Aus diesem Grund wurde abschließend das KTPGRED-Motiv in der Linkerregion genauer untersucht. Durch Mutationen in diesem Motiv und anschließende „Crosslinking“ Experimente mit SgrTec und den EIICB^{Glc}-Mutanten sollten Rückschlüsse auf die Wichtigkeit dieses Motivs in Bezug auf die Wechselwirkung mit SgrTec gezogen werden. Dafür wurden durch Mutagenese PCRs Mutationen in pRR48GH eingeführt. Alle Aminosäuren des Motivs wurden einzeln gegen Alanin ausgetauscht. In Komplementationsanalysen wurden die entstandenen Mutanten auf Funktionsfähigkeit der EIICB^{Glc}-Proteine getestet, indem die Plasmide in LR2-175 transformiert und auf McC Glukose Platten auf Komplementation untersucht wurden. Es zeigte sich, dass alle Mutanten einen Glukose-negativen Phänotyp des LR2-175 komplementieren konnten und damit funktionsfähig waren (Daten nicht gezeigt). Die Versuchsdurchführung der „Crosslinking“ Versuche erfolgte wie bereits beschrieben. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.50 dargestellt.

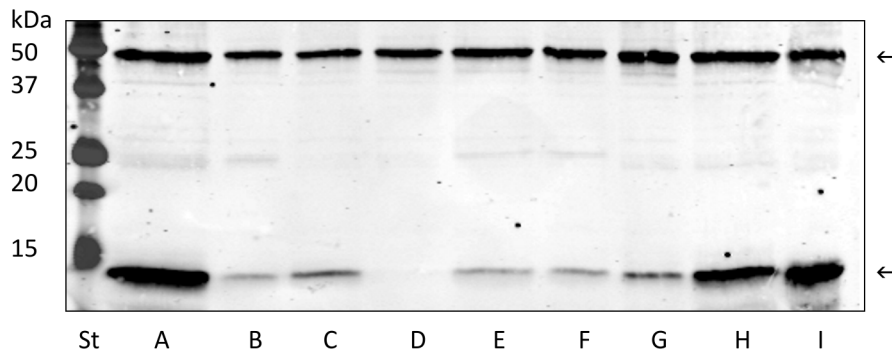


Abbildung 5.50: Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und EIICB^{Glc}-His mit Mutationen des KTPGRED-Motives

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = JKA12/pRR48GH-K382A/pACYC184sgrTec3HA, B = JKA12/pRR48GH-T383A/pACYC184sgrTec3HA, C = JKA12/pRR48GH-P384A/pACYC184sgrTec3HA, D = JKA12/pRR48GH-P384R/pACYC184sgrTec3HA, E = JKA12/pRR48GH-G385A/pACYC184sgrTec3HA, F = JKA12/pRR48GH-R386A/pACYC184sgrTec3HA, G = JKA12/pRR48GH-E387A/pACYC184sgrTec3HA, H = JKA12/pRR48GH-D388A/pACYC184sgrTec3HA, I = JKA12/pRR48GH/pACYC184sgrTec3HA. Gezeigt ist ein Westernblot zum „Crosslinking“ von SgrTec3HA und verschiedenen EIICB^{Glc}-His-Mutanten. Die Membran wurde mit den primären Antikörpern Anti-Penta-His und Anti-HA sowie entsprechenden sekundären Antikörpern behandelt. Die EIICB^{Glc}-His Bande ist zwischen 37 kDa und 50 kDa zu erkennen, die SgrTec3HA Bande liegt zwischen 10 kDa und 15 kDa.

Die Abbildung zeigt, dass nicht alle Mutationen einen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} haben. So ist die Wechselwirkung nicht beeinflusst durch die Mutationen K382A und D388A. Alle anderen Mutationen zeigen eine deutlich verminderte Wechselwirkung der beiden Proteine. Lediglich die Mutation P384R ist in der Lage die Wechselwirkung vollständig zu unterbinden. Dieser Versuch bestätigt die Annahme erneut, dass es sich bei dem KTPGRED-Motiv im Linker des EIICB^{Glc} um ein wichtiges Motiv für die Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} handelt. Dabei scheinen besonders die Aminosäuren T383, P384, G385, R386 und E387 im Linker wichtig zu sein, K382 und D388 sind dagegen vermutlich nicht oder kaum an der Wechselwirkung beteiligt.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass eine Wechselwirkung zwischen SgrTec und dem unphosphorylierten EIICB^{Glc} auf Proteinebene stattfindet. Als wichtige Domäne für die Wechselwirkung konnte der hoch konservierte Linker zwischen EIIC^{Glc} und EIIB^{Glc} identifiziert werden. Dabei konnte die Region, welche für die Wechselwirkung von EIICB^{Glc} und SgrTec verantwortlich ist, auf die Aminosäuren T383, P384, G385, R386 und E387 beschränkt werden. Dem konservierten Motiv im Linker konnte damit zum ersten Mal eine Funktion im Bezug auf den Glukose-Stoffwechsel zugeordnet werden, nämlich die Bindung des SgrTec unter Glukose-6-Phosphatstressbedingungen und den damit verbundenen Schutz der Zelle vor einer weiteren Anhäufung von Glukose-6-Phosphat.

Auf Seiten des EIICB^{Glc} konnten so essentielle Aminosäuren für die Wechselwirkung beider Proteine identifiziert werden. In einem weiteren Kapitel sollten auch essentielle Aminosäuren auf Seiten des SgrT identifiziert werden.

5.1.6 Essentielle Aminosäuren für die Interaktion mit EIICB^{Glc} auf Seiten des SgrT

Eine Sequenzanalyse von homologen Proteinen zu SgrT in verwandten Organismen von *E.coli* zeigt eine Anzahl konservierter Aminosäuren (s. Einleitung, Alignment in Abbildung 1.7). Durch

gezielte Mutationen konservierter Aminosäuren sollten essentielle Aminosäuren für die Wechselwirkung zwischen SgrTec und EIICB^{Glc} identifiziert werden. Zur Isolation der essentiellen Aminosäuren für die Bindung an EIICB^{Glc} wurden einige der konservierten Aminosäuren mutiert. Dafür wurden in das SgrTec durch eine PCR die folgenden Austausche im Plasmid pTM30sgrTec eingeführt Q3E, F4Y, W36T, Y8S und Y8A. Anschließend wurden die Vektoren in einen Δ sgrRST-Stammhintergrund (JKA1) transformiert und in einer Wachstumskurve in Minimalmedium mit Glukose eingesetzt. Die Wachstumskurve ist in Abbildung 5.51 gezeigt.

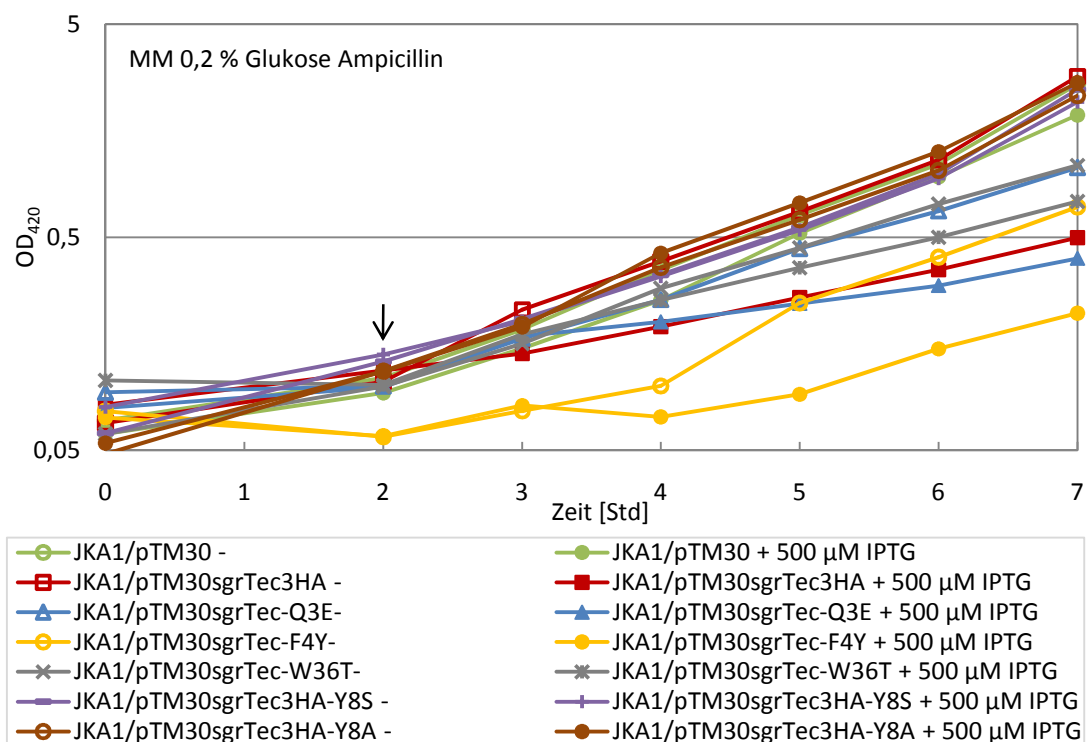


Abbildung 5.51: Wachstumsanalyse von JKA1 mit verschiedenen SgrT-Mutanten

Die dargestellte Wachstumskurve zeigt, dass eine Überproduktion von SgrTec3HA keine Repression des Wachstums von LJ110 in Minimalmedium mit 0,2% Glukose zeigt. Als Kontrolle ist ein Wildtypstamm LJ110 mit pTM30 bzw. pTM30sgrTec3HA gezeigt. Die Zugabe von 500 µM IPTG erfolgte bei gekennzeichneten Kulturen bei einer OD₄₂₀ = 0,1 (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: JKA1/pTM30- = 1,20; JKA1/pTM30+ = 1,19; JKA1/pTM30sgrTec3HA- = 1,16; JKA1/pTM30sgrTec3HA+ = 2,54; JKA1/pTM30sgrTec-Q3E- = 1,47; JKA1/pTM30sgrTec-Q3E+ = 2,53; JKA1/pTM30sgrTec-F4Y- = 1,43; JKA1/pTM30sgrTec-F4Y+ = 2,94; JKA1/pTM30sgrTec-W36T- = 1,41; JKA1/pTM30sgrTec-W36T+ = 1,74; JKA1/pTM30sgrTec3HA-Y8S- = 1,37; JKA1/pTM30sgrTec3HA-Y8S+ = 1,46; JKA1/pTM30sgrTec3HA-Y8A- = 1,28; JKA1/pTM30sgrTec3HA-Y8A+ = 1,17.

Die Abbildung zeigt, dass die meisten SgrT-Mutanten das Wachstum weiterhin reprimieren. Dabei tritt eine unterschiedlich stark ausgeprägte Repression des Wachstums auf, die jedoch keine weitere Aussage über die Funktion der jeweiligen Aminosäure bei der Wechselwirkung mit EIICB^{Glc} zulässt. Keine Repression des Wachstums findet dagegen bei den Mutationen Y8S und Y8A statt. Diese Aminosäure ist Teil eines Motivs von polaren und aromatischen Aminosäuren und wurde schon von Vanderpool et al. als mögliche wichtige Aminosäure identifiziert (Horler und Vanderpool, 2009). Die Überprüfung von SgrTec-Y8A/S-3HA im Westernblot zeigte eine verminderte Expression der beiden Proteine im Vergleich zum Wildtyp SgrTec, sodass nicht

ausgeschlossen werden kann, dass die beiden Proteine auf Grund fehlender Stabilität und Expression einen veränderten Phänotyp der Zellen in Wachstumsanalysen zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Aminosäure Y8 im SgrTec kann daher entweder eine Rolle in der Wechselwirkung mit EII^{Glc} spielen oder aber eine wichtige Funktion in der Struktur und Stabilität des SgrTec übernehmen, ohne direkt an der Wechselwirkung der beiden Proteine beteiligt zu sein. Weitere Untersuchungen sind für die endgültige Klärung dieser Frage notwendig, konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter ausgeführt werden.

5.1.7 Untersuchungen zur Auswirkung einer *sgrRST*-Deletion auf den „Overflow“-Metabolismus

Das Bakterium *Escherichia coli* ist auf Grund seines schnellen Wachstums und seiner einfachen Kultivierung ein häufig angewandter Organismus für die Produktion von heterologen und rekombinanten Proteinen in Fermentationsprozessen. Bei der Maximierung der Produktivität stellt der so genannte „Overflow“-Metabolismus, d.h. die Bildung und Akkumulation unerwünschter Nebenprodukte wie Acetat, ein großes Problem dar. Beim schnellen aeroben Wachstum auf Glukose kann es durch eine zu hohe Glukoseaufnahme zu einer Einschränkung des Wachstums und der Proteinproduktion durch „Overflow“-Metabolismus kommen. Im Rahmen des FORSYS-Partner Projekts „Dynamics and regulation of the metabolic balance in *Escherichia coli*“, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie sich eine *sgrRST*-Deletion auf den „Overflow“-Metabolismus von *E.coli* auswirkt. Als Regulationssystem des Glukose-PTS könnte das SgrRST-System eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Balance spielen.

Beim Glukose-PTS handelt es sich um eines der wichtigsten Regulationssysteme in *E.coli*. Es reguliert nicht nur die Kohlenstoffaufnahme in die Zelle, sondern ist zugleich an einer ganzen Reihe weiterer Regulationen beteiligt, die den Metabolismus der gesamten Zelle betreffen. Da das SgrRST-System wiederum einen starken Einfluss auf das Glukose-PTS hat, sollte in zwei Versuchen u.a. die Auswirkung einer *sgrRST*-Deletion auf das Wachstum sowie die Glukoseaufnahme und die Acetatproduktion im Vergleich zu einem Wildtypstamm untersucht werden. Dabei wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Katja Bettenbrock vom Max Planck Institut Magdeburg sowohl das Verhalten in einer Batch-Kultur im Schüttelkolben untersucht als auch in einer kontinuierlichen Kultur im Fermenter.

5.1.7.1 Analysen von Batch-Kulturen

Zunächst sollten die beiden Stämme LJ110 und JKA1 (LJ110 Δ *sgrRST*) in Batch-Kulturen, d.h. in einer „normalen“ Wachstumskurve, bezüglich ihres Wachstumsverhaltens und der Acetatproduktion untersucht werden. Dafür wurden die Kulturen in Schüttelkolben in Minimalmedium mit einer limitierten Menge Glukose (0,2 %) angezogen. Neben der Wachstumsbestimmung durch OD₄₂₀ Messung wurden auch die extrazelluläre Glukose- und Acetatkonzentration im Medium bestimmt. Durch diese Messung sollte sich herausstellen, ob das Fehlen des regulierenden SgrRST-Systems in JKA1 unter normalen Bedingungen (ohne Glukosestress) einen Einfluss auf das Wachstum sowie die Glukoseaufnahme und Acetatproduktion hat. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 5.52 dargestellt.

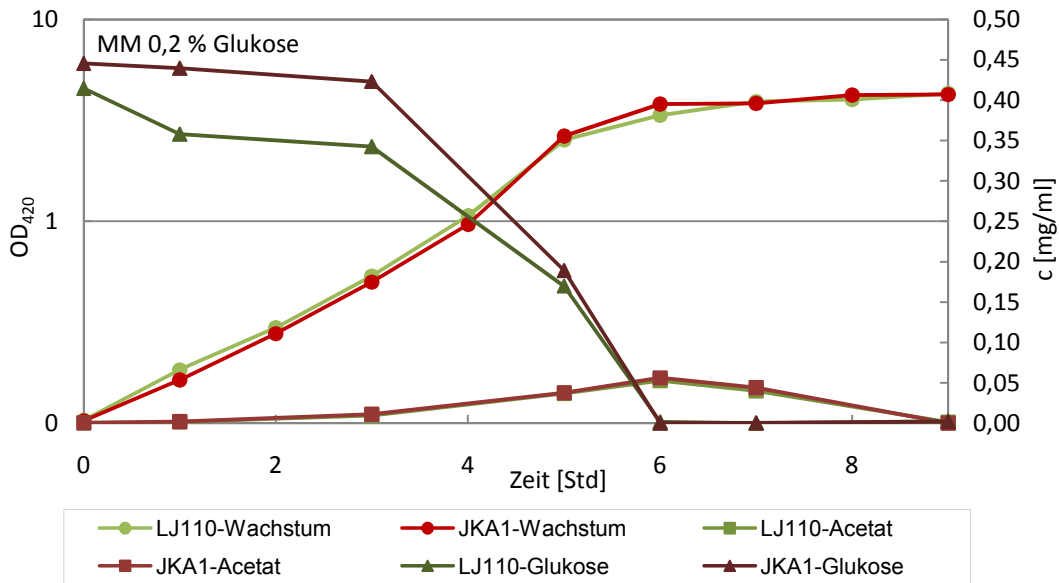


Abbildung 5.52: Analyse des Wachstums sowie der Glukoseaufnahme und Acetatproduktion von LJ110 und JKA1 in einer Batch-Kultur

Gezeigt ist ein Diagramm zum Wachstum von LJ110 und JKA1 in Minimalmedium mit 0,2% Glukose im Schüttelkolben. Zusätzlich ist die Glukoseaufnahme der Zellen anhand einer Messung der extrazellulären Glukosekonzentration gezeigt sowie die Acetat-Produktion der Zellen. Beide Stämme zeigen ein identisches Verhalten. Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 9 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (linke Y-Achse). Generationszeiten [Std]: LJ110 = 1,19; JKA1 = 1,24. Die Bestimmung der Glukose- und Acetatkonzentration erfolgte mit den entsprechenden Kits von r-Biopharm zu ausgewählten Zeitpunkten (rechte Y-Achse).

Die Abbildung zeigt, dass keine Unterschiede zwischen den beiden Stämmen zu beobachten sind, weder im Wachstum noch in der Glukoseaufnahme oder der Acetatproduktion. Während der logarithmischen Wachstumsphase wird die Glukose von den Zellen vollständig verbraucht. Nach 3 Stunden fangen sie bereits an, Acetat zu produzieren, welches sie nach Verbrauch der Glukose wieder als C-Quelle nutzen können und aufnehmen (6 Stunden). Wenn beide C-Quellen verbraucht sind (8 Stunden) gehen die Zellen in die stationäre Phase über und zeigen kein weiteres Wachstum.

In einem nächsten Versuch sollte gezeigt werden, ob die Zugabe von Glukose-6-Phosphat eine Veränderung im Verhalten der Stämme hervorrufen kann. Glukose-6-Phosphat ist eine sehr gute Kohlenstoffquelle für *E.coli*, da sie bereits phosphoryliert und damit sehr energiereich ist. Die Aufnahme von Glukose-6-Phosphat wird durch das Transportprotein UhpT (Gen *uhpT*) katalysiert (Sonna et al., 1988). In einer Diauxie von Glukose und Glukose-6-Phosphat konnte gezeigt werden, dass *E.coli* in diesem Fall zunächst Glukose-6-Phosphat aufnimmt und nicht, wie sonst üblich, zuerst die Glukose (Bettenbrock, unveröffentlichte Daten). Eine Möglichkeit wäre die Hemmung der Transportaktivität von EIICB^{Glc} durch SgrT und der Abbau der *ptsG*-mRNA durch *sgrS*. Intrazelluläres Glukose-6-Phosphat ist als Auslöser der Aktivierung des SgrRST-Systems, d.h. des Transkriptionsaktivators SgrR, bekannt (Vanderpool und Gottesman, 2007). In einem Δ *sgrRST*-Stamm sollte diese Regulation nicht mehr stattfinden, sodass das Wachstum des Stammes durch Anhäufung intrazellulären Glukose-6-Phosphats durch gleichzeitige Aufnahme von Glukose und Glukose-6-Phosphat gehemmt werden müsste. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde in einem

zweiten Versuch eine Wachstumskurve von LJ110 und JKA1 in Minimalmedium mit Glukose und Glukose-6-Phosphat durchgeführt.

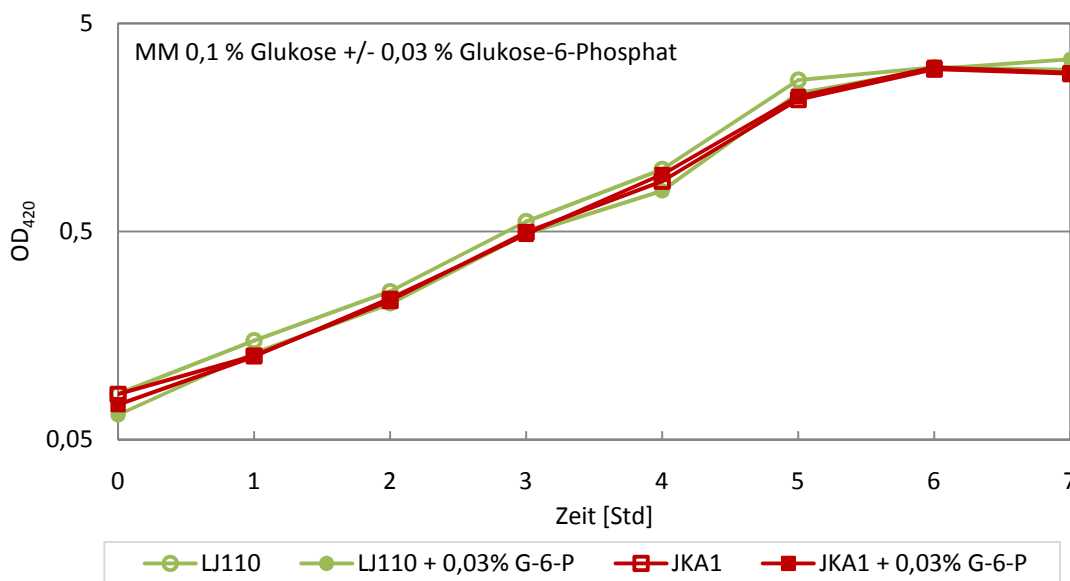


Abbildung 5.53: Analyse des Wachstums von LJ110 und JKA1 in einer Batch-Kultur mit Glukose und Glukose-6-Phosphat

Gezeigt ist ein Diagramm zum Wachstum von LJ110 und JKA1 in Minimalmedium mit 0,1 % Glukose und 0,03 % Glukose-6-Phosphat im Schüttelkolben. Beide Stämme zeigen ein identisches Verhalten. Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: LJ110- = 1,11; LJ110+ = 1,12; JKA1- = 1,18; JKA1+ = 1,09.

Dafür wurden die Stämme wiederum in Batch-Kulturen im Schüttelkolben angezogen, in diesem Fall jedoch mit 0,1 % Glukose und 0,03 % Glukose-6-Phosphat. Auch hier lies sich kein Unterschied im Wachstum zwischen den beiden Kulturen feststellen (s. Abbildung 5.53), weshalb auf eine Messung der Glukose und des Acetats verzichtet wurde. In seltenen Fällen wurde eine leicht verlängerte Lag-Phase von JKA1 im Gegensatz zu LJ110 beobachtet, was zu einem leicht verzögerten Wachstum der Kultur führte. Dieses Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse aus der Batch-Kultur konnten die Annahme, dass bei JKA1 ein verschlechtertes Wachstum in Minimalmedium mit Glukose und Glukose-6-Phosphat auftritt zunächst nicht bestätigen. Die Beobachtung eines leicht verzögerten Wachstums konnte nicht reproduzierbar wiederholt werden.

5.1.7.2 Analysen von kontinuierlichen Kulturen im Fermenter mit Glukose-6-Phosphat Puls

In einem weiteren Versuch sollte das Verhalten der beiden Stämme in einer kontinuierlichen Kultur im Fermenter analysiert werden. Hier findet eine kontinuierliche Zufütterung von Glukose statt (Endkonzentration 20 mM), sodass die Zellen auf eine Wachstumsrate von $\mu = 0,2$ eingestellt werden können. Nach Einstellung der kontinuierlichen Phase wurde den Zellen ein Glukose-6-Phosphat Puls (20 mM) gegeben. Wie zuvor wurde auch bei diesen Kulturen Wachstum, Glukose- und Acetatkonzentration bestimmt. Zudem wurden die mRNA-Level von *ptsG* und *manX* in einer RT-PCR ermittelt und die cAMP-Konzentration während des Glukose-6-Phosphatpulses. Da die Anzucht der Kulturen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. K. Bettenbrock im MPI in

Magdeburg erfolgte, wird hier auf eine detaillierte Beschreibung des Protokolls von Fermentationsversuchen verzichtet. Das Ergebnis der Bestimmung des Wachstums ist in der Abbildung 5.54 dargestellt.

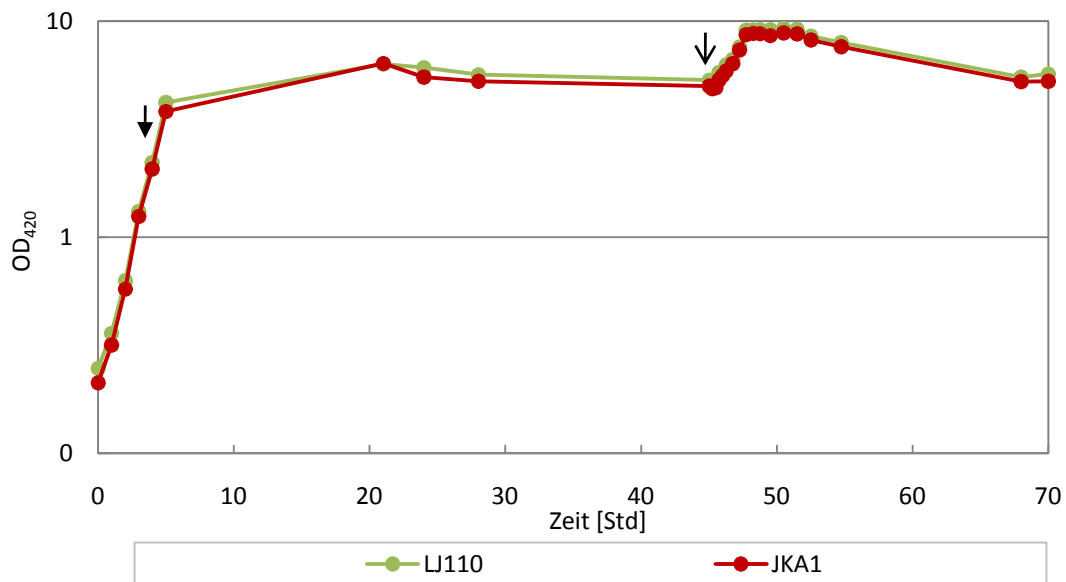


Abbildung 5.54: Analyse des Wachstums von LJ110 und JKA1 in einer kontinuierlichen Kultur im Fermenter

Gezeigt ist ein Diagramm zum Wachstum von LJ110 und JKA1 in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose im Fermenter. Nach 4 Stunden wurde die Kultur auf eine kontinuierliche Kultur umgestellt mit einer Wachstumsrate von 0,2 (geschlossener Pfeil). Nach 45,25 Stunden wurde ein Glukose-6-Phosphat Puls gegeben (offener Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 9 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen.

Die Wachstumsbestimmung zeigt, dass die beiden Stämme ein identisches Wachstumsverhalten zeigen. Auch nach dem Glukose-6-Phosphat Puls lässt sich kein Unterschied erkennen, obwohl eine Repression des Wachstums von JKA1 auf Grund der fehlenden Regulation durch das SgrRST-System zu erwarten gewesen wäre.

Direkt vor und nach dem Glukose-6-Phosphat Puls wurden wiederum die Glukose und Glukose-6-Phosphatkonzentration des Mediums sowie die produzierte Acetatmenge der beiden Kulturen bestimmt. Ein Ausschnitt der Zeitspanne der Stunden 45 bis 49 ist in Abbildung 5.55 gezeigt. Es wird auch hier deutlich, dass die beiden Stämme keinerlei Unterschied in ihrem Verhalten zeigen. Sowohl die Glukose- bzw. Glukose-6-Phosphataufnahme als auch die Acetatproduktion sind identisch. Zusätzlich wurde die cAMP-Konzentration zu diesem Zeitpunkt bestimmt, die jedoch ebenfalls keine Unterschiede in den beiden Kulturen zeigt (Daten nicht gezeigt).

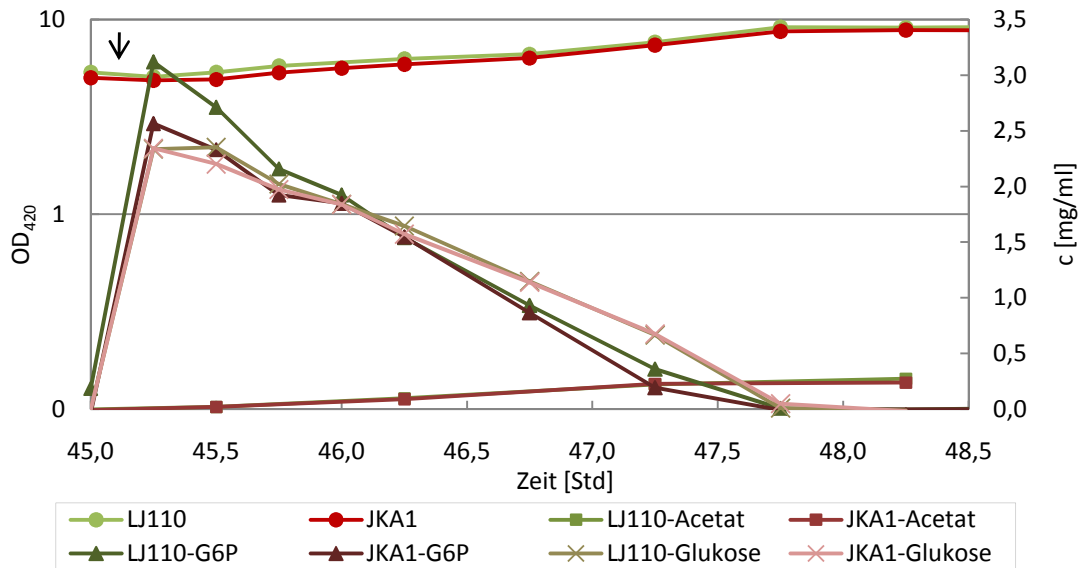


Abbildung 5.55: Analyse des Wachstums sowie der Glukoseaufnahme und Acetatproduktion von LJ110 und JKA1 in einer kontinuierlichen Kultur im Fermenter

Gezeigt ist ein Ausschnitt der Zeitspanne von Stunde 45 bis 49 zum Wachstum von LJ110 und JKA1 in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose im Fermenter. Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 9 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (linke Y-Achse). Zusätzlich ist die Glukose- und Glukose-6-Phosphataufnahme der Zellen anhand einer Messung der extrazellulären Konzentrationen gezeigt, sowie die Acetat-Produktion der Zellen. Die Bestimmung der Glukose- und Acetatkonzentration erfolgte mit den entsprechenden Kits von r-Biopharm zu ausgewählten Zeitpunkten (rechte Y-Achse). Beide Stämme zeigen ein identisches Verhalten.

Obwohl zwischen den beiden Stämmen keine Unterschiede festgestellt werden konnten, wurden die mRNA-Level von *ptsG* und *manX* mit Hilfe der RT-PCR bestimmt. Sie sollten einen Aufschluss über die Regulation der beiden Gene auf Grund des Glukose-6-Phosphatstress geben und einen möglichen Unterschied in der Regulation durch das fehlende SgrRST-System aufzeigen. Die relativen mRNA-Werte (Auswertung erfolgte mit dem Programm „qbase“ von Biogazelle) sind in Abbildung 5.56 gezeigt.

Das Diagramm zeigt, dass die Regulation der mRNA-Menge von *ptsG* und *manX* in LJ110 und JKA1 annähernd gleich ist. Direkt nach dem Glukose-6-Phosphatpuls fällt die mRNA-Menge der beiden Gene ab, die Zellen reagieren sofort auf die zusätzliche Kohlenhydratquelle, indem sie die Aufnahme der Glukose durch eine Reduzierung der Transportproteine hemmen. Dabei scheint das SgrRST-System keinen Einfluss zu haben, da keine Unterschiede zwischen LJ110 und JKA1 auftreten. Nachdem das Glukose-6-Phosphat vollständig aufgebraucht ist, steigt die mRNA-Menge beider Gene wieder mindestens auf die Ausgangsmenge an und die Zellen nehmen vermutlich wieder Glukose zum Wachstum auf.

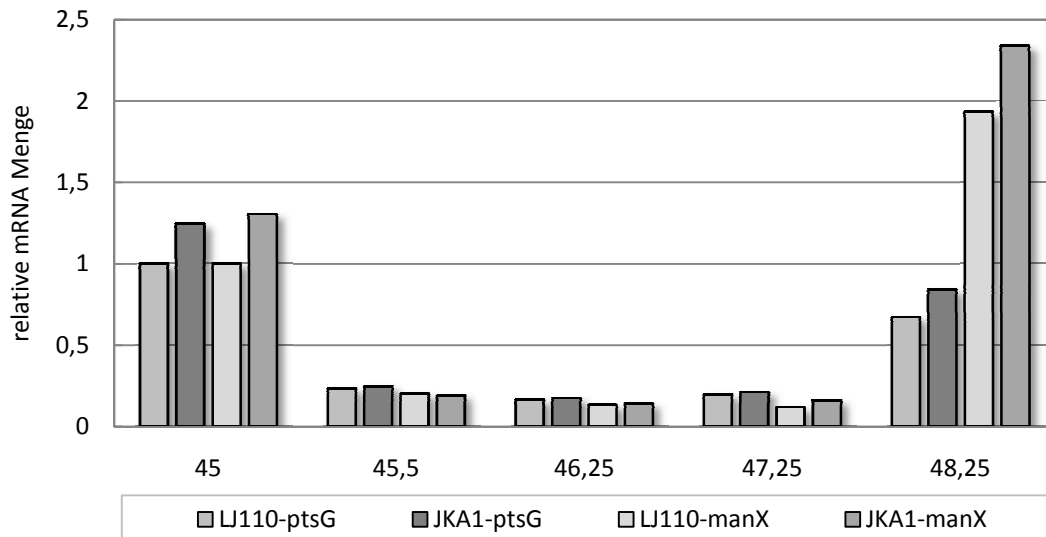


Abbildung 5.56: Relative *ptsG*- und *manX*-mRNA Menge in LJ110 und JKA1 Kulturen bei der Anzucht im Fermenter vor und nach einem Glukose-6-Phosphat Puls

Gezeigt ist ein Balkendiagramm mit den relativen *ptsG*- und *manX*-mRNA Mengen zu ausgewählten Zeitpunkten während der Anzucht im Fermenter. Die Auswertung erfolgte mit dem Program „qbase“ von Biogazelle. Es erfolgte eine Normierung der Werte auf die jeweiligen Werte von LJ110 zum Zeitpunkt 45. Der Zeitpunkt 45 liegt vor dem Glukose-6-Phosphat Puls, alle anderen nach dem Puls. Es ist eine deutliche Abnahme der relativen mRNA-Menge nach dem Glukose-6-Phosphatpuls in beiden Stämmen zu sehen, die erst nach Verbrauch des Glukose-6-Phosphats wieder ansteigt.

Die hier gezeigten Versuche machen deutlich, dass das SgrRST-System scheinbar keinerlei Einfluss auf den „Overflow“-Metabolismus von *E.coli* hat. Eine Deletion des *sgrRST*-Genbereiches zeigt keinen Unterschied zu einem Wildtypstamm im Bezug auf die Reaktion auf Glukose-6-Phosphatstress. Dabei ist weder ein Unterschied im Wachstum noch in der Glukose- bzw. Glukose-6-Phosphataufnahme oder der cAMP- und Acetatproduktion zu sehen. Bei den hier gezeigten Versuchen handelt es sich allerdings um einmalig durchgeführte Versuche, die möglicherweise einer Optimierung der Bedingungen bedürfen. Zum Beispiel sollte zur Verifizierung der hier gezeigten Ergebnisse der Glukose-6-Phosphatpuls in der kontinuierlichen Fermenterkultur erhöht werden, um eine veränderte Reaktion von JKA1 endgültig ausschließen zu können. Auch ein Glukose-Puls bei Wachstum in einem alternativen Medium (z.B. Minimalmedium mit Glyzerin) wäre interessant zu untersuchen. Um abschließende Aussagen treffen zu können, sollte daher zunächst eine Optimierung der Versuche stattfinden, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr erbracht werden konnte.

5.2 Stammkonstruktion zur Untersuchung des Expressionslevels von chromosomal kodiertem EIICB^{Glc}-His

In einem zweiten Projekt dieser Arbeit sollten zwei neue Stämme konstruiert werden, die ein chromosomal kodiertes EIICB^{Glc}-His aufweisen. Die Expression des EIICB^{Glc}-His sollte dabei in einem Stamm unter Kontrolle des natürlichen *ptsG_{PO}* bleiben und in einem zweiten Stamm durch die Verwendung eines *tac_{PO}* IPTG induzierbar werden. Ein solches System würde nicht nur die Kontrolle der Expression von EIICB^{Glc} unter verschiedenen Bedingungen ermöglichen, sondern könnte auch eine alternative und artifizielle Regulationsmöglichkeit des Glukose-PTS in biotechnologischen Produktionsprozessen darstellen.

5.2.1 Konstruktion von Stämmen mit chromosomal kodiertem EIICB^{Glc}-His

Zunächst wurden zwei neue Stämme konstruiert, deren chromosomale EIICB^{Glc} Expression durch Antikörper nachweisbar sein sollte, um das jeweilige Expressionslevel genauer überprüfen und analysieren zu können. Dafür wurden die chromosomal kodierten Proteine mit einem zusätzlichen „His-Tag“ versehen. Zudem wurde in einem Stamm die Expression des EIICB^{Glc}-His unter die Kontrolle des *tac*-Promotor-Operators gestellt, um eine regulierbare, vom Medium unabhängige und IPTG-induzierbare Expression des Proteins zu ermöglichen.

Durch die Expression eines mit einem „His-Tag“ versehenen EIICB^{Glc} ist das Expressionslevel des Proteins bestimmbar. Dadurch ließen sich die Expressionslevel von EIICB^{Glc} unter verschiedenen Bedingungen direkt untersuchen und der Einfluss von EIICB^{Glc} auf den gesamten Metabolismus der Zelle bestimmen. Die Verwendung eines *tac_{PO}* ermöglicht zudem die gezielte Einstellung des Expressionslevels auf ein gewünschtes Niveau, unabhängig von den gewählten Bedingungen. Dies könnte ein alternatives Regulationssystem für das Glukose-PTS darstellen und so Anwendung in biotechnologischen Verfahren finden, in denen die Regulation des Glukose-Metabolismus eine wichtige Rolle spielt (z.B. Vermeidung von „Overflow“-Metabolismus). Die Vorteile von chromosomal kodierten Proteinen gegenüber plasmidkodierten liegen nicht nur im möglichen Verzicht auf Antibiotika, sondern auch in der Stabilität des Geno- und Phänotyps sowie in der kontrollierbaren Kopienanzahl des gewünschten Gens, welches sich auf eins beschränkt. Dies ermöglicht eine Vielzahl von Analysen, welche mit plasmidkodierten Systemen nur schwer oder unzureichend durchzuführen sind. Die Konstruktion der Stämme und eine erste Charakterisierung der Phänotypen sind in den nächsten Kapiteln dargestellt.

5.2.1.1 Stammkonstruktion von JKA4

Zur Konstruktion eines Stammes mit chromosomalem *ptsGHis*-Gen anstelle des eigentlichen *ptsG* wurde die von Wanner et al. beschriebene Methode zur Inaktivierung von chromosomalen Genen mit Hilfe von PCR-Produkten verwendet (Datsenko und Wanner, 2000). Bei dieser Methode werden PCR-Produkte konstruiert, welche an den beiden Seiten jeweils zum Chromosom homologe Sequenzen haben. Durch ein plasmidkodiertes Lambda-red-System werden die PCR-Produkte über homologe Rekombination an den entsprechenden Stellen ins Chromosom eingefügt und ersetzen so das ursprüngliche Gen an dieser Stelle.

Um ein *ptsGHis*-Gen anstelle des eigentlichen *ptsG* ins Chromosom einfügen zu können, musste also ein PCR-Produkt hergestellt werden, welches nicht nur das *ptsGHis* Gen trug, sondern

auch homologe Enden zum Chromosom am *ptsG*-Genort sowie einen Resistenzmarker zur Überprüfung des Stammes und anschließender P1-Transduktion in einen anderen Stammhintergrund.

Dafür wurde zunächst ein Plasmid konstruiert, welches das *ptsGHis*-Gen, eine Kanamycin-Resistenzkassette und einen Abschnitt des direkt hinter dem *ptsG* kodierten *fhuE*-Gens trägt. Das Plasmid, pHex3ptsGHis-neo-fhuE, wurde durch Sequenzüberprüfung und geeignete Kontrollrestriktionen auf Richtigkeit überprüft und dann als Template für eine PCR verwendet. Die PCR wurde mit den Primern ptsG+ und CR-XhoI- durchgeführt, sodass ein lineares PCR-Produkt mit den oben genannten Genen entstand. Für die homologe Rekombination wurde das im Methodenteil beschriebene Protokoll verwendet (s. Kapitel 4.2.3) und das PCR-Produkt in den Stamm BW25113/pKD46 transformiert. Auf dem Plasmid pKD46 ist das Lambda-red-System kodiert, welches die homologe Rekombination in *E.coli* ermöglicht. Der Stamm BW25113 ist dafür konzipiert, lineare PCR-Fragmente für eine Zeit zu halten, ohne deren sofortigen Abbau zu erzwingen. Das Schema der homologen Rekombination ist in Abbildung 5.57 dargestellt.

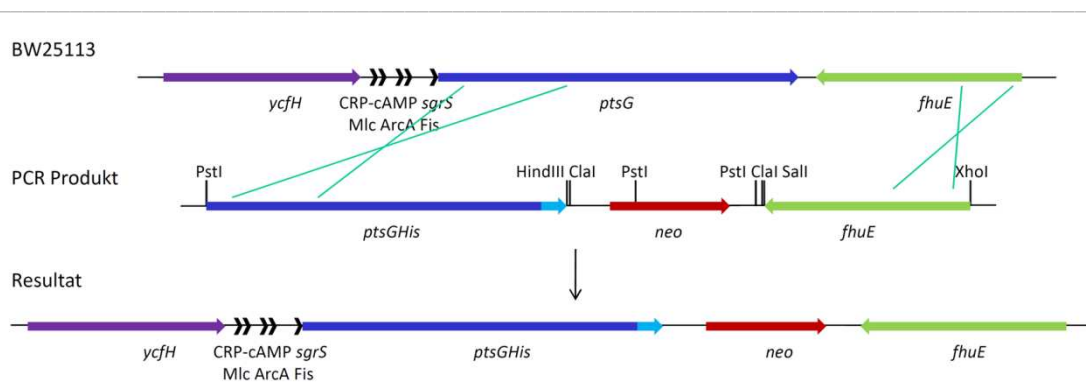


Abbildung 5.57: Schema zur Stammkonstruktion von BW25113ptsGHisKan

Dargestellt ist ein Schema zur Stammkonstruktion von BW25113ptsGHisKan durch homologe Rekombination eines PCR-Produktes in den Stamm BW25113. Gezeigt sind der Ausgangsstamm BW25113 in den der Genabschnitt eingefügt wurde (oben), das PCR-Produkt, welches für die homologe Rekombination verwendet wurde (mitte) und der resultierende Genabschnitt im neuen Stamm BW25113ptsGHisKan (unten). Zusätzlich ist der *ptsG_{PO}*-Bereich gekennzeichnet (schwarze Pfeile) mit den vorrangigen Regulatoren sowie die wichtigsten Restriktionsenzyme des PCR-Produktes, die bei der Klonierung von pHex3ptsGHis-neo-fhuE verwendet wurden.

Der resultierende Stamm trägt nun neben der *ptsGHis* Sequenz auch eine Kanamycin-Resistenzkassette, wodurch eine Selektion auf kanamycinresistente Kolonien nach der Transformation des PCR-Produktes erfolgen kann. Durch einen anschließenden Markertest und verschiedene Kontroll-PCRs ließ sich der Genotyp des Stammes zusätzlich überprüfen.

Da alle bisherigen Versuche im Rahmen dieser Arbeit im LJ110 Stammhintergrund durchgeführt wurden, sollte auch hier dieser Stamm verwendet werden. Aus diesem Grund erfolgte direkt im Anschluss an die homologe Rekombination eine P1-Transduktion des Genbereichs rund um die Kanamycin-Kassette in LJ110. Dieser neue Stamm wurde ebenfalls durch einen Markertest und eine zusätzliche Sequenzierung des Genabschnittes kontrolliert und erhielt die Bezeichnung JKA4. Des Weiteren erfolgte die P1-Transduktion in verschiedene weitere LJ110 Derivate, LJ120 (JKA5), LJ121 (JKA6), JFG2 (JKA7) und LJ110Δ*dgsA* (JKA8).

5.2.1.2 Überprüfung der EIICB^{Glc}-His Expression und Wachstumsanalysen von JKA4

Der „His-Tag“ des chromosomal kodierten Proteins EIICB^{Glc} ermöglicht die Bestimmung der Expressionsmenge unter verschiedenen Bedingungen. Da das Gen unter der Kontrolle des *ptsG*-Promotor-Operator-Bereiches steht, ist eine glukoseabhängige Expression zu erwarten. Um diese Aussage zu überprüfen, wurde JKA4 in Minimalmedium mit Glycerin bzw. Glukose angezogen, geerntet und für einen Westernblot vorbereitet. Die Detektion des Signals erfolgte mit Anti-Penta-His Antikörpern und entsprechenden Zweitantikörpern. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.58 (A und B) dargestellt.

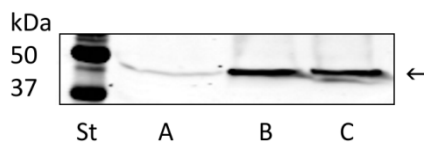


Abbildung 5.58: Westernblot zur Expression von EIICB^{Glc}-His in JKA4 in MM Glycerin und MM Glukose und Zugabe von 1 mM cAMP

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = JKA4 in Minimalmedium mit 0,2 % Glycerin, B = JKA4 in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose, C = JKA4 in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose + 1 mM cAMP. Die Anzucht der Zellen erfolgte in den angegebenen Medien bis zu einer $OD_{650} = 1$. Die Zellen wurden geerntet, mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 10 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte ein Immunoblot mit einem Anti-Penta-His Antikörper und einem sekundären Anti-Maus Antikörper.

Die Abbildung zeigt ein Signal für EIICB^{Glc}-His bei der erwarteten Größe (zwischen 37 und 50 kDa). Dabei wird deutlich, dass die Expression des Proteins durch Glukose im Medium deutlich höher ist als ohne Glukose. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Integration des Genabschnitts ins Chromosom erfolgreich war und sich das EIICB^{Glc}-His im Westernblot nachweisen lässt. Die Glukose-induzierbare Expression ist dabei erhalten geblieben. Die Abhängigkeit der EIICB^{Glc}-Expression von cAMP lässt zudem vermuten, dass die Signalintensität des EIICB^{Glc}-His durch Zugabe von cAMP weiter gesteigert werden kann. Aus diesem Grund wurden verschiedene Konzentrationen cAMP (1 mM bis 4 mM) zu den Kulturen während der Anzucht gegeben. Das Ergebnis nach Zugabe von 1 mM cAMP ist in Abbildung 5.58 (C) gezeigt.

Auch die Zugabe von bis zu 4 mM cAMP konnte die Expression des EIICB^{Glc}-His nicht sichtbar steigern. Möglicherweise ist eine Limitierung der Expression durch die Glukose im Medium schon erreicht. Diese ersten Versuche konnten zeigen, dass die Klonierung eines *ptsGHIS*-Gens ins Chromosom von LJ110 erfolgreich war. In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob dieser Stamm in Wachstumsanalysen einen Unterschied zum Wildtyp zeigt, d.h. ob die Funktionalität von EIICB^{Glc}-His gegenüber dem Wildtypprotein in einer Weise eingeschränkt oder verändert ist.

In Wachstumsanalysen wurde das Wachstum von JKA4 im Vergleich zu Wildtypstämmen untersucht. Da es sich bei dem *ptsGHIS* und der Kanamycin-Resistenzkassette in JKA4 um eine chromosomale Veränderung handelt, kann auf die Verwendung eines Antibiotikums in den Wachstumskurven verzichtet werden. Die Wachstumskurve wurde in Minimalmedium mit Glycerin bzw. Glukose durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.59 gezeigt.

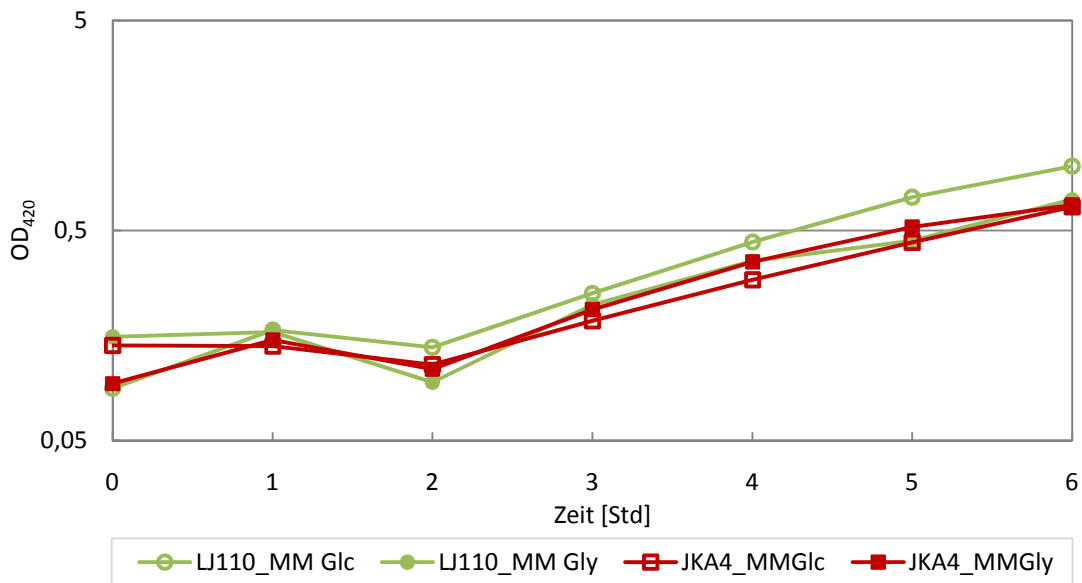


Abbildung 5.59: Wachstumsanalyse von JKA4 und LJ110 in Minimalmedium mit Glukose bzw. Glycerin

Die dargestellte Wachstumskurve zeigt das Wachstumsverhalten von LJ110 und JKA4 in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose bzw. Glycerin. Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: LJ110 MM Glc = 1,27; LJ110 MM Gly = 1,34; JKA4 MM Glc = 1,55; JKA4 MM Gly = 1,34.

LJ110 und JKA4 zeigen in Minimalmedium mit Glycerin ein identisches Wachstum, in Minimalmedium mit Glukose weist JKA4 eine minimal schlechtere Generationszeit als der Wildtyp auf. Zur genaueren Analyse des Wachstums von JKA4 gegenüber dem Wildtyp wurden Wachstumskompetitionsversuche über mehrere Tage und in direkter Konkurrenz zueinander durchgeführt. Bei diesen Analysen werden die beiden zu untersuchenden Stämme in gleichen Mengen in eine Kultur gegeben und täglich in frisches Medium überimpft. Zudem wird täglich ein Teil der Kultur abgenommen und die jeweilige Zellzahl der beiden Stämme bestimmt. Dafür ist es notwendig die beiden Stämme optisch voneinander unterscheiden zu können. In diesem Fall wurde ein Sucrose⁺-Stamm als Wildtypkontrolle verwendet. Normalerweise zeigt *E.coli* K-12 einen Sucrose-negativen Phänotyp, durch das Einbringen der *csc*-Gene kann jedoch ein Sucrose-positiver Phänotyp hervorgerufen werden. Der hierfür verwendete Stamm war LJ200 (LJ110 *csc*⁺ *cscB1 csc3*⁺). Dabei haben die *csc*-Gene keinerlei Einfluss auf das Wachstum des Stammes in Vollmedium oder Minimalmedium mit Glukose oder Glycerin. JKA4 und LJ200 wurden in den drei Medien zu gleichen Teilen (je 50 %) angeimpft und aus diesen Kulturen täglich in frisches Medium überimpft. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Kolonieauszählung auf McC Scr Platten, wobei weiße Kolonien JKA4 repräsentierten, rote Kolonien LJ200. Nach der Auszählung wurde der Anteil von JKA4 an der Gesamtzellzahl bestimmt und graphisch aufgetragen (s. Abbildung 5.60).

JKA4 zeigt einen leichten Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp bei Wachstum in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose. Nach 8 Tagen sind nur noch etwa 5 % aller Zellen JKA4. Dagegen bleibt der Anteil von JKA4 in Minimalmedium mit Glycerin und in Vollmedium bei etwa 50 %, hier liegt also kein Unterschied im Wachstum zwischen JKA4 und LJ200 vor. Der unerwartete Wachstumsnachteil von JKA4 soll in den nächsten Versuchen genauer analysiert werden. Dafür erfolgte zunächst eine erneute Überprüfung der Sequenz des neu eingebrachten *ptsG*-Gens sowie der Promotor und Operatorregion, um einen Funktionsverlust des EIICB^{Glc}-His

durch Sequenzfehler ausschließen zu können. Es konnten keine Mutationen oder Basenaustausche im gesamten Genbereich festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

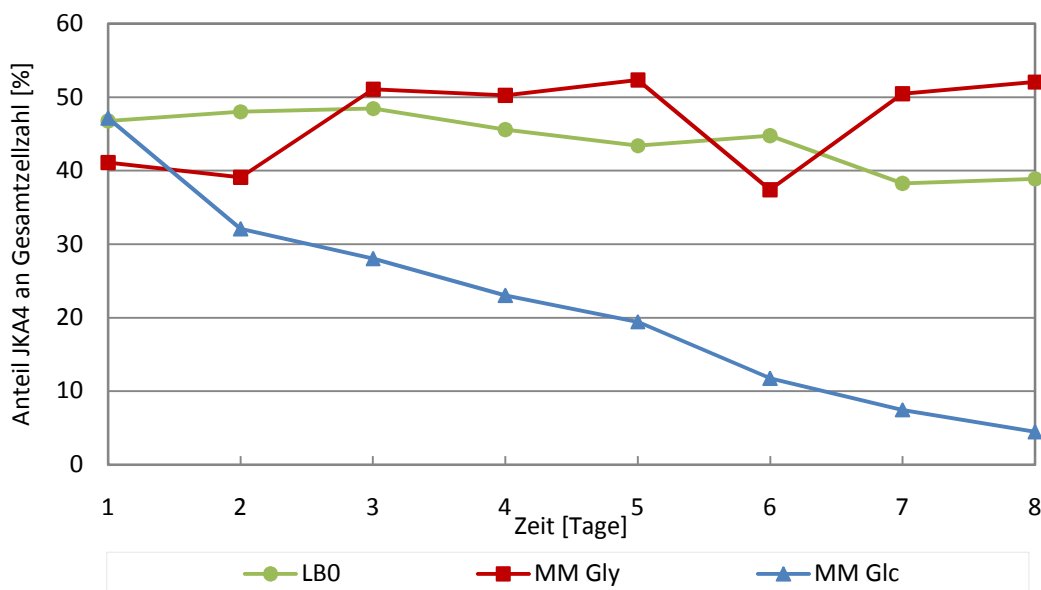


Abbildung 5.60: Wachstumscompetitionsversuch von JKA4 und LJ200

Gezeigt ist ein Diagramm zur Wachstumscompetition von JKA4 und LJ200 in verschiedenen Medien. Die Zellen wurden zu gleichen Anteilen in einer Kultur gemischt und über mehrere Tage angezogen. Zusätzlich wurde jeden Tag der Anteil der beiden Stämme bestimmt und graphisch aufgetragen. Angegeben ist der Anteil JKA4 an der Gesamtzellzahl in Prozent. In Minimalmedium mit 0,2 % Glukose zeigt JK4 einen Wachstumsnachteil gegenüber LJ200.

Neben der Sequenzierung wurde auch eine mögliche Störung der Mlc-Wechselwirkung von EIICB^{Glc}-His im Vergleich zum WT EIICB^{Glc} getestet. Durch den „His-Tag“, welcher C-terminal an der B-Domäne kodiert ist, könnte die Wechselwirkung zwischen der B-Domäne und Mlc gestört sein, sodass die B-Domäne nicht mehr in der Lage wäre Mlc zu titrieren. Unter diesen Umständen würde Mlc auch dann dauerhaft an den Operator des *ptsG* binden und dessen Proteinexpression reprimieren, wenn sich die Zelle in einer glukosereichen Umgebung befinden würde. Dies könnte ein verschlechtertes Wachstum von JKA4 gegenüber dem Wildtyp erklären. Aus diesem Grund wurde der gleiche Wachstumscompetitionsversuch mit $\Delta dgsA$ (Mlc⁻) Stämmen wiederholt (JKA8 = JKA4 $\Delta dgsA$, JKA9 = LJ200 $\Delta dgsA$).

Auch hier zeigt JKA8 einen ähnlichen Wachstumsnachteil gegenüber JKA9 in Minimalmedium mit Glukose, woraus sich schließen lässt, dass die Mlc Bindung nicht beeinflusst und nicht verantwortlich für das reduzierte Wachstum von JKA4 ist (s. Abbildung 5.61).

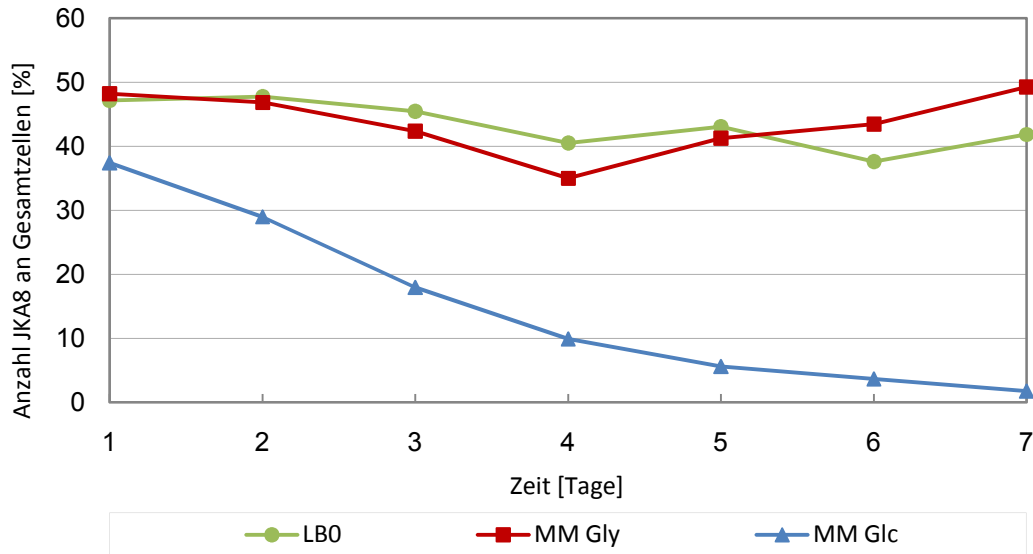


Abbildung 5.61: Wachstumscompetitionsversuch von JKA8 und JKA9

Gezeigt ist ein Diagramm zur Wachstumscompetition von JKA8 und JKA9 in verschiedenen Medien. Die Zellen wurden zu gleichen Anteilen in einer Kultur gemischt und über mehrere Tage angezogen. Zusätzlich wurde jeden Tag der Anteil der beiden Stämme bestimmt und graphisch aufgetragen. Angegeben ist der Anteil JKA8 an der Gesamtzellzahl in Prozent. In Minimalmedium mit 0,2 % Glukose zeigt JK8 einen Wachstumsnachteil gegenüber JKA9.

In einer ersten Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass das *ptsGHis*-Gen erfolgreich ins Chromosom integriert werden konnte. Die Expression des $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His ist im Westernblot nachweisbar und zeigt eine glukoseabhängige Induktion. In Wachstumskurven konnte eine minimal verringerte Generationszeit von JKA4 in Minimalmedium mit Glukose im Vergleich zum Wildtypstamm gezeigt werden. In Wachstumscompetitionsversuchen bestätigte sich, dass JKA4 einen leichten Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp zeigt. Die Ursache hierfür konnte zunächst nicht genauer identifiziert werden, eine Beeinflussung der Mlc-Bindung wurde jedoch ausgeschlossen.

Parallel zur Konstruktion von JKA4 erfolgte eine zweite Stammkonstruktion mit einem chromosomal kodierten und IPTG induzierbaren $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His. Dadurch war auch eine erhöhte $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His Expression möglich, durch die der Wachstumsdefekt eventuell umgangen werden könnte.

5.2.1.3 Stammkonstruktion von JKA10 und JKA11

Die Konstruktion eines IPTG induzierbaren, chromosomal kodierten $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His erfolgte ähnlich der Konstruktion von JKA4. Das oben verwendete Plasmid pHex3ptsGHis-neo-fhuE wurde dafür um einen tac_{pO} vor dem *ptsGHis* und einen Teil des von *ptsG* stromaufwärts liegenden Gens *ycfH* erweitert (pHex3ycfH-tac_{pO}ptsGHis-neo-fhuE). Anschließend wurde ein PCR-Produkt des Plasmids mit den Primern ycfH_{SacI}+ und CRXhoI- hergestellt und eine homologe Rekombination im Stamm JFG2/pKD46 durchgeführt (s. Abbildung 5.62). Dieser Stamm trägt eine *ptsG*-Deletion und eine Chloramphenicol-Resistenzkassette an dessen Stelle. Durch einen Markertest ließ sich so der neue Stamm JKA10 (Kan^{R} , Cam^{S} , Tet^{R}) vom JFG2 (Kan^{S} , Cam^{R} , Tet^{R}) unterscheiden. Zusätzlich wurde JKA10 durch Sequenzierung und PCR überprüft. Im Anschluss folgte eine P1-Transduktion

in LJ130. Der resultierende Stamm wurde JKA11 genannt. Mit JKA11 wurden die nachfolgenden Versuche durchgeführt.

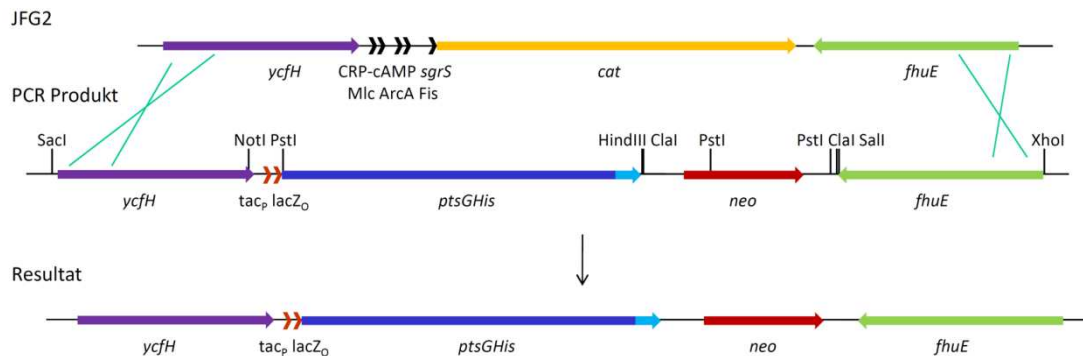


Abbildung 5.62: Schema zur Stammkonstruktion von JKA10

Dargestellt ist ein Schema zur Stammkonstruktion von JKA10 durch homologe Rekombination eines PCR-Produktes in den Stamm JFG2. Gezeigt sind der Ausgangsstamm JFG2 in den der Genabschnitt eingefügt wurde (oben), das PCR-Produkt, welches für die homologe Rekombination verwendet wurde (mitte) und der resultierende Genabschnitt im neuen Stamm JKA10 (unten). Zusätzlich ist der *ptsG_{PO}*-Bereich gekennzeichnet (schwarze Pfeile) mit den vorrangigen Regulatoren, der *tac_P*-Bereich (rote Pfeile) sowie die wichtigsten Restriktionsenzyme des PCR-Produktes, die bei der Klonierung von pHex3ycfH-tac_PptsGHis-neo-fhuE verwendet wurden.

5.2.1.4 Überprüfung der EIICB^{Glc}-His Expression und Wachstumsanalysen von JKA11

Zunächst erfolgte eine Überprüfung der Expression des EIICB^{Glc}-His in JKA11 unter der Kontrolle des *tac_P*. Dafür wurden die Zellen in Vollmedium angezogen und mit verschiedenen IPTG Konzentrationen induziert. Bei einer $OD_{650} = 1$ wurden die Zellen geerntet und im Westernblot aufgetragen. Der Nachweis der EIICB^{Glc}-His Expression erfolgte mit Anti-Penta-His und entsprechenden sekundären Antikörpern. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.63 dargestellt.

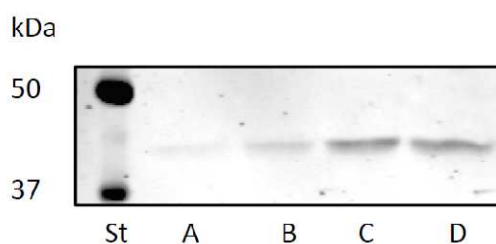


Abbildung 5.63: Westernblot zur Expression von EIICB^{Glc}-His in JKA11

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = JKA11, B = JKA11 + 10 μ M IPTG, C = JKA11 + 50 μ M IPTG, D = JKA11 + 100 μ M IPTG. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB₀ mit unterschiedlichen IPTG Konzentrationen bis zu einer $OD_{650} = 1$. Die Zellen wurden geerntet, mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 10 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte ein Immunoblot mit einem Anti-Penta-His Antikörper und einem sekundären Anti-Maus Antikörper.

Die Abbildung zeigt, dass eine IPTG induzierbare Expression des EIICB^{Glc}-His stattfindet. Ohne IPTG Zugabe ist nur eine sehr schwache Expression vorhanden, die sich mit steigender IPTG Menge bis 50 μ M erhöhen lässt. Mit 100 μ M IPTG findet keine weitere Steigerung des Signals

statt. Eine Sättigung der Expression scheint daher erreicht. Anschließend wurde eine Wachstumskurve von JKA11 im Vergleich zu einem Wildtyp (LJ110) in Minimalmedium mit Glukose oder mit Glycerin durchgeführt, um das Wachstumsverhalten zu beobachten. Dabei wurde die Kultur sowohl uninduziert als auch mit 100 μM IPTG-Zugabe angezogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.64 gezeigt.

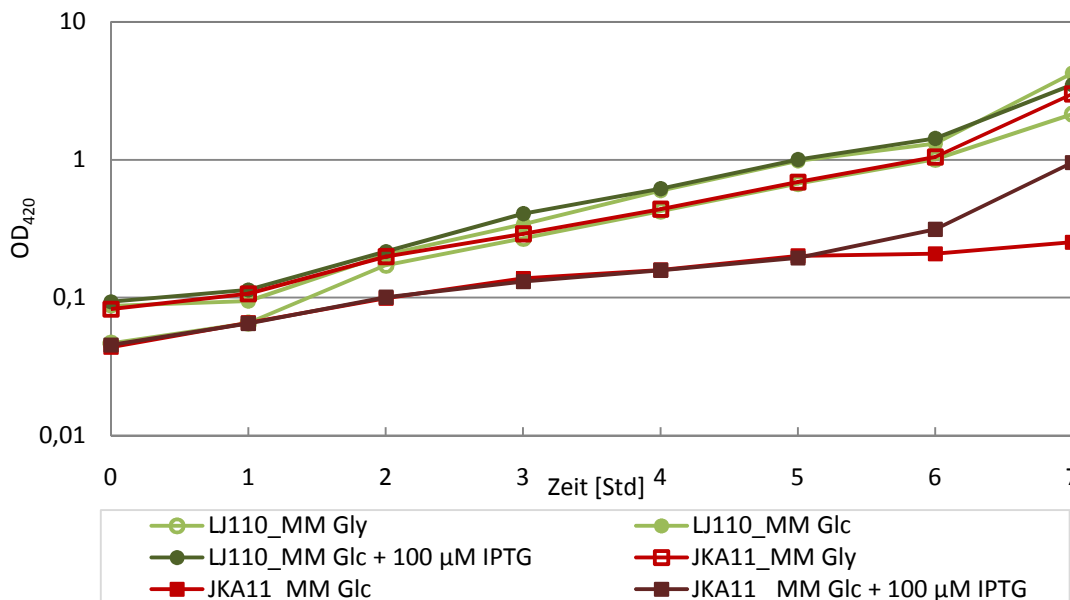


Abbildung 5.64: Wachstumsanalyse von JKA11 und LJ110 in Minimalmedium mit Glukose bzw. Glycerin

Die dargestellte Wachstumskurve zeigt das Wachstumsverhalten von LJ110 und JKA11 in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose bzw. Glycerin. JKA11 zeigt einen deutlichen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp in Minimalmedium mit Glukose. Den gekennzeichneten Kulturen wurde zu Beginn der Wachstumsanalyse 100 μM IPTG zugegeben. Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: LJ110 MM Gly = 1,52; LJ110 MM Glc- = 1,33; LJ110 MM Glc+ = 1,36; JKA11 MM Gly = 1,67; JKA11 MM Glc- = 3,73; JKA11 MM Glc+ = 2,45.

Die Wachstumskurve zeigt, dass JKA11 und LJ110 in Minimalmedium mit Glycerin die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit zeigen. In Minimalmedium mit Glukose zeigt JKA11 dagegen ein deutlich schlechteres Wachstum. Durch die Zugabe von 100 μM IPTG kann die Wachstumsrate zwar gesteigert werden, jedoch ohne die des Wildtyps zu erreichen. JKA11 scheint demnach Wachstumsdefizite zu zeigen, die in Wachstumskompetitionsanalysen noch einmal verdeutlicht werden können.

Die Wachstumskompetitionsversuche erfolgten wie zuvor beschrieben in verschiedenen Medien in Konkurrenz zu LJ200. Dabei wurden im Gegensatz zu den vorigen Wachstumskompetitionen zusätzlich 100 μM IPTG zu den Kulturen gegeben, um in JKA11 eine Expression von EiCB^{Glc} -His zu induzieren. Auf das Wachstum von LJ200 hat das IPTG keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt). Wie bereits JKA4 zeigt auch JKA11 einen deutlichen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtypstamm, wobei der Unterschied hier noch deutlicher wird, da bereits nach 4 Tagen keine JKA11 Kolonien auf den McC Scr Platten mehr nachweisbar sind (s. Abbildung 5.65). JKA11 zeigt demnach ein starkes Wachstumsdefizit gegenüber Wildtypstämmen.

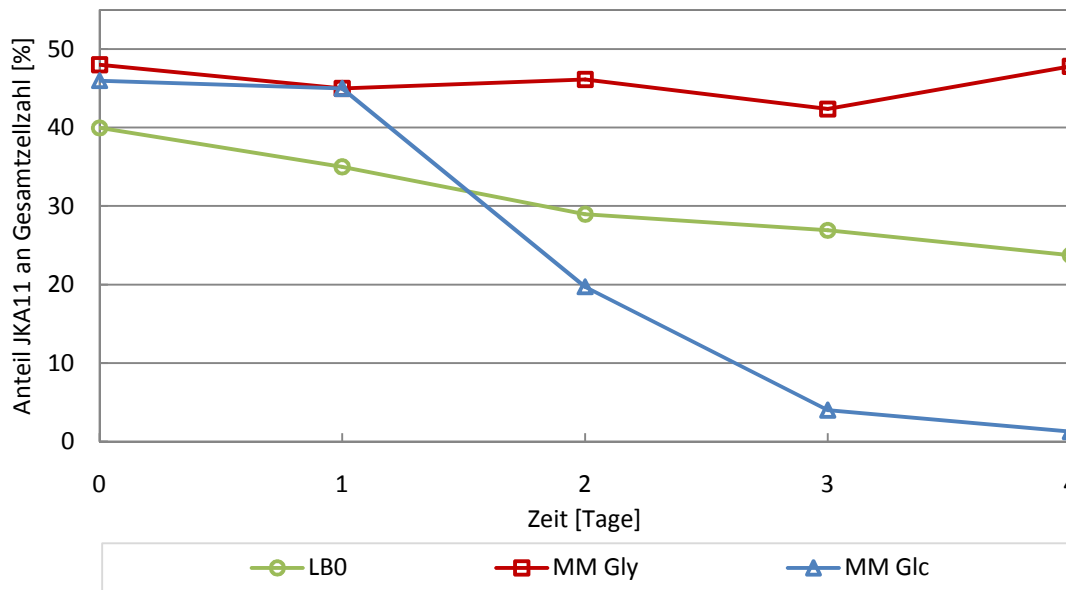


Abbildung 5.65: Wachstumskompetitionsversuch von JKA11 und LJ200

Gezeigt ist ein Diagramm zur Wachstumskompetition von JKA11 und LJ200 in verschiedenen Medien. Die Zellen wurden zu gleichen Anteilen in einer Kultur gemischt und über mehrere Tage angezogen. Zusätzlich wurde jeden Tag der Anteil der beiden Stämme bestimmt und graphisch aufgetragen. Angegeben ist der Anteil JKA11 an der Gesamtzellzahl in Prozent. In Minimalmedium mit 0,2 % Glukose zeigt JKA11 einen Wachstumsnachteil gegenüber LJ200.

5.2.1.5 Isolierung einer Suppressionsmutante von JKA11

Sowohl in Wachstumskurven als auch in Wachstumskompetitionsanalysen wurde ein Wachstumsdefizit von JKA11 festgestellt. Da mit einem solchen Stamm keine weiteren Versuche durchgeführt werden können, wurde zunächst auf eine besser wachsende Suppressionsmutante selektiert. Dafür wurde JKA11 in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose und 100 μ M IPTG angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch tägliches Überimpfen in frisches Medium mit IPTG und Anzucht über mehrere Tage konnten sich in der Kultur Zellen anreichern, die einen Wachstumsvorteil gegenüber den ursprünglichen JKA11 Zellen zeigten. Dabei handelte es sich um so genannte Suppressionsmutanten, d.h. Mutanten, die den ursprünglichen Phänotyp supprimieren können. Der Phänotyp dieser Mutanten, im Folgenden JKA11* genannt, ist stabil und geht auch bei erneutem Animpfen nicht verloren.

5.2.1.6 Expression von EIICB^{Glc}-His und Wachstumsanalysen von JKA11 und der Suppressionsmutante JKA11*

In einer Wachstumskurve in Minimalmedium mit Glukose sollten zunächst JKA11, JKA11* und LJ110 bezüglich ihres Wachstums verglichen werden (s. Abbildung 5.66).

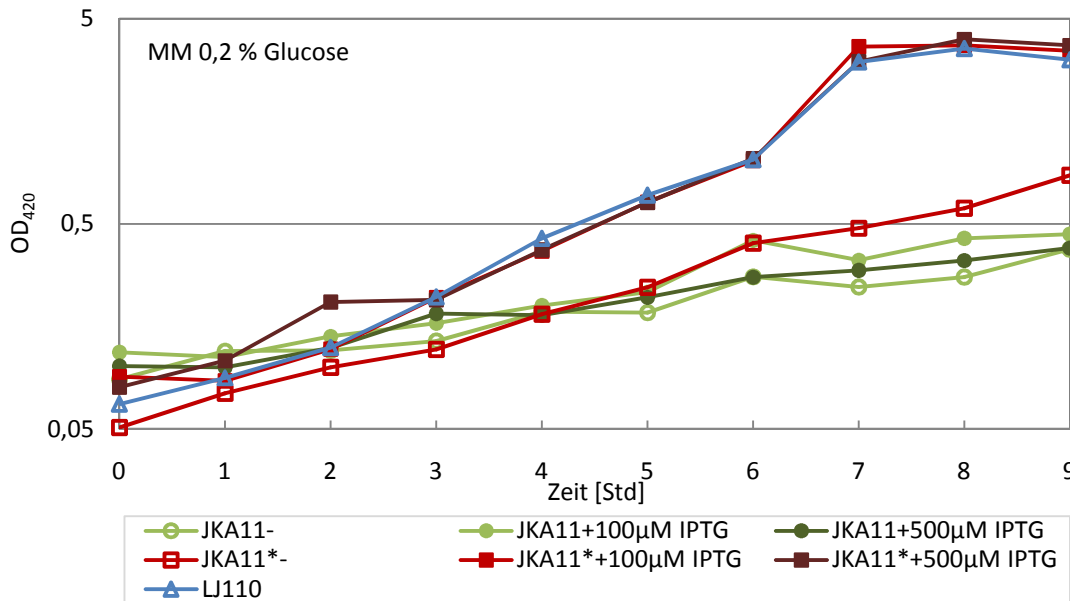


Abbildung 5.66: Wachstumsanalyse von JKA11, JKA11* und LJ110 in Minimalmedium mit Glukose bzw. Glycerin

Die dargestellte Wachstumskurve zeigt das Wachstumsverhalten von LJ110, JKA11 und JKA11* in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose bzw. Glycerin. JKA11 zeigt einen deutlichen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp in Minimalmedium mit Glukose. JKA11* zeigt dieses Defizit nicht bei Zugabe von IPTG. Den gekennzeichneten Kulturen wurde zu Beginn der Wachstumsanalyse 100 µM bzw. 500 µM IPTG zugegeben. Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 7 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: JKA11- = 2,88; JKA11+100 = 2,23; JKA11+500 = 5,06; JKA11*- = 1,75; JKA11*+100 = 1,35; JKA11*+500 = 1,31; LJ110 = 1,35.

Die Wachstumskurve zeigt, dass die Suppressionsmutante JKA11* bereits ohne IPTG Zugabe ein deutlich besseres Wachstum zeigt als JKA11. Durch Induktion mit 100 µM bzw. 500 µM IPTG lässt sich die Wachstumsrate von JKA11* auf Wildtypniveau anheben, die von JKA11 bleibt dagegen, wie bereits beschrieben, niedrig. Interessanterweise lässt sich die Wachstumsgeschwindigkeit von JKA11* nicht über das Wildtypniveau hinaus anheben, obwohl der tac_{PO} als optimierter Promotor-Operator eine deutliche stärkere Expression des nachgeschalteten Gens zulassen sollte als der natürliche $ptsG_{PO}$. Außerdem scheint eine leichte Expression des $EIICB^{Glc}$ auch ohne IPTG-Zugabe stattzufinden, obwohl der tac_{PO} durch den chromosomal kodierten LacI-Repressor unter diesen Bedingungen blockiert werden sollte. Dennoch spricht das Ergebnis zunächst für eine erfolgreich durchgeführte Isolierung einer Suppressionsmutante. Um zu untersuchen, ob dieser Stamm auch in direkter Konkurrenz zu einem Wildtypstamm ein gutes Wachstum zeigt, wurden erneut Wachstumskompetitionsanalysen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.67 gezeigt. Die Anzucht der Zellen erfolgte in Minimalmedium mit Glukose bzw. Glycerin oder in Vollmedium. Den Kulturen wurde zudem jeweils 100 µM IPTG zugegeben.

Die Wachstumskompetition zeigt, dass JKA11* keinen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp zeigt, weder in Minimalmedium noch in Vollmedium, im Gegensatz zu JKA11. Eine Isolierung einer Suppressionsmutante war demnach erfolgreich.

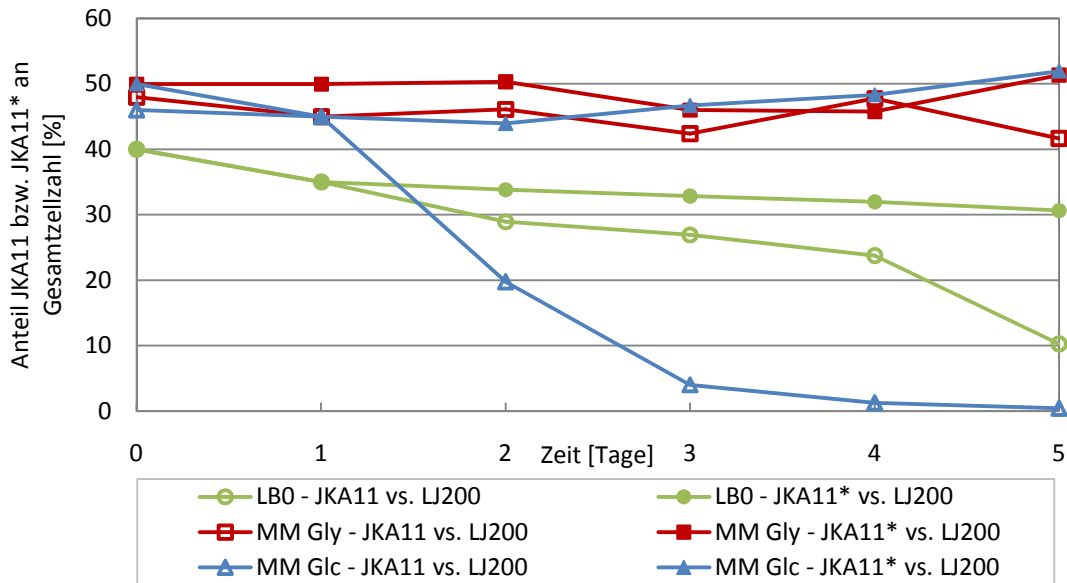


Abbildung 5.67: Wachstumskompetitionsversuch von JKA11 bzw. JKA11* und LJ200

Gezeigt ist ein Diagramm zur Wachstumskompetition von JKA11 bzw. JKA11* und LJ200 in verschiedenen Medien. Die Zellen wurden zu gleichen Anteilen in einer Kultur gemischt und über mehrere Tage angezogen. Zusätzlich wurde jeden Tag der Anteil der beiden Stämme bestimmt und graphisch aufgetragen. Angegeben ist der Anteil JKA11 bzw., JKA11* an der Gesamtzellzahl in Prozent. In Minimalmedium mit 0,2 % Glukose zeigt JKA11 einen Wachstumsnachteil gegenüber LJ200. JKA11* zeigt diesen Wachstumsnachteil nicht.

Eine Westernblotanalyse zur Expression des EIICB^{Glc}-His in JKA11* sollte zeigen, ob auch in diesem Stamm ein Signal nachweisbar ist (s. Abbildung 5.68). Die Abbildung zeigt, dass der Nachweis der EIICB^{Glc}-His Expression in JKA11 und JKA11* keinen Unterschied zeigt. Die Suppressionsmutation scheint also die Expression des EIICB^{Glc}-His nicht zu beeinflussen.

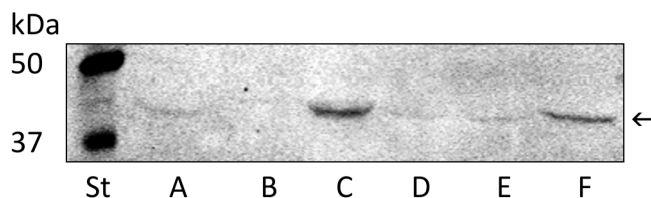


Abbildung 5.68: Westernblot zur Expression von EIICB^{Glc}-His in JKA11 und in JKA11*

Mit: St = Proteinstandard mit angegebenen Bandengrößen, A = JKA11 in Minimalmedium mit 0,2 % Glycerin, B = JKA11 in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose, C = JKA11 in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose + 500 μ M IPTG, D = JKA11* in Minimalmedium mit 0,2 % Glycerin, E = JKA11* in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose, F = JKA11* in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose + 500 μ M IPTG. Die Anzucht der Zellen erfolgte in den angegebenen Medien mit unterschiedlichen IPTG Konzentrationen bis zu einer OD₆₅₀ = 1. Die Zellen wurden geerntet, mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 10 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte ein Immunoblot mit einem Anti-Penta-His Antikörper und einem sekundären Anti-Maus Antikörper.

Durch homologe Rekombination ist es gelungen, ein mit einem „His-Tag“ versehenes EIICB^{Glc}, unter Kontrolle des natürlichen *ptsG_{pO}* (JKA4) bzw. des *tac_{pO}* (JKA11), ins Chromosom von LJ110 bzw. LJ130 zu integrieren. Durch Sequenzierung, PCR und Markertests konnten beide Stämme auf ihre Phäno- und Genotypen untersucht und bestätigt werden.

In Wachstumsanalysen und Wachstumskompetitionsversuchen wurde allerdings ein Defizit von JKA11 im Wachstum gegenüber dem Wildtypstamm gezeigt. Die erfolgreiche Isolierung einer Suppressionsmutante führte zu einem Stamm, der dieses Defizit nicht mehr zeigte. Nachfolgend wurde versucht, die Ursache für das Wachstumsdefizit von JKA11 zu finden bzw. den Genort der spontanen Suppressionsmutation in JKA11* zu ermitteln. Die folgenden Kapitel verdeutlichen die Herangehensweise.

5.2.2 Analyse der Phäno- und Genotypen von JKA4, JKA11 und JKA11*

Der Stamm JKA11 weist in Wachstumsanalysen Defizite gegenüber einem Wildtypstamm auf. Bei der spontan entstandenen Suppressionsmutante JKA11* treten diese Defizite nicht mehr auf. Auch für JKA4 wurden leichte Defizite im Wachstum in direkter Konkurrenz zu einem Wildtypstamm aufgezeigt. In verschiedenen Versuchen wurde nachfolgend untersucht, warum sich die Stämme unterscheiden und welche Gene, Proteine, Konformationen oder Regulationen dafür verantwortlich sein könnten. Als Einstieg wurden zunächst die Sequenzen der neu eingebrachten Genabschnitte in den drei Stämmen überprüft.

5.2.2.1 Sequenzanalysen von JKA4, JKA11 und JKA11*

Um eine fehlerhafte Sequenz der neu eingebrachten Genbereiche von JKA4 und JKA11 ausschließen, bzw. eine spontane Mutation in JKA11* nachweisen zu können, wurden die Sequenzen von *ptsGHis*, den Promotor-Operatorregionen von *ptsG_{PO}* bzw. *tac_{PO}* sowie der umliegenden Gene erneut überprüft. Dabei konnten keine Mutationen festgestellt werden. Auch die Abstände der Gene und die intergenen Regionen wiesen keine Veränderungen auf (Daten nicht gezeigt). Eine fehlerhafte Sequenz oder spontane Mutation in diesem Bereich konnte also endgültig ausgeschlossen werden. Zusätzlich dazu wurden die Sequenzen weiterer Gene überprüft, die einen Einfluss auf die Expression und Transportaktivität von EIICB^{Glc}-His in JKA4, JKA11 und JKA11* haben könnten. Dazu gehörten *dgsA* (Mlc), welches durch seinen Einfluss auf den *ptsG_{PO}* in JKA4 eine Rolle spielt und *sgrRST* (*SgrR*, *sgrS* und *SgrT*), wobei *sgrS* auf die *ptsGHis* mRNA und *SgrT* auf EIICB^{Glc}-His negativ wirken könnte. Auch hier wurden keine Mutationen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Da durch diese ersten Sequenzierungen keine Unterschiede in den Stämmen festgestellt werden konnten, sollte in einem zweiten Schritt die Transduzierbarkeit des Phänotyps von JKA11 und JKA11* untersucht werden, um den Bereich der Suppressionsmutation genauer eingrenzen zu können.

5.2.2.2 Überprüfung der Transduzierbarkeit des Phänotyps von JKA11 und JKA11*

Durch P1-Transduktion lassen sich Genbereiche von bis zu 100 kb von einem Stamm in einen anderen übertragen. Trägt der übertragene Bereich eine Antibiotika-Resistenzkassette, so können diese resultierenden Zellen selektiert und auf ihren Phänotyp untersucht werden.

Um die Transduzierbarkeit des Phänotyps von JKA11 und JKA11* zu überprüfen, wurden aus beiden Stämmen P1-Phagenlysate hergestellt. Anschließend wurden die beiden Stämme LJ120 und LJ130 mit den Phagenlysaten inkubiert und auf solche Zellen selektioniert, die eine Kanamycin-Resistenz aufwiesen. Die Transduktanten (JKA13-JKA16) wurden nach Überprüfung durch PCR und Sequenzierung auf ihr Wachstumsverhalten in Minimalmedium mit Glukose untersucht. Dabei wurden jeweils vier unabhängig voneinander entstandene Transduktanten

analysiert, bei denen davon ausgegangen werden konnte, dass der transduzierte Bereich unterschiedlich war. In Wachstumskurven zeigten die acht Transduktanten der JKA11-Lysate (JKA13 und JKA15) ein schlechtes Wachstum in Minimalmedium mit Glukose, die durch die JKA11*-Lysate entstandenen Transduktanten dagegen ein zu JKA11* vergleichbares Wachstum (Daten nicht gezeigt). Die Expression des EIICB^{Glc}-His konnte in allen Fällen im Westernblot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es kann also die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der Phänotyp von JKA11 und JKA11* in beiden Fällen immer zusammen mit der Kanamycin-Resistenzkassette und dem *ptsGHis*-Gen übertragen wurde. Eine mögliche Suppressionsmutation von JKA11* muss demnach im Bereich 100 kb Stromauf- bzw. Stromabwärts von *ptsGHis* liegen. Da die Phänotypen immer auftraten, auch bei voneinander unabhängig entstandenen Transduktanten, liegt die Mutation vermutlich in der Nähe des *ptsGHis*, da so eine gemeinsame Transduktion wahrscheinlicher wird.

Eine Möglichkeit das Wachstum von JKA11 in Minimalmedium mit Glukose durch spontane Mutationen zu erhöhen, wäre die Hochregulation eines alternativen glukoseaufnehmenden Systems. Neben dem Glukose-PTS transportieren auch das Mannose-PTS, GalP und Mgl Glukose in die Zelle. Keines dieser Systeme befindet sich jedoch in dem hier transduzierten Bereich, 100 kb Stromauf- oder abwärts von *ptsGHis*. Da das Wachstum von JKA11* zudem durch IPTG-Zugabe gesteigert werden kann, scheint die Möglichkeit, eine Mutation in den entsprechenden Genen bzw. Promotor-Operatorbereichen für das Mannose-PTS, GalP oder Mgl zu finden, wenig wahrscheinlich. Ein Gen, welches dagegen in dem transduzierten Bereich vorkommt und im Zusammenhang mit *sgrS* für den Abbau der *ptsGHis*-mRNA verantwortlich ist, ist *rne*, das Gen der RNaseE. Durch Sequenzierung wurde aus diesem Grund auch dieses Gen überprüft, es konnte jedoch keine Mutation festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren befinden sich viele Gene der Fortbewegung in diesem Bereich, z.B. Gene für die Bildung von Flagellen. Durch Untersuchung der Bewegungsgeschwindigkeit der Zellen der hier untersuchten Stämme unter dem Mikroskop konnten zunächst jedoch Veränderungen in der Fortbewegung der neu konstruierten Stämme ausgeschlossen werden. Alle Zellen bewegten sich im Mittel gleich schnell (Daten nicht gezeigt). Eine schlechte Mobilität der Zellen konnte also auch als Grund des schlechten Wachstums ausgeschlossen werden.

5.2.2.3 Konstruktion von JKA23, einem chromosomal kodierten EIICB^{Glc}-Derivat unter der Kontrolle des *tac_{PO}*

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob der „His-Tag“ des EIICB^{Glc} einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von JKA11 hat. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Stamm konstruiert, welcher ein chromosomal kodiertes *ptsG* unter der Kontrolle eines *tac_{PO}* aufweist, jedoch keinen „His-Tag“. Für diese Klonierung wurde zunächst ein Plasmid konstruiert (pHex3ycfH-*tac_{PO}**ptsG*-neo-fhuE), von dem ein PCR-Produkt hergestellt und die Gene über homologe Rekombination in BW25113 integriert wurden. Im Anschluss daran erfolgte eine P1-Transduktion in LJ130. Der resultierende Stamm wurde JKA23 genannt. JKA23 wurde durch Kontrollrestriktionen, Markertest und Sequenzierung überprüft.

In Wachstumsanalysen in Minimalmedium mit Glukose wurde das Wachstum von LJ110, LJ130, JKA11, JKA11* und JKA23 verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.69 gezeigt.

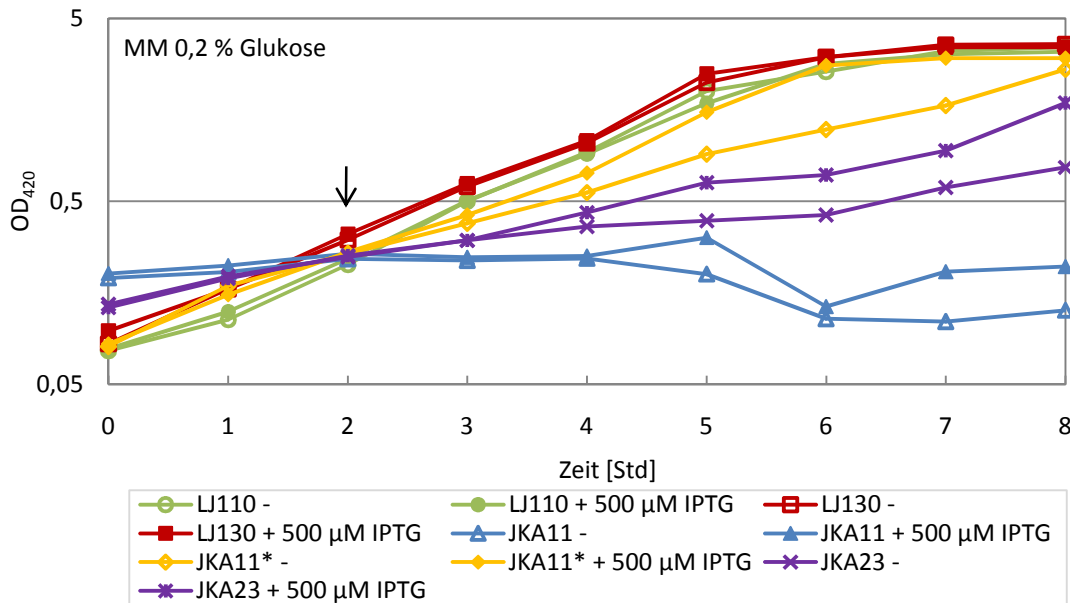


Abbildung 5.69: Untersuchung des Wachstums von LJ110, LJ130, JKA11, JKA11* und JKA23

Die dargestellte Wachstumskurve zeigt das Wachstumsverhalten von LJ110, LJ130, JKA11, JKA11* und JKA23 in Minimalmedium mit 0,2% Glucose. JKA11 zeigt einen deutlichen Wachstumsnachteil gegenüber den Wildtypzellen. JKA11* zeigt dieses Defizit nicht bei Zugabe von IPTG. JKA23 zeigt ein IPTG induzierbares Wachstum, welches jedoch nicht die Wachstumsgeschwindigkeit der Wildtypzellen erreicht. Den gekennzeichneten Kulturen wurde 500 µM IPTG zugegeben (Pfeil). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 8 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Generationszeiten [Std]: LJ110- = 0,95; LJ110+ = 1,06; LJ130- = 1,05; LJ130+ = 1,03; JKA11- = kein Wachstum, JKA11+ = kein Wachstum; JKA11*- = 1,66; JKA11*+ = 1,18; JKA23- = 4,56; JKA23+ = 2,27.

Die Wachstumsanalyse zeigt, dass LJ110 und LJ130 ein vergleichbares Wachstum zeigen. JKA11* erreicht ebenfalls eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit, wenn die Kultur mit IPTG induziert wurde. Das Wachstum von JKA11 ist deutlich eingeschränkt, auch wenn IPTG zu den Kulturen gegeben wurde. Das Wachstum von JKA23 liegt im Bereich zwischen JKA11 und JKA11*. Hier ist zwar eine deutliche Induktion des Wachstums durch IPTG Zugabe zu sehen, die Wachstumsgeschwindigkeit bleibt jedoch unterhalb der von JKA11* und der Wildtypkontrollen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch den Verzicht eines „His-Tags“ am EIICB^{Glc} in JKA23 zwar ein verbessertes Wachstum zu beobachten ist, jedoch auch hier keine optimale Wachstumsgeschwindigkeit erreicht wird. Das schlechte Wachstum von JKA11 kann demnach nicht vollständig auf die Verwendung eines „His-Tags“ zurück geführt werden.

5.2.2.4 Überprüfung des „His-Tags“ im Bezug auf unterschiedliche Phänotypen des EIICB^{Glc}

Das EIICB^{Glc} kann durch verschiedene Mutationen unterschiedliche Phänotypen zeigen. Dazu gehören die „entkoppelten“, „relaxed“ oder „locked-in“ Mutanten. Bisher wurden noch keine Untersuchungen angestellt, ob auch ein „His-Tag“ am Protein einen dieser Phänotypen hervorrufen und damit ein verändertes Wachstumsverhalten gegenüber einem Wildtypstamm bewirken könnte. Dies sollte in verschiedenen Versuchen untersucht werden.

LJ141 zeichnet sich durch Deletionen der Gene *ptsHlcr*, *mgI* und *galP* aus. Dadurch ist er nicht in der Lage, Glukose in die Zelle aufzunehmen und zeigt weiße Kolonien auf McC Glukose Platten. Durch das Einbringen eines *ptsG*-Gens auf einem Plasmid in den Stamm bleiben die Kolonien

weiß, da das exprimierte EIICB^{Glc} nicht in der Lage ist, die Glukose in die Zelle aufzunehmen, wenn die Phosphorylierungskaskade durch die *ptsHlcr*-Deletion fehlt. Die Integration eines „entkoppelten“ EIICB^{Glc} (z.B. durch die Punktmutation I296N) führt dagegen zu einer Aufnahme der Glukose und damit zu roten Kolonien. Um zu überprüfen, ob ein „His-Tag“ eine Entkopplung von Phosphorylierung und Transport der Glukose im EIICB^{Glc} auslösen kann, wurde LJ141 mit pRR48GH bzw. pRR48ptsG transformiert und auf McC Glukose Platten ausgestrichen. Es bildeten sich in beiden Fällen weiße Kolonien, was darauf hindeutet, dass durch den „His-Tag“ alleine keine „entkoppelte“ Mutante des EIICB^{Glc} hervorgerufen werden kann (Daten nicht gezeigt).

Ein „relaxed“-Phänotyp zeichnet sich u.a. durch eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber Arabinitol und Ribitol aus, da diese Alkohole nur von „relaxed“ Mutanten aufgenommen aber nicht verstoffwechselt werden können. Aus diesem Grund wurden die Stämme JKA4, JKA11 und JKA11* auf McC Platten mit Arabinitol bzw. Ribitol ausplattiert und in ihrem Wachstum mit einem Wildtypstamm verglichen. Dabei konnte keine erhöhte Sensitivität der Stämme nachgewiesen werden, d.h. die Zellen zeigten ein gutes Wachstum, was gegen einen „relaxed“ Phänotyp spricht (Daten nicht gezeigt).

Auf einen „Locked-in“ Phänotyp konnten die drei Stämme nicht überprüft werden. In diesem Fall würde kein Transport der Glukose stattfinden, jedoch die Phosphorylierungsaktivität des EIICB^{Glc}-Derivats erhalten bleiben. Da JKA11 kaum Wachstum in Minimalmedium mit Glukose zeigt, könnte hier eine „locked-in“ Mutation vorliegen, dies herauszustellen wäre jedoch mit aufwändigen Versuchen verbunden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten.

5.2.2.5 Analyse der *ptsG*-Genregion von JKA11, JKA11* und JKA23 im Southernblot

Die bisherigen Versuche konnten zeigen, dass keine Unterschiede der Stämme im *ptsG*-Gen vorliegen. In einem Southernblot sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob durch die homologe Rekombination und die anschließende P1-Transduktion in LJ130 eine Genduplikation des *ptsG*-Gens in JKA11, JKA11* und JKA23 entstanden ist. Das Vorhandensein von *ptsG* in seiner Wildtypsequenz und einem zusätzlichen *ptsGHis* unter der Kontrolle des *tac_{PO}* in einem anderen Abschnitt des Chromosoms oder eine mehrfache Kopie des *ptsGHis*-Gens könnte möglicherweise eine Erklärung für die Unterschiede der Stämme im Wachstum in Minimalmedium mit Glukose sein. Um dies zu untersuchen, wurde ein Southernblot mit den Stämmen JKA11, JKA11*, JKA23 und LJ130 durchgeführt. Bei einem Southernblot wird eine markierte Sonde zum zu untersuchenden Genabschnitt hergestellt und mit dem zuvor gereinigten und in Fragmente zerlegten Chromosom der Zellen inkubiert. Die Sonde bindet an die entsprechenden komplementären Fragmente, sodass diese später sichtbar gemacht werden können. Bei einer Genduplikation entstehen dadurch viele Fragmente unterschiedlicher Größe. Auch bei Integration des Gens an einer nicht vorhergesagten Stelle entstehen mit großer Wahrscheinlichkeit andere, nicht erwartete Fragmentgrößen. Durch den Vergleich von Wildtypsequenzen und neu konstruierten Genomabschnitten können Rückschlüsse auf die Kopienanzahl und die Lokalisation des Gens im Genom gezogen werden.

Für einen Southernblot muss zunächst die chromosomale DNA aus den Zellen in reiner Form isoliert werden. Dafür wurde die Isolierung chromosomaler DNA mit der Phenol/Chloroform Methode gewählt. Anschließend wurden die DNA-Konzentrationen bestimmt und 5 µg in einer

Restriktion eingesetzt. Durch die Restriktion in unterschiedlichen Ansätzen mit verschiedenen Restriktionsenzymen (hier: NdeI, Sall und NsiI) wurde das gesamte Chromosom in Fragmente zerschnitten. Dabei sollten die Restriktionsenzyme so gewählt werden, dass in dem Bereich, der von der Sonde gebunden wird, unterschiedlich lange Fragmente zwischen Kontrollen und zu untersuchenden Stämmen entstehen. Durch Agarosegelelektrophorese wurden die Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend über einen Southernblot auf eine Membran transferiert. Zusätzlich wurde durch PCR mit den Primern ptsG7 und ptsG-linker-BamHI und anschließendes Markieren mit DIG-dUTP eine ca. 900 bp lange Sonde hergestellt, die im *ptsG*- und *ptsGHis*-Gen binden kann. Durch Hybridisierung der Sonde und der geschnittenen DNA auf der Membran fand eine Bindung der Sonde an die entsprechenden Genfragmenten statt. Anschließend wurde überschüssige Sonde abgewaschen und die an die Fragmente gebundene Sonde entweder durch CDP-Star-Färbung auf einem Chemilumineszenzfilm oder die Verwendung der Chemikalien BCIP und NBT auf der Membran sichtbar gemacht. Zum Vergleich der Fragmentgrößen wurde ein Lambda-Standard verwendet. Die Ergebnisse beider Färbungen sind in Abbildung 5.70 gezeigt.

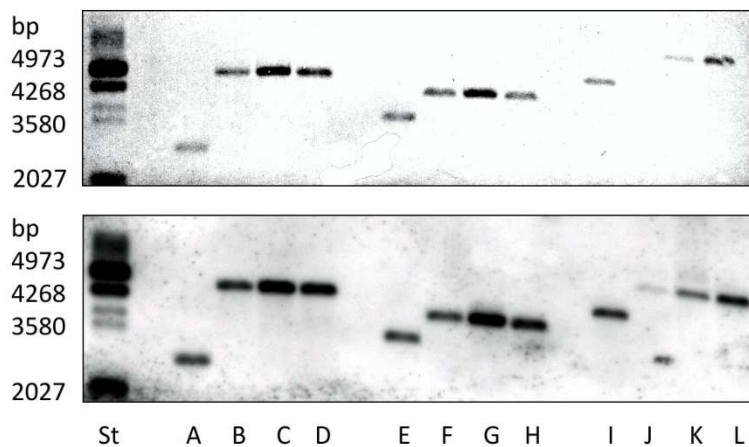


Abbildung 5.70: Southernblot von LJ130, JKA11, JKA11* und JKA23

Mit: Oben = NBT/BCIP Färbung, Unten = CDP Star Färbung. St = Lambda-Standard mit den angegebenen Bandengrößen, A = LJ130 (NdeI geschnitten, 3275 bp), B = JKA11 (NdeI, 4689 bp), C = JKA11* (NdeI, 4689 bp), D = JKA23 (NdeI, 4689 bp), E = LJ130 (Sall, 3243 bp), F = JKA11 (Sall, 3946 bp), G = JKA11* (Sall, 3946 bp), H = JKA23 (Sall, 3946 bp), I = LJ130 (NsiI, 4629 bp), J = JKA11 (NsiI, 6154 bp), K = JKA11* (NsiI, 6154 bp), L = JKA23 (NsiI, 6154 bp). Beide Southernblots zeigen die identischen Proben. Die Inkubation des Chemilumineszenzfilms erfolgte für 1,5 min, die mit NBT/BCIP behandelte Membran wurde für 4 Stunden gefärbt.

Alle Restriktionsmuster zeigen die erwarteten Bandengrößen. Dabei fällt auf, dass keine zusätzlichen Banden vorhanden sind, sodass davon ausgegangen werden kann, dass in allen Stämmen das entsprechende Gen, *ptsG* bzw. *ptsGHis*, nur in einfacher Kopienzahl an der richtigen Stelle im Chromosom vorliegt. Die unterschiedlich starken Banden im Southernblot beruhen vermutlich auf unterschiedlich eingesetzten DNA-Mengen und geben keinerlei Auskunft über die Kopienzahl der Gene. Zudem zeigt sich, dass die Färbung mit CDP-Star auf einem Chemilumineszenzfilm deutlich sensitiver ist und daher der Färbung mit NBT/BCIP vorzuziehen ist.

Die bisherigen Versuche konnten zeigen, dass Unterschiede im Wachstum zwischen LJ130, LJ110 und JKA11, JKA11* und JKA23 nicht auf unterschiedlichen oder fehlerhaften Sequenzen

beruhen. Zudem liegt in allen Fällen nur jeweils eine Kopie des entsprechenden *ptsG*-Derivates vor. Der Phänotyp von JKA11 und JKA11* ist außerdem transduzierbar, sodass eine Suppressionsmutation in einem Bereich 100 kb Stromauf- bzw. Stomabwärts von *ptsG* liegen muss. Der „His-Tag“ konnte als alleiniger Verursacher des schlechten Wachstums von JKA11 ebenfalls ausgeschlossen werden. Bisher konnte daher noch kein Grund identifiziert werden, warum die Stämme ein so unterschiedliches und unerwartetes Wachstum in Minimalmedium mit Glukose zeigen.

5.2.2.6 Überprüfung des LacI Repressors in JKA11 und JKA11*

Die Expression des EIICB^{Glc}-His steht sowohl in JKA11 als auch in JKA11* unter der Kontrolle des *tac_{PO}*. Dieser Promotor-Operator-Bereich ist durch den Repressor des Laktose-Operons LacI (Gen *lacI*) kontrolliert, der ebenfalls chromosomal kodiert vorliegt. LacI bindet an den Operator des *tac_{PO}* und verhindert dadurch die Expression des nachgeschalteten Gens. Die Zugabe u.a. von IPTG löst den Repressor vom Operator ab und induziert dadurch die Expression des Gens. Durch unterschiedliche Mutationen im LacI-Repressor oder Promotor-Operator-Bereich des *ptsGHis* im Chromosom von JKA11 und JKA11* könnten unterschiedliche Phänotypen entstehen, die z.B. durch einen daueraktiven Repressor ein schlechtes Wachstum in Minimalmedium mit Glukose zeigen. Um zu überprüfen, ob der LacI-Repressor in JKA11 und JKA11* funktionsfähig ist und keinerlei Veränderung in seiner Aktivität aufzeigt, wurden β -Galaktosidase-Aktivitätstests durchgeführt.

Für den β -Galaktosidase-Aktivitätstest wurden die Zellen entsprechend des Protokolls angezogen und behandelt. Es wurden sowohl JKA11 und JKA11* als auch LJ110, CSH36 und L17 als Kontrollen untersucht. Alle Stämme besitzen einen chromosomal kodierten LacI-Repressor und alle bis auf L17 ein Gen für die β -Galaktosidase (Gen *lacZ*). β -ONPG stellt ein farbloses Substrat der β -Galaktosidase dar und wird durch sie zu einem gelben Analogon umgewandelt. Diese Farbreaktion lässt sich photometrisch bestimmen. Im Wildtypstamm (LJ110) ist die Expression der β -Galaktosidase durch IPTG induzierbar, sodass eine verstärkte Aktivität nach Induktion auftritt. L17 hat dagegen u.a. kein *lacZ*-Gen, sodass hier keine Umsetzung des β -ONPG stattfindet. CSH36 zeigt durch eine Mutation im Repressor einen konstitutiven Phänotyp. Hier findet eine Umsetzung des β -ONPG immer, unabhängig von der Induktion durch IPTG, statt. Durch vergleichende Tests sollte ermittelt werden, ob JKA11 und JKA11* möglicherweise ebenfalls einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp zeigen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.71 dargestellt.

Die Kontrollstämme zeigen jeweils die zu erwartenden Ergebnisse. LJ110 zeigt einen induzierbaren Phänotyp, L17 hat keinerlei β -Galaktosidaseaktivität und CSH36 ist konstitutiv in der Expression der β -Galaktosidase. Die beiden Stämme JKA11 und JKA11* zeigen wie der Wildtyp ebenfalls einen induzierbaren Phänotyp. Dabei liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Stämmen vor. Eine Mutation im Repressor LacI in JKA11 bzw. JKA11* ist demnach kein Grund für das schlechte Wachstum von JKA11 und das verbesserte Wachstum von JKA11* in Minimalmedium mit Glukose.

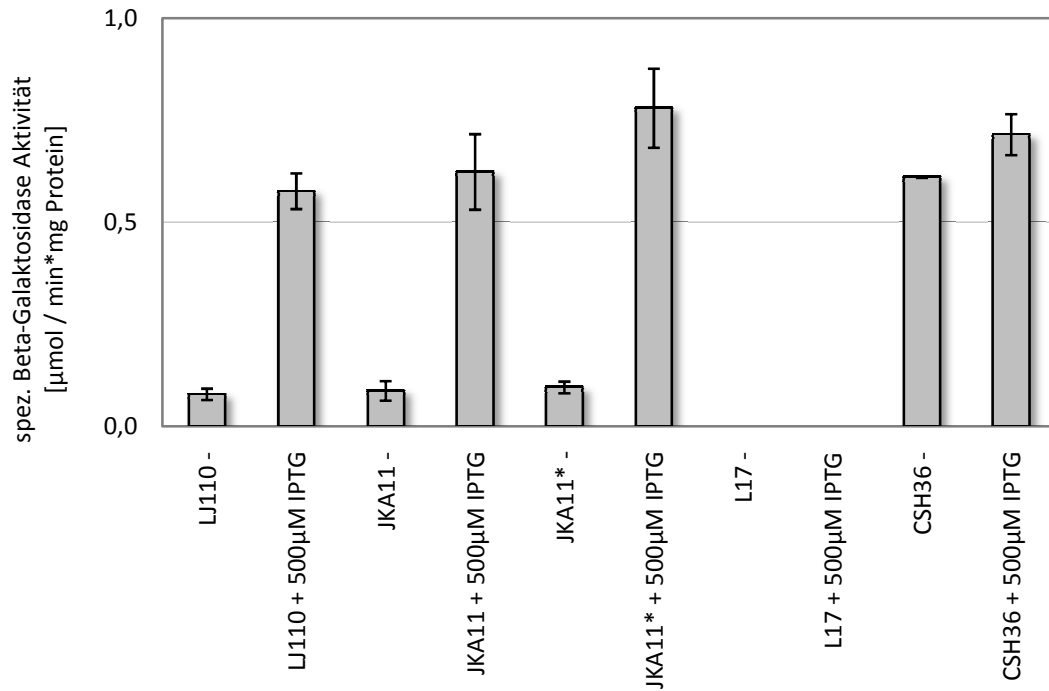


Abbildung 5.71: β -Galaktosidase Aktivitätstest zur Überprüfung des LacI Repressors in JKA11 und JKA11*

Gezeigt ist ein Balkendiagramm zu den Mittelwerten aus drei unabhängigen Ergebnissen eines β -Galaktosidase Aktivitätstests mit verschiedenen Stämmen. Die gekennzeichneten Kulturen wurden mit 500 μ M IPTG während des Wachstums induziert. LJ110, JKA11 und JKA11* zeigen eine induzierbare β -Galaktosidase Aktivität, L17 hat keine Aktivität und CSH36 zeigt eine konstitutive Expression der β -Galaktosidase Aktivität.

Diese Versuche konnten zeigen, dass auch in der Expression der EIICB^{Glc}-His Derivate von JKA11 und JKA11* keine Unterschiede feststellbar sind, die die unterschiedlichen Phänotypen erklären könnten. Mit den bisher vorgestellten Methoden konnte daher noch keine Ursache identifiziert werden. Durch den *ta_{C_{PO}}* könnte möglicherweise eine veränderte Transkription der Gene hervorgerufen werden, was zu unterschiedlichen mRNA-Leveln führen würde. Mit Hilfe einer RT-PCR sollten daher die mRNA-Level von *ptsG*- bzw. *ptsGHis*-mRNA miteinander verglichen werden.

5.2.2.7 Überprüfung der *ptsG*-mRNA in JKA4, JKA11 und JKA11*

Zur Überprüfung der Transkription des *ptsGHis* in JKA4, JKA11 und JKA11* wurden Real Time-PCRs durchgeführt. Die Real Time-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich die Quantifizierung der eingesetzten DNA. Dafür wird aus den Stämmen zunächst die gesamte RNA isoliert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA kann dann in der RT-PCR eingesetzt werden und die Menge der entstehenden PCR Produkte durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen (hier SYBR-Green) während der PCR in Echtzeit („Real Time“) mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen bestimmt werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der entstehenden PCR Produkte zu, da sich das SYBR-Green in die doppelsträngigen PCR-Produkte einlagert und erst dann fluoresziert. So kann der Amplifikationszyklus ermittelt werden, in welchem die entstehende DNA-Menge einen gewissen Schwellenwert (Ct-Wert) überschreitet. Von diesem Wert kann durch Annahme einer

gewissen Amplifikationseffizienz (angegeben durch die Standardkurve) auf die Ausgangsmenge der eingesetzten RNA bzw. cDNA zurück geschlossen werden (Kubista et al., 2006).

Durch die RT-PCR könnte somit eine mögliche reduzierte Transkription der *ptsGHis*-Gene in JKA11 oder JKA4 aufgedeckt und so das verschlechterte Wachstum in Minimalmedium mit Glukose gegenüber dem Wildtyp erklärt werden. Die RT-PCR wurde zunächst vergleichend mit den beiden Stämmen LJ110 und JKA4 in unterschiedlichen Medien durchgeführt. Dabei wurde neben der mRNA-Menge des *ptsG* bzw. *ptsGHis* auch die mRNA-Menge von *glk* (Glucokinase) bestimmt. Die mRNA der Glucokinase sollte sich unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen in beiden Stämmen nicht oder nur geringfügig verändern und kann in diesem Fall als Kontrolle („Housekeeping“-Gen) verwendet werden. Für die RT-PCR muss für jedes PCR-Primerpaar zunächst das Protokoll optimiert werden. Das optimierte Protokoll für die RT-PCR mit den Primern pts-RT+/- (*ptsG* bzw. *ptsGHis*) und glk+/- (*glk*) ist im Methodenteil dieser Arbeit dargestellt (s. Kapitel 4.4.13.3). Beide Primerpaare ermöglichen eine Amplifikation eines etwa 100 bp langen PCR-Produktes, welches das 5'-Ende des jeweiligen Gens umfasst. Die Elongationszeit für die beiden PCR-Produkte betrug jeweils 30 Sekunden, als Annealingtemperatur für die Primer wurden 58 °C gewählt. Die Schmelzkurven der Primerpaare in Abbildung 5.72 zeigen jeweils nur einen Peak, was auf eine Bildung von PCR-Produkten ohne unspezifische Nebenprodukte hindeutet und damit ein Indiz für eine funktionierende RT-PCR ist.

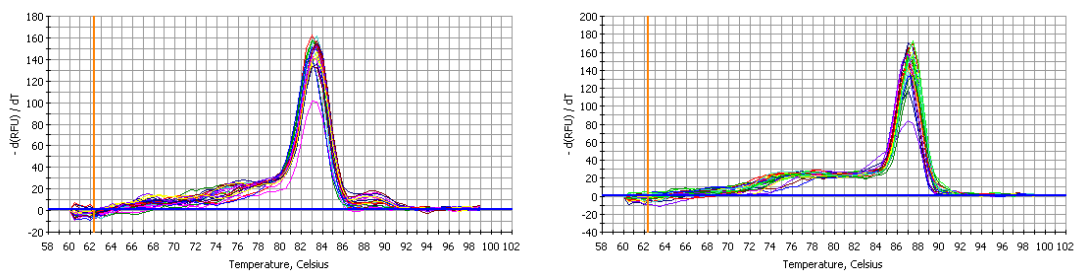


Abbildung 5.72: Schmelzkurven der für die RT-PCR verwendeten Primerpaare pts-RT+/- und glk+/-

Abgebildet sind zwei Schmelzkurven der für die RT-PCR verwendeten Primerpaare pts-RT+/- (links) und glk+/- (rechts). Die Schmelzkurven wurden jeweils aus mehreren verschiedenen Proben bestimmt. Beide Schmelzkurven zeigen jeweils nur einen Peak der Schmelztemperatur der PCR-Produkte, was auf eine Bildung von PCR-Produkten ohne unspezifische Nebenprodukte hindeutet. Die Aufnahme der Schmelzkurven erfolgte mit dem Icyler-Programm von BioRad.

Das Protokoll für die RT-PCR ist demnach für alle Primerpaare geeignet, sodass die Proben alle gemeinsam in einer RT-PCR analysiert werden konnten. Für die RT-PCR wurden die Stämme LJ110 und JKA4 in LB₀ bzw. Minimalmedium mit Glukose oder Glycerin angezogen und bei einer OD_{420/650} = 1 geerntet. Anschließend wurden sowohl RNA als auch DNA aus den Zellen isoliert, die DNA durch DNase verdaut und 300 ng der so gewonnenen RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Für die RT-PCR wurde 1 µl der cDNA eingesetzt. Die RT-PCR erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Das „Icyler“-Programm der RT-PCR (BioRad) zeichnet die Fluoreszenzwerte der einzelnen Proben auf und gibt sie als Kurve wieder (s. Abbildung 5.73).

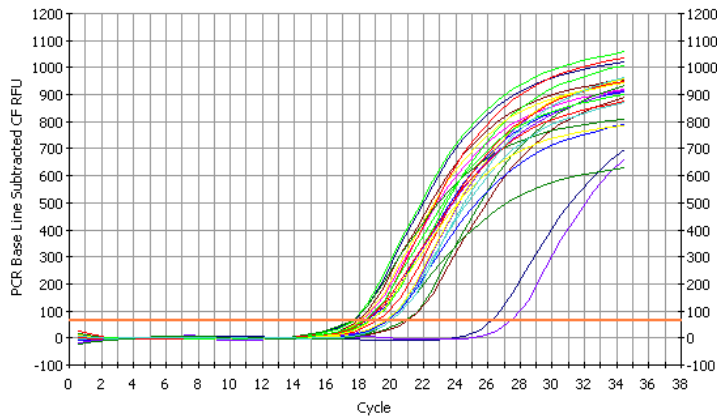


Abbildung 5.73: Bestimmung der Ct-Werte einer RT-PCR

Dargestellt sind Kurven, welche die Entstehung der PCR-Produkte mit den pts-RT+/- Primern in einer RT-PCR aufzeichnen. Jede Kurve steht für eine Probe. Die orange Linie gibt den Schwellenwert an, anhand dessen der Ct-Wert jeder Probe bestimmt wird. Der Ct-Wert entspricht dem Zyklus, in dem der Schwellenwert überschritten wird und liegt bei den Proben dieses Beispiels zwischen 18 und 28.

Die Kurven zeichnen die Entstehung der PCR-Produkte mit den pts-RT+/- Primern in der RT-PCR durch Messung der Fluoreszenz auf. Jede Kurve steht dabei für eine individuelle Probe. Nach einer initialen Lag-Phase, in der kein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann, beginnt eine exponentielle Log-Phase in der sich die Signalstärke, und damit die PCR-Produktmenge, in jedem Zyklus verdoppelt. Der Ct-Wert stellt den Zyklus dar, in dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Am Ende der PCR zeigen die meisten Kurven eine Plateau-Phase in der die Entstehung von neuen PCR-Produkten durch begrenzte Mengen an PCR-Komponenten limitiert ist. Anhand der Kurve lassen sich die Ct-Werte bestimmen und miteinander vergleichen.

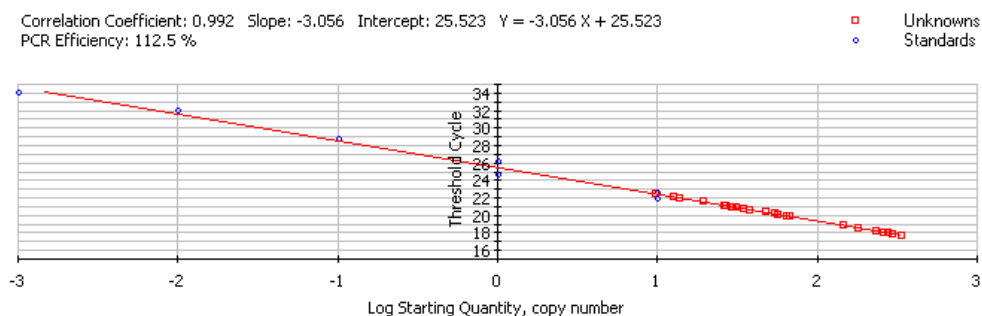


Abbildung 5.74: Standardkurve zur RT-PCR

Gezeigt ist als Beispiel eine Standardkurve zur RT-PCR mit den glk+/- Primern. Sie gibt die Effizienz der RT-PCR an (PCR Efficiency, optimal zwischen 90 % und 100 %) und die Formel inkl. der Steigung der Standardkurve (Slope, optimal zwischen -3,1 und -3,6) mit deren Hilfe die Effizienz der PCR berechnet werden kann (Effizienz = $10^{(1/\text{Slope}) - 1}$). Außerdem gibt der Korrelationskoeffizient an, wie gut die gemessenen Werte auf der Standardkurve liegen und zeigt damit die Linearität des Ansatzes (Correlation Coefficient, optimal $\geq 0,985$). Die Sensitivität der PCR wird durch den Schnittpunkt der Kurve mit der Y-Achse gegeben und bezeichnet die Anzahl an Zyklen, die notwendig sind, um sicher zu sein, dass sich kein PCR-Produkt in der Probe befindet (Intercept).

Um die Auswertung und Analyse der einzelnen Werte zu vereinfachen, wurde das Programm „qbase“ von Biogazelle herangezogen. Mit der in einer Standardkurve berechneten Effizienz, die während der RT-PCR ebenfalls erstellt wird (s. Abbildung 5.74) und einem „Housekeeping“-Gen als Referenz (hier *glk*) kann mit diesem Programm eine detaillierte Auswertung vorgenommen werden. Setzt man die Ct-Werte der Glucokinase aller Proben als Referenz (sollte sich unter den untersuchten Bedingungen nicht oder nur geringfügig ändern), erhält man für die Auswertung einer jeweils dreifach durchgeführten RT-PCR von JKA4 und LJ110 in Minimalmedium mit Glukose oder Glyzerin, bzw. LB₀ das folgende Ergebnis (Abbildung 5.75).

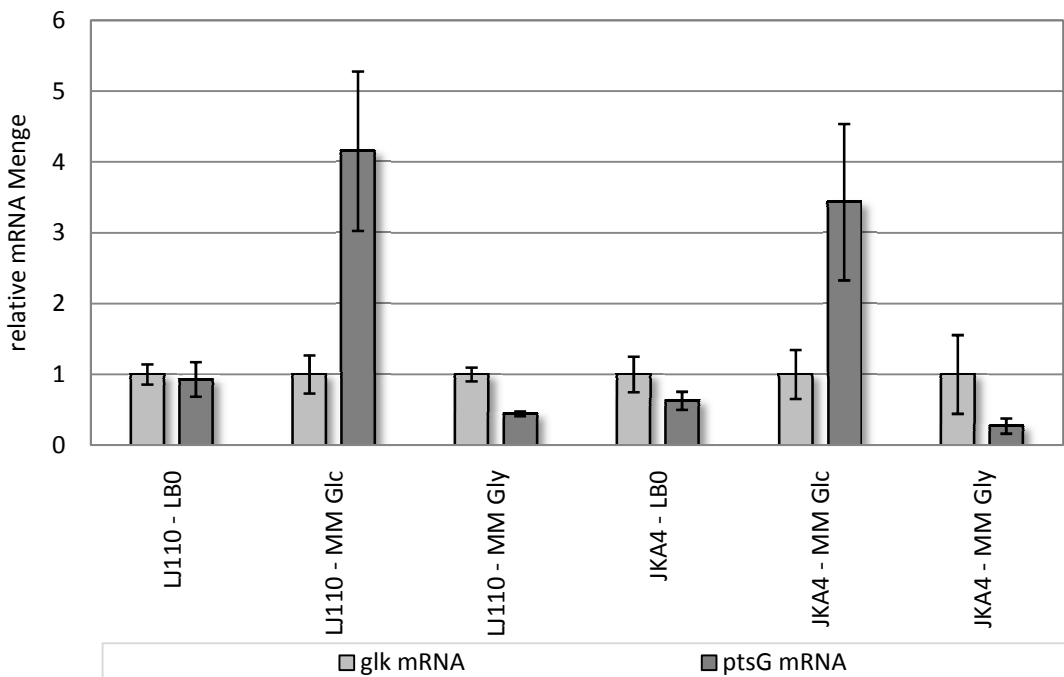


Abbildung 5.75: Berechnung der mRNA Menge von *ptsG* und *glk* aus LJ110 und JKA4 durch eine RT-PCR

Gezeigt ist ein Diagramm zur Auswertung der RT-PCR von LJ110 und JKA4 mit Hilfe des Programms „qbase“ von Biogazelle. Angegeben sind die relativen Mengen von *ptsG*-mRNA (*glk* als Referenzgen gleich 1 gesetzt) in den beiden Stämmen nach Anzucht in verschiedenen Medien. Die Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Messungen dar. Es ist eine deutliche Induktion der *ptsG*-Transkription durch Glukosezugabe in beiden Stämmen zu erkennen.

Die Abbildung zeigt die jeweiligen relativen Mengen der mRNA von *ptsG* in LJ110 und JKA4, wenn diese Stämme in unterschiedlichen Medien angezogen wurden. Die Menge der Glucokinase-mRNA ist dabei als Referenz auf 1 skaliert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Messungen gezeigt. Die Fehlerbalken machen deutlich, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen LJ110 und JKA4 vorliegen.

Um die Werte besser miteinander vergleichen zu können, wurde eine Normalisierung aller Proben auf den Wert von LJ110-LB₀ durchgeführt (s. Abbildung 5.76). Bei der Auswertung der RT-PCR von LJ110 wird deutlich, dass in Minimalmedium mit Glukose wie erwartet eine etwa 4 bis 5 mal höhere Menge an *ptsG*-mRNA vorliegt als in Vollmedium oder Minimalmedium mit Glyzerin. Da die Expression von *ptsG* glukoseabhängig ist, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Bei JKA4 zeigt sich ein ähnlicher Trend. Hier liegt generell minimal weniger *ptsG*-mRNA vor als im

Wildtyp, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant (s. Abbildung 5.75) und müssten durch weitere RT-PCRs zunächst bestätigt werden. Die Tendenz der Induktion durch Glukose ist vergleichbar mit der von LJ110. Die RT-PCR mit JKA4 und LJ110 konnte zeigen, dass keine deutlichen Unterschiede im *ptsG*-mRNA-Level der beiden Stämme vorliegen. Eine verschlechterte Transkription kann demnach kein Grund für die Wachstumsnachteile von JKA4 gegenüber den Wildtypzellen in Wachstumscompetitionsversuchen sein.

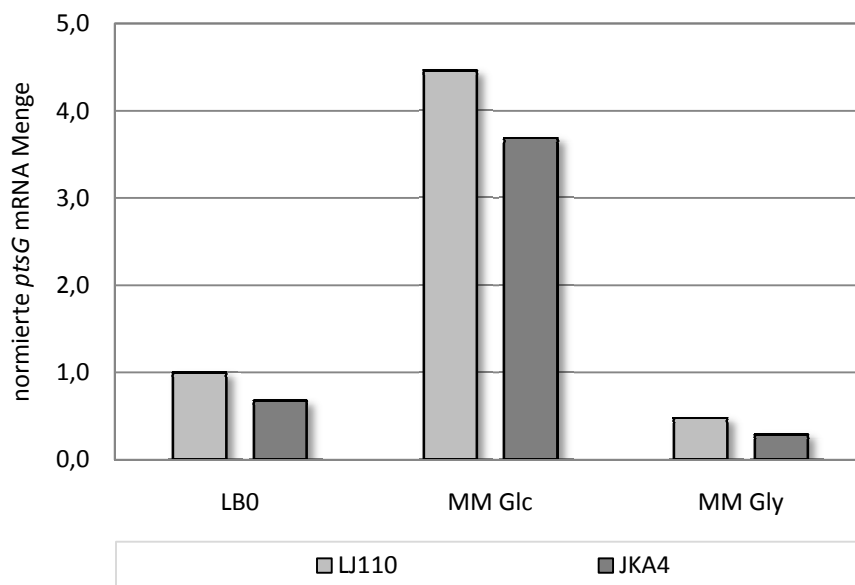


Abbildung 5.76: Normierte *ptsG*-mRNA Level in LJ110 und JKA4

Gezeigt ist ein Diagramm mit den auf LJ110-LB₀ normierten Werten der *ptsG* mRNA Mengen von LJ110 und JKA4 in unterschiedlichen Medien.

Die RT-PCR wurde ebenfalls mit den Stämmen JKA11 und JKA11* durchgeführt. Da hier eine Veränderung am Anfang der *ptsG*-Sequenz durch das Einbringen eines *tac*_{P0} vorliegt, wurden für die Untersuchung der *ptsGHis*-mRNA dieser Stämme andere Primer verwendet (*pts*-RT2+/-). Es konnte das gleiche Protokoll für die RT-PCR verwendet werden. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB₀ ohne und mit 500 µM IPTG Zugabe. Das Ergebnis der normierten Werte ist in Abbildung 5.77 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass sowohl in JKA11 als auch in JKA11* ohne die Zugabe von IPTG eine *ptsG*-mRNA Menge vorliegt, die mit dem uninduzierten Wildtyp vergleichbar ist. Durch die Zugabe von IPTG konnte die mRNA-Menge von *ptsG* in beiden Stämmen um das etwa siebenfache gesteigert werden. Durch die Verwendung eines starken *tac*_{P0} kann so die Transkription der *ptsG*-mRNA über das durch Glukose induzierte Wildtypniveau angehoben werden. Dies zeigt, dass in JKA11 und JKA11* nach IPTG Induktion ausreichend *ptsG*-mRNA vorhanden ist, die ein gutes Wachstum der Stämme in Minimalmedium mit Glukose ermöglichen müsste. Unterschiede zwischen JKA11 und JKA11* sind nicht in unterschiedlichen mRNA-Leveln von *ptsGHis* begründet. Auffällig ist, dass das mRNA-Level von *ptsG* in JKA11* auf Grund des starken *tac*_{P0} wie erwartet deutlich höher ist, als das eines Wildtypstammes. Trotzdem konnte die Wachstumsgeschwindigkeit von JKA11* nicht über das des Wildtyps hinaus gesteigert werden (s. Abbildung 5.66). Möglicherweise liegt auch hier eine verminderte Transportaktivität des EIICB^{Glc}-His-Derivates vor, oder die maximale Wachstumsgeschwindigkeit ist bereits erreicht.

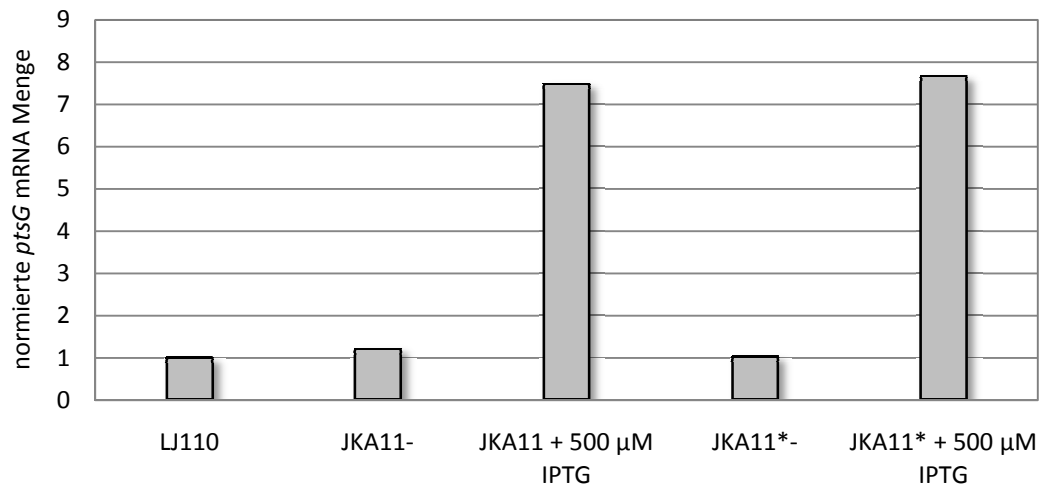


Abbildung 5.77: Berechnung der mRNA-Menge von *ptsG* aus LJ110, JKA11 und JKA11* durch eine RT-PCR

Gezeigt ist ein Diagramm zur Auswertung der RT-PCR von LJ110, JKA11 und JKA11* mit Hilfe des Programms „qbase“ von Biogazelle. Angegeben sind die auf LJ110 normierten Mengen von *ptsG*-mRNA (*glk* als Referenzgen) in den Stämmen nach Anzucht in Vollmedium. Die gekennzeichneten Kulturen wurden mit 500 µM IPTG induziert. Die Werte sind aus drei unabhängig durchgeführten Messungen und anschließende Normierung entstanden. Es ist eine deutliche Induktion der *ptsG* Transkription durch IPTG Zugabe in JKA11 und JKA11* zu erkennen.

Die hier gezeigten RT-PCR Versuche konnten also zeigen, dass weder in JKA4 noch in JKA11 oder JKA11* veränderte *ptsG*-mRNA Mengen vorliegen. Eine verschlechterte Transkription kann also keine Ursache für das verschlechterte Wachstum von JKA11 und JKA4 gegenüber dem Wildtyp sein und auch nicht für die Suppressionsmutation von JKA11*.

5.2.2.8 Bestimmung der spezifischen Transportaktivität verschiedener EIICB^{Glc}-Derivate

Ein weiterer Aspekt, welcher sich auf das Wachstum der Stämme in Minimalmedium mit Glukose auswirken würde, sind die Transportaktivitäten der kodierten Proteine. Verschiedene Gründe können der Auslöser für eingeschränkte Transportaktivitäten der EIICB^{Glc}-Derivate sein, die sich nicht in einem Sequenzfehler oder einer anderen Kopienzahl begründen lassen. Dazu gehören z.B. posttranslationale Modifikationen der Proteine oder veränderte Strukturen und Konformationen, die einen normalen Transport der Glukose behindern.

Aus diesem Grund wurden die Transportaktivitäten der EIICB^{Glc}-Derivate aus verschiedenen Stämmen bestimmt und miteinander verglichen. Die Transportaktivität wurde dabei nicht mit Glukose bestimmt, sondern es wurde ¹⁴C-markierte α -Methyl-Glukose verwendet. Diese wird spezifisch über das EIICB^{Glc} in die Zelle aufgenommen, aber im Gegensatz zur Glukose nicht weiter verstoffwechselt. Dies hat den Vorteil, dass aufgenommene α -Methyl-Glukose sich in den Zellen anreichert und dadurch spezifisch die aufgenommene Menge gemessen werden kann. Die Methode wurde im Wesentlichen nach Schmid et al. durchgeführt (Schmid et al., 1982).

Zur Bestimmung der Transportaktivität von EIICB^{Glc} in verschiedenen Stämmen und unter unterschiedlichen Bedingungen müssen die Zellen zunächst entsprechend angezogen werden. Untersucht wurden dabei sowohl die Transportaktivität von EIICB^{Glc} in LB₀ als auch in Minimalmedium mit Glukose oder Glyzerin. Die verwendeten Stämme waren LJ110 als Wildtypkontrolle, LJ110 Δ *dgsA*, LJ120 als *ptsG*⁻ Kontrolle, plasmidkodierte EIICB^{Glc}-Derivate mit und

ohne „His-Tag“, sowie die hier konstruierten Stämme JKA4, JKA8, JKA11 und JKA11*. Die Bestimmung der Transportaktivität erfolgte nach dem in Kapitel 4.6.2 beschriebenen Protokoll. Daher wurden die Kulturen zunächst unter den gewünschten Bedingungen angezogen (ggf. mit 0,2 % Glukose bzw. 100 μM bis 1 mM IPTG induziert), geerntet und in Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen. Anschließend wurde die OD_{650} der Kultur bestimmt und der Transporttest durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von radioaktiv-markierter α -Methyl-Glukose gestartet und nach 30, 60 und 90 Sekunden eine Probe zur Bestimmung der cpm-Rate (Zerfälle pro Minute) genommen. Die zeitabhängigen cpm-Werte jeder Probe wurden anschließend grafisch aufgetragen, um den Δcpm -Wert pro Minute zu bestimmen. Ein Beispiel der gemessenen cpm-Werte einiger Stämme nach Anzucht in LB_0 ist in Abbildung 5.78 gegeben. Die Abbildung zeigt bei allen Proben einen linearen Zusammenhang zwischen den gemessenen cpm-Werten und der Zeit. Aus diesen Kurven wurde der Δcpm -Wert jeder Probe berechnet und mit Hilfe der Formel 4.7 in Kapitel 4.6.2 die spezifische Transportaktivität der $\text{EiICB}^{\text{Glc}}$ -Derivate in den unterschiedlichen Stämmen berechnet.

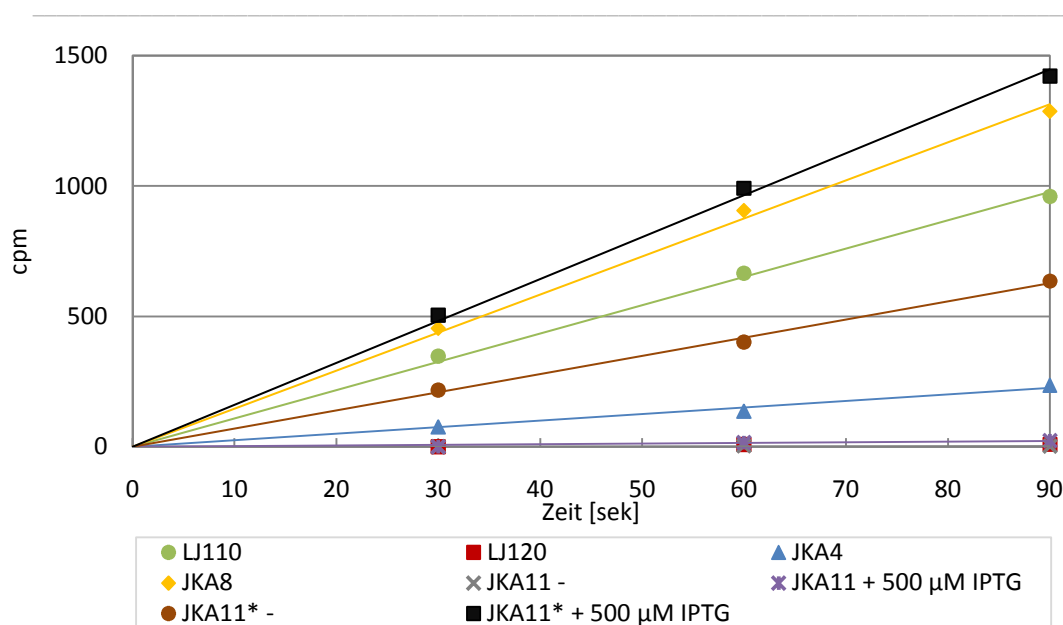


Abbildung 5.78: Beispiel zur Berechnung der Δcpm Werte

Gezeigt ist ein Diagramm zur Berechnung der Δcpm Werte verschiedener Stämme. Die Kulturen wurden in Vollmedium angezogen und einem radioaktiven Transporttest mit ^{14}C -markierter α -Methyl-Glukose unterzogen. Nach 30, 60 und 90 Sekunden wurden Proben genommen, die durch die Zellen aufgenommene Menge der α -MG bestimmt und graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Anhand der gezeigten Ausgleichsgeraden lässt sich der Δcpm -Wert der einzelnen Kulturen bestimmen.

Das Ergebnis des Transportaktivitätstests ist in Abbildung 5.79 gezeigt. Anhand der Auswertung des Transporttests lässt sich beim Wildtyp LJ110 eine um den Faktor 10 erhöhte Transportaktivität des $\text{EiICB}^{\text{Glc}}$ erkennen, wenn der Stamm in Minimalmedium mit Glukose angezogen wird, im Gegensatz zum Vollmedium oder Minimalmedium mit Glycerin. In einem $\text{LJ110}\Delta\text{dgsA}$ Stamm ist bereits im Vollmedium eine hohe Transportaktivität vorhanden, da hier keine Repression der *ptsG*-Expression durch Mlc stattfindet. LJ120 zeigt dagegen keinerlei Transportaktivität für α -Methyl-Glukose, da in diesem Stamm das *ptsG*-Gen fehlt. Diese

Ergebnisse entsprechen demnach den Erwartungen und es kann davon ausgegangen werden, dass die Methode funktioniert.

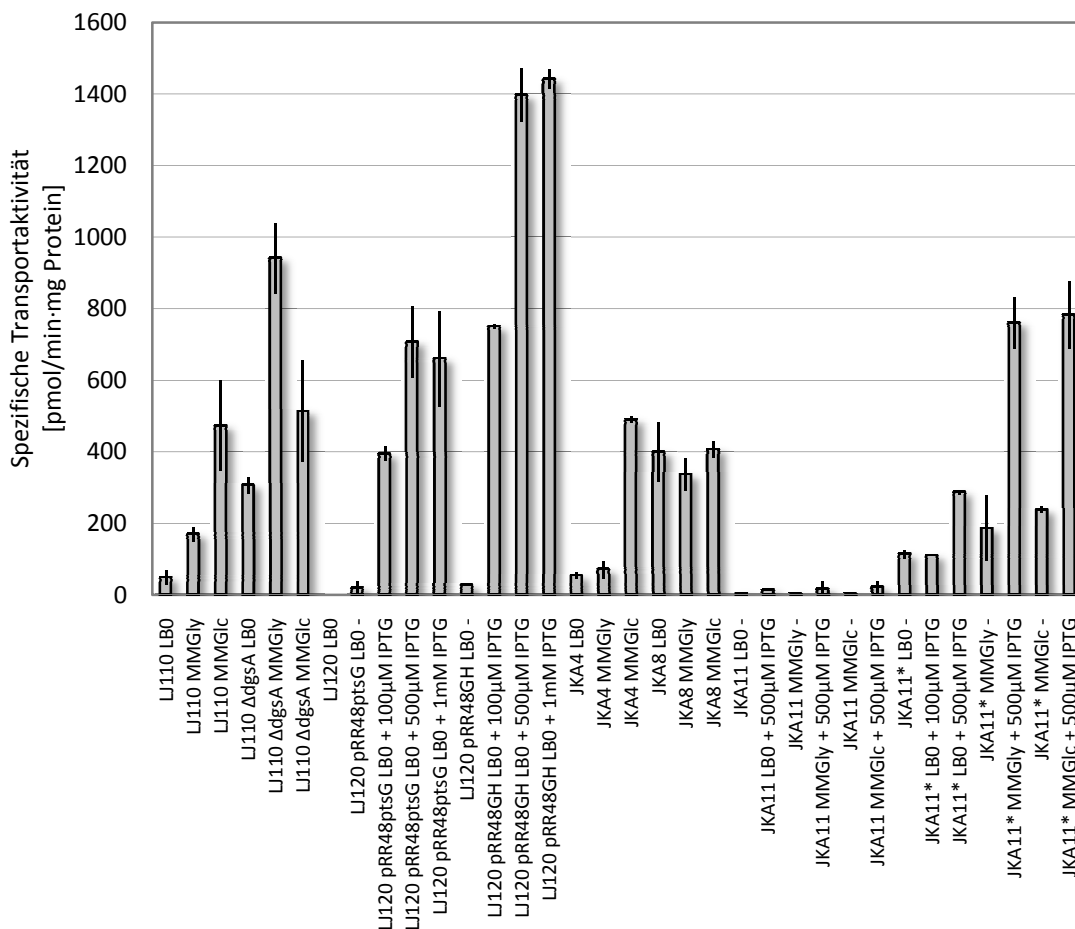


Abbildung 5.79: Auswertung des Transporttests mit ^{14}C -markierter α -Methyl-Glukose

Gezeigt ist ein Balkendiagramm zur spezifischen Transportaktivität von ^{14}C -markierter α -Methyl-Glukose unterschiedlicher Stämme. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Messungen mit Standardabweichung. Die Anzucht der Kulturen erfolgte in den angegebenen Medien. Den gekennzeichneten Kulturen wurde während der Anzucht IPTG zugegeben.

Transformiert man einen LJ120 Stamm mit den Plasmiden pRR48ptsG bzw. pRR48GH, so steigt die Transportaktivität in LB_0 Medium ohne Zugabe von IPTG leicht an. Induziert man die Expression von $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ bzw. $\text{EIICB}^{\text{Glc}}\text{-His}$ mit $100\ \mu\text{M}$ bis $1\ \text{mM}$ IPTG, so steigt die Transportaktivität auf einen bis zu 100-fachen Wert. Dabei zeigt sich, dass ein mit einem „His-Tag“ versehenes $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ keine schlechtere Transportaktivität als ein Wildtyp $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ zeigt. Hier scheint die Transportaktivität im Gegenteil deutlich höher anzusteigen. Dieser Versuch bestätigt, dass die Transportaktivität von $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ durch einen „His-Tag“ nicht beeinflusst wird. Warum der Wert hier höher ist, lässt sich durch einen Transporttest alleine nicht klären.

Der neu konstruierte Stamm JKA4 mit einem *ptsGHis*-Gen im Chromosom unter der Kontrolle eines *ptsG_{P0}* zeigt Transportaktivitäten wie der Wildtyp LJ110. Auch hier findet eine Induktion der Transportaktivität bei Glukose im Medium statt. Dabei lassen sich keine signifikanten

Unterschiede in der Transportaktivität von JKA4 und JKA8 feststellen, sodass keine Rückschlüsse auf ein verschlechtertes Wachstum in Wettbewerbsversuchen gezogen werden können. JKA8 (*JKA4ΔdgsA*) zeigt ebenfalls eine ähnliche Transportaktivität wie der entsprechende Kontrollstamm *LJ110ΔdgsA*.

JKA11 zeigt fast keine Transportaktivität in allen Medien ohne Zugabe von IPTG. Da die Expression des chromosomal kodierten $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His in diesem Fall unter der Kontrolle des tac_{pO} steht, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Allerdings lässt sich die Transportaktivität dieses Stammes auch nicht durch die Zugabe von 500 μM IPTG steigern. Auch in diesem Fall findet fast kein Transport der α -Methyl-Glukose statt. Der Grund für das schlechte Wachstum von JKA11 liegt demnach eindeutig in der schlechten Transportaktivität von $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His begründet. Warum dieser Stamm eine so schlechte Transportaktivität zeigt, lässt sich allerdings mit diesem Transporttest nicht sagen.

Die Suppressionsmutante JKA11* zeigt im Gegensatz zu JKA11 eine mit IPTG induzierbare, hohe Transportaktivität, die mit einem Plasmid kodierten $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ (ebenfalls unter der Kontrolle des tac_{pO}) vergleichbar ist. Der Unterschied zwischen JKA11 und JKA11* liegt demnach in der unterschiedlichen Transportaktivität von $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His.

Der Transporttest konnte zeigen, dass die beiden Stämme JKA4 und JKA8 die gleichen Transportaktivitäten wie die entsprechenden Wildtypstämme zeigen. Hier lässt sich keinerlei Nachteil in der Transportaktivität durch das Vorhandensein eines „His-Tags“ feststellen. Das gleiche Ergebnis konnte mit den plasmidkodierten Derivaten belegt werden. Die Wachstumsdefizite von JKA11 scheinen dagegen in der Transportaktivität des $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His-Derivates begründet zu liegen. Warum dieses Protein eine so geringe Transportaktivität zeigt, konnte dagegen nicht ermittelt werden. Die Suppressionsmutante JKA11* zeigt dagegen wieder einen Transport, wie er bei einem IPTG induzierbaren Gen im Chromosom zu erwarten wäre. Wo der Unterschied zwischen beiden Stämmen JKA11 und JKA11* liegt, konnte mit allen hier gezeigten Versuchen jedoch nicht ermittelt werden.

Die bisher gezeigten Versuche konnten zeigen, dass die Konstruktion der neuen Stämme, mit einem chromosomal kodierten $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His unter der Kontrolle des natürlichen ptsG_{pO} bzw. eines artifizialen, IPTG induzierbaren tac_{pO} erfolgreich waren. In allen Stämmen lässt sich die Expression des $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His nachweisen und ggf. durch IPTG oder Glukosezugabe verstärken. Dabei wurde deutlich, dass der Stamm JKA4 nur einen leichten Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtypstamm aufweist, der sich in Wachstumswettbewerbsversuchen in direkter Konkurrenz zueinander zeigt. Abgesehen davon lässt sich mit diesem Stamm die Expression des $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ unter verschiedenen Bedingungen nachweisen. So zeigt JKA4 nicht nur eine verstärkte Expression von $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ bei Anzucht in Minimalmedium mit Glukose, sondern auch eine verstärkte ptsG -mRNA Bildung und eine erhöhte Transportaktivität. JKA11, mit einem IPTG induzierbaren $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His, zeigt dagegen vermehrte Wachstumsdefizite gegenüber Wildtypstämmen. Auch bei voller Induktion des $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ -His, nachweisbar durch erhöhte Expression und vermehrte mRNA-Bildung, zeigt der Stamm kaum Transportaktivität der Proteine. Ein Grund hierfür könnten Konformationsänderungen oder posttranslationale Modifikationen sein, die in dieser Arbeit jedoch nicht weiter spezifiziert werden konnten. Des Weiteren konnte erfolgreich eine Suppressionsmutante von JKA11 isoliert werden, die keine Wachstumsdefizite gegenüber den

Wildtypstämmen zeigt und auch eine hohe Transportaktivität hat. Wo die Suppression in diesem Stamm zu finden ist, konnte jedoch nicht genauer spezifiziert werden. Vermutlich hängt sie jedoch mit einer veränderten Struktur des Transportproteins EIICB^{Glc} zusammen, da sich hier der größte Unterschied zwischen JKA11 und JKA11* zeigte.

5.2.3 Erstellung von Glukose-Laktose Diauxiekurven

In einem letzten Kapitel sollten die neu konstruierten Stämme in Diauxiekurven mit Laktose und Glukose als Kohlenstoffquellen untersucht werden, um einen besseren Einblick in den Glukosestoffwechsel der Stämme zu bekommen. Um die neu konstruierten Stämme ggf. zur Produktivitätssteigerung in biotechnologischen Prozessen einsetzen zu können, ist zunächst eine detaillierte Betrachtung der Glukoseaufnahme- und verstoffwechsellung notwendig. Diauxiekurven mit zwei angebotenen Kohlenstoffen bieten sich in diesem Fall an.

Werden einem Wildtypstamm zwei Kohlenstoffquellen parallel angeboten, so nimmt dieser zunächst die für ihn besser zu verwertende C-Quelle auf und verstoffwechselt sie, bevor auch die zweite Kohlenstoffquelle verbraucht wird. Handelt es sich bei den beiden Kohlenstoffquellen um Glukose und Laktose, so wird erst die Glukose verstoffwechselt, dann die Laktose (Monod, 1942). Der Stamm zeigt eine so genannte Glukose-Laktose Diauxie oder ein zweiphasiges Wachstum. Das Protein, was hauptsächlich für das Auftreten einer Diauxie verantwortlich ist, ist das EIIA^{Glc}. Während der ersten Phase, der Verstoffwechsellung von Glukose, liegt EIIA^{Glc} zum größten Teil in seiner unphosphorylierten Form vor, da das Phosphat über den EIICB^{Glc}-Komplex beim Transport der Glukose direkt an diese weitergegeben wird. In dieser Form ist es in der Lage, direkt an die Laktose-Permease zu binden und die Aufnahme von Laktose zu verhindern (Induktorausschluss). Zudem bewirkt unphosphoryliertes EIIA^{Glc} eine inaktivierte Adenylatzyklase, dadurch geringe Mengen cAMP und eine verringerte Transkription von cAMP-CAP abhängigen Genen, wie dem Lac-Operon (Katabolitenrepression) (Jahreis, 2010; Postma et al., 1993). In dieser Phase findet ein schnelles Wachstum der Zellen und zudem eine Acetat Exkretion („Overflow“ Metabolismus) statt. Der Übergang zur zweiten Phase, der Laktose-Aufnahme, ist in Wachstumskurven durch einen leichten Einbruch der Wachstumsgeschwindigkeit, d.h. eine kurze lag-Phase, gekennzeichnet (s. Abbildung 5.80). Dies liegt vermutlich an den fehlenden Enzymen für den Laktose-Stoffwechsel, die während der Glukose-Phase durch Induktorausschluss und Katabolitenrepression inhibiert wurden. Im Anschluss an die Lag-Phase beginnt die Wachstumsrate wieder zu steigen und die Zellen nehmen die Laktose auf. In dieser Phase beginnt die Menge an phosphoryliertem EIIA^{Glc} zu steigen, bis sie etwa 80 % bis 100 % erreicht. Auch hier wird Acetat exkretiert. Nachdem auch die Laktose vollständig verbraucht ist, lässt sich eine kurze Phase des Wachstums auf dem exkretierten Acetat feststellen, bei der das EIIA^{Glc} zu fast 100 % phosphoryliert vorliegt. Aus diesem Grund lässt sich auch die Vermutung aufstellen, dass es sich bei dem Wachstum der Zellen auf Glukose und Laktose nicht um ein zwei- sondern ein mehrphasiges Wachstum handelt (Bettenbrock, unveröffentlichte Daten). Wird beim Wachstum auf Glukose und Laktose zunächst die vermeintlich schlechtere Kohlenstoffquelle, die Laktose, von den Zellen aufgenommen und verstoffwechselt, so spricht man von einer reversen Diauxie. Dies kann z.B. durch Mutationen im Glukosestoffwechsel hervorgerufen werden.

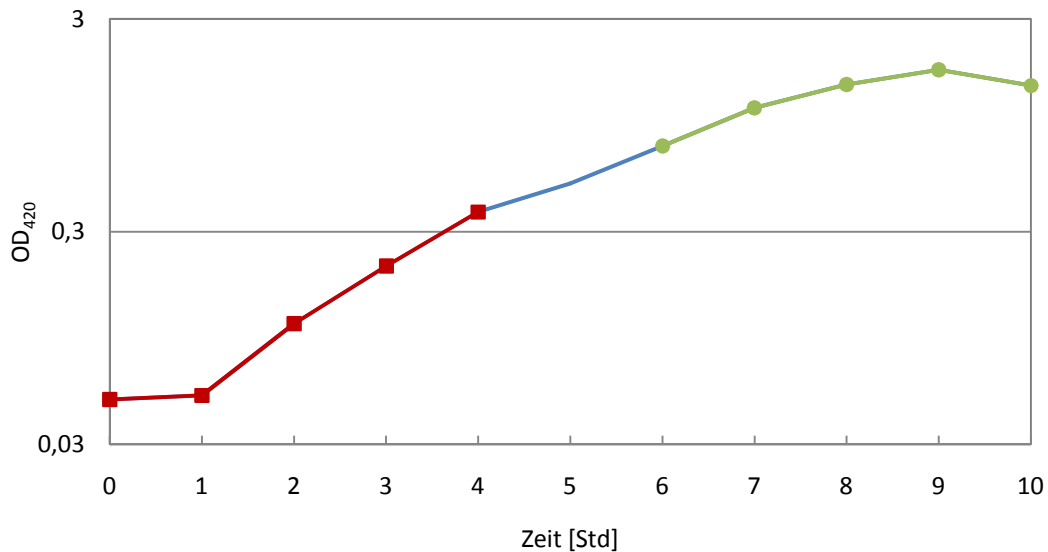


Abbildung 5.80: Wachstumskurve zur Glukose-Laktose Diauxie von LJ110

Die dargestellte Wachstumskurve zeigt das Wachstumsverhalten von LJ110 in Minimalmedium mit 0,05 % Glukose und 0,05 % Laktose. Der erste Teil der Kurve kennzeichnet die erste Phase der Diauxie, das Wachstum der Zellen auf Glukose (rot). Es folgt eine kurze Lag-Phase beim Übergang zur nächsten Phase (blau). Die zweite Phase zeichnet sich durch einen erneuten Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit und eine Verstoffwechslung der Laktose aus (grün). Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte photometrisch über 10 Stunden. Die optische Dichte ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen.

Die in dieser Arbeit konstruierten Stämme JKA4, JKA11 und JKA11* sollten in Diauxiekurven mit Glukose und Laktose untersucht werden. Für die Aufnahme von Diauxiekurven wurden die Zellen in Minimalmedium mit 0,05 % Glukose und 0,05 % Laktose angezogen. Jede Stunde wurden Proben entnommen für die Bestimmung der optischen Dichte (Daten nicht gezeigt), die Bestimmung der extrazellulären Glukose- bzw. Laktosekonzentration und zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades des EIIA^{Glc}. Um zu ermitteln, welche Kohlenstoffquelle zu welchem Zeitpunkt des Wachstums verbraucht wird, kann die extrazelluläre Menge an Glukose bzw. Laktose im Medium zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen werden. Auch der Phosphorylierungszustand des Proteins EIIA^{Glc} gibt Aufschluss über die genutzte Kohlenstoffquelle und die Phase der Diauxie, in welcher sich der Stamm zum Zeitpunkt der Messung befindet. Das Ergebnis der Glukose- und Laktosebestimmung sowie des EIIA^{Glc}-P Anteils für den Wildtypstamm LJ110 ist in Abbildung 5.81 (A) dargestellt.

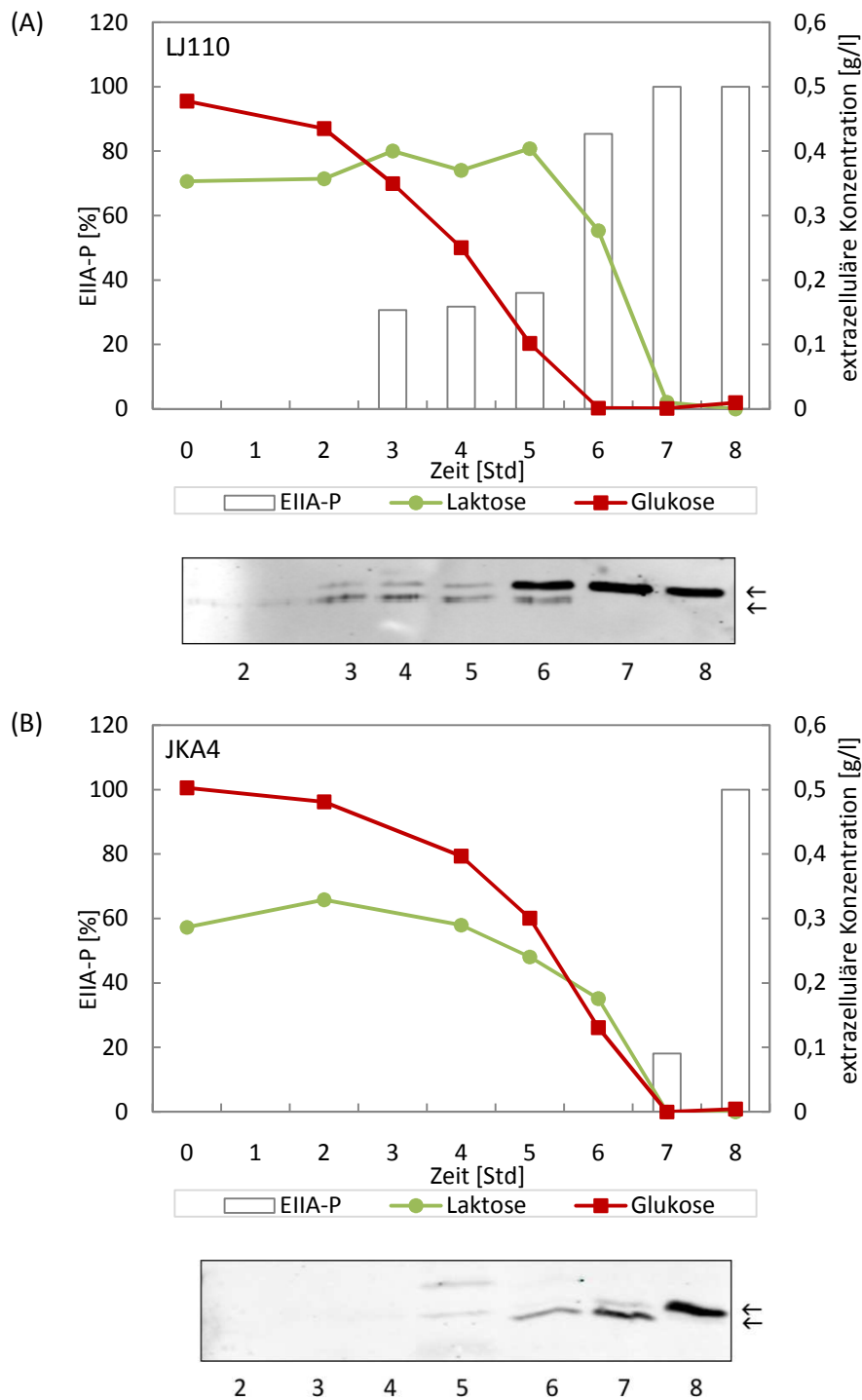


Abbildung 5.81: Bestimmung der extrazellulären Glukose- und Laktosekonzentration sowie des EIIA^{Glc}-P Anteils in einer Glukose-Laktose Diauxie von LJ110 und JKA4

Mit: (A) LJ110 und (B) JKA4. Gezeigt ist je oben ein Diagramm mit Angaben der extrazellulären Glukose- und Laktosekonzentrationen in g/l sowie der prozentualen Anteile an EIIA^{Glc}-P an der Gesamtmenge dieses Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten in einer Glukose-Laktose Diauxie. Die Anzucht der Zellen erfolgte in MM mit 0,05 % Glukose und 0,05 % Laktose. Die Bestimmung des EIIA^{Glc}/EIIA^{Glc}-P Verhältnisses erfolgte durch Quantifizierung der Banden des unten gezeigten Westernblots. Im Immunoblot wurde die Membran mit Anti-EIIA^{Glc} Antikörpern und entsprechenden sekundär Antikörpern behandelt. Die obere Bande bei ca. 20 kDa repräsentiert EIIA^{Glc}-P, die untere Bande EIIA^{Glc}. Die Kennzeichnung der Banden bezieht sich auf die Zeitpunkte der Probenentnahme.

Die Abbildung zeigt, dass LJ110 eine normale Diauxie aufweist. Dabei findet zunächst eine Aufnahme und Verstoffwechslung der Glukose statt, was sich durch die Abnahme der extrazellulären Glukosekonzentration zeigt. Der Anteil an phosphoryliertem EIIA^{Glc} liegt in dieser Phase (Stunden 0 bis 5) bei ca. 30 %. Die Bestimmung des EIIA^{Glc}/EIIA^{Glc}-P Verhältnisses erfolgte in Westernblots mit EIIA-spezifischen Antikörpern. Dabei lässt sich ein Unterschied im Molekulargewicht zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem EIIA^{Glc} nachweisen. Im Westernblot läuft phosphoryliertes EIIA^{Glc} bei ca. 20 kDa, unphosphoryliertes leicht darunter. Die Bestimmung der EIIA^{Glc}-P Menge erfolgte durch Quantifizierung der beiden Banden mit dem Odyssey-Scanner. Eine Messung des EIIA^{Glc}/EIIA^{Glc}-P Verhältnisses zu Beginn des Wachstums (Stunden 0 bis 2) konnte auf Grund einer zu niedrigen Zellzahl nicht durchgeführt werden. Beim Übergang in die nächste Phase lässt sich eine kurze Lag-Phase im Wachstum beobachten (s. Abbildung 5.80, Stunde 5). Nachdem die Glukose vollständig verbraucht ist, findet eine Aufnahme der Laktose statt (Stunden 6 bis 7). Der Anteil an phosphoryliertem EIIA^{Glc} steigt in dieser Phase auf bis zu 90 %. Nach Verbrauch beider Kohlenstoffquellen (ab Stunde 8), findet zunächst weiterhin ein geringes Wachstum der Zelldichte statt (s. Abbildung 5.80), welches vermutlich auf der Aufnahme von zuvor exkretiertem Acetat beruht. Hier ist das EIIA^{Glc} zu fast 100 % phosphoryliert. Erst nach 10 Stunden tritt kein weiteres Wachstum der Zelldichte auf.

Der Stamm JKA4 zeigt ein ähnliches Verhalten in Diauxiekurven (s. Abbildung 5.81 (B)). Auch er verstoffwechselt zunächst die Glukose und dann die Laktose. Der Phosphorylierungszustand des EIIA^{Glc} ist ebenfalls vergleichbar mit dem des Wildtyps LJ110. Allerdings lässt sich hier eine leicht verlangsamte Verstoffwechslung der Glukose beobachten, da JKA4 erst nach 7 Stunden die gesamte Glukose verbraucht hat, LJ110 dagegen schon nach 6 Stunden. Dies entspricht den zuvor aufgestellten Beobachtungen, dass JKA4 ein leichtes Wachstumsdefizit gegenüber LJ110 zeigt.

Die Diauxiekurven der beiden Mlc⁻ Stämme LJ110Δ*dgsA* und JKA8 zeigen ein sehr ähnliches Verhalten (s. Abbildung 5.82). Bei beiden findet zunächst eine Verstoffwechslung der Glukose statt, erst dann wird die Laktose aufgenommen. Der Phosphorylierungsgehalt des EIIA^{Glc} ist ebenfalls vergleichbar mit den Wildtypbestimmungen. Die Deletion des Gens *dgsA* für die Expression von Mlc hat demnach keinen Einfluss auf das Verhalten der Stämme in einer Diauxie mit Glukose und Laktose. Da Mlc lediglich einen reprimierenden Einfluss unter Glukosemangelbedingungen auf *ptsG* hat, entspricht dies den Erwartungen.

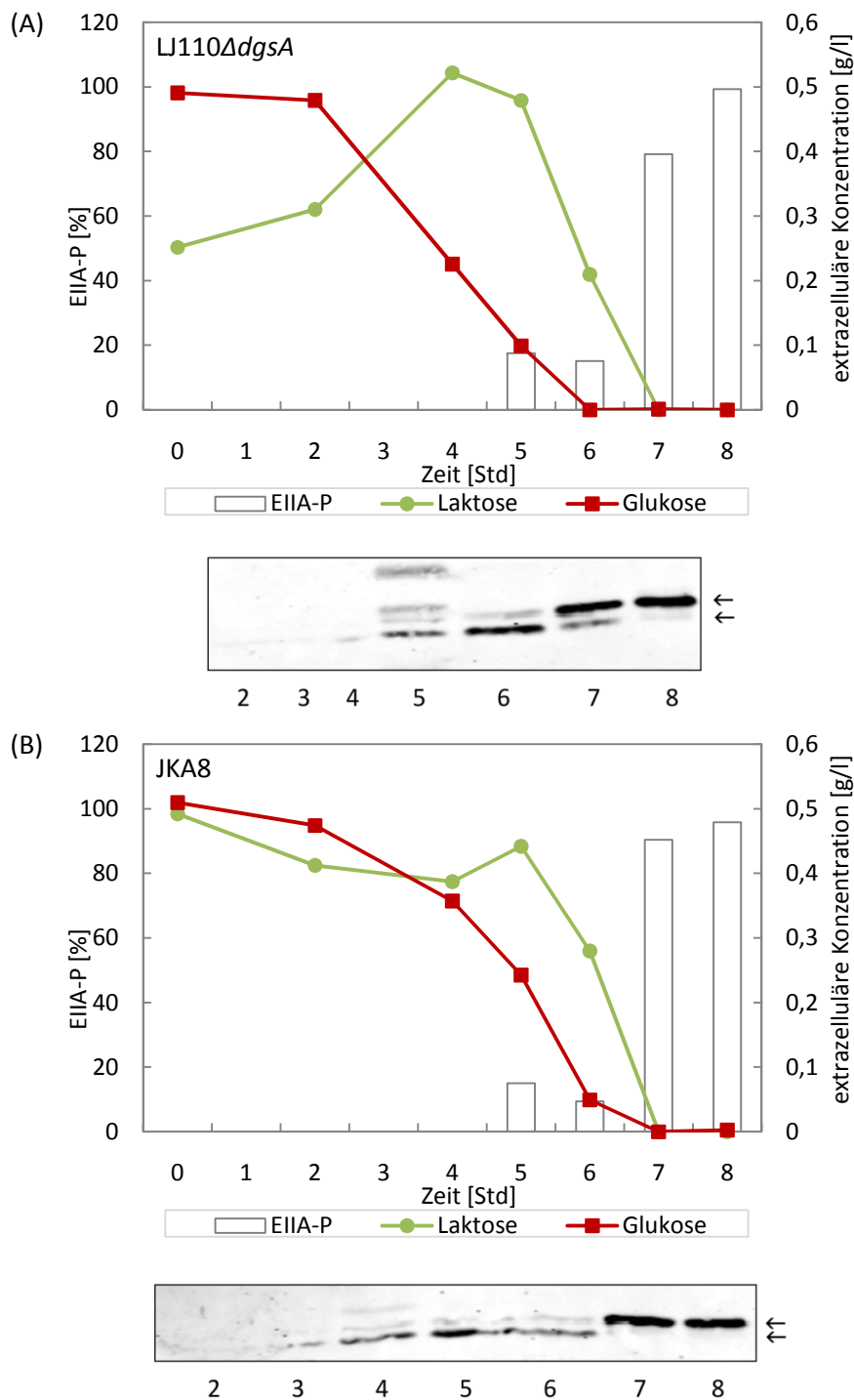


Abbildung 5.82: Bestimmung der extrazellulären Glukose- und Laktosekonzentration sowie des EIIA^{Glc}-P Anteils in einer Glukose-Laktose Diauxie von LJ110ΔdgsA und JKA8

Mit: (A) LJ110ΔdgsA und (B) JKA8. Gezeigt ist je oben ein Diagramm mit Angaben der extrazellulären Glukose- und Laktosekonzentrationen in g/l sowie der prozentualen Anteile an EIIA^{Glc}-P an der Gesamtmenge dieses Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten in einer Glukose-Laktose Diauxie. Die Anzucht der Zellen erfolgte in MM mit 0,05 % Glukose und 0,05 % Laktose. Die Bestimmung des EIIA^{Glc}/EIIA^{Glc}-P Verhältnisses erfolgte durch Quantifizierung der Banden des unten gezeigten Westernblots. Im Immunoblot wurde die Membran mit Anti-EIIA^{Glc} Antikörpern und entsprechenden sekundär Antikörpern behandelt. Die obere Bande bei ca. 20 kDa repräsentiert EIIA^{Glc}-P, die untere Bande EIIA^{Glc}. Die Kennzeichnung der Banden bezieht sich auf die Zeitpunkte der Probenentnahme.

Der ebenfalls in dieser Arbeit konstruierte Stamm JKA11 zeigt ein anderes Verhalten in einer Diauxie mit Glukose und Laktose. Bereits in Wachstumskurven konnte gezeigt werden, dass JKA11 Defizite im Wachstum in Minimalmedium mit Glukose aufweist. Dies bestätigt sich in den hier gezeigten Untersuchungen zur Diauxie. Wird JKA11 zusätzlich zur Glukose auch Laktose angeboten, so zeigt der Stamm eine reverse Diauxie, d.h. er nimmt zunächst die vermeintlich schlechtere Kohlenstoffquelle, die Laktose, auf. Dabei ist es unerheblich, ob die Expression des EIICB^{Glc} durch Zugabe von IPTG induziert wurde oder nicht (s. Abbildung 5.83).

Ohne die Zugabe von IPTG zur Kultur zeigt JKA11 zunächst eine Verstoffwechselung der Laktose. Erst wenn diese nahezu vollständig verbraucht ist, setzt eine geringe Aufnahme der Glukose ein. Der Phosphorylierungsgehalt des EIIA^{Glc} scheint nicht beeinflusst zu sein und zeigt ein zu erwartendes Ergebnis. Nach dem Modell sollte durch IPTG Induktion die Expression von EIICB^{Glc} induziert und damit die Glukoseaufnahme gesteigert werden. Die Diauxiekurve zeigt jedoch, dass auch nach IPTG Zugabe zunächst eine Verstoffwechselung der Laktose stattfindet, bevor eine langsame Aufnahme der Glukose einsetzt. Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen demnach den Defekt der Glukose-Verstoffwechselung von JKA11, der sich in vorigen Wachstumsanalysen schon zeigte. Die Transporttests gaben einen Hinweis darauf, dass die Glukoseaufnahme durch EIICB^{Glc} in JKA11 gestört ist, wodurch sich auch die reverse Diauxie erklären lässt. Warum ein Defekt im Transport vorliegt, lässt sich jedoch nicht sagen. Da das EIIA^{Glc} ein normales Phosphorylierungsverhalten zeigt, scheint die Phosphorylierung von EIICB^{Glc} nicht beeinflusst und damit nicht verantwortlich zu sein.

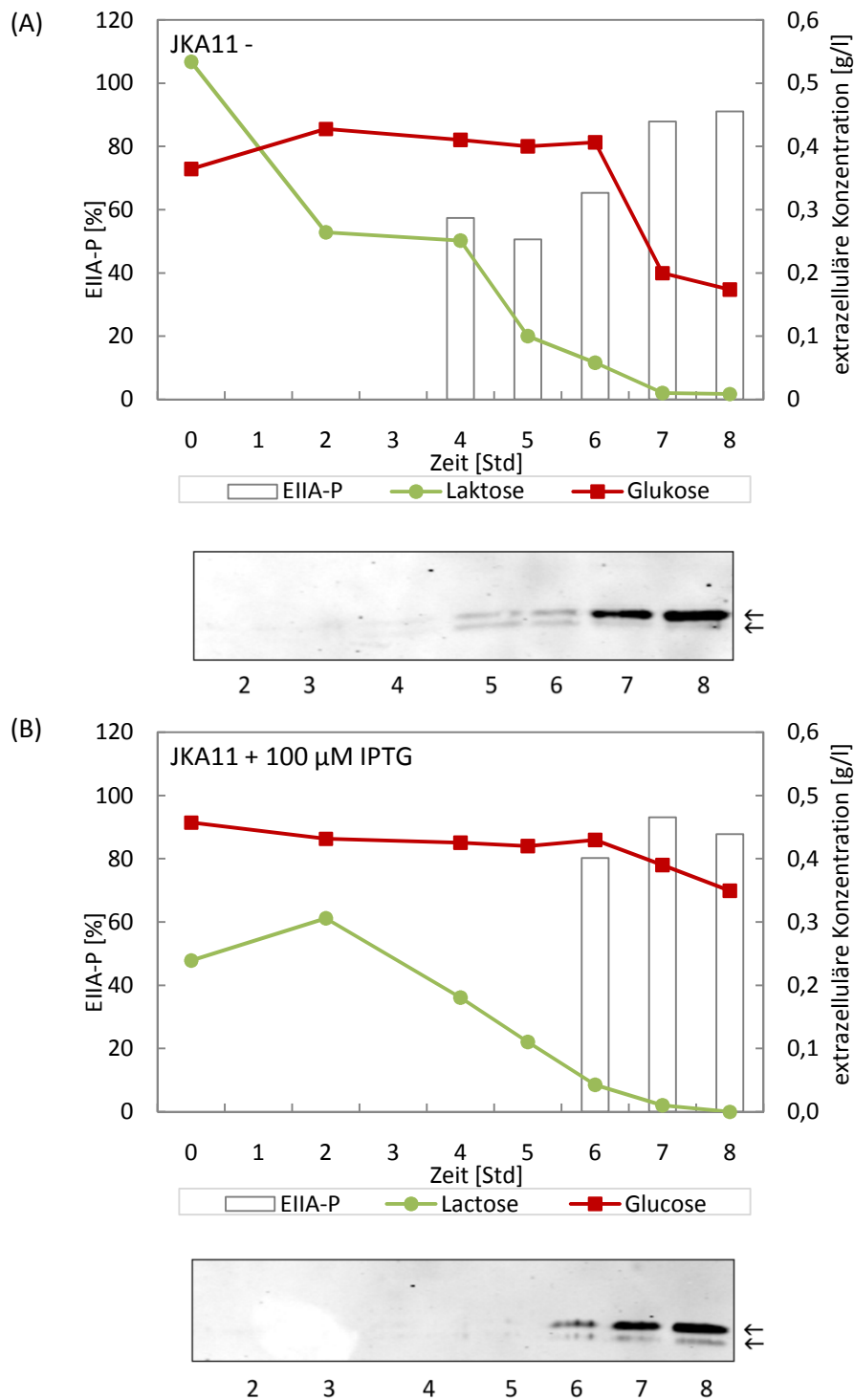


Abbildung 5.83: Bestimmung der extrazellulären Glukose- und Laktosekonzentration sowie des EIIA^{Glc}-P Anteils in einer Glukose-Laktose Diaxie von JKA11

Mit: (A) JKA11 ohne IPTG-Zugabe und (B) JKA11 mit Zugabe von 100 μ M IPTG. Gezeigt ist oben je ein Diagramm mit Angaben der extrazellulären Glukose- und Laktosekonzentrationen in g/l sowie der prozentualen Anteile an phosphoryliertem EIIA^{Glc} an der Gesamtmenge dieses Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten in der Glukose-Laktose Diaxie von JKA11. Die Anzucht der Zellen erfolgte in MM mit 0,05 % Glukose und 0,05 % Laktose. Bei (B) wurde zusätzlich 100 μ M IPTG zu Beginn des Wachstums zur Kultur gegeben. Die Bestimmung des EIIA^{Glc}/EIIA^{Glc}-P Verhältnisses erfolgte durch Quantifizierung der Banden des unten gezeigten Westernblots. Im Immunoblot wurde die Membran mit Anti-EIIA^{Glc} Antikörpern und entsprechenden sekundär Antikörpern behandelt. Die obere Bande bei ca. 20 kDa repräsentiert EIIA^{Glc}-P, die untere Bande EIIA^{Glc}. Die Kennzeichnung der Banden bezieht sich auf die Zeitpunkte der Probenentnahme.

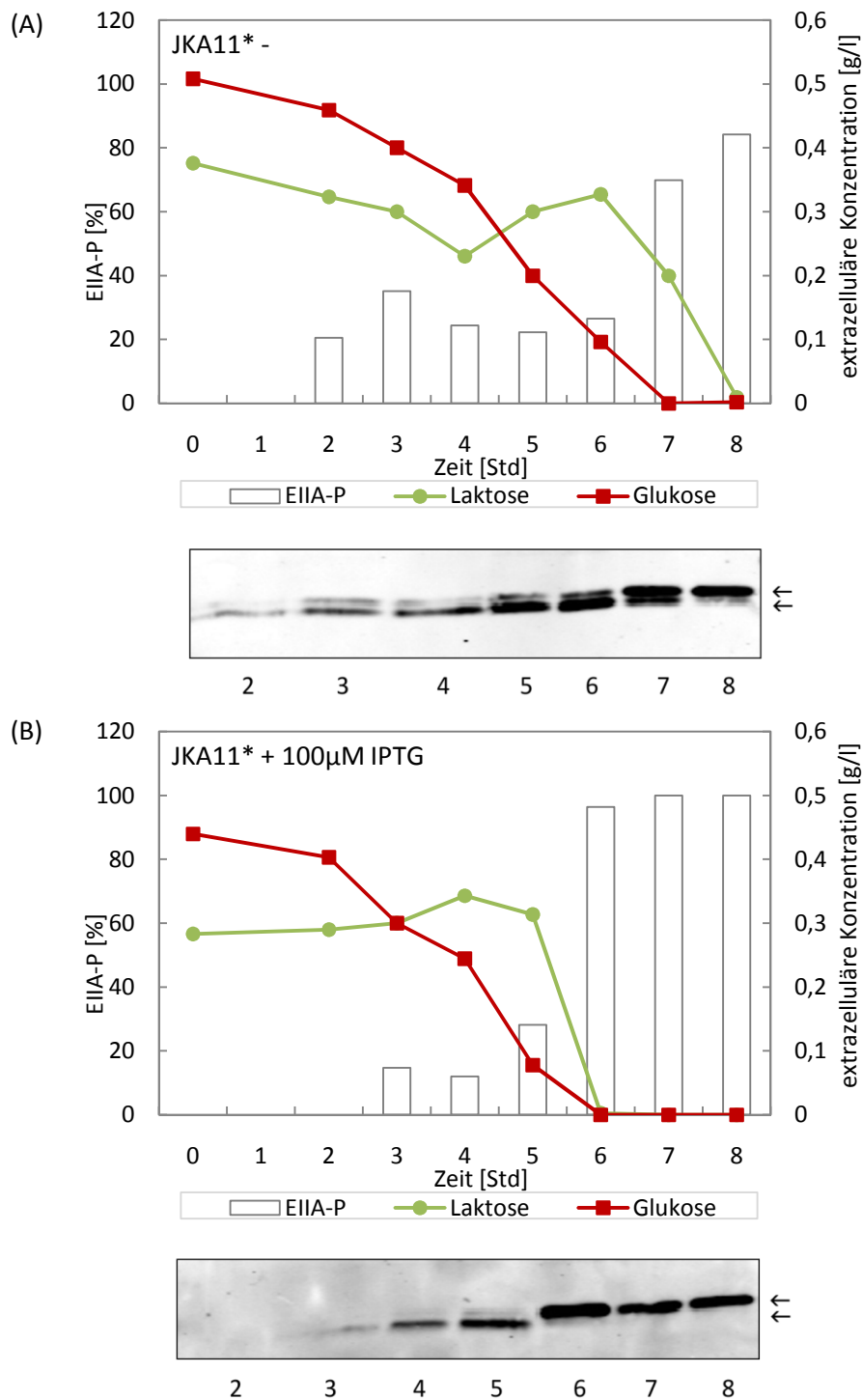


Abbildung 5.84: Bestimmung der extrazellulären Glukose- und Laktosekonzentration sowie des EIIA^{Glc}-P Anteils in einer Glukose-Laktose Diauxie von JKA11*

Mit: (A) JKA11* ohne IPTG-Zugabe und (B) JKA11* mit Zugabe von 100 μ M IPTG. Gezeigt ist oben je ein Diagramm mit Angaben der extrazellulären Glukose- und Laktosekonzentrationen in g/l sowie der prozentualen Anteile an phosphoryliertem EIIA^{Glc} an der Gesamtmenge dieses Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten in der Glukose-Laktose Diauxie von JKA11. Die Anzucht der Zellen erfolgte in MM mit 0,05 % Glukose und 0,05 % Laktose. Bei (B) wurde zusätzlich 100 μ M IPTG zu Beginn des Wachstums zur Kultur gegeben. Die Bestimmung des EIIA^{Glc}/EIIA^{Glc}-P Verhältnisses erfolgte durch Quantifizierung der Banden des unten gezeigten Westernblots. Im Immunoblot wurde die Membran mit Anti-EIIA^{Glc} Antikörpern und entsprechenden sekundär Antikörpern behandelt. Die obere Bande bei ca. 20 kDa repräsentiert EIIA^{Glc}-P, die untere Bande EIIA^{Glc}. Die Kennzeichnung der Banden bezieht sich auf die Zeitpunkte der Probenentnahme.

Die Suppressionsmutante JKA11* zeigte bereits in Wachstumsanalysen ein anderes Verhalten als JKA11. Hier konnte ein gutes Wachstum in Minimalmedium mit Glukose gezeigt werden, ohne einen Unterschied zum Wildtyp. Auch die Transporttests zeigten eine hohe, IPTG induzierbare, Transportaktivität des EIICB^{Glc}-His. Die hier gezeigten Diauxie-Untersuchungen zeigen ein ähnliches Ergebnis. Auch ohne die Zugabe von IPTG nimmt JKA11* zunächst die Glukose, erst dann die Laktose auf (s. Abbildung 5.84). Während der Glukose-Phase liegt der Anteil an phosphoryliertem EIIA^{Glc} bei ca. 30 %, während der Laktose-Phase steigt er auf etwa 70 % und liegt in der Endphase bei 90 %. Damit zeigt JKA11* eine mit dem Wildtyp LJ110 vergleichbare Diauxie. Durch die Induktion der EIICB^{Glc}-His Expression lässt sich sowohl die Glukose- als auch die Laktoseaufnahme beschleunigen. Dennoch wird auch hier zunächst die Glukose verstoffwechselt.

Die hier gezeigten Diauxie Kurven zeigen eine Bestätigung der zuvor aufgestellten Vermutungen. JKA4 zeigt eine normale Diauxie, die dem Wildtyp LJ110 ähnelt. Lediglich eine leicht verzögerte Aufnahme der Glukose konnte beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Konstruktion von JKA4 erfolgreich war und der Stamm für verschiedene Analysen bezüglich der Expression des EIICB^{Glc} eingesetzt werden könnte. Dabei ist besonders die unterschiedlich starke Genexpression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und Medien von Interesse. Die Auswirkung einer *sgrRST*-Deletion auf die EIICB^{Glc} Expression wäre ebenfalls interessant zu beobachten.

In den Diauxiekurven von JKA11 zeigt sich dagegen noch einmal die Vermutung bestätigt, dass hier ein Defekt in der Glukoseaufnahme vorliegt. Selbst wenn Glukose angeboten wird, nimmt der Stamm zunächst die schlechtere Kohlenstoffquelle, die Laktose, auf. Auf Grund dieser Wachstumsdefizite eignet sich der Stamm nicht für die Untersuchung der Expression von EIICB^{Glc}. Dagegen konnte erfolgreich eine Suppressionsmutante isoliert werden, die keine Wachstumsdefizite zeigt. Auch in den Diauxiekurven verstoffwechselt dieser Stamm, JKA11*, zunächst die Glukose. Allerdings nimmt der Stamm auch ohne Induktion der EIICB^{Glc} Expression bereits die Glukose zuerst auf und dann die Laktose. Dies deutet darauf hin, dass keine vollständige Unterdrückung der *ptsG*-Expression durch den *tac*_{PO} stattfindet. Aus diesem Grund ist auch dieser Stamm nur bedingt geeignet, die unterschiedlichen Expressionslevel von EIICB^{Glc} und das damit verbundene Wachstumsverhalten zu beobachten, da scheinbar die Expression nicht vollständig abgeschaltet werden kann.

Die Konstruktion eines Stammes mit chromosomal kodiertem und IPTG induzierbarem EIICB^{Glc}-His konnte demnach nicht optimal gelöst werden und erfordert eine weitere Optimierung.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung peripherer und artifizierlicher Regulationsmechanismen des Glukose-PTS, u.a. im Hinblick auf die Produktivitätssteigerung von *E.coli*-Stämmen in biotechnologischen Prozessen. Dabei wurden zwei Systeme genauer betrachtet, auf der einen Seite das SgrRST-System, im Besonderen die Regulation der EIICB^{Glc}-Aktivität durch das regulatorische Protein SgrT, und auf der anderen Seite die artifizierlich hervorgerufene Regulation des EIICB^{Glc} durch IPTG-induzierbare Expression. In der Diskussion werden die hier gezeigten Ergebnisse in Verbindung zu bisherigen Forschungsergebnissen gesetzt und diskutiert. Zudem wird ein Ausblick auf eine mögliche weiterführende Untersuchung der vorgestellten Erkenntnisse gegeben. Die Diskussion gliedert sich in drei Teile, wobei sich der erste mit der Regulation des EIICB^{Glc} durch das kleine Protein SgrT beschäftigt und der zweite mit der Konstruktion von Stämmen mit chromosomal kodiertem EIICB^{Glc}-His. Im dritten Abschnitt findet eine Bewertung der gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Optimierung von *E.coli*-Stämmen für biotechnologische Prozesse statt.

6.1 Regulation der EIICB^{Glc}-Aktivität durch das kleine Protein SgrT

Escherichia coli K-12 stellt eines der am besten untersuchten Mikroorganismen in der Biologie dar. Dennoch sind auch bei diesem seit vielen Jahren untersuchten Organismus immer noch viele Funktionen von Proteinen und deren Genen unbekannt. Dabei stellen besonders komplexe Regulationssysteme die Wissenschaft immer wieder vor neue Herausforderungen. Das Glukose-Phosphotransferasesystem (PTS) ist das Hauptaufnahmesystem für Glukose von *E.coli* und einer Vielzahl von Regulationen unterworfen. An der Regulation der EIICB^{Glc} Transkription und Aktivität unter Glukose-6-Phosphatstress ist besonders das SgrRST-System beteiligt. Vom Transkriptionsaktivator unter Stressbedingungen aktiviert, inhibiert die sRNA *sgrS* die Translation der *ptsG*-mRNA und initiiert deren Abbau durch RNaseE. Zusätzlich sorgt das kleine Protein SgrT (von *sgrS* kodiert) für eine verringerte Aufnahme der Glukose durch Herabsetzen der Transportaktivität von bereits bestehenden EIICB^{Glc}-Proteinen. Dabei war der Mechanismus der Aktivitätskontrolle von EIICB^{Glc} durch das kleine regulatorische Protein bisher unklar und damit Hauptaspekt der Untersuchungen in dieser Arbeit.

6.1.1 SgrT wird von einer sRNA kodiert und stellt einen völlig neuartigen Mechanismus der Glukose-Regulation dar

Glukose, das Hauptsubstrat von *E.coli*, wird über das Glukose-PTS in die Zelle aufgenommen und dabei gleichzeitig zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Während Glukose-6-Phosphat auf der einen Seite ein essentielles Intermediat im Glukose-Metabolismus darstellt, ist die Anhäufung von Glukose-6-Phosphat auf der anderen Seite toxisch für die Zelle und verursacht so genannten Zuckerphosphatstress. Aiba et al. machten die Beobachtung, dass unter diesen Bedingungen die *ptsG*-mRNA spezifisch abgebaut wird, dadurch limitierte Mengen an EIICB^{Glc} Transporter gebildet und die Zellen vor einer weiteren Anhäufung des Glukose-6-Phosphats geschützt werden (Kimata et al., 2001). Vanderpool et al. konnten den Abbau der *ptsG*-mRNA anschließend in Verbindung mit der kleinen regulatorischen sRNA *sgrS* setzen und verschiedene Arbeitsgruppen den Mechanismus aufklären, in dem *sgrS*, von SgrR aktiviert, die *ptsG*-mRNA Hfq-abhängig bindet und

so ein Signal zum Abbau durch die RNaseE bildet (Kawamoto, 2005; Morita et al., 2004; Vanderpool und Gottesman, 2004; Zhang et al., 2003).

Mit einer Länge von etwa 220 Nukleotiden ist *sgrS* länger als die meisten anderen sRNAs, was in der Tatsache begründet liegt, dass *sgrS* neben der Funktion als sRNA auch für ein kleines Peptid, SgrT, kodiert und so eine mRNA Funktion übernimmt. Damit ist *sgrS* die erste identifizierte Hfq-abhängige sRNA in *E.coli*, die eine solche duale Funktion aufweist (Wadler und Vanderpool, 2007). Das Prinzip bifunktionaler RNAs ist dagegen nicht neu, sondern auch aus anderen Organismen bekannt, z.B. *Staphylococcus aureus*, *Drosophila melanogaster* oder *Xenopus laevis* (s. Einleitung, Kapitel 1.4).

Das Protein SgrT wird am 5'-Ende von *sgrS* kodiert und befindet sich damit außerhalb der Basenpaar ausbildenden Region von *sgrS* am 3'-Ende (Wadler und Vanderpool, 2007). Mit nur 43 Aminosäuren stellt es ein sehr kleines Peptid dar, das dennoch eine wichtige Funktion in der Zelle übernehmen kann. Beide Funktionen von *sgrS*, d.h. *sgrS* als sRNA und SgrT als regulatorisches Protein, sind physiologisch redundant und in der Lage, die Bakterienzelle vor Glukose-6-Phosphatstress zu schützen. So zeigte die Überproduktion von SgrT eine deutliche Repression des Wachstums der Zellen in Minimalmedium mit Glukose (s. Abbildung 5.2 und (Wadler und Vanderpool, 2007)). Die Funktionsweisen von *sgrS* und SgrT sind dagegen unterschiedlich, da bereits von Vanderpool et al. gezeigt werden konnte, dass SgrT weder das mRNA-Level von *ptsG* noch die EIICB^{Glc}-Proteinstabilität beeinflusst, sondern vermutlich durch Proteinwechselwirkungen mit dem Transporter EIICB^{Glc} dessen Aktivität herabsetzt (Morita und Aiba, 2007; Wadler und Vanderpool, 2007). Die direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (s. auch Kapitel 6.1.2).

Betrachtet man die Homologie von *sgrS* und SgrT in unterschiedlichen Organismen, wird deutlich, dass *sgrS* sehr stark in verschiedenen Enterobakterien konserviert ist, eine SgrT Sequenz ist dagegen zwar häufig vorhanden, aber weniger stark konserviert. Einige Ausnahmen, z.B. *Yersinia pestis* zeigen sogar gar keine SgrT kodierende Region im *sgrS* (Wadler und Vanderpool, 2009). Die SgrT-homologen Proteine haben eine Länge zwischen 40 und 57 Aminosäuren und obwohl die Sequenz nicht sehr konserviert ist, existieren einige konservierte Leucin-Reste sowie ein sich wiederholendes Motiv aus einem polaren Rest gefolgt von einem aromatischen Rest, denen eine besondere Funktion in der Wechselwirkung mit dem Zielprotein zugesprochen wird (s. Abbildung 1.7 und (Horler und Vanderpool, 2009)). Eine der Aminosäuren des sich wiederholenden Motives (Tyrosin an Position 8) konnte in dieser Arbeit als für die Funktionalität von SgrT wichtig identifiziert werden (s. Abbildung 5.51). Weitere Untersuchungen sind allerdings notwendig, um zu klären, ob diese Aminosäure an der Struktur und Stabilität des Proteins beteiligt ist oder direkt die Funktionalität durch Bindung des Interaktionspartners beeinflusst. Zudem könnte eine Analyse aller konservierten Aminosäuren möglicherweise weitere essentielle Aminosäuren für Struktur, Stabilität und Funktionalität von SgrT identifizieren.

Die Synthese von SgrT aus dem *E.coli* K-12 Stamm ist, vermutlich auf Grund von Sekundärstrukturen der sRNA, unter dem natürlichen Promotor nur sehr gering, auch wenn Glukose-6-Phosphatstress gegeben ist (Wadler und Vanderpool, 2009). Die Expression SgrT-homologer Proteine aus anderen Organismen in *E.coli* ist dagegen deutlich höher und kann das Wachstum der Zellen in Minimalmedium mit Glukose reprimieren, z.B. SgrTkpn aus *Klebsiella pneumoniae* (s. Abbildung 5.7 und (Wadler und Vanderpool, 2009)). Dies, und die Betrachtungen

der Homologie von SgrT und *sgrS*, machen deutlich, dass die Bedeutung von SgrT in verschiedenen Organismen vermutlich unterschiedlich ausfällt. So scheint die Basenpaar-bildende Funktion von *sgrS* die Hauptaufgabe in *E.coli* und *Yersinia pestis* zu sein, während z.B. in *K.pneumoniae* auch SgrT eine wichtige Aufgabe zu übernehmen scheint (Horler und Vanderpool, 2009; Wadler und Vanderpool, 2009). Dies könnte auch ein Grund sein, warum die Untersuchungen von SgrTec und SgrTkpn in dieser Arbeit zum Teil unterschiedliche Ergebnisse lieferten und besonders in Wachstumskurven unterschiedlich starke Auswirkungen zeigten. Besonders die Expression von SgrTkpn in *E.coli* führte zu einem stark eingeschränkten Wachstum der Zellen in unterschiedlichen Medien (s. z.B. Kapitel 5.1.1.2 und 5.1.5.2). Weitere Untersuchungen des SgrTkpn könnten möglicherweise Hinweise auf wichtige funktionelle Aminosäuren im SgrT geben. Konservierte Aminosäuren in den homologen Proteinen könnten sich dabei als besonders interessant herausstellen und sollten in weiterführenden Arbeiten genauer untersucht werden.

Vergleiche der Homologie der *sgrRST*-Region und *ptsG* zeigten, dass die *sgrRST*-Region nicht so verbreitet ist wie *ptsG*. Zudem ist die 5'-UTR von *ptsG* nur in den Organismen konserviert, in denen auch *sgrS* Homologe zu finden sind. Dies zeigt, dass Glukose-6-Phosphatstress entweder kein Problem aller Organismen ist, oder dass es noch einen anderen Mechanismus gibt, der dieses Problem lösen kann (Horler und Vanderpool, 2009). In Bezug auf den Glukose-Metabolismus der gesamten Zelle sind also auch hier weitere Untersuchungen notwendig und möglicherweise noch weitere, bisher nicht identifizierte, Regulationsmechanismen beteiligt.

Dennoch scheint es einen wichtigen Grund für das Auftreten der redundanten Funktionen von *sgrS* und SgrT zu geben. So zeigten mathematische Modelle, dass die Verwendung nicht-kodierender RNAs als Regulatoren für die Zelle eine sehr energiesparende und schnelle Möglichkeit der Regulation von ganzen Stoffwechselwegen ist. Bei Glukose-6-Phosphatstress kann so durch *sgrS* schnell die Neubildung von EIICB^{Glc} Transportproteinen unterbunden werden, um eine weitere Aufnahme des Glukose-6-Phosphats zu stoppen. Ein Nachteil der durch *sgrS* gesteuerten Regulation ist die Tatsache, dass vorher gebildete EIICB^{Glc}-Proteine durch die sRNA nicht beeinflusst werden können. Für diesen Fall erweisen sich Protein-Protein-Wechselwirkungen, wie sie durch SgrT stattfinden, als effektiver und schneller (Shimoni et al., 2007). Auch in *E.coli* hat SgrT so vermutlich eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Balance der Zelle in Stresssituationen, trotz geringer Expression im Wildtyp.

Mit der Entdeckung von *sgrS* und SgrT ist in *E.coli* ein völlig neuartiger Mechanismus identifiziert worden, bei dem nicht nur eine sRNA zwei wichtige und unabhängige Funktionen zeigt, sondern auch ein sehr kleines regulatorisches Peptid direkt die Aktivität eines Membranproteins herabsetzt.

6.1.2 SgrT reguliert die Transportaktivität von EIICB^{Glc} durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung

Als Hauptaufnahmesystem für Glukose stellt das Glukose-PTS einen wichtigen Knotenpunkt im Metabolismus von *E.coli* dar. Aus diesem Grund unterliegt es einer Vielzahl von Regulationen, um eine optimale Glukoseaufnahme zu gewährleisten. Dabei findet nicht nur eine transkriptionelle Regulation, sondern besonders unter Glukose-6-Phosphatstress auch eine posttranskriptionelle Regulation statt (Gabor et al., 2011; Lengeler und Jahreis, 1996). Gerade in plötzlich auftretenden

Stresssituationen ist nicht nur eine langfristige Regulation notwendig, sondern auch eine schnelle Reaktion der Zelle auf die veränderten Umweltbedingungen gefordert. Die Regulation durch das SgrRST-System gewährleistet in der Zelle sowohl eine längerfristige Einstellung auf die neue Umgebung (*sgrS*) als auch eine kurzfristige Umstellung (SgrT) (Wadler und Vanderpool, 2007). Dabei war bislang unklar, wie SgrT die Glukose-6-Phosphataufnahme in die Zelle reguliert und war damit ein wichtiger Aspekt in dieser Arbeit. Eine *sgrRST*-Deletionsmutante zeigt eine erhöhte Sensitivität gegenüber α -Methyl-Glukose, die durch die alleinige Expression von SgrT wieder aufgehoben werden kann (s. Abbildung 5.1 und (Wadler und Vanderpool, 2007)). Dies verdeutlicht, dass *sgrS* nicht unbedingt notwendig für den Schutz der Zelle vor Glukose-6-Phosphatstress ist und dass beide Funktionen redundant sind. Eine Überproduktion von SgrT in der Zelle hat zudem nicht nur Auswirkungen auf das Glukose-PTS, sondern zeigt auch eine geringfügige Repression des Wachstums in Minimalmedium mit N-Acetyl-Glukosamin (s. Abbildung 5.2 und Abbildung 5.4, (Wadler und Vanderpool, 2007)), nicht jedoch in Minimalmedium mit Sucrose (s. Abbildung 5.5). Wadler et al. haben bereits die Vermutung postuliert, dass die Regulation der EIICB^{Glc}-Aktivität durch SgrT auf Proteinebene stattfindet, da sie keine Beeinflussung des mRNA-Levels von *ptsG* feststellen konnten (Wadler und Vanderpool, 2007). Von ihnen konnte allerdings weder die Protein-Protein-Wechselwirkung nachgewiesen noch ausgeschlossen werden, dass SgrT auch ein anderes Protein des PTS beeinflusst, z.B. EI, HPr oder EIIA^{Glc}. Durch die hier gezeigten Wachstumskurven zum Einfluss von SgrT auf das Wachstum in Minimalmedium mit Glukose bzw. Sucrose wurde zum ersten Mal gezeigt, dass SgrT das Transportprotein EIICB^{Glc} beeinflusst und kein anderes PTS-Protein, da sowohl das Glukose- als auch das Sucrose-PTS die Enzyme EI, HPr und EIIA^{Glc} verwenden und der einzige Unterschied im Transporter zu finden ist.

Die Wechselwirkung zwischen SgrT und dem EIICB^{Glc}-Transporter sollte in dieser Arbeit anhand geeigneter Methoden genauer untersucht und verifiziert werden. In „Crosslinking“ Analysen mit Paraformaldehyd wurde zum ersten Mal eine direkte Interaktion der beiden Proteine gezeigt (s. Abbildung 5.23). Diese Wechselwirkung konnte auch *in vivo* durch BiFC und fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsstudien belegt werden (s. Abbildung 5.30 und Abbildung 5.44). EIICB^{Glc} rekrutiert das SgrT dabei an die Zellmembran, was auf eine Protein-Protein-Wechselwirkung am Ort der Glukoseaufnahme hindeutet und einen Einfluss von SgrT auf bereits vorhandene Transportproteine bestätigt. Neben dem eigentlichen Nachweis der Wechselwirkung standen besonders auch die Bedingungen im Fokus, bei denen eine Interaktion der beiden Proteine stattfindet. In „Crosslinking“ Analysen konnte gezeigt werden, dass eine Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} nur dann stattfindet, wenn das Transportprotein in seiner unphosphorylierten Form vorliegt. Dagegen scheint die Konformationsänderung, die das Protein während der Glukose-Translokation durchläuft, für die Interaktion mit SgrT unerheblich zu sein, solange das Membranprotein kein Phosphat gebunden hat (s. Abbildung 5.25). EIICB^{Glc} liegt immer dann in seiner unphosphorylierten Form vor, wenn es Glukose in die Zelle transportiert. Nur dann kann das Phosphat direkt an die Glukose weitergegeben werden. Eine Bindung von SgrT an EIICB^{Glc} tritt daher nur unter glukosereichen Bedingungen auf, d.h. auch bei Glukosestress im Fall eines Überschusses an Glukose. Dies erscheint sinnvoll, da SgrT nur unter diesen Bedingungen exprimiert wird.

Die in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen konnten nicht völlig ausschließen, dass noch weitere Proteine an der Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} beteiligt sind, obwohl die

Versuche auf einen engen räumlichen Kontakt von SgrT und EIICB^{Glc} hindeuten (z.B. BiFC). Hier sind also noch weitere Untersuchungen notwendig, um die Frage endgültig zu klären. Genetische Ansätze, die auf der Entstehung spontaner oder durch „Random“-Mutagenese erzeugter Suppressionsmutanten beruhen, könnten einen Hinweis auf eine direkte Wechselwirkung der beiden Proteine geben. Erste Versuche zu dieser Problematik sind in einer Bachelorarbeit zum Thema „Molekulargenetische Analyse der Feinregulation des Glukose-Phosphotransferase-Systems in *Escherichia coli*“ von B. Schlee vorgestellt (Schlee, 2011). Alternativ bietet sich natürlich auch die weitere Untersuchung des SgrTkpn an, welches als „natürliche Suppressionsmutante“ bereits eine veränderte Bindung unterschiedlicher EIICB^{Glc}-Mutanten zeigt (s. Abbildung 5.37). Ein gereinigtes SgrT könnte zudem, immobilisiert an Säulen, genutzt werden, um mögliche weitere Interaktionspartner zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings keine Reinigung von SgrTec10His bzw. SgrTkpnHis mit Hilfe von Affinitätschromatographie oder spezifischer Bindung an Ni-NTA-Agarose erreicht werden, sodass hier zunächst eine Optimierung der Methoden notwendig ist (s. Kapitel 5.1.3).

Zwei Proteine, die ebenfalls an unphosphoryliertes EIICB^{Glc} binden, sind EIIA^{Glc} und Mlc. Beide konnten jedoch in „Crosslinking“ Versuchen ausgeschlossen werden, die Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} negativ zu beeinflussen (s. Abbildung 5.25 und Abbildung 5.26). Die Abwesenheit von Mlc scheint die Wechselwirkung von SgrT und EIICB^{Glc} dagegen eher noch leicht zu verstärken, was auf eine ähnliche Bindestelle von SgrT und Mlc am EIICB^{Glc}, oder eine räumliche Nähe beider Bindestellen zueinander hindeuten könnte. Bei EIIA^{Glc} und SgrT scheinen dagegen unterschiedliche Domänen innerhalb des EIICB^{Glc} gebunden zu werden, es findet eine Bindung verschiedenen Zeitpunkten in der Zelle statt oder die Bindungen werden noch durch andere Faktoren als die Phosphorylierung bestimmt.

6.1.3 SgrT bindet in der hoch konservierten Linkerregion des EIICB^{Glc}

Nachdem in verschiedenen Analysen gezeigt werden konnte, dass SgrT die unphosphorylierte EIIB^{Glc}-Domäne bindet, wurde in weiteren Untersuchungen versucht, die Region der Wechselwirkung auf eine der Domänen des EIICB^{Glc} einzuschränken. Das EIICB^{Glc} besteht aus einer membranintegralen C-Domäne und einer cytoplasmatischen B-Domäne, die beide durch einen cytoplasmatischen Linker verbunden sind. Die C-Domäne ist für die Translokation der Glukose verantwortlich, während die B-Domäne die Funktion der Phosphorylierung der Glukose übernimmt (Lengeler und Jahreis, 1996). Der Linker verbindet beide Domänen und ist vermutlich an der Konformationsänderung des Proteins beteiligt, die es beim Transport der Glukose durchläuft (Lanz und Erni, 1998).

Bereits „Two-Hybrid“ Analysen konnten einen Hinweis darauf geben, dass die EIIB^{Glc}-Domäne nicht an der Wechselwirkung zwischen EIICB^{Glc} und SgrT beteiligt ist (s. Abbildung 5.17 und Abbildung 5.19). In BiFC Versuchen konnte dagegen eine Wechselwirkung zwischen SgrT und der um den Linker verlängerten EIIC^{Glc}-Domäne nachgewiesen werden. Dabei wurde eine stärkere Interaktion gezeigt, als sie zwischen SgrT und dem Vollängenprotein vorliegt. Dies führt zu der Vermutung, dass SgrT an den Linker zwischen den beiden Domänen des EIICB^{Glc} bindet. Durch die exponierte Lage bei Entfernung der EIIB^{Glc}-Domäne wird die Wechselwirkung noch verstärkt (s. Abbildung 5.30). Weitere „Crosslinking“ und BiFC Versuche konnten zeigen, dass die EIIC^{Glc}-Domäne vermutlich ebenfalls essentiell an der Wechselwirkung beteiligt ist (s. Abbildung 5.49), als

alleiniger Wechselwirkungspartner jedoch ausgeschlossen werden kann (s. Abbildung 5.30). Durch ortserichtete Mutationen konnten Aminosäuren im Linker identifiziert werden, die an der Wechselwirkung zwischen SgrT und EIICB^{Glc} beteiligt sind. So sind die Aminosäuren T383, P384, G385, R386 und E387 im hoch konservierten KTPGRED-Motivs des Linkers vermutlich direkt an der Bindung von SgrT involviert (s. Abbildung 5.50). Die Interaktion zwischen SgrT und EIICB^{Glc} scheint dabei nicht besonders stark oder von langer Dauer zu sein, da sie nur mit Hilfe von Methoden nachgewiesen werden konnte, die eine solche Wechselwirkung stabilisieren. Damit wurde dem hoch konservierten Motiv des Linkers zum ersten Mal eine Funktion, unabhängig von der Konformationsänderung des EIICB^{Glc}, nachgewiesen, nämlich die Bindung von SgrT unter Glukose-6-Phosphatstress Bedingungen und die damit verbundene Hemmung des Glukosetransports durch das Protein.

Der Linker verbindet im EIICB^{Glc} die EIIB^{Glc}- und die EIIC^{Glc}-Domänen flexibel miteinander. Er liegt oberflächenexponiert im Cytoplasma vor und ist wahrscheinlich an der Konformationsänderung des Proteins während der Glukose-Translokation beteiligt (Erni, 2002; Lanz und Erni, 1998). Von der EIIB^{Glc}-Domäne ist eine detaillierte Struktur bekannt (Eberstadt et al., 1996), nicht jedoch von der EIIC^{Glc}-Domäne und dem Linker. Aus diesem Grund ist auch der Übergang zwischen EIIC^{Glc}-Domäne und Linker unklar. Alte Modelle von Lengeler (Lengeler et al., 1994) und Erni (Buhr und Erni, 1993) gehen von einem Beginn der Linker-Region ab Aminosäure 372 oder früher aus (vgl. Abbildung 1.2 und Abbildung 6.1). Ein neues Modell, welches auf der Strukturaufklärung des zu EIICB^{Glc} homologen Proteins EIIC^{Chb} aus *Bacillus cereus* (Cao et al., 2011) beruht, geht davon aus, dass sich die Linker-Region beginnend mit der Aminosäure L381 direkt an die zehnte transmembrane Helix von EIIC^{Glc} anschließt (Gabor, 2011). Innerhalb des Linkers ist ein in sehr vielen Organismen hoch konserviertes Motiv mit der Aminosäure-Abfolge KTPGRED (Aminosäuren 382 bis 388) zu finden, welches in allen PTS-Permeasen spezifisch für Glukose und N-Acetyl-Glukosamin vorkommt (s. Abbildung 6.1). Die Position des KTPGRED-Motivs direkt im Anschluss an die EIIC^{Glc}-Domäne an der Membran (neues Modell) würde für eine Funktion des Motivs bei der Konformationsänderung des Proteins sprechen und für den Linker eine Art „Scharnier“-Funktion vorhersagen, mit dessen Hilfe die EIIB^{Glc}-Domäne während der Translokation der Glukose umklappen und diese phosphorylieren könnte. Außerhalb dieses Motives ist der Linker, gerade nach dem neuen Modell, wenig konserviert, was die KTPGRED-Sequenz noch einmal besonders hervorhebt. Linker zeigen normalerweise zwar eine Konservierung bestimmter Aminosäuren oder Aminosäuregruppen (polar, geladen etc.), allerdings selten eine so hoch konservierte Sequenzabfolge (Lanz und Erni, 1998). Die Funktion dieser Sequenz war bislang unklar (Jahreis et al., 2008). Für die Transportaktivität des EIICB^{Glc} ist die Linkerregion nicht essentiell. Selbst wenn beide Domänen im Linker voneinander getrennt und einzeln exprimiert werden, zeigen sie Transport- und Phosphorylierungsaktivität (Buhr et al., 1994). Auch Mutationen innerhalb des Linkers beeinflussen die Aktivität im Glukosetransport kaum. Alaninmutationen im KTPGRED-Motiv haben entweder keinen Effekt oder reduzieren die PTS Aktivität auf Werte zwischen 10 % und 60 %. Nur eine Substitution des G385 zu Alanin sowie die komplette Deletion des Motivs im Vollängenprotein reduzieren die Transport- und Phosphorylierungsaktivität auf unter 1 % der im Wildtyp gemessenen Aktivität (Siebold et al., 2001), vermutlich durch die Einschränkung der Beweglichkeit des Linkers und der damit verbundenen Konformationsänderung des Proteins während des Transportes (Lanz und Erni, 1998).



Abbildung 6.1: Alignment der EIIcB^{Glc}-Proteinsequenz aus verschiedenen Organismen (Ausschnitt der Linkerregion)

Mit: Citrobacter kose = *Citrobacter kosei*, Citrobacter rode = *Citrobacter rodentium*, Cronobacter turi = *Cronobacter turicensis*, Edwardsiella tar = *Edwardsiella tarda*, Enterobacter clo = *Enterobacter cloacae*, Enterobacter sak = *Enterobacter sakazakii*, Erwinia carotovo = *Erwinia carorovora*, Erwinia pyrofoli = *Erwinia pyrofoliae*, Klebsiella pneum = *Klebsiella pneumoniae*, Klebsiella varii = *Klebsiella variicola*, Proteobacterium = *Proteobacterium wasabiae*, Salmonella enter = *Salmonella enterica Typhimurium*, Salmonella enter = *Salmonella enterica*, Serratia proteam = *Serratia proteamaculans*, Shigella dysente = *Shigella dysenteriae*, Shigella flexner = *Shigella flexneri*, Yersinia enteroc = *Yersinia enterocolitica*, Yersinia peudot = *Yersinia pseudotuberculosis*. Aminosäuren, die zu 50 % mit der Referenzsequenz aus *E.coli* übereinstimmen sind grün unterlegt, der Linkerbereich zwischen der EIIc^{Glc}- und EIIB^{Glc}-Domäne ist markiert. Dabei entspricht die Markierung oben der Linkerregion aus den Modellen von Lengeler (Lengeler et al., 1994) und Erni (Buhr und Erni, 1993), die Markierung unten einem neuen Modell von Gabor (Gabor, 2011) (nach Vorlagen von Cao et al. (Cao et al., 2011)). Die hoch konservierte KTPGRED-Sequenz ist rot hervorgehoben.

Da die beiden Domänen EIIB^{Glc} und EIIc^{Glc} auch ohne das Vorhandensein des Linkers Transportaktivität zeigen, wenn sie getrennt voneinander exprimiert werden, bietet sich hier ein weiterer Ansatz zum Nachweis der Wechselwirkung von SgrT und dem Linker des EIIcB^{Glc}, z.B. durch Wachstumsanalysen.

Die Frage, warum gerade der Linker im EIIcB^{Glc} eine hoch konservierte Sequenz zeigt, konnte lange nicht aufgeklärt werden. Die Bindung des SgrT unter Glukose-6-Phosphatstress Bedingungen zeigt hier zum ersten Mal eine wichtige Funktion der Sequenz. Dabei ist auffällig, dass auch Organismen wie *Yersinia pestis* das konservierte KTPGRED-Motiv zeigen, obwohl sie kein *sgrT*-Gen aufweisen (s. Abbildung 1.7 und Abbildung 6.1). Dies deutet darauf hin, dass das SgrT vermutlich im Laufe der Evolution in diesem Organismus an Bedeutung verloren hat und das Gen sich so durch Mutationen verändert hat.

Geht man davon aus, dass der Linker, wie nach einem neuen Modell beschrieben (Gabor, 2011), direkt mit dem KTPGRED-Motiv im Anschluss an die letzte transmembrane Helix von EIIc^{Glc} beginnt, und sollte der Linker wie bereits vermutet an der Konformationsänderung des EIIcB^{Glc} während der Glukose-Translokation beteiligt sein (Lanz und Erni, 1998), so liegt die Vermutung nahe, dass SgrT durch die Bindung des Linkers direkten Einfluss auf die Konformationsänderung des Proteins hat und damit die Translokation und Phosphorylierung der Glukose negativ beeinflusst.

6.1.4 SgrT inhibiert durch EIICB^{Glc}-Bindung die Translokation und Phosphorylierung der Glukose

Während des Transportes der Glukose durchläuft das EIICB^{Glc} verschiedene Konformationen, die sowohl für die Translokation der Glukose über die Membran, als auch für deren Phosphorylierung sorgen (s. Abbildung 6.2 (A)).

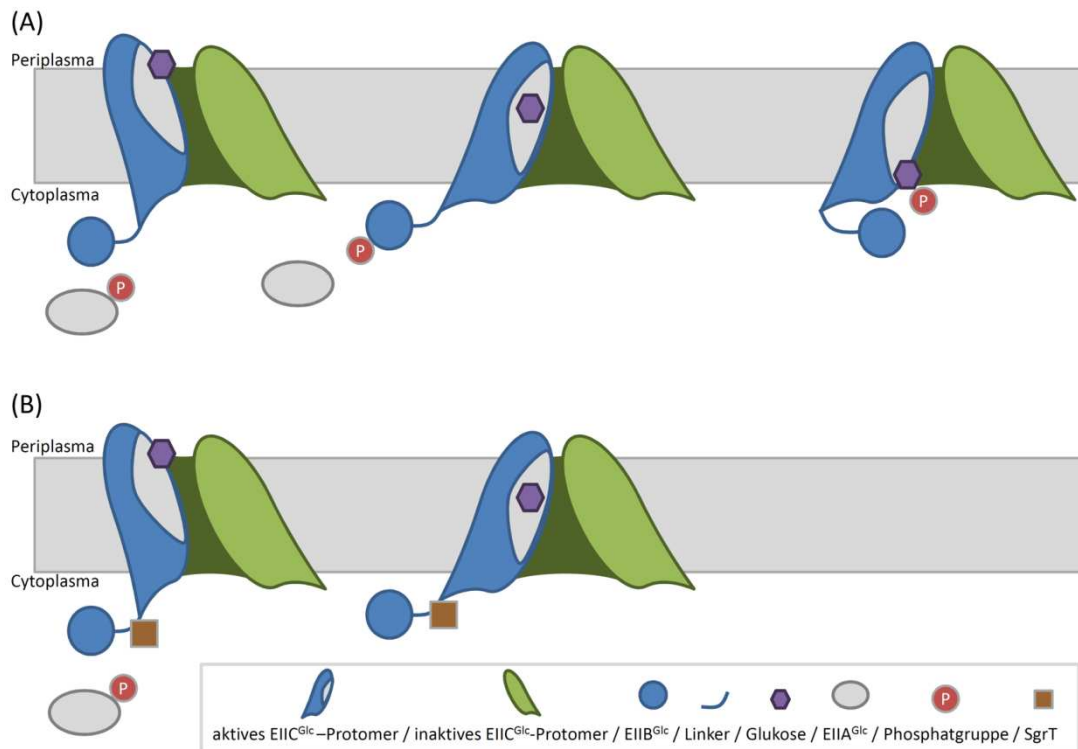


Abbildung 6.2: Modell zur Konformationsänderung des EIICB^{Glc} während des Glukose-Transportes und Auswirkungen der Bindung von SgrT

Mit: (A) ohne SgrT und (B) mit SgrT. Links = zum Periplasma geöffneter Zustand, Mitte = „Locked-in“, Rechts = zum Cytoplasma geöffneter Zustand. Die Abbildung zeigt ein Modell zur Konformationsänderung des EIICB^{Glc} während der Glukose Translokation und Phosphorylierung. Dabei ist in Abbildung (A) der Transport der Glukose unter normalen Bedingungen gezeigt, in (B) die mögliche Auswirkung der SgrT Bindung an den Linker des EIICB^{Glc}. Nähere Erläuterungen im Text [nach (Cao et al., 2011)].

Dabei ist ausschließlich die EIIC^{Glc}-Domäne am Transport und die EIIB^{Glc}-Domäne an der Phosphorylierung der Glukose beteiligt (Lengeler et al., 1994). Hochaffine Substrate (wie die Glukose) werden in einer zum Periplasma offenen Konformation des EIICB^{Glc} gebunden. Diese Bindung löst eine Konformationsänderung des Proteins aus und es wird in einen so genannten „locked-in“-Status überführt (Lengeler et al., 1994; Lolkema et al., 1992). In dieser Konformation ist die Glukose weder von der periplasmatischen noch von der cytoplasmatischen Seite zugänglich. Anschließend geht das Protein, vermutlich durch die phosphorylierte EIIB^{Glc}-Domäne ausgelöst, in den zum Cytoplasma geöffneter Zustand über und die EIIB^{Glc}-Domäne gibt das von ihr gebundene Phosphat an die Glukose ab. An dieser Umlagerung ist vermutlich auch der Linker, der die beiden Domänen miteinander verbindet und für die Beweglichkeit der EIIB^{Glc}-Domäne sorgt, beteiligt (Lanz und Erni, 1998). Durch die Phosphorylierung der Glukose verringert sich die Affinität des Substrates zur elektronegativen Bindestelle um das etwa vier- bis sechsfache

(Robillard und Broos, 1999). Dadurch kann die Glukose von der Bindestelle gelöst und ins Cytoplasma entlassen werden. Die Phosphorylierung der Glukose ist daher essentiell für die Freisetzung aus der Bindestelle und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Konformationsänderungen und damit die Transportaktivität des EIICB^{Glc} (Lengeler et al., 1994). Erst nach der Freisetzung kann das Protein wieder in den zum Periplasma geöffneten Zustand zurückgehen. Die Bindung der Glukose im Periplasma kann dagegen auch ohne EIIB^{Glc}-Domäne oder in Gegenwart von unphosphoryliertem EIIB^{Glc} stattfinden. In diesem Fall verbleibt das Protein vermutlich im „locked-in“-Zustand gefangen und die Glukose kann nicht in die Zelle aufgenommen werden (Lengeler et al., 1994). Das Phosphat der EIIB^{Glc}-Domäne stammt vom EIIA^{Glc} und wird durch Bindung dieses Proteins weitergegeben. Dabei findet im Gegensatz zur Phosphorylierung der Glukose keine Konformationsänderung des EIICB^{Glc} statt (Robillard und Broos, 1999).

Niedrigaffine Substrate und verschiedene Mutanten von EIICB^{Glc} zeigen eine andere Konformationsänderung während der Translokation. So zeigen „entkoppelte“ Mutanten häufig bereits in der zum Periplasma geöffneten Konformation eine niedrige Affinität zu ihren Substraten. Dadurch werden die Substrate zwar gebunden und das Protein durchläuft Konformationsänderungen, es bleibt jedoch vermutlich nicht im „locked-in“-Zustand blockiert, sondern geht sofort in den zum Cytoplasma geöffneten Status über. Dadurch können niedrigaffine Substrate oder hochaffine Substrate durch „entkoppelte“ Mutanten auch ohne Phosphorylierung durch die EIIB^{Glc}-Domäne transportiert werden (Lengeler et al., 1994). „Locked-in“ Mutanten bleiben dagegen, wie der Name sagt, immer im „locked-in“-Zustand und können so keine Glukose über die Membran transportieren. Aus diesem Grund liegen diese Mutanten immer in der phosphorylierten Form vor, da das Phosphat nicht an die Glukose abgegeben werden kann (Buhr et al., 1992). Bei „relaxed“ Mutanten wird vermutet, dass sie durch eine Veränderung der Bindetasche auch andere Substrate akzeptieren und in die Zelle transportieren (Erni, 2002).

SgrT greift durch seine Bindung des unphosphorylierten EIICB^{Glc} Proteins an der Linkerregion in diesem Prozess der Konformationsänderungen, Translokation und Phosphorylierung ein und verhindert die Aufnahme der Glukose effektiv. Dabei ist ein Modell denkbar, das hier vorgestellt werden soll. Durch die Bindung von SgrT an der Linkerregion könnte SgrT die Konformationsänderung des EIICB^{Glc} möglicherweise verhindern und das Protein so entweder im „locked-in“-Zustand halten und/oder die EIIB^{Glc}-Domäne an der Phosphorylierung der Glukose hindern (s. Abbildung 6.2 (B)). Für dieses Modell spricht, dass dem Linker bereits eine Funktion an der Konformationsänderung des EIICB^{Glc} zugesprochen wurde (Lanz und Erni, 1998). Durch eine vollständige Deletion des Linkers im Volllängenprotein ist das EIICB^{Glc} nicht mehr funktionell, werden beide Domänen einzeln exprimiert, kann dagegen auf den Linker verzichtet werden. Dies bestätigt eine wichtige Aufgabe des Linkers bei Änderungen der relativen Lage von EIIC^{Glc} und EIIB^{Glc} zueinander, unabhängig von der SgrT-Bindung (Erni, 2002). Als „Scharnier“ könnte der Linker die Umlagerung der EIIB^{Glc}-Domäne zur Bindestelle der Glukose in der EIIC^{Glc}-Domäne bewirken. Eine Bindung von SgrT im Linker wäre in diesem Fall hinderlich bei der notwendigen Konformationsänderung und könnte so die Aufnahme der Glukose verhindern, indem EIICB^{Glc} im „locked-in“-Zustand gehalten wird. Vermutlich wird dabei auch die Rephosphorylierung des EIICB^{Glc} durch EIIA^{Glc} verhindert, da gezeigt werden konnte, dass SgrT nur unphosphoryliertes Protein bindet (s. Abbildung 5.25).

Die „Crosslinking“ Analysen verschiedener EIICB^{Glc}-Derivate und Mutanten in dieser Arbeit konnten weiteren Aufschluss über die SgrT bedingte Regulation geben. So konnte gezeigt werden, dass SgrT unphosphoryliertes EIICB^{Glc} bindet, die Glukosezugabe dabei jedoch keine Auswirkungen hat (s. Abbildung 5.23 und Abbildung 5.25). Dies spricht für das oben beschriebene Modell, bei dem die Bindung der Glukose und die damit verbundene Überführung des EIICB^{Glc} in den „locked-in“-Zustand keinerlei Einfluss auf die Bindung des SgrT haben sollte. Dagegen ist die Bindung von unphosphoryliertem EIICB^{Glc} durch SgrT sinnvoll, da dieser Zustand bei Glukosestress vermehrt vorliegt. Die Analyse von „relaxed“ Mutanten ergab, dass die Mutationen keinen Einfluss auf die SgrT-Bindung haben, mit Ausnahme der Mutation P384R, da diese im für die Wechselwirkung wichtigen Bereich des Linkers liegt. Generell lässt sich jedoch festhalten, dass die erweiterte Substratspezifität der „relaxed“ Mutanten unerheblich für die Wechselwirkung mit SgrT ist (s. Abbildung 5.35). Die Untersuchung von „locked-in“ Mutanten konnte zeigen, dass hier keine Wechselwirkung mit SgrT mehr stattfindet (s. Abbildung 5.31). Bei diesen Mutanten liegt das EIICB^{Glc} von Beginn an in einer phosphorylierten Form vor und unterbindet so die Interaktion mit SgrT. Dies bestätigt noch einmal die Aussage, dass SgrT nur unphosphoryliertes Protein binden kann und verdeutlicht, dass zumindest ein einmaliger Transport der Glukose stattfinden muss, um ein unphosphoryliertes EIICB^{Glc} vorliegen zu haben. Die „entkoppelte“ Mutante I296N zeigte ebenfalls keine Wechselwirkung mit SgrT mehr, sofern ein *ptsHlcr^{r+}*-Stammhintergrund vorlag (s. Abbildung 5.31 und Abbildung 5.32). Ohne die Phosphorylierung von EIICB^{Glc}-I296N durch die vorgeschalteten PTS-Enzyme findet dagegen eine Interaktion zwischen SgrT und dem Membranprotein statt. Dies zeigt, dass keine Konformationsänderung von EIICB^{Glc}-I296N für die fehlende Interaktion mit SgrT verantwortlich, sondern dass alleine der Phosphorylierungszustand des Proteins entscheidend ist. Es deutet darauf hin, dass die „entkoppelte“ Mutante das Phosphat nicht an die Glukose abgibt und so im phosphorylierten Zustand verbleibt. Bisherige Versuche konnten zeigen, dass „entkoppelte“ Mutanten weiterhin in der Lage sind, Glukose zu phosphorylieren (Robillard und Broos, 1999). Vermutlich geschieht dies jedoch nicht immer bei der Glukose-Translokation, sodass eine Vielzahl der Membranproteine phosphoryliert bleibt. Besonders für die Mutation I296N wurde bereits eine schlechte Phosphorylierungsaktivität vorhergesagt (Ruijter et al., 1992), weshalb auch die Untersuchung weiterer „entkoppelter“ Mutanten sinnvoll wäre. Scheinbar kann die SgrT Bindung an „entkoppelten“ Mutanten zwar stattfinden (sofern diese unphosphoryliert vorliegen), sie sollte aber nach dem hier vorgestellten Modell die Transportaktivität des EIICB^{Glc} nicht vollständig inhibieren. In Transporttests mit ¹⁴C-markierter α -Methyl-Glukose könnte diese Vermutung näher analysiert werden. Die Transporttests könnten zudem einen generellen Eindruck von der Auswirkung der SgrT-Bindung geben und zeigen, ob und wie stark SgrT die Transportaktivität des EIICB^{Glc} herabsetzen kann.

Die hier vorgestellten Versuche konnten also zeigen, dass SgrT durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Linker des EIICB^{Glc} einen direkten Einfluss auf die Glukose-Transportaktivität des Proteins hat. Ob dies auch einen Einfluss auf den gesamten Glukose-Metabolismus der Zelle hat, wurde in weiteren Versuchen untersucht.

6.1.5 Eine *sgrRST*-Deletion hat nur einen geringen Einfluss auf den Glukose-Metabolismus

Escherichia coli ist auf Grund seines schnellen Wachstums und seiner einfachen Kultivierung ein häufig angewandter Organismus für die Produktion von heterologen und rekombinanten

Proteinen in Fermentationsprozessen. Dabei stellt der so genannte „Overflow-Metabolismus“, d.h. die Bildung und Akkumulation unerwünschter Nebenprodukte wie Acetat bei der Maximierung der Produktivität immer wieder ein großes Problem dar. Durch eine zu hohe Glukoseaufnahmerate bei aerobem Wachstum kommt es zur vermehrten Produktion von Acetat durch die Zellen, was nicht nur die Wachstumsgeschwindigkeit negativ beeinflusst, sondern auch die Proteinproduktion. Als Regulationssystem des Glukose-PTS könnte das SgrRST-System eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Balance spielen. Da das SgrRST-System einen großen Einfluss auf die Zelle unter Glukose-6-Phosphatstress hat, wäre zu erwarten, dass eine Deletion des Systems einen veränderten Phänotyp der Zellen unter diesen Bedingungen hervorruft. Aus diesem Grund wurde in Batch-Kulturen und Fermentationsversuchen die Auswirkung einer *sgrRST*-Deletion auf das Wachstum sowie die Glukoseaufnahme und die Acetatproduktion im Vergleich zu einem Wildtypstamm untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass weder in einer Batch- noch in einer Fermenterkultur in Minimalmedium mit Glukose und Glukose-6-Phosphat die *sgrRST*-Deletion einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum und die Acetatproduktion der Zellen hatte (s. Abbildung 5.52 bis Abbildung 5.56). Diese Ergebnisse scheinen überraschend, da dem SgrRST-System bisher eine große Bedeutung bei der Regulation der Glukoseaufnahme unter Stressbedingungen zugesprochen wurde. Möglicherweise liegt hier jedoch auch ein großer Optimierungsbedarf der durchgeführten Methoden zugrunde, da die gezeigten Versuche auf Einzelmessungen beruhen. Eine erhöhte Menge Glukose-6-Phosphat oder andere Versuchsbedingungen könnten möglicherweise Unterschiede zwischen den beiden Stämmen deutlich machen. Auch ein Glukose-Puls bei Anzucht in Minimalmedium mit Glycerin sollte untersucht werden. Der umgekehrte Fall, das heißt die (moderate) Überexpression von SgrT während der Fermentationsversuche, konnte ebenfalls noch nicht analysiert werden. Möglicherweise lässt sich mit einem solchen System das Wachstum der Zellen unter bestimmten Bedingungen steigern bzw. die Acetatproduktion senken. Dabei könnte besonders heterolog exprimiertes SgrTkpn interessant sein, da es einen deutlich stärkeren Einfluss auf das Wachstum von *E.coli* in Stresssituationen hat. Sollte sich ein Einfluss des SgrRST-Systems auf das Wachstumsverhalten und besonders die Acetatproduktion der Zellen bestätigen, so könnte dies ein geeigneter Ansatzpunkt sein, die Produktivität von *E.coli*-Stämmen zu erhöhen und die maximale Ausbeute rekombinanter Proteine zu steigern.

6.1.6 Zusammenfassung und Outlook zur Regulation von EIICB^{Glc} durch SgrT

Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche konnten nicht nur eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem unphosphorylierten Membranprotein EIICB^{Glc} und dem kleinen regulatorischen Protein SgrT zeigen, sondern auch die Region der Wechselwirkung auf den Linker zwischen den beiden Domänen des EIICB^{Glc} beschränken. Damit wurde der hoch konservierten KTPGRED-Sequenz des Linkers zum ersten Mal eine essentielle Funktion zugewiesen. Außerdem konnte ein Modell entwickelt werden, welches den Mechanismus beschreibt, mit dem SgrT die Glukoseaufnahme über das EIICB^{Glc} in die Zelle inhibiert. Weitere Versuche sind dagegen notwendig, um die Beteiligung anderer Proteine an der Interaktion von SgrT und EIICB^{Glc} endgültig ausschließen zu können. Zudem könnten Transporttests Aufschluss über die Auswirkung auf die Transportaktivität des EIICB^{Glc} durch die SgrT-Bindung geben. Weitere Analysen zur Wechselwirkung der beiden Proteine würden sich ebenfalls anbieten, gegebenenfalls über gereinigte Proteine oder gemeinsame Kristallisierung der Interaktionspartner. Dies könnte vor

allem auch Einblicke in die Funktionsweise von SgrT geben und das hier vorgestellte Modell möglicherweise verifizieren. In Bezug auf die Herstellung rekombinanter und heterologer Proteine im industriellen Maßstab könnte sich das SgrRST-System als möglicher Ansatzpunkt für die Reduzierung der Acetatbildung herausstellen. Auch hier sind jedoch weitere Analysen notwendig.

6.2 Konstruktion von Stämmen mit chromosomal kodiertem EIICB^{Glc}-His

Nicht nur die Aufklärung der Regulationsmechanismen des EIICB^{Glc} ist wichtig beim Verständnis des Glukose-Metabolismus von *E.coli* K-12, sondern auch die Auswirkungen, die durch unterschiedliche Expressionslevel des EIICB^{Glc} auf die gesamte Zelle hervorgerufen werden. Dafür ist es wichtig, die Expressionslevel unter verschiedenen Bedingungen nachweisen und untersuchen zu können und gleichzeitig die Expression auf ein gewünschtes Level einstellen zu können. Plasmidkodierte Systeme liegen dafür schon seit langer Zeit vor, zeigen aber viele Nachteile wie Abhängigkeit von Antibiotika oder kaum regulierbare Kopienanzahl. Aus diesem Grund wurden in einem zweiten Projekt dieser Arbeit zwei Stämme konstruiert, die ein chromosomal kodiertes EIICB^{Glc}-His aufweisen. Die Expression des Gens für das EIICB^{Glc}-His sollte dabei in einem Stamm unter Kontrolle des natürlichen *ptsG_{PO}* bleiben und in einem zweiten Stamm durch die Verwendung eines *tac_{PO}* IPTG induzierbar werden. Durch die Expression eines mit einem „His-Tag“ versehenen EIICB^{Glc} ist das Expressionslevel des Proteins bestimmbar. Die Verwendung eines *tac_{PO}* ermöglicht zudem die gezielte Einstellung des Expressionslevels auf ein gewünschtes Niveau. Dies könnte als artifizielles Regulationssystem gegebenenfalls interessant für die Produktivitätssteigerung von *E.coli*-Zellen in biotechnologischen Ansätzen sein.

6.2.1 Erfolgreiche Konstruktion von chromosomal kodiertem EIICB^{Glc}-His unter Kontrolle des natürlichen Promotors

In einem ersten Teil dieses Projektes konnte die erfolgreiche Klonierung eines EIICB^{Glc}-His unter der Kontrolle des natürlichen *ptsG_{PO}* durchgeführt werden. Durch die Methode zum Austausch von chromosomalen Genabschnitten nach Wanner et al. (Datsenko und Wanner, 2000) konnte das chromosomale *ptsG* erfolgreich gegen ein *ptsGHis* und eine sich anschließende Kanamycinkassette ausgetauscht werden (s. Abbildung 5.57). In Wachstumskurven und Westernblotanalysen konnte die Funktionalität und Expression des EIICB^{Glc}-His nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine natürliche Induktion der Expression durch Glukose (s. Abbildung 5.58 und Abbildung 5.59). Wachstumskompetitionsanalysen mit einem Wildtypstamm zeigten ein leichtes Wachstumsdefizit des neu konstruierten Stammes JKA4 in direkter Konkurrenz zum Wildtypstamm auf (s. Abbildung 5.60). Warum dieses auftritt, konnte nicht abschließend geklärt werden. In Transportanalysen mit ¹⁴C-markierter α -Methyl-Glukose konnte kein Aktivitätsverlust des Proteins nachgewiesen werden (s. Abbildung 5.79) und auch andere Versuche, z.B. zur Sequenzanalyse oder mRNA-Stabilität, konnten keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp zeigen (s. Abbildung 5.76). In Diauxiekurven mit Laktose und Glukose zeigte JKA4 wie erwartet eine normale Diauxie, d.h. es wurde zunächst die Glukose dann die Laktose aufgenommen und verstoffwechselt (s. Abbildung 5.81). Dies deutet auf ein gut funktionierendes EIICB^{Glc}-His Protein mit einer hohen Transportaktivität hin, welches zudem in der Lage ist, Katabolitenrepression und Induktorausschluss aufrecht zu erhalten.

Abschließend konnte nicht geklärt werden, warum der Stamm JKA4 ein leichtes Wachstumsdefizit gegenüber Wildtypstämmen in Wachstumscompetitionsversuchen zeigt. Da dies jedoch nur in direkter Konkurrenz der Stämme zueinander auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass die Konstruktion des Stammes erfolgreich war und er für weitere Analysen verwendet werden kann. Mit Hilfe von JKA4 ist es nun möglich, das Expressionsniveau eines chromosomal kodierten EIICB^{Glc} unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Dies könnte für den gesamten Glukose-Metabolismus wichtige Hinweise geben und besonders im Hinblick auf die mögliche Stammoptimierung für industrielle Zwecke von Interesse sein. Das Glukose-PTS ist als das Hauptaufnahmesystem von Glukose maßgeblich am Stoffwechsel und der metabolischen Balance von *E.coli* beteiligt. Neue Einblicke in die Expression und Regulation des wichtigen Transportproteins EIICB^{Glc} könnten daher wichtige Erkenntnisse zur Optimierung der Produktivität von *E.coli* Stämmen in der industriellen Mikrobiologie und rekombinanten Proteinproduktion geben.

6.2.2 Chromosomal kodiertes EIICB^{Glc}-His unter der Kontrolle eines *tac*_{PO} zeigt Wachstumsdefizite in Minimalmedium mit Glukose

In einem zweiten Teil dieses Projektes wurde die Expression des EIICB^{Glc}-His unter die Kontrolle eines IPTG induzierbaren *tac*_{PO} gestellt. In diesem Fall ist die Expression des Proteins nicht mehr von der Glukoseanwesenheit abhängig, sondern kann gezielt durch IPTG induziert werden. Die Konstruktion des Stammes erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei JKA4 (s. Abbildung 5.62). Auch der hier neu konstruierte Stamm JKA11 sollte zunächst durch Wachstumsanalysen und Competitionsversuche genauer charakterisiert werden. Dabei zeigten sich unerwartet deutliche Wachstumsdefizite des Stammes in Minimalmedium mit Glukose, die auch ohne direkte Konkurrenz zu einem Wildtypstamm zu beobachten waren (s. Abbildung 5.64 und Abbildung 5.65). Durch verschiedene Versuche wurde versucht herauszufinden, warum dieser Stamm solch gravierende Defizite im Wachstum zeigt. Dabei konnte in Southernblot Analysen und Sequenzierungen zunächst eine fehlerhafte Integration des Gens ins Chromosom ausgeschlossen werden (s. Abbildung 5.70). Auch die Untersuchung der mRNA-Stabilität oder die Kontrolle des LacI-Repressors konnten keine Hinweise geben (s. Abbildung 5.77 und Abbildung 5.71). In Transporttests stellte sich jedoch heraus, dass der Stamm JKA11 fast keine Transportaktivität zeigte. Auch die Induktion der Expression durch IPTG führte nicht zu einer gesteigerten Aktivität der Proteine, obwohl in Westernblot und mRNA Analysen eine eindeutig erhöhte Expression des Proteins durch IPTG-Zugabe nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 5.63, Abbildung 5.77 und Abbildung 5.79). Dies zeigt deutlich, dass der Stamm ein Defizit in der Transportaktivität des EIICB^{Glc}-His aufweist. Parallel durchgeführte Versuche mit plasmidkodierten EIICB^{Glc}-His Proteinen konnten die Vermutung, dass die geringe Aktivität auf Grund des „His-Tags“ zustande kommt, nicht bestätigen (s. Abbildung 5.79).

Warum JKA11 eine drastisch verringerte Transportaktivität zeigt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise sind Struktur- oder Konformationsänderungen des Proteins beteiligt, die eine korrekte Translokation und Phosphorylierung der Glukose behindern. Untersuchungen, ob das EIICB^{Glc}-His aus JKA11 noch in der Lage ist, Glukose zu phosphorylieren oder ob es z.B. im „locked-in“ Zustand blockiert bleibt, könnten weiteren Aufschluss über diese Vermutungen geben. Auch posttranslationale Modifikationen des Proteins könnten verantwortlich sein. Da der Phänotyp stabil in andere

Stämme transduzierbar ist, ist eine erste Eingrenzung der möglichen verantwortlichen Gene und Proteine 100 kbp stromauf- und abwärts von *ptsG* gegeben.

Auf Grund der schlechten Transportaktivität ist JKA11 nicht geeignet, weitere Untersuchungen zur Auswirkung der EIICB^{Glc} Expression auf den Metabolismus der Zelle zu machen. Die Isolierung und Charakterisierung einer Suppressionsmutante mit einer gesteigerten Transportaktivität des EIICB^{Glc}-His war daher der nächste Schritt.

6.2.3 Eine Suppressionsmutante von JKA11 zeigt kein Wachstumsdefizit in Minimalmedium mit Glukose

Durch gezielte Selektion auf gutes Wachstum in Minimalmedium mit Glukose konnte eine Suppressionsmutante von JKA11 isoliert werden, die ein normales Wachstum zeigt. Sowohl in Wachstumskurven als auch in Kompetitionsanalysen konnte kein Nachteil von JKA11* gegenüber einem Wildtypstamm festgestellt werden (s. Abbildung 5.66 und Abbildung 5.67). Auch im Transporttest zeigt dieser Stamm eine gute und durch IPTG induzierbare Transportaktivität, wie sie zu erwarten ist (s. Abbildung 5.79). Die Isolierung einer Suppressionsmutante von JKA11 mit einem verbesserten Wachstum war demnach erfolgreich. Auch dieser Phänotyp war stabil und in andere Stämme transduzierbar. Ein Nachteil von JKA11* zeigte sich dagegen in der Expression von EIICB^{Glc}-His ohne die Zugabe von IPTG, welche bereits unter diesen Bedingungen relativ hoch war. Eine vollständige Unterdrückung der EIICB^{Glc}-His Expression ist in diesem Stamm daher nicht möglich, was wiederum ein Problem bei der Verwendung des Stammes darstellt. Um den Einfluss der Expression von EIICB^{Glc} auf den Metabolismus von *E.coli* untersuchen zu können, muss es sowohl möglich sein, die Expression vollständig herunter zu fahren als auch voll zu induzieren. Dieses Ziel konnte mit beiden hier konstruierten Stämmen, JKA11 und JKA11* nicht erreicht werden.

6.2.4 Zusammenfassung und Ausblick zur Stammkonstruktion

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Konstruktion eines Stammes mit chromosomal kodiertem EIICB^{Glc}-His unter der Kontrolle des natürlichen *ptsG_{p₀}* erfolgreich durchgeführt werden konnte. Dieser Stamm kann in weiterführenden Versuchen zur Analyse der EIICB^{Glc}-His Expression unter verschiedenen Bedingungen genutzt werden, die im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht weiter durchgeführt werden konnten. Die Konstruktion eines Stammes mit chromosomal kodiertem EIICB^{Glc}-His unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren *tac_{p₀}* stellte sich dagegen jedoch als schwierig heraus und konnte nicht erfolgreich zu Ende geführt werden. Hier bedarf es einer weiteren Charakterisierung und Optimierung der Stämme, um eine Aussage über die beobachteten Phänotypen treffen zu können.

6.3 Bewertung der Ergebnisse im Hinblick auf die Stammoptimierung zur Produktivitätsmaximierung von *E.coli*-Stämmen

Auf Grund der einfachen Kultivierung und des schnellen Wachstums ist *E.coli* ein häufig verwendeter Organismus in biotechnologischen Verfahren. Dabei stellt der „Overflow“-Metabolismus, d.h. die Produktion und Akkumulation unerwünschter Nebenprodukte bei schnellem aerobem Wachstum auf Glukose, jedoch häufig ein Problem dar. Verschiedene Strategien haben bisher versucht, dieses Problem zu umgehen. Dabei wurden nicht nur unterschiedliche Modifikationen des Glukose-PTS untersucht, sondern auch davon unabhängige Systeme analysiert. So wurde z.B. von der Arbeitsgruppe von F. Bolívar aus Mexiko ein System postuliert, in dem das Glukose-PTS vollständig deletiert und stattdessen das Glukoseaufnahmesystem GalP und die Glukokinase überproduziert werden. Sie konnten zeigen, dass in einem solchen System die Bildung von erwünschten aromatischen Verbindungen und Ethanol deutlich gesteigert werden konnte, im Vergleich zu bisherigen PTS⁺-Produktionsstämmen (Flores et al., 2007; Sigala et al., 2009).

In dieser Arbeit wurde ein anderer Ansatz untersucht, der das Hauptaufnahmesystem für Glukose, das Glukose-PTS erhält. Durch die Regulation des Glukose-PTS durch SgrT bzw. die artifizielle Expression von EIICB^{Glc} durch IPTG-Zugabe sollte eine Optimierung von *E.coli*-Stämmen in Hinblick auf ihre Produktivität erreicht werden. Dafür war zunächst eine Charakterisierung beider Systeme notwendig. Im Fall von SgrT konnte eine Wechselwirkung mit unphosphoryliertem EIICB^{Glc} nachgewiesen werden und die Bindestelle auf das KTPGRED-Motiv im Linker eingegrenzt werden. Zudem wurde ein Modell zum Verständnis der Funktionsweise entwickelt. Bei der Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse in Fermentationsversuchen zum Wachstum und der Acetatproduktion von *E.coli*-Stämmen konnten zunächst jedoch keine Unterschiede zwischen einem Wildtyp- und einem SgrRST-Deletionsstamm gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass der Effekt des SgrRST-Systems auf das Wachstum der Zellen unter diesen Bedingungen sehr gering ist und sich die Veränderung des SgrRST-Systems daher nicht eignet, um die Produktivität von *E.coli*-Stämmen zu erhöhen. Allerdings konnte nicht untersucht werden, wie sich die Zellen in Fermentationsversuchen bei (moderater) Überproduktion von SgrT verhalten. Dies könnte einen Ansatz zur weiteren Forschung bieten. Dabei wäre besonders die Untersuchung von heterolog exprimiertem SgrTkpn interessant. Durch eine schnelle Freisetzung des kleinen Peptids könnte möglicherweise eine ebenso schnelle Regulation des Glukose-PTS unter Stressbedingungen und damit ein optimiertes Wachstum erreicht werden. Ein zweites System, welches die IPTG-induzierbare Expression des Glukose-Transporters EIICB^{Glc} zur Grundlage hatte, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend erfolgreich konstruiert werden. Hier zeigten sich besonders Probleme bei der Einstellung des Expressionslevels. Nach Optimierung dieses Systems, möglicherweise durch die bessere Regulation des Promotors, könnte es allerdings vielversprechende Ergebnisse liefern. Dagegen konnte ein Stamm konstruiert werden, der ein mit einem „His-Tag“ versehenes EIICB^{Glc} chromosomal kodiert. Dieser Stamm könnte für erste Versuche bezüglich des Glukose-Metabolismus verwendet werden.

7 Zusammenfassung

Bakterien wie *Escherichia coli* sind immer wieder wechselnden Umweltbedingungen und Nährstoffen ausgesetzt. Aus diesem Grund zeigen sie eine starke Regulation des Kohlenstoff-Metabolismus, um stets die am besten geeignete Nährstoffquelle nutzen zu können. Das Glukose-Phosphotransferase-System (PTS) stellt in *E.coli* das Hauptaufnahmesystem für Glukose dar und unterliegt damit einer besonderen Regulation. Die Untersuchung der Regulation des Glukose-PTS durch das kleine regulatorische Peptid SgrT war ein Hauptaspekt in dieser Arbeit.

Das so genannte SgrRST-System wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen als verantwortlich für die Regulation der Expression und Aktivität des Glukose-Transportproteins EIICB^{Glc} (Gen *ptsG*) unter Glukose-6-Phosphatstress identifiziert. Sie konnten einen durch SgrR aktivierten und durch *sgrS* (sRNA) vermittelten spezifischen Abbau der *ptsG*-mRNA zeigen und zudem das von *sgrS* kodierte Protein SgrT nachweisen (Wadler und Vanderpool, 2007). Dabei waren der Mechanismus und die Funktion von SgrT bei der Regulation des Glukose-PTS bislang unklar.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen SgrT und dem Membranprotein EIICB^{Glc} durch *in vitro*- und *in vivo*-Methoden nachgewiesen werden. Dabei wurde nicht nur der Nachweis einer Wechselwirkung erbracht, sondern es konnte auch auf Seiten des EIICB^{Glc} eine für die Interaktion der beiden Proteine essentielle Region identifiziert werden. Im hoch konservierten KTPGRED-Motiv des Linkers, welcher die membranständige EIIC^{Glc}- und die cytoplasmatische EIIB^{Glc}-Domäne flexibel miteinander verbindet, wurden die Aminosäuren T383, P384, G385, R386 und E387 als Interaktionspartner für SgrT nachgewiesen. Damit wurde der in allen Enterobakterien vorkommenden Sequenz des Linkers in den Glukose- und N-Acetyl-Glukosamin-spezifischen Transportproteinen zum ersten Mal eine Funktion zugewiesen. Zudem wurde ein Modell entwickelt, welches die Funktionsweise von SgrT verdeutlicht. Durch die Bindung des Linkers und die damit verbundene Verhinderung der zum Glukose-Transport notwendigen Konformationsänderung des EIICB^{Glc}, setzt SgrT die Transportaktivität des Membranproteins unter Glukose-6-Phosphatstress drastisch herab. Im Rahmen des FORSYS-Partner Projektes wurde zudem die Auswirkung des SgrRST-Systems auf die Aufrechterhaltung der metabolischen Balance von *E.coli* in Fermentationsversuchen untersucht.

Ein zweites Projekt dieser Arbeit befasste sich mit der Auswirkung der Expression eines chromosomal kodierten EIICB^{Glc}-His auf das Wachstum verschiedener Stämme. Es konnte erfolgreich ein Stamm mit einem *ptsGHis*-Gen im Chromosom konstruiert und in verschiedenen Versuchen auf z.B. Transportaktivität und Wachstum getestet werden. Des Weiteren wurde ein Stamm mit einem chromosomal kodierten EIICB^{Glc}-His unter der Kontrolle des *tac_{po}* kloniert. Durch gezielte IPTG-Zugabe ist das Expressionslevel einstellbar und könnte so in verschiedenen Versuchsansätzen zur Analyse der Auswirkung auf den Metabolismus der Zelle dienen. Auf Grund einer geringen Transportaktivität dieses Stammes wurde eine Suppressionsmutante isoliert, welche einen verstärkten Transport zeigt, bei der sich jedoch das Expressionslevel des EIICB^{Glc}-His nicht mehr vollständig herabsetzen lässt. Eine Optimierung beider Stämme ist demnach erforderlich.

8 Summary

Bacteria, such as *Escherichia coli*, are continually exposed to environments in which conditions and nutrients vary. For this reason they show a strong regulation of carbohydrate metabolism in order to utilise the best nutrients first. The glucose phosphotransferase-system (PTS) is the main uptake system for glucose in *E.coli* and is subject to a special regulation. The investigation of the glucose-PTS regulation by the small peptide SgrT was a major aspect for this thesis.

The so called SgrRST-System has been identified as being responsible for the regulation of expression and activity of the glucose transport protein EIICB^{Glc} (gene *ptsG*) under glucose-6-phosphate stress conditions. Activated through SgrR, *sgrS* (sRNA) mediates the RNaseE dependent degradation of *ptsG*-mRNA. *sgrS* was also identified to encode for the small protein SgrT (Wadler und Vanderpool, 2007). The mechanism of SgrT dependent EIICB^{Glc} regulation is unknown so far.

By the use of *in vitro* and *in vivo* methods, a direct protein-protein interaction of SgrT and the membrane protein EIICB^{Glc} was shown for the first time. In the course of this study not only has the interaction been verified but an essential region of EIICB^{Glc} for the interaction with SgrT also been identified. Within the highly conserved KTPGRED-motive in the linker, which flexibly connects the membrane bound EIIC^{Glc}-domain and the cytoplasmic EIIB^{Glc} domain, the amino acids T383, P384, G385, R386 and E387 were identified as interaction partners of SgrT. This is the first time that it has been possible to assign a function to the linker-sequence which is present in all glucose- and N-acetyl-glucosamine specific transport proteins in all enterobacteria. Additionally, a model has been developed which illustrates the SgrT function. The binding of the linker leads to the inhibition of a conformational change which is necessary for glucose translocation and thus drastically reduces the transport activity of EIICB^{Glc}. In the context of a FORSYS-partner initiative, the impact of the SgrRST-system for the maintenance of metabolic balance in *E.coli* was tested in fermentation analyses.

A second project of this thesis dealt with the effect of the expression of a chromosomal encoded EIICB^{Glc}-His on the growth of different strains. A strain with a *ptsGHis* was successfully constructed and analysed in different experiments regarding, e.g., transport activity and growth. Additionally, a strain with an EIICB^{Glc}-His under the control of a *tac_{PO}* was constructed. Selective IPTG induction allows the adjustment of the expression level of EIICB^{Glc} and, therefore, the strain can be used to analyse the consequences of different expression levels on cell metabolism. Due to the low transport activity of this strain, a suppression mutant was isolated. This mutant displays a higher transport activity but the expression level cannot be totally inhibited. Therefore, an optimisation of both strains is necessary.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
	Aminosäuren wurden gemäß des allgemein gültigen Einbuchstabencodes abgekürzt
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid, Proteaseinhibitor
α-MG	α-Methyl-Glukose
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Bidest	zweifach destilliertes Wasser
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (engl. B imolecular f luorescence c omplementation)
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl. B ovine s erum a lbumin)
BTH	Bakterielles „Two-Hybrid“-System
CAA	Casaminoacids
Cam	Chloramphenicol
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Chromosomale DNA
CoIP	Co-Immunopräzipitation
Cpm	Zerfälle pro Minute (engl. C ounts p er m inute)
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. E thylene d iamine t etra a ctic a cid)
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EI	EnzymI
EII	EnzymII
et al.	Und andere (lat. E t a lii)
FM4-64	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromid
FPLC	Chromatographie (engl. F ast p rotein l iquid c hromatography)
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GLB	Gel-Ladepuffer (engl. G el l oading b uffer)
Glc	Glukose (engl. G lucose)
Gly	Glyzerin
„His-Tag“	Aminosäuresequenz aus fünf bis sechs Histidinen
HPr	Histidin-Protein
HTH	Hefe „Two-Hybrid“
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Lak	Laktose
LKS	Laborkultursammlung
McC	MacConkey Agar
MCS	Polylinker (engl. M ultiple c loningsite)
MM	Minimalmedium

MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
mRNA	M essenger R NA
Mtl	M annitol
Nag	N -Acetyl-Glukosamin
NBT	N itroblau-Tetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel ²⁺ -Nitrilotriessigsäure (engl. Nickel ²⁺ - Nitrilotriacetic acid)
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD _x	O ptische D ichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAGE	P olyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
PEP	P hosphenolpyruvat
PP1	P hosphatpuffer 1
PTS	PEP-abhängiges Phosphotransferasesystem
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. Revolutions per minute)
RT-PCR	R eal-Time P CR
SC	Synthetisches Komplettmedium (engl. Synthetic complete medium)
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Scr	S ucrose
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
sRNA	Kleine regulatorische RNA (engl. Small RNA)
SSC	engl. saline sodium citrate buffer
β-ONPG	o -Nitrophenyl-β-D-Galactosid
TBE	T ris- B orat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure (engl. Trichloroacetic acid)
TE	T ris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametylendiamin
Tet	T etracyclin
TM	T ransmembrane Helix
TNT	T ris-HCl- N aCl- T ween-Puffer
ÜK	Ü bernachtkultur
UTR	Nicht-translatierte Region (engl. Untranslated region)
WT	W ildtyp
X-Gal	(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranoside)
YEPD	Vollmedium mit Glukose (<i>S.cerevisiae</i>) (engl. Yeast Extract Peptone Dextrose)

10 Literaturverzeichnis

- 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), 763-71, PMID: 12634344
- Arber, W. (1960). Transduction of chromosomal genes and episomes in *Escherichia coli*. *Virology* **11**, 273-88, PMID: 13794037
- Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**(6), 920-4, PMID: 8333960
- 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), 75-8, PMID: 1840539
- Becker, A. K. (2000). Das EIICB^{Glc} als Glukose-Sensor in *E.coli* K-12: Eine molekulargenetische Analyse der Funktion des Enzyms und der Regulation des zugehörigen Gens *ptsG*. *Diplomarbeit, Universität Osnabrück*
- Becker, A. K. (2003). Molekularbiologische Untersuchungen zur Wirkung des Proteins Yeel auf das Glukose-spezifische Phosphotransferasesystem in *Escherichia coli* K-12. *Dissertation, Universität Osnabrück*
- Becker, A. K., Zeppenfeld, T., Staab, A., Seitz, S., Boos, W., Morita, T., Aiba, H., Mahr, K., Titgemeyer, F. and Jahreis, K. (2006). Yeel, a novel protein involved in modulation of the activity of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **188**(15), 5439-49, PMID: 16855233
- 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), 940-2, PMID: 8550539
- Berg, H. C. and Anderson, R. A. (1973). Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature* **245**(5425), 380-2, PMID: 4593496
- Berg, H. C. and Brown, D. A. (1972). Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* **239**(5374), 500-4, PMID: 4563019
- Berlyn, M. K., Low, B. and Rudd, K. E. (1996). Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, Edition 9. In: *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and molecular biology, Edited by: F.C. Neidhardt, ASM Press, Second Edition* **2**, 1715-1902
- Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J. W. and Gilles, E. D. (2007). Correlation between Growth Rates, EIICB^{Glc} Phosphorylation, and Intracellular Cyclic AMP Levels in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **189**(19), 6891-6900, PMID: 17675376
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**(5331), 1453-62, PMID: 9278503
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54, PMID: 942051
- 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), 3847-51, PMID: 1310984

- Buhr, A. and Erni, B. (1993). Membrane topology of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**(16), 11599-603, PMID: 8505291
- 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), 23437-43, PMID: 8089109
- Cao, Y., Jin, X., Levin, E. J., Huang, H., Zong, Y., Quick, M., Weng, J., Pan, Y., Love, J., Punta, M., Rost, B., Hendrickson, W. A., Javitch, J. A., Rajashankar, K. R. and Zhou, M. (2011). Crystal structure of a phosphorylation-coupled saccharide transporter. *Nature* **473**(7345), 50-54, PMID: 21471968
- Chang, A. C. and Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**(3), 1141-56, PMID: 149110
- Chauvin, F., Brand, L. and Roseman, S. (1996). Enzyme I: the first protein and potential regulator of the bacterial phosphoenolpyruvate: glycolate phosphotransferase system. *Res Microbiol* **147**(6-7), 471-9, PMID: 9084757
- Compton, S. J. and Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**(2), 369-74, PMID: 4096375
- Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12), 6640-5, PMID: 10829079
- De Mey, M., De Maeseneire, S., Soetaert, W. and Vandamme, E. (2007). Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**(11), 689-700, PMID: 17668256
- 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
- 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), 205-12, PMID: 9491079
- 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), 11286-92, PMID: 8784182
- Erni, B. (1986). Glucose-specific permease of the bacterial phosphotransferase system: phosphorylation and oligomeric structure of the glucose-specific IIGlc-IIIIGlc complex of *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* **25**(2), 305-12, PMID: 3513827
- Erni, B. (2002). Glucose Transport by the Bacterial Phosphotransferase System (PTS): An Interface between Energy- and Signal Transduction. In: *Microbial Transport Systems. Edited by G. Winkelmann, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, 115-138
- Escherich, T. (1989). The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1885. *Rev Infect Dis* **11**(2), 352-6, PMID: 2649968
- Flores, N., Leal, L., Sigala, J. C., de Anda, R., Escalante, A., Martinez, A., Ramirez, O. T., Gosset, G. and Bolivar, F. (2007). Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. *J Mol Microbiol Biotechnol* **13**(1-3), 105-16, PMID: 17693718
- Gabor, E. (2011). Molekularbiologische Untersuchungen verschiedener Komponenten des Glukose-Phosphotransferasesystems in *Escherichia coli* K-12 mit Schwerpunkt auf der Strukturanalyse des Transportproteins EIICBGlc. *Dissertation, Universität Osnabrück*

- 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. *European Journal of Cell Biology*, PMID: 21621292
- 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), 7408-17, PMID: 9200688
- Göhler, A. K. (2011). *Dissertation, Universität Osnabrück*
- Gorke, B. and Vogel, J. (2008). Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars. *Genes & Development* **22**(21), 2914-2925, PMID: 18981470
- Gottesman, S. (2004). The Small RNA Regulators of *Escherichia coli*: Roles and Mechanisms*. *Annual Review of Microbiology* **58**(1), 303-328, PMID: 15487940
- Gottesman, S. (2005). Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* **21**(7), 399-404, PMID: 15913835
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. and Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**(14), 4121-30, PMID: 7608087
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4), 557-80, PMID: 6345791
- Heckmann, D. (2009). *Masterarbeit, Universität Osnabrück*
- 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), 4032-5, PMID: 17994626
- Heuel, H. (1997). Struktur und Funktion bakterieller Polyalkohol-Transportsysteme: Molekularbiologische und genetische Untersuchung zum Transport und Stoffwechsel von D-Arabinitol, Ribitol und D-Mannitaol in Enterobakterien. *Dissertation, Universität Osnabrück*
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10**(4), 413-7, PMID: 1368485
- Horler, R. S. P. and Vanderpool, C. K. (2009). Homologs of the small RNA SgrS are broadly distributed in enteric bacteria but have diverged in size and sequence. *Nucleic Acids Research* **37**(16), 5465-5476, PMID: 19531735
- Hosono, K., Kakuda, H. and Ichihara, S. (1995). Decreasing accumulation of acetate in a rich medium by *Escherichia coli* on introduction of genes on a multicopy plasmid. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**(2), 256-61, PMID: 7766024
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. and Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* **8**(6), 1693-6, PMID: 8502489
- Jahreis, K. (2010). cAMP Signaling in Prokaryotes. In: *Bacterial Signaling, Edited by R. Krämer und K. Jung; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*, 357-375
- 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), 5307-16, PMID: 12218016
- Jahreis, K., Pimentel-Schmitt, E. F., Brückner, R. and Titgemeyer, F. (2008). Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **32**(6), 891-907, PMID: 18647176

- James, P., Halladay, J. and Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**(4), 1425-36, PMID: 8978031
- 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), 38513-8, PMID: 15252051
- Kawamoto, H. (2005). Implication of membrane localization of target mRNA in the action of a small RNA: mechanism of post-transcriptional regulation of glucose transporter in *Escherichia coli*. *Genes & Development* **19**(3), 328-338, PMID: 15650111
- Kerppola, T. K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* **37**, 465-87, PMID: 18573091
- 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), 3587-95, PMID: 11432845
- 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), 1808-12, PMID: 10677538
- Kosfeld, A. (2008). Charakterisierung peripherer Regulationsmechanismen des PEP-abhängigen Glukose-Phosphotransferase-Systems in *Escherichia coli* K-12. *Masterarbeit, Universität Osnabrück*
- 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), 502-17, PMID: 16233138
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A. and Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27**(2-3), 95-125, PMID: 16460794
- 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**, 1067-74, PMID: 14224387
- Ladisch, M. R. and Kohlmann, K. L. (1992). Recombinant human insulin. *Biotechnol Prog* **8**(6), 469-78, PMID: 1369033
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-5, PMID: 5432063
- 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), 12239-43, PMID: 9575173
- 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), 5353-61, PMID: 11032803
- Lengeler, J. W. (1966). [Studies on the glucose effect in the synthesis of the galactose enzyme of *Escherichia coli*]. *Z Vererbungsl* **98**(3), 203-29, PMID: 4863695
- Lengeler, J. W. and Jahreis, K. (1996). Phosphotransferase systems or PTSs as carbohydrate transport and as signal transduction systems. In: *Konings, W.N., Kaback, H.S., Lolkema, J.S. eds., Handbook of Biological Physics, Vol. 2 "Transport Processes in Eukaryotic and Prokaryotic Organisms" (Elsevier Science, Amsterdam, N.L.), 573 - 598*

- 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
- 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
- Lennox, E. S. (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**(2), 190-206, PMID: 13267987
- 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), 5514-21, PMID: 1610796
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**(10), 953-61, PMID: 9717241
- 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), 11583-7, PMID: 8524808
- Macconkey, A. (1905). Lactose-Fermenting Bacteria in Faeces. *J Hyg (Lond)* **5**(3), 333-79, PMID: 20474229
- 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), 146-57, PMID: 15631464
- Majdalani, N., Vanderpool, C. K. and Gottesman, S. (2005). Bacterial small RNA regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**(2), 93-113, PMID: 15814430
- Majewski, R. A. and Domach, M. M. (1990). Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng* **35**(7), 732-8, PMID: 18592570
- Maki, K., Uno, K., Morita, T. and Aiba, H. (2008). RNA, but not protein partners, is directly responsible for translational silencing by a bacterial Hfq-binding small RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(30), 10332-10337, PMID: 18650387
- Martinez, E., Bartolome, B. and de la Cruz, F. (1988). pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and *lacZ alpha* reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene* **68**(1), 159-62, PMID: 2851489
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Monod, J. (1942). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. *Dissertation*
- Morita, T. and Aiba, H. (2007). Small RNAs making a small protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(51), 20149-20150, PMID: 18077354
- Morita, T., El-Kazzaz, W., Tanaka, Y., Inada, T. and Aiba, H. (2003). Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**(18), 15608-14, PMID: 12578824
- Morita, T., Kawamoto, H., Mizota, T., Inada, T. and Aiba, H. (2004). Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**(4), 1063-75, PMID: 15522087

- 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), 5485-9, PMID: 8202513
- Mulder, N. J., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Barrell, D., Bateman, A., Binns, D., Biswas, M., Bradley, P., Bork, P., Bucher, P., Copley, R. R., Courcelle, E., Das, U., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Griffiths-Jones, S., Haft, D., Harte, N., Hulo, N., Kahn, D., Kanapin, A., Krestyaninova, M., Lopez, R., Letunic, I., Lonsdale, D., Silventoinen, V., Orchard, S. E., Pagni, M., Peyruc, D., Ponting, C. P., Selengut, J. D., Servant, F., Sigrist, C. J., Vaughan, R. and Zdobnov, E. M. (2003). The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. *Nucleic Acids Res* **31**(1), 315-8, PMID: 12520011
- 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), 3751-6, PMID: 18319344
- Nevo-Dinur, K., Nussbaum-Shochat, A., Ben-Yehuda, S. and Amster-Choder, O. (2011). Translation-independent localization of mRNA in *E. coli*. *Science* **331**(6020), 1081-4, PMID: 21350180
- 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), 4437-42, PMID: 10913076
- Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B. and Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* **12**(10), 3967-75, PMID: 7691599
- Oh, H., Park, Y. and Park, C. (1999). A mutated PtsG, the glucose transporter, allows uptake of D-ribose. *J Biol Chem* **274**(20), 14006-11, PMID: 10318813
- 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), 2267-76, PMID: 12644498
- Pas, H. H. and Robillard, G. T. (1988). S-phosphocysteine and phosphohistidine are intermediates in the phosphoenolpyruvate-dependent mannitol transport catalyzed by *Escherichia coli* EII^{Mtl}. *Biochemistry* **27**(16), 5835-9, PMID: 3142516
- Plumbridge, J. (2001). DNA binding sites for the Mlc and NagC proteins: regulation of *nagE*, encoding the N-acetylglucosamine-specific transporter in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **29**(2), 506-14, PMID: 11139621
- Postma, P. W. and Lengeler, J. W. (1985). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol Rev* **49**(3), 232-69, PMID: 3900671
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. and Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**(3), 543-94, PMID: 8246840
- Postma, P. W. and Stock, J. B. (1980). Enzymes II of the phosphotransferase system do not catalyze sugar transport in the absence of phosphorylation. *J Bacteriol* **141**(2), 476-84, PMID: 6988384
- Reizer, J. and Saier, M. H., Jr. (1997). Modular multidomain phosphoryl transfer proteins of bacteria. *Curr Opin Struct Biol* **7**(3), 407-15, PMID: 9204284
- Rice, J. B. and Vanderpool, C. K. (2011). The small RNA SgrS controls sugar-phosphate accumulation by regulating multiple PTS genes. *Nucleic Acids Research* **39**(9), 3806-3819, PMID: 21245045

- 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., Firman, K., Gromova, E. S., Gumport, R. I., Halford, S. E., Hattman, S., Heitman, J., Hornby, D. P., Janulaitis, A., Jeltsch, A., Josephsen, J., Kiss, A., Klaenhammer, T. R., Kobayashi, I., Kong, H., Kruger, D. H., Lacks, S., Marinus, M. G., Miyahara, M., Morgan, R. D., Murray, N. E., Nagaraja, V., Piekarowicz, A., Pingoud, A., Raleigh, E., Rao, D. N., Reich, N., Repin, V. E., Selker, E. U., Shaw, P. C., Stein, D. C., Stoddard, B. L., Szybalski, W., Trautner, T. A., Van Etten, J. L., Vitor, J. M., Wilson, G. G. and Xu, S. Y. (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* **31**(7), 1805-12, PMID: 12654995
- 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
- 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 II^{Glc} of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *J Bacteriol* **174**(9), 2843-50, PMID: 1569016
- Rungrassamee, W., Liu, X. and Pomposiello, P. J. (2008). Activation of glucose transport under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **190**(1), 41-9, PMID: 18368388
- Schlee, B. (2011). Molekulargenetische Analyse der Feinregulation des Glukose-Phosphotransferase-Systems in *Escherichia coli*. *Bachelorarbeit, Universität Osnabrück*
- Schmid, K., Schupfner, M. and Schmitt, R. (1982). Plasmid-mediated uptake and metabolism of sucrose by *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **151**(1), 68-76, PMID: 6211435
- 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), 211-5, PMID: 15059634
- 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), 26511-21, PMID: 9334229
- Shapiro, J., Machattie, L., Eron, L., Ihler, G., Ippen, K. and Beckwith, J. (1969). Isolation of pure lac operon DNA. *Nature* **224**(5221), 768-74, PMID: 4902927
- Shimoni, Y., Friedlander, G., Hetzroni, G., Niv, G., Altuvia, S., Biham, O. and Margalit, H. (2007). Regulation of gene expression by small non-coding RNAs: a quantitative view. *Molecular Systems Biology* **3**, PMID: 17893699
- 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), 14776-81, PMID: 12588863
- 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), 25871-5, PMID: 11340070
- Siebold, C., Flukiger, K., Beutler, R. and Erni, B. (2001). Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Lett* **504**(3), 104-11, PMID: 11532441
- Siepelmeier, J. (2003). Entwicklung von Systemen zur quantitativen Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration und der *in vivo* Aktivität der Adenylatzyklase CyaA in einer isogenen Stammreihe von *Escherichia coli* K-12. *Dissertation, Universität Osnabrück*

- Sigala, J. C., Flores, S., Flores, N., Aguilar, C., de Anda, R., Gosset, G. and Bolivar, F. (2009). Acetate metabolism in *Escherichia coli* strains lacking phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and futile cycles. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**(3-4), 224-35, PMID: 18679018
- Sonna, L. A., Ambudkar, S. V. and Maloney, P. C. (1988). The mechanism of glucose 6-phosphate transport by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**(14), 6625-30, PMID: 3283129
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**(3), 503-17, PMID: 1195397
- 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
- Staab, A. (2007). Molekularbiologische Charakterisierung des Glukose-Phosphotransferase-System Regulators MtfA aus *Escherichia coli* K-12. *Dissertation, Universität Osnabrück*
- Stein, A., Seifert, M., Volkmer-Engert, R., Siepelmeyer, J., Jahreis, K. and Schneider, E. (2002). Functional characterization of the maltose ATP-binding-cassette transporter of *Salmonella typhimurium* by means of monoclonal antibodies directed against the MalK subunit. *Eur J Biochem* **269**(16), 4074-85, PMID: 12180984
- Tanaka, S., Lerner, S. A. and Lin, E. C. (1967). Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J Bacteriol* **93**(2), 642-8, PMID: 4289962
- 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), 5344-52, PMID: 11032802
- 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), 329-46, PMID: 11361063
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9), 4350-4, PMID: 388439
- Ulveling, D., Francastel, C. and Hube, F. (2011). When one is better than two: RNA with dual functions. *Biochimie* **93**(4), 633-44, PMID: 21111023
- Valgepea, K., Adamberg, K., Nahku, R., Lahtvee, P. J., Arike, L. and Vilu, R. (2010). Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase. *BMC Systems Biology* **4**(1), 166, PMID: 21122111
- 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. *Molecular Microbiology* **54**(4), 1076-1089, PMID: 15522088
- Vanderpool, C. K. and Gottesman, S. (2005). Noncoding RNAs at the membrane. *Nat Struct Mol Biol* **12**(4), 285-6, PMID: 15809646
- Vanderpool, C. K. and Gottesman, S. (2007). The Novel Transcription Factor SgrR Coordinates the Response to Glucose-Phosphate Stress. *Journal of Bacteriology* **189**(6), 2238-2248, PMID: 17209026
- 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), 20454-9, PMID: 18042713

- Wadler, C. S. and Vanderpool, C. K. (2009). Characterization of homologs of the small RNA SgrS reveals diversity in function. *Nucleic Acids Research* **37**(16), 5477-5485, PMID: 19620214
- Wang, J., Gilles, E. D., Lengeler, J. W. and Jahreis, K. (2001). Modeling of inducer exclusion and catabolite repression based on a PTS-dependent sucrose and non-PTS-dependent glycerol transport systems in *Escherichia coli* K-12 and its experimental verification. *J Biotechnol* **92**(2), 133-58, PMID: 11640984
- Welinder-Olsson, C. and Kaijser, B. (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scand J Infect Dis* **37**(6-7), 405-16, PMID: 16011999
- Wilson, C. G., Magliery, T. J. and Regan, L. (2004). Detecting protein-protein interactions with GFP-fragment reassembly. *Nat Methods* **1**(3), 255-62, PMID: 16145770
- 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), 10382-6, PMID: 1961703
- 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), 103-19, PMID: 2985470
- 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), 4443-52, PMID: 10913077
- Zhang, A., Wassarman, K. M., Rosenow, C., Tjaden, B. C., Storz, G. and Gottesman, S. (2003). Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* **50**(4), 1111-24, PMID: 14622403
- Zhaxybayeva, O. and Doolittle, W. F. (2011). Lateral gene transfer. *Curr Biol* **21**(7), R242-6, PMID: 21481756
- Zimmermann, F. K. (1975). Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **31**(2), 71-86, PMID: 235086

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei einigen Menschen zu bedanken, die mir in den letzten drei Jahren zur Seite gestanden haben und ohne die ich diese Arbeit nicht hätte vollenden können.

Vielen lieben Dank...

... zuallererst an meinen Doktorvater PD Dr. Knut Jahreis, dafür, dass ich diese Arbeit in seinem Labor durchführen konnte, für die vielen hilfreichen Tipps und Tricks, die Unterstützung und das Vertrauen in mich und meine Arbeit.

... an Prof. Dr. Jürgen Heinisch, für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

... an Prof. Dr. Roland Brandt für die Begutachtung meiner Arbeit.

... an die FORSYS-Partner für die vielen Kooperationstreffen und die hilfreichen Gespräche, besonders aber an die Arbeitsgruppe von Dr. Katja Bettenbrock in Magdeburg für die Unterstützung bei Fermentationsversuchen und Wachstumsanalysen und die Möglichkeit auch mal ein anderes Laborleben kennen zu lernen.

... an Dr. Kurt Schmid, für die hilfreichen Ideen bei diversen Methoden und die notwendige Portion Humor, an Dr. Hans-Peter Schmitz für die Einführung in die Geheimnisse der Fluoreszenzmikroskopie und die Hilfe bei dem ein oder anderen Computerproblem, an Lucille Schmieding, besonders für sprachliche Unterstützung.

... an meine Arbeitskolleginnen, Anna, Liese und Katrin für die schöne Zeit im Labor und natürlich auch in der Freizeit, für Hilfe bei fachlichen Problemen, moralische Unterstützung und Zuspruch, wenn es notwendig war und so viel Lachen und Spaß, wie man es nur mit so guten Freunden haben kann. Ich danke euch für alles und so vieles mehr.

... an die ganze Arbeitsgruppe Genetik, die Nord- und Südseite, für die schöne Arbeitsatmosphäre und die tolle Zeit. Besonders aber an Manuela für die Einführung in den Southernblot und andere Methoden, Dette für die Transporttests, Southernblots und alles andere, Arne und Ulf für Fluoreszenzmikroskopie und Hefeversuche, Janina und Nele, nicht nur für Freizeitgestaltung, Katja und Sascha für eine schöne Woche in Karlsruhe und die sonnigen Aufenthalte auf der Südseite.

... last but not least an meine Freunde und Familie für die Unterstützung und den Rückhalt in den letzten drei Jahren. An meine Eltern, für einfach alles. An den Rest meiner Familie für moralischen Beistand und besonders auch an Monika und Susanne für tatkräftige Hilfe. An meine Freunde Janine, Fabian, Christian, Julia und Christiane, an die Zeltlagerleute und die Siedler und an alle meine Freunde in Osnabrück und Gütersloh, die ich hier nicht alle aufzählen kann. Vielen lieben Dank euch allen.

12 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 die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils 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 die Konstruktion des Stammes JKA1 in Zusammenarbeit mit Lisa Dorhn entstanden. Einige Ergebnisse zum „Crosslinking“ mit Paraformaldehyd (insbesondere die Abbildungen 5.25, 5.31, 5.33 und 5.50) und die damit verbundenen Plasmide wurden mit Bianca Schlee gemeinsam entwickelt.

Die Untersuchungen von JKA1 im Fermenter erfolgten in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. S. Steinsiek und Fr. Dr. K. Bettenbrock vom Max-Planck-Institut (Magdeburg), insbesondere die Abbildungen 5.54 bis 5.56.

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 im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Datum, Ort

Unterschrift