
**Die Sensorkinase KdpD aus *Escherichia coli*:
Funktionelle Reinigung, Nukleotidbindestudien und
in vivo Protein- Protein Interaktionen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
des Fachbereiches Biologie/Chemie
an der Universität Osnabrück

Kerstin Kipschull

Osnabrück, 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung von Kalium für die Zelle.....	1
1.2 Kaliumaufnahme in <i>E. coli</i>	1
1.3 Das KdpFABC-System	2
1.4 Die Regulation des Kdp-Systems.....	4
1.5 Die Sensorkinase KdpD	6
1.6 Reizwahrnehmung der Sensorkinase KdpD.....	10
1.7 KdpD und Pathogenität	13
1.8 Diese Arbeit.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	16
2.3 Medien und Anzuchtverfahren.....	20
2.4 Molekularbiologische und genetische Methoden.....	21
2.4.1 Plasmidisolierung	21
2.4.2 DNA-Modifikation.....	21
2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	21
2.4.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	22
2.4.5 Herstellung kompetenter Zellen	22
2.4.6 Transformation und Elektroporation von kompetenten Zellen	22
2.4.7 DNA-Sequenzanalyse	23
2.4.8 Konstruktion der BTHS-Plasmide	23
2.4.9 Konstruktion von Plasmiden mittels LIC Methode.....	24
2.4.10 Vector-backbone-Exchange (VBEx Methode)	25
2.5 Biochemische und analytische Methoden.....	28
2.5.1 Screening mittels McConkey-Agarplatten	28
2.5.2 β -Galaktosidase-Aktivitätstest	28
2.5.3 SDS-PAGE und Blue Native Gelelektrophorese	29
2.5.4 Immunoblot	29
2.5.5 Proteinbestimmung.....	30
2.5.6 Präparation von invertierten Membranvesikeln	30
2.5.7 Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie.....	30
2.5.8 Rekonstitution von KdpD-6His.....	31
2.5.9 Proteinphosphorylierung mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	32
2.5.10 Fluoreszenzspektroskopie	32
2.5.11 Bestimmung von Nukleotidaffinitäten mittels Titration	33
2.5.12 Verdrängungstitrationen mit ADP und ATP	33
2.5.13 Analyse der Titrationsdaten	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Anwendung des “BTH“ Systems zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen .	34
3.1.1 Interaktion der Sensorkinase KdpD mit dem Antwortregulator KdpE.....	35
3.1.2 Interaktion der Sensorkinase KdpD mit dem KdpFABC-Komplex.....	38
3.1.3 Interaktion der Sensorkinase KdpD mit Lipidsynthasen.....	40
3.1.4 Interaktion von KdpD Derivaten mit KdpD, KdpE, KdpB und PlsB	41
3.1.5 Interaktion der Sensorkinase KdpD mit co-eluierten Proteinen.....	45
3.2 Reinigung der Sensorkinase KdpD	47
3.2.1 Überproduktion von KdpD-His.....	47

3.2.2 Überproduktion von KdpD-10His in <i>Lactococcus lactis</i>	49
3.2.3 Solubilisierung von KdpD(+His-Tag).....	51
3.2.4 Ni ²⁺ -NTA- Affinitätschromatographie.....	55
3.2.5 Größenausschlusschromatographie	57
3.2.6 Rekonstitution und Kinase-Aktivität von gereinigtem KdpD-6His.....	61
3.2.7 Charakterisierung der Interaktion von KdpD-6His mit Nukleotiden mittels Fluoreszenzspektroskopie	63
4. Diskussion	72
4.1 Interaktionsstudien des Zweikomponentensystems KdpD/KdpE durch Etablierung des “Bacterial Two Hybrid“ Systems	72
4.2 Die Interaktion der Sensorkinase KdpD mit der KdpB Untereinheit des KdpFABC- Komplexes.....	76
4.3 Die Interaktion der Sensorkinase KdpD mit der Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase PlsB	81
4.4 Die Reinigung der Sensorkinase KdpD und das Oligomerisierungsverhalten des Proteins.....	85
4.5 Die Interaktion der Sensorkinase KdpD mit Nukleotiden	88
5. Ausblick	97
6. Zusammenfassung	99
7. Literaturverzeichnis.....	103
8. Danksagung	115
Anhang 1: Lebenslauf	
Anhang 2: Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung....	

Abkürzungen

Ap^r	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure
β-Gal	β-Galaktosidase
Bp	Basenpaare
BTH	“Bacterial Two Hybrid“
BTHS	“Bacterial Two Hybrid System“
CA	“catalytic ATP-binding“
Cm^r	Chloramphenicolresistenz
CTD	C-terminale Domäne
Cyglu 4	4-Cyclohexyl-1-Butyl-β-D-Glucoside
CYMAL 5	5-Cyclohexyl-1-Pentyl-β-D-Maltoside
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid
DHp	“Dimerization histidine phosphotransfer“
Em^r	Erythromycinresistenz
FOS-Cholin 10	n-Decyl Phosphocholin
kdp	“K ⁺ -dependent“
K_D	Dissoziationskonstante
LDAO	Lauryldimethylaminoxid
LIC	“Ligation Independent Cloning“
MCS	“Multiple Cloning Site“
NICE	Nisin induzierbares Genexpressionssystem
Ni²⁺-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NTD	N-terminale Domäne
OD_x	Optische Dicht der Wellenlänge x nm
RT	Raumtemperatur
TEV	Tobacco Etch Virus
TM	Transmembrandomäne
TMC	Transmembrandomänen + C-terminale Domäne
Usp	“Universal Stress Protein“
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Kalium für die Zelle

Bakterien sind in ihrer Umgebung ständig wechselnden Umwelteinflüssen ausgesetzt und müssen daher über viele verschiedene Mechanismen zur Anpassung an diese Bedingungen verfügen. Von großer Bedeutung ist dabei die Aufrechterhaltung von Ionengradienten über der Zellmembran. Hierbei spielt Kalium (K^+) neben Natrium (Na^+) eine entscheidende Rolle. Es handelt sich hierbei um monovalente Kationen, die in entgegengesetzter Richtung in die Zelle hinein oder aus ihr heraus transportiert werden und somit einen Konzentrationsgradienten über der Zellmembran aufrechterhalten. Dabei werden Kaliumionen meistens intrazellulär angereichert (Harold *et al.*, 1974), während Natriumionen aus der Zelle ausgeschleust werden (Bakker, 1993). Die intrazelluläre K^+ -Konzentration liegt bei 200-500mM, wobei fast die Hälfte frei im Cytoplasma vorliegt. Bei diesen K^+ -Konzentrationen ist die Aktivierung von Enzymen (Suelter, 1970), die Regulation des intrazellulären pH-Wertes (Booth, 1985; Stumpe *et al.*, 1996) und der Aufbau bzw. die Regulation des Zellurgors gegeben. Eine weitere Adaptionstrategie der Bakterien umfasst die Bereitstellung des Salzes Kalium-Glutamat. Kalium wirkt zusammen mit Glutamat als "second messenger" und induziert durch eine Aufhebung der inhibitorischen Wechselwirkung zwischen der RNA-Polymerase und dem σ^{38} - Promotor (Lee & Gralla, 2004), die Transkription von Genen, welche für Transportsysteme kodieren, die für die Aufnahme von kompatiblen Soluten essentiell sind. Die Transkription des σ^{70} -Promotors wird dabei inhibiert. Biochemische Studien von Lee *et al.* (2010) zeigten zusätzlich, dass K^+ durch den unterschiedlichen Einfluß auf die Bindung der σ^{70} - und σ^{38} -Faktoren an die RNA-Polymerase, für die Kompetition der σ^{70} - und σ^{38} -Faktoren verantwortlich ist.

1.2 Kaliumaufnahme in *E. coli*

Für die Aufnahme von Kalium besitzt *E. coli* verschiedene, regulierbare Transportsysteme, die sich in ihren Affinitäten für Kalium unterscheiden. Die konstitutiven Kaliumaufnahmesysteme TrkG/TrkH sowie Kup haben eine geringere Affinität für Kalium und transportieren Kaliumionen in die Zelle hinein, wenn sich die externe K^+ -Konzentration in der Umgebung über 200 μ M befindet (Bossemeyer *et al.*, 1989; Dosch *et al.*, 1991; Schlösser *et al.*, 1992). Das einzig induzierbare K^+ -Aufnahmesystem ist das hochaffine KdpFABC-System (K^+ dependent). Wird die K^+ -Aufnahme in die Zelle durch die niedrigaffinen Transportsysteme nicht mehr gewährleistet, transportiert dieses System K^+ -

Ionen mit hoher Affinität in die Zelle hinein (Altendorf & Epstein, 1996). Die Bestimmung des K_M -Wertes für die Aufnahme von Kalium ergab hier einen Wert von $\sim 2\mu\text{M}$, während der K_M -Wert des Trk-Systems zwischen 0.5 und 1.5mM liegt (Rhoads *et al.*, 1976). Andersherum kann Kalium bei einem hypoosmotischen Schock über die mechanosensitiven Kanäle ausgeschleust werden. Desweiteren kann *E. coli* über die KefB/KefC-Systeme (Bakker *et al.*, 1987; Booth *et al.*, 1996) und einen K^+/H^+ - Antiporter Kaliumionen aus dem Cytoplasma exportieren. Eine genaue Darstellung der Kaliumtransportsysteme ist in Abbildung 1.1 gezeigt.

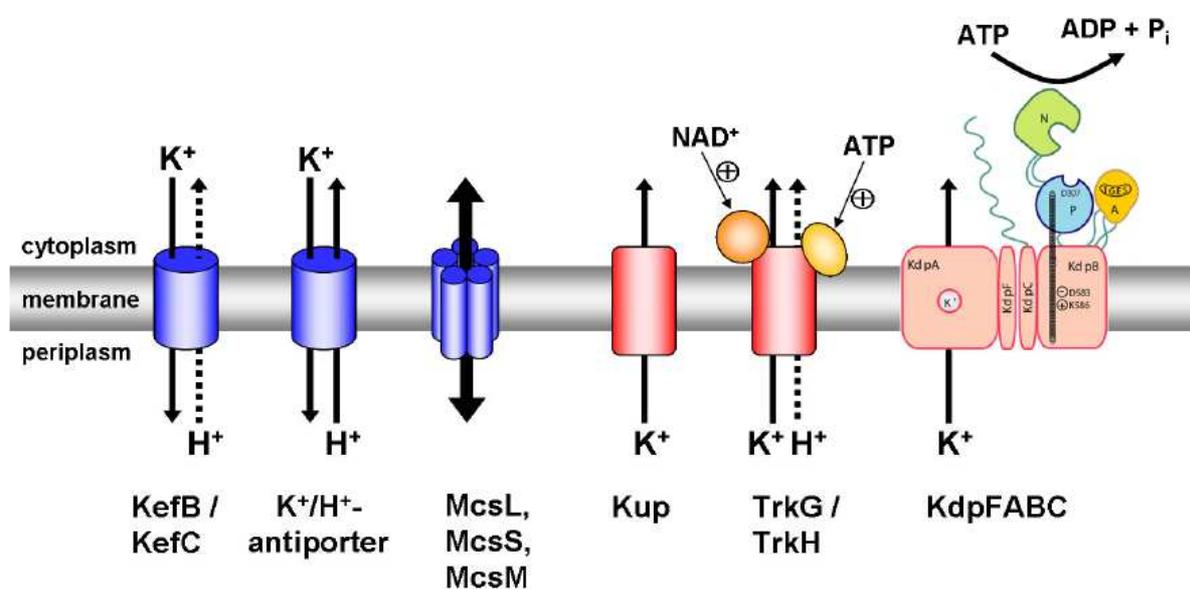


Abb. 1.1: Kaliumtransportsysteme in *Escherichia coli* (verändert nach Epstein, 1982).

1.3 Das KdpFABC-System

Der KdpFABC-Komplex gehört zur Familie der P-Typ ATPasen, deren Mitglieder sowohl eukaryotischen sowie prokaryotischen Ursprungs entstammen. Typisches Merkmal dieser Familie ist die Bildung eines säurestabilen und alkalilabilen Phosphointermediats (Pedersen & Carafoli, 1987). P-Typ ATPasen funktionieren als Ionenpumpen, sie transportieren Kationen und schaffen so große Ionengradienten über der Membran. Die nötige Energie hierzu wird durch die aus der Phosphorylierung freigesetzten Gibbs Energie geliefert (Møller *et al.*, 1996). Alle P-Typ ATPasen besitzen gemeinsame strukturelle Merkmale, dabei kann man insbesondere die katalytische Untereinheit in vier Domänen mit spezifischen Funktionen unterteilen. Im Falle des KdpFABC-Systems findet man diese strukturelle Ähnlichkeit in der Untereinheit KdpB, die sich in eine Transmembrandomäne, eine Phosphorylierungsdomäne, eine Attenuator-domäne und eine Nukleotidbindedomäne unterteilen lässt (Greie & Altendorf,

2007). Neben KdpB setzt sich der KdpFABC-Komplex aus den drei weiteren Untereinheiten, KdpF, KdpA, und KdpC zusammen (Laimins *et al.*, 1981; Hesse *et al.*, 1984; Gaßel *et al.*, 1998). Die entsprechenden Strukturgene liegen in dem *kdpFABC*-Operon vor.

Verantwortlich für die Bindung und den Transport von Kaliumionen ist die Untereinheit KdpA (Buurmann *et al.*, 1995). Sie ist 59kDa groß und mit 10 Transmembrandomänen in der Cytoplasmamembran der Zelle verankert. KdpA stellt einen Kanal vom MPM-Typ (membrane helix – P-loop – membrane helix) dar (Durell *et al.*, 2000).

Die oben bereits erwähnte katalytische Untereinheit KdpB ist mit einem Molekulargewicht von 72kDa die größte Untereinheit des Transportkomplexes. Das Protein durchspannt die Cytoplasmamembran vermutlich mit sieben Transmembrandomänen (Altendorf *et al.*, 1998) und liefert die notwendige Energie für den Transport der K⁺-Ionen (Siebers & Altendorf, 1989; Siebers & Altendorf, 1993). Somit ist die ATP-Hydrolyse und die Substrattranslokation auf zwei Untereinheiten verteilt, was unter den P-Typ ATPasen sonst nicht vorkommt (Bramkamp *et al.*, 2007). Es wird vermutet, dass eine Kopplung dieser beiden Vorgänge durch die fünfte Transmembrandomäne von KdpB vermittelt wird (Bramkamp & Altendorf, 2003). Diese Domäne besitzt die hochkonservierten polaren Aminosäuren D583 und K586. Sie bilden einen Dipol, der wie in Becker *et al.* (2007) diskutiert wird, Auswirkungen auf ein von KdpA gebundenes K⁺-Ion haben könnte und dieses somit durch die Pore bewegen könnte. In Übereinstimmung mit diesen Vermutungen, konnte über Einzelmolekül-Transmissions-Elektronenmikroskopie ein enger Kontakt von KdpA mit der Transmembrandomäne von KdpB gezeigt werden (Heitkamp *et al.*, 2008).

Die 20kDa große KdpC-Untereinheit ist essentiell für den Transport und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Assemblierung des Komplexes (Laimins *et al.*, 1981; Gaßel, 1999). Außerdem wird eine Funktion von KdpC bei der Energieübertragung von KdpB und KdpA diskutiert (Gaßel & Altendorf, 2001), sowie eine mögliche katalytische Rolle bei dem Reaktionszyklus des KdpFABC-Komplexes (Ahnert *et al.*, 2008). Zuletzt wurde die Funktion von KdpC als katalytisches Chaperon diskutiert, welches durch Interaktion mit ATP die schwache ATP-Bindeaffinität der hochkonservierten Phosphorylierungsstelle des KdpB Proteins erhöht (Irzik *et al.*, 2011). Diese Hypothese wird ebenfalls von Ergebnissen aus der Einzelmolekül-Transmissions-Elektronenmikroskopie von Heitkamp *et al.* (2008) unterstützt. Der cytosolische Teil von KdpC konnte in enger Nachbarschaft zur Nukleotidbindedomäne von KdpB lokalisiert werden, was eine direkte Interaktion während des kooperativen ATP-Bindemechanismus ermöglichen würde. Der mit 3,1kDa kleinsten Untereinheit des Komplexes, KdpF, wird eine Funktion bei der Stabilisierung des Komplexes zugewiesen,

wobei das Peptid für den Transport *in vivo* nicht essentiell ist (Gaßel *et al.*, 1999). Passend dazu werden hydrophobe Peptide als eine neue Klasse aktiver Moleküle in *E. coli* und *Salmonella enterica* serovar Typhimurium angesehen. Es wird diskutiert, dass diese Peptide durch Interaktion mit Proteinpartnern an der inneren Membran und durch Modulieren der Aktivität bzw. Stabilität dieser Partnerproteine regulatorische Funktionen haben (Alix & Blanc-Potard, 2009).

Die Studien von Heitkamp *et al.* (2008) befassen sich außerdem mit der Aufklärung der makromolekularen Struktur des KdpFABC-Komplexes. Mithilfe von chemischen Crosslink-Studien und Einzelmolekül-FRET-Messungen konnte der KdpFABC Komplex als Homodimer beschrieben werden. Desweiteren wurde die Dissoziationskonstante des Monomer/Dimer Equilibriums ermittelt. Mit 30-50nM stimmt sie mit bereits ermittelten Dissoziationskonstanten anderer im Dimer vorliegenden P-Typ ATPasen überein.

1.4 Die Regulation des Kdp-Systems

Das Sensorkinase/Antwortregulatorsystem KdpD/KdpE aus *E. coli* ist ein typisches Zweikomponentensystem, welches die Expression des *kdpFABC*-Operons reguliert (Walderhaug *et al.*, 1992). Das *kdpFABC*-Operon mit dem durch KdpE induzierbaren Promotor und das *kdpDE*-Operon bilden zusammen das *kdp*-Regulon, dessen Schema in Abbildung 1.2 zu sehen ist. Das *kdp*-Regulon ist bei 16,5 min auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert (Bachmann, 1990). Das *kdpDE*-Operon kodiert für die beiden regulatorischen Komponenten des Kdp-Systems, der Sensorkinase KdpD und dem Antwortregulator KdpE (Polarek *et al.*, 1992; Walderhaug *et al.*, 1992). Der Promotor des *kdpDE*-Operons befindet sich innerhalb des *kdpC* Gens; der Transkriptionsstart von *kdpDE* liegt 5 bp vor dem *kdpC* Stopcodon (Polarek *et al.*, 1992). Dieser Promotor weist ähnliche Konsensussequenzen wie die „-35“- und die „-10“-Region von typisch vegetativen Promotoren in *E. coli* auf. Der *kdpDE*- Promotor ist (vermutlich) konstitutiv und synthetisiert ständig die Proteine KdpD und KdpE auf einem basalen Level. Unter *kdp*-induzierenden Bedingungen wird die Synthese von KdpD und KdpE um das 11-fache erhöht (Polarek *et al.*, 1992). Dieses Phänomen ist auf den “read through“-Effekt zurückzuführen, welcher ein Durchlesen der RNA-Polymerase bei der Transkription des *kdpFABC*-Operons in das *kdpDE*-Operon beschreibt (Voelkner *et al.*, 1993).

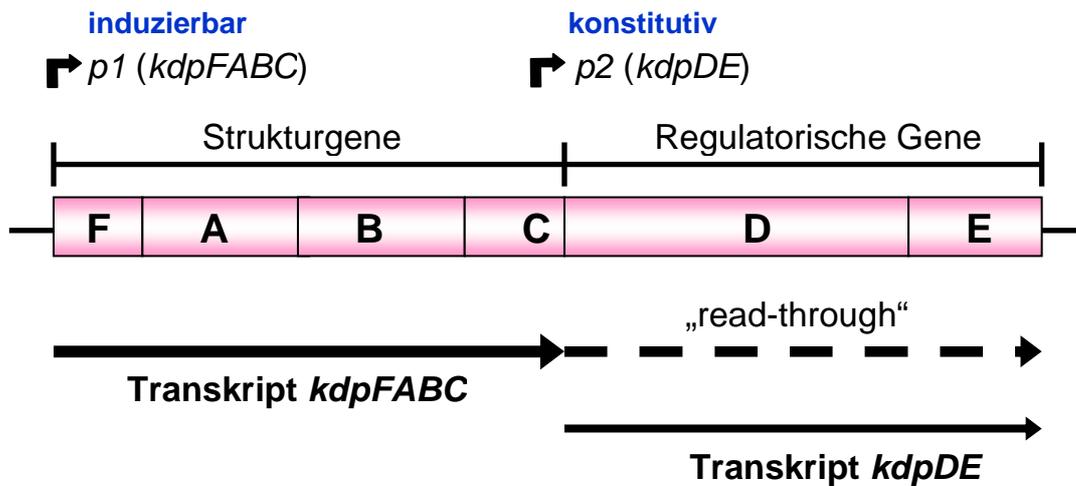


Abb. 1.2: Das *kdp*-Regulon aus *Escherichia coli* (verändert nach Epstein, 1985).

Bei Erhöhung der Osmolalität sowie unter Kaliumlimitation kommt es zu einer Autophosphorylierung der Sensorkinase KdpD mit der γ -Phosphorylgruppe von ATP am hochkonservierten Histidinrest H673 in der "Transmitter"-Domäne (Nakashima *et al.*, 1992; Voelkner *et al.*, 1993). Für die einwandfreie Funktion einer Sensorkinase ist dabei wichtig, dass diese als Dimer in der Cytoplasmamembran der Zelle vorliegt. Dass der homooligomere Zustand einer Sensorkinase, unter anderem auch von KdpD, für deren Funktionalität von entscheidender Bedeutung ist, wurde bereits für viele Sensorkinasen nachgewiesen (Hidaka *et al.*, 1997; Heermann *et al.*, 1998). Infolge der Phosphorylierung der Sensorkinase KdpD wird die Phosphorylgruppe auf den Aspartatrest D52 in der "Receiver"-Domäne des Antwortregulators KdpE übertragen (Nakashima *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 1997; Lucassen, 1998). Katalysiert wird dieser Schritt vermutlich durch KdpE, da es *in vitro* auch durch Acetylphosphat phosphoryliert werden kann (Lucassen, 1998). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung von KdpE eine Homodimerisierung des Antwortregulators zur Folge hat (Lucassen, 1998). Dieses phosphorylierte KdpE-Homodimer zeigt eine gesteigerte Affinität zu einer speziellen 23bp Bindesequenz unmittelbar stromaufwärts der „-35“ und „-10“ Regionen des *kdpFABC*-Promotors. Die Bindung von phosphoryliertem KdpE an diese Sequenz induziert schließlich die Transkription des *kdpFABC*-Operons (Nakashima *et al.*, 1993). Neben der Kinase-Aktivität weist KdpD auch eine Phosphatase-Aktivität auf, die für die Dephosphorylierung von KdpE~P verantwortlich ist (Jung *et al.*, 1997). Vermutlich ist ein elektrostatischer Mechanismus für den Wechsel zwischen Kinase- und Phosphatase-Aktivität von KdpD verantwortlich (Jung & Altendorf, 1998a).

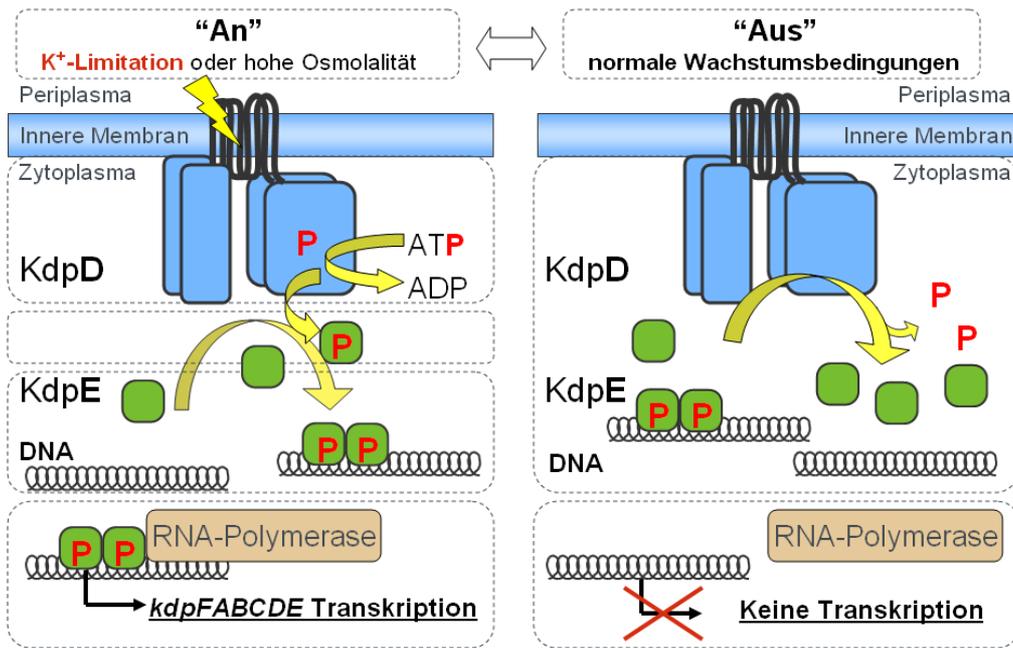


Abb.1.3: Model der Signaltransduktionskaskade zwischen KdpD und KdpE (verändert nach Hamann, 2006).

1.5 Die Sensorkinase KdpD

Die Sensorkinase KdpD besteht aus 894 Aminosäuren und ist in Abb.1.3 in ihrem schematischen Aufbau dargestellt. Gemäß ihres Hydrophobizitätsprofils (Walderhaug *et al.*, 1992) und mit Hilfe von Untersuchungen mit LacZ- und PhoA-Hybridproteinen sowie Protease-Behandlung von KdpD in Sphäroplasten, wurde die Topologie von KdpD bestimmt. Die Sensorkinase ist mit vier Transmembrandomänen in der Cytoplasmamembran verankert. Sowohl der N- als auch der C-Terminus sind im Cytoplasma lokalisiert (Zimmann *et al.*, 1995). Die "Input"-Domäne, welche neben dem für Sensorkinasen ungewöhnlich langen N-terminalen Bereich, die vier Transmembrandomänen, eine dahinterliegende Arginin-reiche Region und weitere 140 Aminosäuren beinhaltet, ist über einen Linker mit der konservierten "Transmitter"-Domäne verbunden.

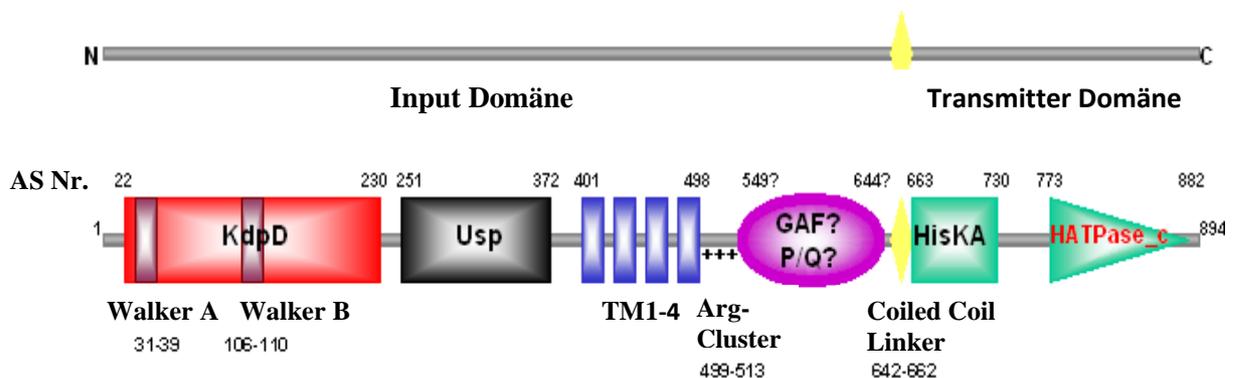


Abb. 1.4: Schematische Übersicht der Sensorkinase KdpD (nach Zimmann, 2007).

Bei Vergleichen der Aminosäuresequenz N-terminaler Domänen von KdpD Proteinen verschiedener Bakterien, fällt auf, dass diese in ihrer Länge für Sensorinasen einzigartig, aber in ihrer Aminosäuresequenz hoch konserviert ist. Außerdem fallen zwei Sequenzmotive auf, die den für eine ATP-Bindung charakteristischen “Walker A“- und “Walker B“-Motiven ähneln. Das Sequenzmotiv GXXXGXGKT innerhalb der N-terminalen Domäne unterscheidet sich zu einem klassischen “Walker A“-Motiv in einer zusätzlichen Aminosäure zwischen den beiden ersten Glycinresten. Sequenzverkürzungen, die Reste dieses Motifs umfassen, resultieren in einer deregulierten Phosphataseaktivität des KdpD Proteins (Jung & Altendorf, 1998b). Versuche von Heermann (2001) mit der N-terminalen Domäne (KdpD/1-395) zeigten, dass sie, obwohl die Transmembrandomänen fehlen, an die Cytoplasmamembran assoziiert vorliegt. Die Anlagerung an die Membran könnte in der hydrophoben Aminosäuresequenz an Position 27-43 von KdpD begründet liegen. Nach Heermann *et al.* (2000) hat die Assoziation der N-terminalen Domäne an die Cytoplasmamembran einen Einfluss auf die ATP-Bindung, denn diese konnte nur gezeigt werden, wenn die Domäne assoziiert vorlag. Hamann (2008) konnte zusätzlich KdpD/1-395 (6His) auch im Cytoplasma nachweisen. Eine Bindung von ATP an die lösliche N-terminale Domäne sowie an membrangebundenes KdpD/1-395 (6His) erwies sich bei genauerer Betrachtung jedoch als unspezifisch. Neben den beiden “Walker A und B“ ähnlichen Sequenzmotiven, wurde mithilfe von Strukturmodellierungen eine weitere mögliche ATP-Bindedomäne entdeckt (Strahl & Greie, 2008). Hierbei handelt es sich um eine Domäne, die sich in allen Mitgliedern der Familie der Usp-Proteine (“universal stress protein“) wiederfinden lässt. Die Superfamilie der Usp-Proteine umfasst eine konservierte Proteingruppe, die sowohl in Bakterien, Archaea und Eukaryoten (Pilze, Pflanzen) vorkommt. Dabei besitzt eine Vielzahl von Organismen ein ganzes Repertoire an Usp-Proteinen. Diese Proteine liegen entweder als “single-type“ Proteine vor oder sie sind, wie im Falle von KdpD, zusammen mit anderen funktionellen Domänen in größere Proteine eingebaut (Siegele, 2005; Weber, 2003). Die Synthese dieser Proteine ist bei vielen Stresssituationen, die das Zellwachstum hemmen, erhöht (Van Bogelen *et al.*, 1990). *E. coli* besitzt sechs solcher Usp Proteine, die, basierend auf Sequenzähnlichkeiten, in zwei Familien unterteilt werden können (Gustavsson *et al.*, 2002). Zur Familie der UspA Proteine gehören UspA, UspC und UspD, wohingegen die *E. coli* Proteine UspF und UspG einer anderen gemeinsamen Familie zugeordnet werden. UspE wird als Sonderfall durch Ähnlichkeiten zu beiden Familien dazwischenliegend angeordnet. Gustavsson und Mitarbeiter konnten dabei ein erhöhtes Niveau an UspA, UspC, UspD und UspE in Folge von Nährstoffmangel, moderatem Hitzestress, oxidativem Stress und

osmotischen Stress detektieren. UspG wird ebenfalls bei osmotischem Stress induziert und wird dabei autophosphoryliert und autoadenyliert (Weber & Jung, 2006). Studien von Heermann *et al.* (2008 und 2009) diskutieren zum einen eine mögliche Bindung von UspC an die N-terminale Domäne von KdpD zur Stabilisierung des Komplexes aus KdpD, phosphoryliertem KdpE und DNA unter Salzstress, zum anderen wird mithilfe von Usp-Domänen-Austauschen ein Model der KdpD Aktivierung aufgestellt, dem elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der N- und C-terminalen Domäne des KdpD Proteins zugrunde liegen.

Als weiteres Charakteristikum in der Struktur von KdpD gilt eine Ansammlung von positiv geladenen Argininen hinter der vierten Transmembrandomäne des Proteins. Eine ortsgerichtete Mutagenese der Arginine 503, 506 und 508 führt zu einer Änderung des Phosphatase-Kinase-Verhältnisses *in vitro*. Vermutlich wird der wechselnde Anteil von Kinase- und Phosphatase-Aktivität durch einen elektrostatischen Wechselmechanismus gesteuert (Jung & Altendorf, 1998a). Diese Hypothese wird durch die Feststellung unterstützt, dass negativ geladene Phospholipide für die Kinase-Aktivität von KdpD *in vitro* essentiell sind, während die Struktur des Phospholipids eher eine untergeordnete Rolle spielt (Stallkamp *et al.*, 1999). Schniederberend *et al.* (2009) konnten zeigen, dass es unter Kalium limitierenden Bedingungen im Medium zu einem Anstieg des anionischen Phospholipids Cardiolipin während der exponentiellen Wachstumsphase kommt, verbunden mit einem reduzierten Gehalt des zwitterionischen Phospholipids Phosphatidylethanolamin. Eine Änderung der Fettsäure-zusammensetzung der Phospholipide konnte unter K⁺-Limitation nicht beobachtet werden.

Desweiteren wird angenommen, dass die Initiation der Transkription des *kdpFABC*-Operons durch das Abschalten bzw. die Reduktion der Phosphatase-Aktivität von KdpD gesteuert wird (Brandon *et al.*, 2000). Diese Hypothese unterstützt auch die Beobachtung, dass Mutanten mit einem semikonstitutiven Phänotyp im Bezug auf die *kdpFABC*-Expression unter K⁺-Limitation, eine verminderte Phosphatase-Aktivität im Verhältnis zur Kinase-Aktivität aufweisen (Zimmann *et al.*, 2007). Die verminderte Phosphatase-Aktivität von KdpD führt zu einer Anhäufung von phosphoryliertem KdpE, welches im dimerisierten Zustand die *kdpFABC*-Expression folglich auch unter nicht-induzierenden Bedingungen ermöglicht. Die Phosphatase-Aktivität von KdpD ist *in vitro* abhängig von der Anwesenheit von ATP (Jung & Altendorf, 1998b). Es konnte gezeigt werden, dass nur in Gegenwart von ATP der phosphorylierte Antwortregulator schnell und in Abwesenheit von ATP langsam dephosphoryliert wird (Jung & Altendorf, 1998b). Untersuchungen von KdpD-Konstrukten,

bei denen die Transmembrandomänen sowie das Arginin-Cluster fehlten, zeigten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* keine Kinase-Aktivitäten mehr (Puppe *et al.*, 1996). Somit wurde den vier Transmembrandomänen von KdpD zunächst eine bedeutsame Rolle bei der Reizwahrnehmung und Signalweiterleitung zugeteilt (Puppe *et al.*, 1996). Dagegen zeigten KdpD Proteine, welche Deletionen im Bereich der Transmembrandomänen, unter Beibehaltung der Arginin-reichen Region besaßen, *in vitro* eine Kinaseaktivität und *in vivo* die daraus resultierende Fähigkeit zur Expression des *kdpFABC*-Operons (Jung *et al.*, 1998; Heermann *et al.*, 2003b). Aufgrund weiterer Untersuchungen wurde den vier Transmembrandomänen nur eine entscheidende Rolle bei der korrekten Positionierung der beiden im Cytoplasma lokalisierten N- und C-terminalen Domänen zuerkannt, während die Relevanz für die Reizwahrnehmung in Bezug auf Kaliumlimitation als weniger wichtig angesehen wurde (Heermann *et al.*, 2003b). Dieser Interpretation sprach die Beobachtung entgegen, dass Cysteinaustausche in der TM 1 zu einer starken Induktion der *kdpFABC*-Expression bei Erhöhung der Osmolalität und teilweise auch durch K^+ -Limitation führten (Stallkamp *et al.*, 2002). Folglich wurde der TM 1 eine Rolle bei der Wahrnehmung der Osmolalität zugeschrieben. Zimmann *et al.* (2007) interpretierten die im Gegensatz zum Wildtyp stark reduzierte Induktionsrate des *kdpFABC*-Operons unter kaliumlimitierenden Bedingungen sehr wohl als vermindertes Signaltransduktionsvermögen des KdpD Δ TM1-4 Proteins. Der semikonstitutive Phänotyp des entsprechenden Stammes hinsichtlich der *kdpFABC*-Expression erklärt die geringe *kdp*-Induktion unter K^+ -Limitation.

Zwischen dem Arginin-Cluster und dem "Coiled Coil" Linker, der die "Input" Domäne mit der "Transmitter" Domäne verbindet, liegen weitere 140 Aminosäuren, die laut Pfam-Datenbank Sequenzhomologien zu typischen GAF-Domänen aufweisen. Es wird vermutet, dass GAF-Domänen Liganden binden können, die eine Rolle in Reizwahrnehmungsprozessen spielen (Aravind & Ponting, 1997). Untersuchungen mit einer GAF-Deletionsmutante zeigten, dass auch bei KdpD dieser Bereich essentiell ist und in der Reizwahrnehmung bzw.-weiterleitung von Bedeutung sein könnte (Hüging, 2006).

Die "Transmitter" Domäne des KdpD Proteins weist die für Sensorinasen typischen Sequenzmotive „H“, „N“, „G“, „F“ und „G2“ auf (Parkinson & Kofoid, 1992). Diese Domäne wird in zwei Subdomänen unterteilt. Die erste Subdomäne besitzt das „H“-Motiv mit dem hochkonservierten Histidinrest und wird als „DHp“-Domäne ("dimerization histidine phosphotransfer") bezeichnet. Auf Grund des Histidinrestes werden Sensorinasen auch als Histidinkinasen (HK) bezeichnet. Die „DHp“-Domäne bildet z.B. bei der Sensorkinase EnvZ mit einer zweiten „DHp“-Domäne ein Dimer (Tomomori *et al.*, 1999). Die andere

mit Glutamat als “second messenger“ und induziert die Transkription von Genen, welche für Transportsysteme kodieren, die für die Aufnahme von kompatiblen Soluten essentiell sind. Ist der Zellturgor letztlich durch den Einstrom der Ionen und kompatiblen Solute wiederhergestellt, wird die Transkription des *kdpFABC*-Operons wieder eingestellt. Das “turgor control“ Modell wird jedoch angezweifelt, da man zeigen konnte, dass die *kdpFABC*-Expression nur dann ausgelöst wird, wenn eine Erhöhung der Osmolalität im Medium und damit eine Abnahme des Zellturgors, der Zugabe von Salzen zugrunde liegt. Die Zugabe von Zucker als osmotisch wirksame Substanz löst nach Gowrishankar *et al.* (1985) und Sutherland *et al.* (1986) keine *kdpFABC*-Expression aus, während Laimins (1981) die Induktion der *kdpFABC*-Expression aufgrund einer Erhöhung der Osmolalität im Medium durch osmotisch aktive Zucker und verschiedene Salze zeigen konnte. Weitere Experimente zur Reizwahrnehmung wiesen daraufhin, dass eine Kombination von mechanischer Membranspannung und externer K^+ -Konzentration von der Sensor kinase wahrgenommen wird (Sugiura *et al.*, 1994). Steigt die externe K^+ -Konzentration auf Werte über 2mM an, wird nicht nur die *kdpFABC*-Transkription, sondern auch die Aktivität des KdpFABC-Transportkomplexes inhibiert (Roe *et al.*, 2000). Die neuesten Ergebnisse bezüglich Untersuchungen zum “turgor control“ Modell liefern Hamann *et al.* (2008). Hier konnte direkt gezeigt werden, dass der Turgordruck nicht der Stimulus ist, den KdpD unter Kalium limitierenden Bedingungen wahrnimmt. Eine maximale und permanente Expression der Gene des KdpFABC-Systems konnte bei einem Kalium-“downshock“ detektiert werden, ein Schrumpfen des Cytoplasmas der gestressten Zellen fand aber nicht statt, wohingegen eine Reduktion des cytoplasmatischen Volumens aus einem osmotischen “Upshock“ resultierte, dabei die Gene des KdpFABC-Systems aber nur moderat und transient induziert wurden. Ein osmotischer Schock der Zellen mit 0.4M KCl verminderte das cytoplasmatische Volumen um 40%, eine Induktion der *kdpFABC* Gene blieb jedoch aus, was zeigt, dass die Verminderung des cytoplasmatischen Volumens der Zelle in diesem Fall wahrscheinlich einem Natriumeffekt zugrunde liegt.

Das “ionic strength“ Modell zur Osmolaritätswahrnehmung besagt, dass der Reiz in dem Anstieg der cytoplasmatischen Ionenkonzentration liegt (Poolman *et al.*, 2002). Eine aus der Plasmolyse resultierende Volumenabnahme der Zelle erhöht die Konzentrationen aller cytoplasmatischen Komponenten. Die damit einhergehende erhöhte Kaliumkonzentration im Cytoplasma der Zelle aktiviert in Kombination mit dem “macromolecular crowding“ die Transkription von Genen, die an der Zellantwort auf die erhöhte Osmolalität beteiligt sind, wozu unter anderem auch das *kdpFABC*-Operon gehört. Als Argument für dieses Modell

konnten Jung *et al.* (2000) *in vitro* zeigen, dass eine Erhöhung der Ionenstärke im Cytoplasma mit einem Anstieg der Autophosphorylierungsaktivität der Sensorkinase gekoppelt ist. Desweiteren wurde der Einfluss von Cs^+ auf die Expression des *kdpFABC*-Operons getestet. Cs^+ ist als ein Inhibitor für K^+ -Transportsysteme bekannt (Bossemeyer *et al.*, 1989). Die Zugabe von Cs^+ zum Medium bewirkte eine Steigerung der *kdpFABC*-Transkription und damit eine erhöhte Synthese des KdpFABC-Komplexes *in vivo* (Jung *et al.*, 2001a). Diese Beobachtung beruht vermutlich auf der abnehmenden K^+ -Konzentration im Cytoplasma, welche durch die Inhibierung der K^+ -Transporter hervorgerufen wird. Im Gegensatz dazu konnten Hamann *et al.* (2008) zeigen, dass es keinen Zusammenhang zwischen einer Änderung der cytoplasmatischen Kaliumkonzentration nach Zugabe verschiedener Substanzen zum Medium der Zellen und einer Induktion der Gene des Kdp-Systems gibt. Bezüglich eines Kalium-“downshocks“ konnte keine sofortige Veränderung in der cytoplasmatischen Kalium- und Glutamatkonzentration detektiert werden, die als Stimulus für die *kdp*-Induktion dienen könnte. Die Ergebnisse von Balaji *et al.* (2005) zweifeln sowohl das “turgor control“ als auch das “ionic strength“ Model an. Mittels quantitativer real-time RT-PCR Analyse der Expression von sieben osmotisch regulierten Genen in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium konnte zum Einen gezeigt werden, dass die Induktion der *kdp*-Gene nach einem osmotischen Schock mit 0,3M NaCl erst nach Induktion der Gene, die für Proteine kodieren, welche für den Transport kompatibler Solute verantwortlich sind, stattfand. Zum anderen wurde zusätzlich eine Abnahme der *kdp*-Induktion nach osmotischen Schock mit 0,6M Sucrose beobachtet. Wie aus der Zusammenfassung dieser Ergebnisse hervorgeht, ist es wahrscheinlicher, dass die Sensorkinase KdpD unterschiedliche Reize wahrnehmen kann.

Bereits früher wurde gezeigt, dass die *kdpFABC*-Expression von der cytoplasmatischen K^+ -Konzentration und/oder von der Rate des K^+ -Transportes abhängen könnte (Asha & Gowrishankar, 1993). Beide Modelle zur Regulation liefern noch keine zufriedenstellende Antwort auf die Frage, welche Reize von der Sensorkinase wahrgenommen werden.

Einen anderen Ansatz verfolgen Rothenbücher *et al.* (2005), indem sie davon ausgehen, dass die cytoplasmatische C-terminale Domäne von KdpD als Sensor der extracytoplasmatischen Kaliumkonzentration fungiert. Diese These basiert auf Versuchsergebnissen, die zeigten, dass die lösliche C-terminale Domäne die Fähigkeit besitzt, die Deletion des Wildtyp *kdpD* Gens zu komplementieren. Da die *kdpFABC*-Expression jedoch in diesem Falle sehr niedrig ist, ist diese Aussage eher zweifelhaft. Diese kritische Bewertung steht im Einklang mit der

Beobachtung, dass die intrazelluläre K^+ -Konzentration als Reiz unwahrscheinlich ist (Malli & Epstein, 1998; Hamann *et al.*, 2008).

Eine weitere Möglichkeit der Reizwahrnehmung von KdpD könnte in der Interaktion mit anderen Proteinen liegen. In *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv konnte eine Wechselwirkung der KdpD-“Input“-Domäne mit den Lipoproteinen LprJ und LprF nachgewiesen werden (Steyn *et al.*, 2003), was bedeuten könnte, dass es funktionell möglich ist, ein Zweikomponenten-system mit Mitgliedern großer Membranproteinfamilien zu koppeln und darauf hinweist, dass Reize, die von KdpD wahrgenommen werden, über diese Adapterproteine zur Sensor kinase geleitet werden könnten. Görke *et al.* (2009) konnten außerdem mittels “Two Hybrid“ Daten eine Interaktion zwischen der Sensor kinase KdpD und dem Phosphotransferase-Protein IIA^{Ntr} aufzeigen.

1.7 KdpD und Pathogenität

Aktuelle Studien zum Zweikomponentensystem KdpD/KdpE befassen sich mit einer möglichen Bedeutung des Systems im Rahmen bakterieller Pathogenität. Das Sensor kinase/ Antwortregulator-System KdpD/KdpE des insekten- und humanpathogenen Bakteriums *Photorhabdus asymbiotica* reicht aus, um einen harmlosen *E. coli* Laborstamm widerstandsfähig gegen phagocytotischen Verdau zu machen und so in den Hemocyten zu verbleiben, resultierend im Tod der Insekten (Vlisidou *et al.*, 2010). Andersherum führte eine Deletion der *kdpDE* Gene in *Mycobacterium tuberculosis* zu einer gesteigerten Virulenz. Mäuse, die mit der *M. tuberculosis kdpDE* Mutante infiziert wurden, starben schneller, als mit dem Wildtyp infizierte Mäuse (Parish *et al.*, 2003). Auch in *Staphylococcus aureus* wird eine Rolle des Zweikomponentensystem in der Regulation der bakteriellen Virulenz diskutiert. Studien von Zhao *et al.* (2010) weisen daraufhin, dass der “Quorum Sensing“ Autoinduktor AI-2 mit KdpD wechselwirkt. Mittels “Gel shift Assays“ konnte gezeigt werden, dass der Antwortregulator KdpE an die Promotorregion des *cap*-Operons binden kann, resultierend in einer erhöhten Synthese von kapsulären Polysacchariden, die während der Invasion als Zellwandkomponenten mit dem Immunsystem des Wirtes interagieren und so dem Bakterium eine Resistenz gegenüber der Aufnahme und dem Töten durch die Wirtspagocyten verleihen. Allerdings gehen die Autoren nicht näher auf mögliche KdpE-Bindestellen in der *cap*-Promotorregion ein, die keine Homologien zum *kdpFABC*-Promotor aufweisen. In der Genregulation der Pathogenitätsinsel des Bakteriums *Francisella tularensis* wurde eine Wechselwirkung zwischen der Sensor kinase KdpD und dem Antwortregulator PmrA gefunden, welcher im phosphoryliertem Zustand an Promotorregionen von Genen bindet, die

wiederum die Transkription der *Francisella* Pathogenitätsinselgene initiieren (Bell *et al.*, 2010).

1.8 Diese Arbeit

Diese Arbeit befasst sich sowohl mit biochemischen Untersuchungen der Sensorkinase KdpD, als auch mit Wechselwirkungen zu unbekanntem Proteinen, die für das Anschalten der Kdp-Signaltransduktionkaskade verantwortlich sein könnten. Im ersten Teil dieser Arbeit richtet sich die Suche nach dem Stimulus, der von KdpD detektiert wird, auf eine mögliche Interaktion der Sensorkinase mit einem bisher unbekanntem Protein. Die Anwendung des "Bacterial Two Hybrid" Systems sollte nicht nur *in vivo* Interaktionsstudien zwischen der Sensorkinase und dem Antwortregulator des Zweikomponentensystems ermöglichen, sondern auch die Beziehung zwischen den Proteinen des Zweikomponentensystems und den Untereinheiten der KdpFABC-ATPase näher beschreiben. Zusätzlich sollten mögliche KdpD-Interaktionspartner getestet werden, die schon in vorausgegangenen Experimenten und Arbeiten hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Regulation des KdpFABC-Systems diskutiert wurden. Außerdem sollte dieses Testsystem benutzt werden, um das Interaktionsverhalten verschiedener KdpD Derivate (Punktmutationen, Teildeletionen) zu untersuchen und um Rückschlüsse auf strukturelle Komponenten einer Interaktion ziehen zu können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte ein funktionelles Reinigungs- und Rekonstitutionsprotokoll etabliert werden, welches zur näheren Aufklärung der Struktur und der biochemischen Charakterisierung der Sensorkinase beiträgt. Zusätzlich sollte die Bindung von ATP innerhalb der "Transmitter"-Domäne des Proteins mittels Fluoreszenzspektroskopie näher untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Für diese Arbeit wurden folgende Materialien verwendet:

Restriktionsenzyme Phusion High Fidelity DNA Polymerase T4 DNA Ligase T4 DNA Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt)
Gene Ruler DNA Ladder Mix Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas (St.Leon-Rot)
Qiaquick Gel Extraction Kit Qiaprep Spin Miniprep Kit Ni ²⁺ -NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
M17 Agar M17 Broth	Oxoid (Basingstoke, England)
MacConkey Agar	Applichem (Darmstadt)
Imidazol LDAO	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich (Steinheim)
Detergenzien	Affymetrix, Anatrace Produkt (Maumee, Ohio, USA)
TNP-ATP	Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), DIFCO (Sparks), Invitrogen (Karlsruhe), Riedel-de Haen (Seelze), Applichem (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) im Reinheitsgrad "pro analysis" bezogen.

2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterien-Stämme sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2 und die verwendeten Oligonukleotide in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tab. 2.1

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> K12	WT	Tatum (1945)
<i>E. coli</i> TKR2000	$\Delta kdpFABCDE$ <i>thi rha lacZ nagA trkA405</i> <i>trkD1 atp706</i>	Kollmann & Altendorf (1993)
<i>E. coli</i> BTH101	<i>F</i> , <i>cya99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> (<i>Str^r</i>), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	Karimova <i>et al.</i> (2005)
<i>E. coli</i> MC1061	<i>araD139</i> Δ (<i>araA-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74 galK16</i> <i>galE15(GalS)</i> λ <i>e14⁻ mcrA0 relA1</i> <i>rpsL150(strR) spoT1 mcrB1 hsdR2</i>	Casadaban & Cohen (1980)
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	MG1363 mit <i>pepN::nisRK</i>	Kuipers <i>et al.</i> (1998)

Tab. 2.2

Plasmid	Resistenz	Genotyp	Referenz
pKJ2-6His	Ap ^r	<i>kdpD-6His</i> in pKK223-3 mit zusätzlicher <i>HindIII</i> (2869) Restriktionsschnittstelle	Jung <i>et al.</i> (1997)
pBADnLIC	Ap ^r	Arabinose- induzierbarer <i>E.coli</i> Expressionsvektor mit LIC Kassette	Geertsma & Poolman (2007)
pBADcLIC	Ap ^r	Arabinose- induzierbarer <i>E.coli</i> Expressionsvektor mit LIC Kassette	Geertsma & Poolman (2007)
pREnLIC	Ap ^r , Cm ^r	<i>E.coli</i> Expressionsvektor mit LIC Kassette, pBR322 Replikon und Nisin- induzierbarem Promotor	Geertsma & Poolman (2007)

pERL	Em ^r	<i>Lactococcus lactis</i> Expressionsvektor mit pSH71 Replikon	Geertsma & Poolman (2007)
pBAD- kdpDnLIC	Ap ^r	<i>kdpD</i> in pBAD mit N-terminalem 10er His-Tag gefolgt von einer TEV Proteaseschnittstelle	diese Arbeit
pBAD- kdpDcLIC	Ap ^r	<i>kdpD</i> in pBAD mit C-terminaler TEV Proteaseschnittstelle gefolgt von einem 10er His-Tag	diese Arbeit
pRE-kdpDnLIC	Ap ^r	<i>kdpD</i> in pREnLIC mit N- terminalem 10er His-Tag gefolgt von einer TEV Proteaseschnittstelle unter Kontrolle des Nisin-Promotors	diese Arbeit
pNZ kdpDnLIC	Em ^r	<i>kdpD</i> in pERL mit N-terminalem 10er His-Tag gefolgt von einer TEV Proteaseschnittstelle unter Kontrolle des Nisin-Promotors	diese Arbeit
pBD-6His G37A, K38A, T39C	Ap ^r	<i>kdpD-6His</i> mit Punktmutationen im Walker A Motiv	Jung (1998)
pBAD kdpDcLIC- ΔUsp	Ap ^r	Δ <i>kdpD</i> ₂₅₁₋₃₇₂ -10His in pBAD18	diese Arbeit
pBAD kdpDcLIC- H673Q	Ap ^r	<i>kdpD-10His</i> mit mutiertem Histidinrest 673 in pBAD18	diese Arbeit
pBD5-9	Ap ^r	<i>kdpD</i> in pBAD18 mit einzelner <i>EcoRV</i> -Restriktionsschnittstelle (562) und zusätzlichen Schnitt- stellen <i>XhoI</i> (395), <i>SacI</i> (843), <i>SpeI</i> (1291), <i>NotI</i> (1395), <i>AatII</i> (1603), <i>KpnI</i> (1587), <i>MluI</i> (1715),	Zimmann <i>et al.</i> (2007)

		<i>BsuI</i> (1767) und <i>HindIII</i> (2869)	
pBD5-9ΔArg1	Ap ^r	Δ <i>kdpD</i> ₄₉₈₋₅₃₀ in pBD5-9	Eisenbarth (2006)
pBD5-9ΔArg2	Ap ^r	Δ <i>kdpD</i> ₄₉₉₋₅₁₃ in pBD5-9	Andreeßen (2007)
pBDΔTM1-4	Ap ^r	Δ <i>kdpD</i> ₄₀₁₋₄₉₈ in pBAD18	Heermann <i>et al.</i> (2003)
pBD5-9/E509K	Ap ^r	<i>kdpD</i> /E509K in pBD5-9	Zimmann <i>et al.</i> (2007)
pGS4	Ap ^r	pSM5 Derivat mit <i>kdpFABC</i> Operon	Durell <i>et al.</i> (2000)
pUT18	Ap ^r	ColEI-ori, P _{lac} ::MCS, <i>cyaA</i> ₂₂₅₋₃₉₉	Karimova <i>et al.</i> (2001)
pUT18C	Ap ^r	ColEI-ori, P _{lac} :: <i>cyaA</i> ₂₂₅₋₃₉₉ , MCS	Karimova <i>et al.</i> (2001)
pKT25	Km ^r	Ori p15A, P _{lac} :: <i>cyaA</i> ₁₋₂₂₄ , MCS	Karimova <i>et al.</i> (2001)
pKNT25	Km ^r	Ori p15A, P _{lac} :: MCS <i>cyaA</i> ₁₋₂₂₄	Karimova and Ladant (2005)
pUT18C- zip	Ap ^r	Leucin Zipper von GCN1 in pUT18C	Karimova <i>et al.</i> (2001)
pKT25- zip	Km ^r	Leucin Zipper von GCN1 in pKT25	Karimova and Ladant (2005)
pEF7	Km ^r	<i>kdpD</i> ₁₋₃₉₅ in pKT25	Feuerbaum (2008)
pEF9	Ap ^r	<i>kdpD</i> ₁₋₃₉₅ in pUT18	Feuerbaum (2008)
pEF10	Ap ^r	<i>kdpD</i> ₃₉₆₋₈₉₅ in pUT18	Feuerbaum (2008)
pEF11	Km ^r	<i>kdpD</i> ₃₉₆₋₈₉₅ in pKT25	Feuerbaum (2008)
pKdpD18	Ap ^r	<i>kdpD</i> in pUT18C	diese Arbeit
pKdpD25	Km ^r	<i>kdpD</i> in pKNT25	diese Arbeit
pKdpE18	Ap ^r	<i>kdpE</i> in pUT18C	diese Arbeit
pKdpE25	Km ^r	<i>kdpE</i> in pKT25	diese Arbeit
pKdpA18	Ap ^r	<i>kdpA</i> in pUT18C	diese Arbeit
pKdpA25	Km ^r	<i>kdpA</i> in pKT25	diese Arbeit
pKdpB18	Ap ^r	<i>kdpB</i> in pUT18C	diese Arbeit
pKdpB25	Km ^r	<i>kdpB</i> in pKT25	diese Arbeit
pKdpC18	Ap ^r	<i>kdpC</i> in pUT18	diese Arbeit
pKdpC25	Km ^r	<i>kdpC</i> in pKNT25	diese Arbeit

pPssA18	Ap ^r	<i>pssA</i> in pUT18C	diese Arbeit
pPssA25	Km ^r	<i>pssA</i> in pKNT25	diese Arbeit
pPlsB18	Ap ^r	<i>plsB</i> in pUT18C	diese Arbeit
pPlsB25	Km ^r	<i>plsB</i> in pKNT25	diese Arbeit
pKdpDE509K-25	Km ^r	<i>kdpD</i> /E509K in pKNT25	diese Arbeit
pKdpDΔArg1-25	Km ^r	Δ <i>kdpD</i> ₄₉₈₋₅₃₀ in pKNT25	diese Arbeit
pKdpDΔArg2-5	Km ^r	Δ <i>kdpD</i> ₄₉₉₋₅₁₃ in pKNT25	diese Arbeit
pKdpDΔTM1-4-25	Km ^r	Δ <i>kdpD</i> ₄₀₁₋₄₉₈ in pKNT25	diese Arbeit

Tab. 2.3

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')
n-LIC <i>kdpD</i> for	ATGGTGAGAATTTATATTTTCAAGGTATGAATAACGAACCCTTACGTCCCGACCCCGATC
n-LIC <i>kdpD</i> rev	TGGGAGGGTGGGATTTTCATAACATATCCTCATGAAATTCTTCAAGTTCAGGGGCAG
c-LIC <i>kdpD</i> for	ATGGGTGGTGGATTTGCTATGAATAACGAACCCTTACGTCCCGACCCCGATC
c-LIC <i>kdpD</i> rev	TTGGAAGTATAAATTTTCCATATCCTCATGAAATTCTTCAAGTTCAGGGGCAG
PstI <i>kdpD</i> BTHS	GCCTGCAGGATGAATAACGAACCCTTACGTC
XbaI <i>kdpD</i> BTHS	CGTCTCTAGAGTCATATCCTCATGAAATTCTTCAAG
PstI <i>kdpE</i> 25 BTHS	GCCTGCAGGGGTGACAAACGTTCTGATTGTTG
PstI <i>kdpE</i> 18 BTHS	GCCTGCAGGGGTGACAAACGTTCTGATTGTTG
XbaI <i>kdpE</i> BTHS	CGTCTCTAGAGTTTAAAGCATAAACCGATAGCCAATAC
PstI <i>kdpA</i> 25 BTHS	GCCTGCAGTGATGGCTGCGCAAGGGTTCTTA

PstI <i>kdpA18</i> BTHS	GCCTGCAGGATGGCTGCGCAAGGGTTCTTA
XbaI <i>kdpA</i> BTHS	CGTCTCTAGAGTGGAGAGATATTCGCCACCGGACC
PstI <i>kdpB25</i>	GCCTGCAGTGATGAGTCGTAAACAACCTGGCG
XbaI <i>kdpB</i> BTHS	CGTCTCTAGAGTCACCAGACCGCAAACGGTCAGCAG
PstI <i>kdpC</i> BTHS	GCCTGCAGCATGAGTGGATTACGTCCGGCA
XbaI <i>kdpC</i> BTHS	CGTCTCTAGAGTTTCATCAAGTTTATCCAGCGCCAG
PstI <i>pssA</i> BTHS	GCCTGCAGTATGTTGTCAAAATTTAAG
XbaI <i>pssA</i> BTHS	CGTCTCTAGAGTCAGGATTCGGCTAAT
PstI <i>plsB</i> BTHS	GCCTGCAGTATGTCCGGCTGGCCACGA
XbaI <i>plsB</i> BTHS	CGTCTCTAGAGTCCCTTCGCCCTGCGTC
pUT18C for	CGCCGGATGTACTGGAAACG
pUT18C rev	TGCGGCATCAGAGCAGATTG
pUT18 for	TGCTTCCGGCTCGTATGTTG
pUT18 rev	TCGATGCGTTCGCGATCCAG
pKT25 for	GCGATTCGGTGACCGATTAC
pKT25 rev	AACGACGGCCGAATTCTTAG
pKNT25 for	TTATGCTTCCGGCTCGTATG
pKNT25 rev	AACCAGCCTGATGCGATTGC

2.3 Medien und Anzuchtverfahren

Die Anzucht der in Tabelle 2.1 aufgeführten *E.coli* Stämme erfolgte in KML-Medium (1% KCl; 1% Trypton; 0.5% Hefeextrakt) nach Epstein & Kim (1971). Nährböden wurden durch Zugabe von 1,5% (w/v) Agar hergestellt. Antibiotika wurden in Konzentrationen von 100µg/ml (Ampicillin, Carbenicillin) und 50µg/ml (Kanamycin) zugesetzt. Das Wachstum der Zellen erfolgte aerob bei 37°C. Zur *kdpD*-Überexpression wurden die Zellen aerob in einer 27 bzw. 90 Liter Batchkultur in Bioengineering Lab Pilot Fermenter mit einer Kapazität von 30 bzw. 100 Liter, angezogen. Die Zellernte erfolgte hier durch Ankonzentration der Zellen in einer Pellicon Tangentialflussfilterpumpe mit 2,5m² Filterfläche vor der Zentrifugation. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600nm in einem Uvikon

943 Spektralphotometer (Kontron Instruments, Watford) bestimmt. Die Anzucht von *Lactococcus lactis* erfolgte in M17 Medium (Oxoid, Hampshire) supplementiert mit 0.5% Glucose. Zur Erhaltung von Plasmiden wurde dem Medium bei Anzucht des Stammes mit Plasmid 10µg/ml Chloramphenicol bzw. Erythromycin hinzugegeben. Die Zellen wurden anaerob bei 30°C kultiviert.

2.4 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.4.1 Plasmidisolierung

Die DNA von Plasmiden wurde aus 5ml Übernachtskultur mittels des "QIAprep Spin Miniprep Kits" der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Plasmid-DNA aus *Lactococcus lactis* wurde aus 5ml Übernachtskultur mittels des "NucleoSpin Plasmid Kits" der Firma Macherey- Nagel (Düren) nach Herstellerangaben gewonnen.

2.4.2 DNA- Modifikationen

Die Standard-DNA-Techniken wurden, falls nicht anders beschrieben, nach Maniatis *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1987) durchgeführt. Die *in vitro*-Veränderungen von DNA-Molekülen wie Restriktionen und Ligationen wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zur Verhinderung einer Religation mit Alkalischer Phosphatase behandelt. Bei neu konstruierten Plasmiden wurde die Korrektheit durch Kontrollrestriktionen mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen und DNA-Sequenzanalyse verifiziert.

2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 0.7-1.5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40mM Tris; 40mM Essigsäure; 1mM EDTA) verwendet, die mit GelStar (5µl der 10.000-fachen Stocklösung in 50ml TAE Puffer) versetzt waren. Vor dem Lauf wurde zu den Proben 10 x DNA-Probenpuffer (50% Glycerin; 0.1M EDTA; 1% SDS; 0.1% Bromphenolblau) gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragment-Größen diente der "GeneRuler DNA Ladder Mix" der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Der Gellauf wurde in einer "Mini Sub DNA Cell"-Agarosegel-Laufkammer (BioRad, München) bei konstant 100V für 30-60min durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 304nm

und die Dokumentation der Gele mit einer Gel-Dokumentationsanlage von Herolab (Wiesloch).

2.4.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels des “QIAquick Gel Extraction Kits“ von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen extrahiert.

2.4.5 Herstellung kompetenter Zellen

Die Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten RbCl-Methode (Promega Technical Manual, 1994). Zur Präparation von kompetenten Zellen wurde eine Übernachtskultur 1:100 in frisches Medium überimpft und aerob bei 37°C bis zu einer Optischen Dichte von 0.3-0.5 angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 4500 x g für 10min zentrifugiert und in dem halben Volumen kalter Lösung A (10mM MOPS, pH 7.0; 10mM RbCl) resuspendiert. Nach erneuter zehnminütiger Zentrifugation bei 4500 x g wurden die Zellen im gleichen Volumen kalter Lösung B (100mM MOPS, pH 6.5; 50mM CaCl₂; 10mM RbCl) resuspendiert und für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Lösung B (10% des Ausgangsvolumens) aufgenommen und dann direkt für Transformationen verwendet. Für eine längere Aufbewahrung wurden die kompetenten Zellen mit 10% Glycerin versetzt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Die Präparation von elektrokompenten *Lactococcus lactis* Zellen erfolgte nach dem modifiziertem Protokoll von Geertsma & Poolman (2007). Zellen wurden dazu in mit 0.5% Glucose, 0.5M Sucrose und 2% Glycin supplementiertes M17 Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ~ 0.5 angezogen und anschließend für 15min bei 5000 x g und 4°C abzentrifugiert. Nach Waschen der Zellen in einem Volumen eiskalter Lösung A (0.5M Sucrose, 10% Glycerin), einem halben Volumen Lösung A supplementiert mit 50mM Na-EDTA, pH7.5 und einem Viertel Volumen Lösung A, wurden die Zellen in einem hundertstel Volumen Lösung A resuspendiert. Aliquots von 40µl wurden nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

2.4.6 Transformation und Elektroporation von kompetenten Zellen

Für die Transformation wurden 200µl kompetente *E. coli* Zellen mit 100-200ng Plasmid-DNA (1µl) oder einem kompletten Ligationsansatz mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1.5min bei 42°C) und 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde zu

jedem Ansatz 0.8ml KML-Medium gegeben und für mindestens eine Stunde aerob bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf geeigneten Selektionsnährböden ausplattiert. Bei Plasmidtransformationen wurden 100µl des Transformationsansatzes und bei Transformationen mit Ligationsansätzen wurde der gesamte Ansatz ausplattiert. Es folgte eine Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C.

Für die Elektroporation kompetenter *Lactococcus lactis* Zellen wurden 40µl Zellen mit 1µl Plasmid-DNA gemischt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette transferiert (2mm). Die Zellen wurden einem elektrischen Impuls mit einer Feldstärke von 2000V, bei 25µF und 200Ω ausgesetzt. Danach wurden die Zellen sofort mit 1ml eiskaltem M17-Medium, welches mit 0.5% Glucose, 0.5M Sucrose, 20mM MgCl₂ und 2mM CaCl₂ supplementiert war, versetzt und für 10min auf Eis gekühlt. Nach anschließender Inkubation für zwei Stunden bei 30°C, wurden Aliquots auf M17 Agarplatten supplementiert mit 0.5% Glucose, 0.5M Sucrose und 5µg/ml Antibiotikum, ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert.

2.4.7 DNA-Sequenzanalysen

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach dem Prinzip des "Cycle Sequencing", welches auf dem nach Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden basiert. Als Primer fanden verschiedene synthetische Oligonukleotide (Operon, Köln) Verwendung, welche komplementär zu gewünschten Abschnitten der Sequenz der jeweiligen DNA-Fragmente waren.

Die Sequenzierung der entsprechenden Plasmide oder PCR-Fragmente wurde durch die Firma Seqlab (Göttingen) mit den passenden Primern durchgeführt und mit der Software Chromas (Version 1.43) und SE Central (Clone Manager) ausgewertet.

2.4.8 Konstruktion der "BTHS"- Plasmide

Zur Konstruktion der "Bacterial two hybrid" Plasmide wurden die Gene *kdpA*, *kdpB*, *kdpC*, *kdpD* (sowie dessen Derivate), *kdpE*, *pssA* und *plsB* durch PCR mit den Primern PstI GenX BTHS und XbaI GenX BTHS amplifiziert (GenX = *kdpA*, *kdpB*, *kdpC*, *kdpD*, *kdpE*, *pssA* bzw. *plsB*). Das PCR-Produkt wurde anschließend zwischen die *PstI* und *XbaI* Restriktionsschnittstellen innerhalb der MCS der Vektoren pUT18C, pUT18, pKT25 bzw. pKNT25 kloniert, resultierend in den Plasmiden pKdpA18, pKdpA25, pKdpB18, pKdpB25, pKdpC18, pKdpC25, pKdpD18, pKdpD25, pKdpDE509-25, pKdpDΔArg1-25,

pKdpDΔArg2-25, pKdpDΔTM1-4-25, pKdpE18, pKdpE25, pPssA18, pPssA25, pPlsB18 und pPlsB25. Eine detaillierte Darstellung der “BTHS“ Vektoren ist in Abbildung 2.1 gezeigt

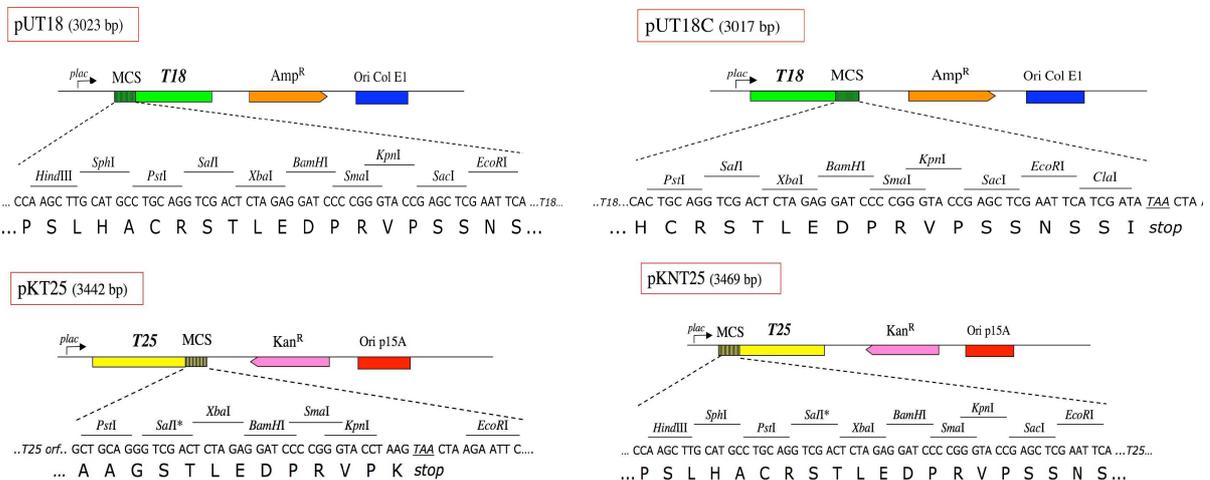


Abb. 2.1: Vektoren des “BTH“ Systems (nach Euromedex, 2000). pUT18 ist ein Derivat des “multi-copy” Vektors pUC19 und expremiert als Selektionsmarker eine Ampicillinresistenz. Es kodiert das T18 Fragment (AS 225-399 der Adenylatzyklase), welches unter transkriptionaler Kontrolle des lac-Promotors expremiert wird. Das offene Leseraster von T18 liegt stromabwärts der MCS mit 9 Einzelrestriktionsschnittstellen. Das Plasmid ist konstruiert um Fusionsproteine zu expremieren, in denen das heterologe Polypeptid an das N-terminale Ende von T18 fusioniert ist. pUT18C unterscheidet sich von pUT18 darin, dass die MCS am 3`Ende des offenen Leserasters von T18 lokalisiert ist und so Fusionproteine expremiert werden, in denen das heterologe Polypeptid an das C-terminale Ende von T18 fusioniert ist. pKT25 kodiert für das T25 Fragment (AS 1-224 der Adenylatzyklase), welches ebenfalls unter transkriptioneller Kontrolle des lac-Promotors steht. Der Vektor ist ein Derivat des “low-copy“ Plasmids pSU40 und expremiert einen Kanamycinresistenzmarker. Die MCS befindet sich am 3`Ende des T25 Fragments und erlaubt so die Konstruktion von in-frame Fusionen am C-terminalen Ende des T25 Polypeptids. pKNT25 kodiert dagegen das T25 Fragment, welches *in frame* stromabwärts der MCS liegt und somit die Konstruktion von *in frame* Fusionen am N-terminalen Ende von T25 erlaubt.

2.4.9 Konstruktion von Plasmiden mittels Ligation Independent Cloning (LIC)

Die Methode des “n-LICing“ wurde für die Klonierung von *kdpD* verwendet, resultierend in einem Konstrukt mit N-terminalem 10er His-Tag, gefolgt von einer TEV Proteaseschnittstelle und KdpD. Die Vektoren für diese Methode (pBADnLIC bzw. pREnLIC) enthalten eine n-LIC Kasette, die u.a. für den 10er His-Tag und die TEV-Proteaseschnittstelle kodiert und in der sich eine *SwaI* Restriktionsschnittstelle befindet. Die Restriktion des Vektors erfolgte über Nacht mit 25 Units des *SwaI* Enzyms bei 25°C. Durch PCR wurde außerdem das Gen *kdpD* amplifiziert. Dazu wurden Primer benötigt, welche die Start- bzw. Endsequenz (ohne

Stopcodon) von *kdpD* enthalten, sowie spezielle nLIC-Verlängerungen (Tab. 2.4). Nach Aufreinigen des PCR-Produktes und des geschnittenen Vektors, wurden 200ng des *SwaI* verdauten Vektors sowie äquimolare Mengen des PCR-Produktes mit Bidest auf 10µl eingestellt. Nach Zugabe von 3µl 5x Puffer (250mM Tris/ HCl, 75mM (NH₄)SO₄, 35mM MgCl₂, 0.5mM EDTA, 50mM 2-Mercaptoethanol, 0.1mg/ml BSA, pH8.8), 1,5µl 25mM dCTP (Vektor) bzw. 1,5µl 25mM dGTP (PCR-Produkt) und 0,5µl T4-DNA-Polymerase, erfolgte eine 30 minütige Inkubation in einem mit Wasser gefülltem Becherglas bei RT. Durch Inkubation des Ansatzes bei 75°C für 20 Minuten wurde die T4-DNA-Polymerase anschließend inaktiviert. Die DNA war nun "LIC-ready" und konnte in diesem Zustand bis zu sechs Monate bei 4°C gelagert werden. Schließlich wurde "LIC-ready" Vektor-DNA im Verhältnis 1:3 mit dem "LIC-ready" PCR-Produkt gemischt und nach fünf minütiger Inkubation bei RT in kompetente Zellen transformiert. Die Zellen wurden nach phänotypischer Expression auf KML-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Methode des "c-LICing" erfolgte nach dem gleichen Prinzip, Unterschiede finden sich in den speziellen LIC- Verlängerungen der Primer (siehe Tab.2.4) und in den entsprechenden Vektoren (pBADcLIC bzw. pREcLIC), wodurch *kdpD* an eine andere Stelle innerhalb der LIC-Kassette kloniert wird, resultierend in einem Konstrukt mit kleiner Modifikation am N-Terminus von KdpD (MGGFA) und C-terminaler TEV-Proteaseschnittstelle gefolgt von einem 10er His-Tag. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der herkömmlichen Ligation ist, dass dieses Verfahren effizient und schneller durchzuführen ist.

Primer	Sequenz 5' → 3'
n-LIC kdpDfor	ATGGTGAGAATTTATATTTTCAAGGT – Start <i>kdpD</i>
n-LIC kdpDrev	TGGGAGGGTGGGATTTTCATTA - Ende <i>kdpD</i> (ohne Stopcodon)
c-LIC kdpDfor	ATGGGTGGTGGATTTGCT - Start <i>kdpD</i>
c-LIC kdpDrev	TTGGAAGTATAAATTTTC - Ende <i>kdpD</i> (ohne Stopcodon)

Tab. 2.4: LIC- Verlängerungen der Primer, die für das "Ligation Independent Cloning" benötigt werden.

2.4.10 Vector-backbone Exchange (VBEx-Methode) nach Geertsma & Poolman (2007)

Als Grundlage für die VBEx-Methode wurde *kdpD* über die "n-LICing" Strategie in den Vektor pREnLIC kloniert, resultierend in dem Plasmid pRE-kdpDnLIC. Das *kdpD* Gen liegt nun unter Kontrolle des Nisin- Promotors und enthält den N-terminalen 10er His-Tag gefolgt von der TEV-Proteaseschnittstelle. Außerdem enthält das Plasmid das *Lactococcus lactis cat*

Resistenzgen. Der Austausch des Vektoren-„Rückgrats“ von pRE-kdpDnLIC erfolgte in einem kleinen Volumen (10µl) in einem PCR-Gerät mit beheizbarem Deckel, um Kondensation zu vermeiden. Mindestens 125ng des *Lactococcus lactis* Vektors pERL (enthält den *L. lactis* pSH71 ori) und mindestens 125ng pRE-kdpDnLIC DNA wurden gemischt und durch Zugabe von 1µl 10x Puffer (100mM Tris/HCl, pH7.5, 100mM MgCl₂, 500mM NaCl, 1mg/ml BSA), 5 Units *SfiI* Restriktionsenzym (Fermentas) und MilliQ auf ein Endvolumen von 10µl gebracht. Der Ansatz wurde für 80 min bei 50°C inkubiert, gefolgt von einer 20 minütigen Inkubation bei 80°C zur Inaktivierung von *SfiI*. Nach Abkühlung auf RT wurde die Ligation durch Zugabe von 1,5µl 8mM Na₂-ATP, pH7 und 0.5 Units T4 DNA Ligase (NEB) gestartet. Nach einstündiger Inkubation bei 20°C wurde die T4 DNA Ligase hitzeinaktiviert durch Inkubation bei 65°C für 20min. Für die Transformation wurden 2µl des Ansatzes zu 30µl elektrokompetenten *Lactococcus lactis* NZ9000 Zellen gegeben und Aliquots wurden auf 0.5% Glucose-, 0.5M Sucrose- und 5µg/ml Chloramphenicol- supplementierte M17 Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Eine schematische Darstellung der Methode verändert nach Geertsma und Poolman (2007) ist in Abb. 2.2 gezeigt.

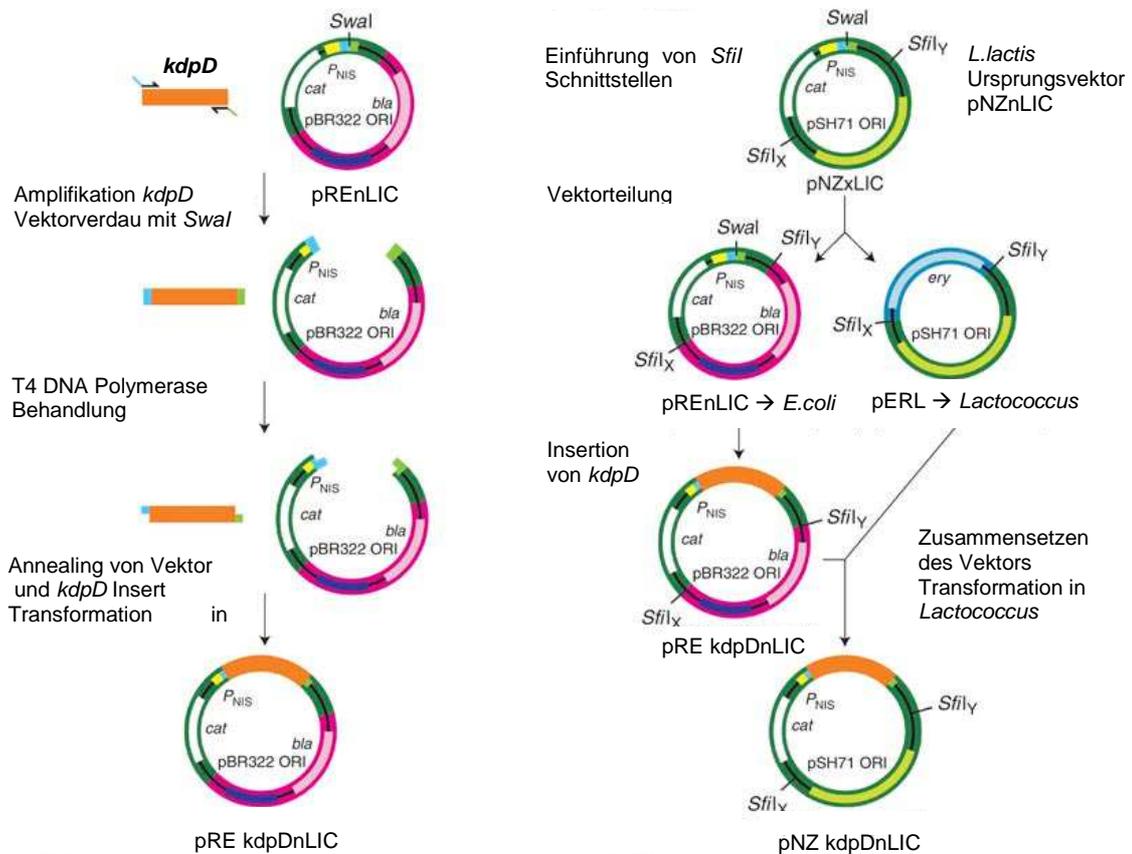


Abb. 2.2: Klonierungsstrategie mittels LIC und VBEEx (verändert nach Geertsma und Poolman, 2007). a) Bei der LIC- Methode wird das Gen *kdpD* zunächst mittels Primern mit spezifischen LIC- Überhängen amplifiziert (blau und grün). Das Plasmid pREnLIC wird durch Restriktion innerhalb der LIC- Kassette mit *SwaI* linearisiert. Einzelstrangüberhänge des PCR- Produktes und des Vektors werden durch Behandlung mit der T4 DNA Polymerase erzeugt und die komplementären Überhänge, welche lang genug sind, um eine spezifische Enzym-freie Anlagerung zu gewährleisten, lagern sich durch Mischen des PCR- Produktes mit dem Vektor an. Das entstandene Heteroduplex pRE kdpDnLIC wird schließlich in *E. coli* Zellen transformiert. b) Bei der VBEEx- Methode wird der *L. lactis* Expressionsvektor pNZxLIC an den beiden eingeführten *SfiI* Restriktionsstellen geschnitten. Das Plasmid pERL besteht nun aus dem pSH71 Replikon (hellgrün) aus pNZxLIC fusioniert mit einem Erythromycinmarker (blau). Das Plasmid pREnLIC besteht aus einem *cat* Marker und der LIC Sequenz aus pNZxLIC, fusioniert an das *E. coli* Replikon pBR322 (lila) und einem *bla* Marker (pink). Dieser Vektor wurde bei der LIC- Methode (a) eingesetzt; der pNZ kdpDnLIC Vektor wird nun erhalten, indem die Plasmide pERL und pRE kdpDnLIC gemischt werden und mit dem Enzym *SfiI* geschnitten werden. Nach Ligation und Transformation werden die Zellen selektiert auf der Fähigkeit in Anwesenheit von Chloramphenicol in *L. lactis* zu replizieren.

2.5 Biochemische und analytische Methode

2.5.1 Screening mittels McConkey-Agarplatten

Zur Selektion der "BTHS"-Klone wurden MacConkey/Maltose-Agarplatten verwendet. Hierzu wurden 40g MacConkey Agar (Difco, Michigan) in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Im Anschluß wurden vor dem Giessen der Platten sterilfiltrierte Maltose-Stocklösung [20%] zu einer Endkonzentration von einem Prozent, sowie Antibiotika (100µg/ml Ampicillin und 50µg/ml Kanamycin) hinzugegeben. Die Inkubation der Platten erfolgte für 24-48 Stunden bei 30°C.

2.5.2 β-Galaktosidase-Aktivitätstest

Die *in vivo* Expression des für die Adenylatzyklase kodierenden Gens *cya* wurde mittels des Reportergens *lacZ* nachgewiesen. Die mit dem β-Galaktosidase-Aktivitätstest nach Miller (1972) bestimmte Aktivität der vom *lacZ*-Gen kodierten β-Galaktosidase diente als indirektes Maß für die Expression von *cya* im "BTHS"-Verfahren. Für den Test wurden Zellen des Stammes *E. coli* BTH101 (Δcya) mit den entsprechenden Plasmiden (kodierend für das T18 Fragment der Adenylatzyklase + Protein A bzw. das T25 Fragment der Adenylatzyklase + Protein B) in KML Medium bis zu einer OD₆₀₀ von etwa eins angezogen. Anschließend wurde 1ml jeder Zellkultur für 10min bei 16.000 x g zentrifugiert und in 1ml Phosphatpuffer (200mM, pH7) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 100µl Chloroform und 50µl SDS [0.1 % (w/v)]. Zur Bestimmung der Aktivität wurden 200µl ortho-Nitrophenyl-β-D-Galaktosid [4mg/ml] zu den Proben gegeben. Die Reaktionen wurden nach 4min durch Zugabe von 500µl Natriumcarbonat [1M] gestoppt. Zelltrümmer konnten durch Zentrifugation bei 16.000 x g für 10min entfernt werden. Die Intensität der durch die Reaktion hervorgerufenen Färbung wurde photometrisch bei einer Absorption von 420nm bestimmt. Die Aktivität konnte mit Hilfe folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Aktivität [units]} = (A_{420} \times 1000) / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

Dabei ist A_{420} als die Absorption der Reaktionslösung, OD_{600} als die Optische Dichte der Zellsuspension, t als die Reaktionszeit [min] und V als das Reaktionsvolumen [ml] definiert.

2.5.3 SDS-PAGE und Blue Native Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Dazu wurden 0.75mm dicke Flachgele der Größe 7x10cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 4.9% und im Trenngel 9%. Die SDS-Gele wurden mit Hilfe von Rotiphorese-Fertiglösung [30% (w/v) Acrylamid; 0.8% (w/v) Bisacrylamid] (Roth, Karlsruhe) hergestellt. Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit SDS-Probenpuffer versetzt, so dass eine Endkonzentration von 50mM Tris/HCl, pH6.8, 10% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol und 0.1% (w/v) Bromphenolblau erzielt wurde. Als Proteinstandard wurde "PageRuler Prestained Protein Ladder" verwendet. Der SDS-Laufpuffer bestand aus 0.025M Tris, 0.19M Glycin und 0.1% SDS. Der Gellauf wurde in einer "Mini-Protean"-Laufanlage (BioRad, München) für Minigele bei konstant 200V durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Serva Blau G-250 (Coomassie-Blau) nach Weber & Osborn (1969) detektiert, wobei die Färbelösung zur Fixierung der Proteine neben 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue und 50% (v/v) Methanol zusätzlich 10% (w/v) TCA enthielt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in 5% (v/v) Methanol und 7.5% (v/v) Essigsäure. Zur Trennung von Proteinen unter nativen Bedingungen wurde eine Blue Native Gelelektrophorese mittels des "ServaGel Native Gel Starter Kit" nach Angaben des Herstellers (Serva, Heidelberg) durchgeführt.

2.5.4 Immunoblot

Der Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrocellulose (Porengröße 0.45 μ m) erfolgte mit Hilfe einer "Trans-Blot SD semi dry"-Anlage (BioRad, München) für 20min bei 20V. Dafür wurde, nach Angaben des Herstellers, ein Puffer mit 125mM Tris/HCl, pH8.3; 192mM Glycin und 20% (v/v) Methanol verwendet. Anschließend wurde die Nitrocellulose für eine Stunde bei 37°C in Puffer A (0.9% (w/v) NaCl; 50mM Tris/HCl, pH7.4) + 5% (w/v) Magermilch inkubiert, um die Membran mit Protein abzusättigen und somit eine unspezifische Bindung der Antikörper auf der Blotmembran zu verhindern. Mit Hilfe des Antiserums α KdpD (1:2500 verdünnt in Puffer A + 5% (w/v) Magermilch) konnte KdpD nachgewiesen werden (Zimmann, 1995). Nach der Behandlung mit dem ersten Antikörper (über Nacht bei 4°C) wurde die Membran dreimal für 10min in Puffer A gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für 10min mit Puffer A und 5% (w/v) Magermilch gequenchet. Anschließend erfolgte die Bindung des zweiten Antikörpers für 1 Stunde bei RT. Dazu wurde, gemäß dem Protokoll nach Zimmann (1995), Ziege-anti-(Kaninchen-IgG) konjugiert

mit Alkalischer Phosphatase für die Detektion von KdpD verwendet. Vor der Detektion wurde die Membran wieder dreimal für 15min mit Puffer A gewaschen. Die Entwicklung des Immunoblots erfolgte durch Inkubation in Substratlösung (45mM Natriumcarbonat, pH9.5; 0.01% (w/v) Nitro-Blue-Tetrazolium; 0.045% (w/v) 5-Bromo-4-chloro-3-indolyolphosphat).

2.5.5 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes in Membranvesikeln bzw im Cytoplasma wurde mit dem BCA-Assay in Abwandlung des Protokolls von Smith et al. (1985) ermittelt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (New England Biolabs) verwendet. Die Bestimmung der Konzentration von gereinigtem KdpD erfolgte mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington).

2.5.6 Präparation von invertierten Membranvesikeln

Invertierte Membranvesikel wurden nach dem Protokoll von Siebers & Altendorf (1988) hergestellt. In Abwandlung zu diesem Protokoll wurde ein Aufschlusspuffer verwendet, der nicht Hepes/Tris, sondern Tris/HCl, pH8 enthält. Aufgeschlossen wurden die Zellen am Aufschlussgerät Basic-Z (Düse: 0,18mm, Aufschlussdruck *E.coli* Zellen: 1,35kbar, Aufschlussdruck *Lactococcus* Zellen: 2,1kbar). Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch einen niedertourigen Zentrifugationsschritt für 10min bei 12000 x g und 4 °C entfernt. Die invertierten Membranvesikel wurden bei 235.000 x g in einer Beckman L-80 XP Ultrazentrifuge pelletiert und anschließend in 20mM Tris/HCl, pH8 aufgenommen. Die Lagerung der Vesikel erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.5.7 Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Membranvesikel wurden zunächst mit Puffer A (50mM Tris/HCl pH8; 300mM NaCl) auf 5mg/ml eingestellt und mit 1% (w/v) DDM für eine Stunde auf Eis solubilisiert. Nach anschließender Zentrifugation (20min, 444.000 x g, 4°C) zur Trennung von Membranen und Solubilisat erfolgte die Bindung von KdpD(6His) an die zuvor mit dem vierfachen Säulenvolumen Wasser gewaschene und mit Puffer A äquilibrierte Ni²⁺-NTA Agarose für eine Stunde bei 4°C und leichtem Schwenken unter Zugabe von 15mM Imidazol pH7 im Batchverfahren. Nach Bindung des Proteins an die Ni²⁺-NTA Agarose erfolgte ein Waschschriff inklusive eines Detergenzwechsels von DDM zu CYMAL 5. Dazu wurde das zehnfache Säulenvolumen Puffer A mit 30mM Imidazol, pH7 und 0,24% (w/v) CYMAL 5

verwendet. Schließlich erfolgte eine stufenweise Elution des Proteins von der Ni²⁺-NTA Agarose unter Verwendung des 0,4fachen Säulenvolumens Puffer A inklusive 0,24% (w/v) CYMAL 5 sowie 100mM, 187mM und 250mM Imidazol, pH7. Zusätzlich wurde den einzelnen Elutionsfraktionen zur Bindung von Ni²⁺-Ionen 5mM EDTA hinzugegeben.

2.5.8 Rekonstitution von KdpD-6His

Für die Rekonstitution von gereinigtem KdpD wurden Liposomen benutzt, welche aus mit Aceton und Ether gewaschenen *E. coli* Lipiden (Avanti Lipidextrakt) und L- α -Phosphatidylcholin aus Eigelb (Sigma) im Verhältnis 3:1 (w/w) (Jeschke *et al.* 2007) bestanden. Kleine, unilamellare Vesikel relativ homogener Größe wurden durch Lösen der Lipide in 50mM KPi, pH7 bis 20mg/ml und durch Beschallung unter Stickstoff mit dem Ultraschallgerät Branson 250 Sonifier II Cell Disruptor (Branson, Shelton, USA) bis zum Aufklaren der Lipidlösung hergestellt. Anschließend folgte dreimal ein abwechselndes Einfrieren der Liposomen in flüssigem Stickstoff und langsames Wiederauftauen bei RT und das finale Extrudieren durch einen 400nm Polycarbonatfilter (Avestin) nach Heginbotham *et al.* (1998). Die Liposomen wurden danach mit Puffer (50mM Tris/HCl pH8, 300mM NaCl) auf 4mg/ml eingestellt und mit Triton X100 (Sigma) knapp unter die „Detergenzsättigung“ titriert. Um den physikalischen Zustand der Liposomen zu erfassen, wurde die Trübung der Lösung bei einer Wellenlänge von 540nm gemessen gemäß Nimigean *et al.* (2006) und Lowry *et al.* (1951). Die Detergenz-destabilisierten Liposomen wurden nun mit gereinigtem KdpD in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und für 30min unter langsamer Bewegung bei RT inkubiert. Um das Detergenz wieder zu entfernen, wurden Polystyren Biobeads (Biobeads SM2, BioRad) mit einem Feuchtgewicht von 25mg/ml dem Ansatz zugegeben gefolgt von einer weiteren Inkubation des Ansatzes für 30min unter langsamer Bewegung bei RT. Anschließend erfolgten drei weitere Zugaben von frischen Biobeads (15mg/ml, 19mg/ml und 29mg/ml) und die Inkubationszeiten wurden erweitert auf eine Stunde, über Nacht und weitere zwei Stunden am nächsten Tag bei 4°C und langsamer Bewegung. Nach Entfernen der Biobeads erfolgte eine 30minütige Ultrazentrifugation bei 444.000 x g und 4°C zum Pelletieren der Proteoliposomen. Diese wurden im Anschluß in Puffer (50mM Tris/HCl pH8, 300mM NaCl) resuspendiert und wieder auf 20mg Lipid eingestellt bevor sie erneut zweimal in flüssigen Stickstoff eingefroren und zwischendurch wieder bei RT aufgetaut wurden und letztendlich in -80°C gelagert wurden.

2.5.9 Proteinphosphorylierung mit [γ - 32 P] ATP

Für die Messung der Kinase-Aktivität von KdpD-6His wurden invertierte Membranvesikel aus dem Stamm TKR2000 (*atp⁻*) verwendet. Das radioaktive Phosphat kann folglich nicht durch die ATPase abgebaut werden. Die invertierten Membranvesikel wurden mit TG-Puffer auf eine Endkonzentration von 2mg/ml eingestellt bzw. Proteoliposomen und gereinigtes KdpD wurden auf eine Proteinkonzentration von 1mg/ml eingengt. Die Kinase-Aktivität wurde in Phosphorylierungspuffer (25mM Tris/HCl, pH7.5; 2mM DTT; 0.01mM MgCl₂; 0.5M NaCl; 5% Glycerin) bei Raumtemperatur gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ M [γ - 32 P]-ATP (2.38Ci/mmol) gestartet. Nach fünf Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 x SDS Probenpuffer im Verhältnis 1:2 abgestoppt. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (11% Gel; 200V; 60min). Als Standard wurden der "Page Ruler Prestained Protein Ladder" und 0.702pmol [γ - 32 P]-ATP eingesetzt. Die SDS-Gele wurden anschließend für 60min bei 80°C getrocknet und über Nacht auf einem "Storage Phosphor Screen" exponiert. Die phosphorylierten Proteine konnten mittels "Phosphoimager Storm 820" (Molecular Dynamics) detektiert werden.

2.5.10 Fluoreszenzspektroskopie

Die Bindung von Nukleotiden (ATP, ADP, GTP) in An- und Abwesenheit von Magnesium an gereinigtes KdpD wurde mittels Tryptophanfluoreszenzspektroskopie bestimmt. Die Emissionsspektren wurden mit einem JASCO Spektralfluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 295nm und einem Emissions-Wellenlängenscan von 300 bis 400nm, aufgenommen. Die Einstellung der Anregungs- bzw. Emissionmonochromatoren lag bei einer Spaltbreite von 5nm bzw. 1nm. Gereinigtes KdpD mit einer Konzentration von ~125nM wurde in Puffer (50mM Tris/ HCl, pH8; 300mM NaCl und 0,24% (w/v) CYMAL 5) in 1x 1cm-Fluoreszenzküvetten bei Raumtemperatur eingesetzt und verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Nukleotids hinzugegeben. Das Binden des Trinitrophenylderivates von ATP (TNP-ATP) wurde mittels einer Fluoreszenzvergrößerung in Anwesenheit von gereinigtem KdpD bei einer Anregungswellenlänge von 412nm detektiert. Dazu wurde zunächst ein Emissionsscan von TNP-ATP (1 μ M) in Puffer (50mM Tris/ HCl, pH8; 300mM NaCl, 0,24% (w/v) CYMAL 5 sowie +/- 20mM MgCl₂) bei Wellenlängen von 450nm bis 600nm aufgenommen. Anschließend wurde gereinigtes KdpD mit einer Konzentration von ~250nM dem Probenansatz in der Küvette hinzugefügt und ein vergleichender Emissionsscan aufgezeichnet.

2.5.11 Bestimmung von Nukleotidaffinitäten mittels Titration

Titrationen von ATP und ATPMg²⁺ bzw. ADP und ADPMg²⁺ wurden in Puffer (50mM Tris/HCl, pH8; 300mM NaCl und 0,24% (w/v) CYMAL 5) mit ~125nM KdpD durchgeführt. Zu 800µl Probenansatz wurden jeweils nanomolare Mengen des zu titrierenden Nukleotids aus einer 12µM Stocklösung gegeben. Aufgenommen wurde die Tryptophanfluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 295nm und Spaltbreiten der Anregungs- bzw. Emissionsmonochromatoren von 5nm bzw. 1nm, gegen die Zeit. Die Titration von TNP-ATP erfolgte ebenfalls in dem oben genannten Puffer in An- bzw. Abwesenheit von 20mM MgCl₂. Zu circa 250nM KdpD wurden nanomolare Mengen TNP-ATP (Stocklösung 266,6µM) titriert und die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 412nm und gleichbleibenden Spaltbreiten, gegen die Zeit aufgenommen. Außerdem wurden Kontrolltitrationen ohne gereinigtes Protein für jede TNP-ATP Titration durchgeführt, um die TNP-Fluoreszenz in Puffer aufzuzeichnen.

2.5.12 Verdrängungstitrationen mit ATP

Die Verdrängung von ATP durch TNP-ATP wurde ebenfalls mittels Titration bestimmt. Der Probenansatz enthielt 500nM gereinigtes KdpD in Puffer (50mM Tris/HCl, pH8; 300mM NaCl und 0,24% (w/v) CYMAL 5) und 250nM bzw. 500nM ATP. Titriert wurden auch hier nanomolare Mengen TNP-ATP und die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 412nm und geöffneten Spaltbreiten von 5nm bzw. 1nm, gegen die Zeit, wurde aufgezeichnet.

2.5.13 Analyse der Titrationsdaten

Die aufgezeichneten Werte der Fluoreszenzintensitäten gegen die Zeit wurden gemittelt und nach Einberechnung der Verdünnungsfaktoren, durch Subtraktion des unter den gleichen Bedingungen aufgenommenen Pufferemissionsspektrums korrigiert. Anschließend wurden die Änderungen der Fluoreszenzintensität (ΔF) ermittelt, indem die Werte der Fluoreszenzintensitäten bei $[\text{Nukleotid}]_{\text{konz}} = 0$, von allen anderen Werten subtrahiert wurden. Die Fluoreszenzintensitätsänderungen bei jeder gegebenen Nukleotidkonzentration (ΔF) wurden gegen die maximale Änderung der Fluoreszenzintensität (ΔF_{max}) normalisiert, um das Verhältnis $\Delta F/\Delta F_{\text{max}}$ zu erhalten. Die Daten wurden schließlich einem sigmoidalen Boltzmann Fit unterzogen unter Verwendung von Origin 6.0. Die K_D -Werte entsprechen jeweils den Nukleotidkonzentrationen bei halbmaximaler Fluoreszenzintensitätsänderung.

3. Ergebnisse

3.1 Anwendung des “BTH“ Systems zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen

Das “Bacterial Two Hybrid“ System ist ein genetisches Testverfahren zur Detektion und Charakterisierung von Protein-Protein Interaktionen *in vivo*. Das Testsystem beruht auf der Aktivierung der aus zwei Domänen bestehenden Adenylatcyclase (CyaA) in *E. coli*. Das Prinzip des Testsystems ist in Abb 3.1 im Genaueren dargestellt.

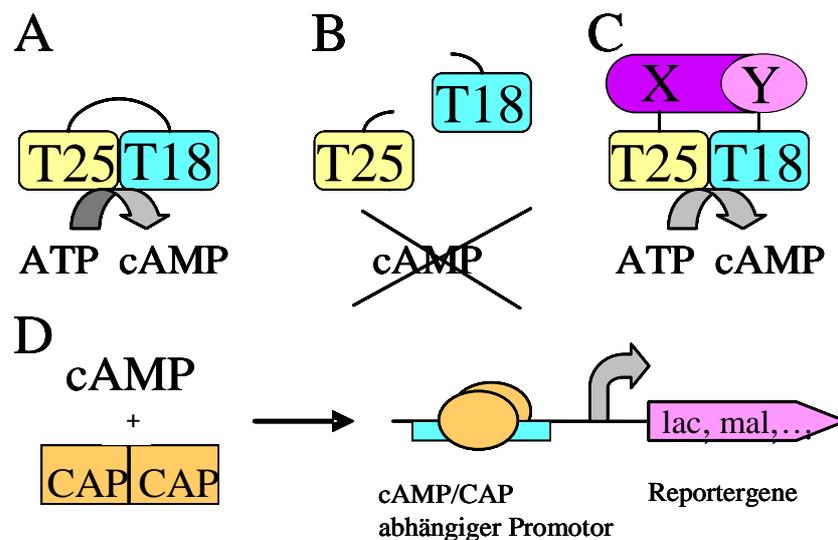


Abb. 3.1: Model des “Bacterial Two Hybrid“ Systems (verändert nach Karimova & Ladant, 1998).

Die aus dem Bakterium *Bordetella pertussis* stammende Adenylatcyclase CyaA besitzt eine katalytische Untereinheit bestehend aus zwei Domänen, T25 und T18 und katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP (A). Sind diese beiden Domänen räumlich voneinander getrennt, ist die Adenylatcyclase inaktiv und es findet keine cAMP-Synthese statt (B). Fusioniert man ein Protein X an Domäne T25 und ein Protein Y an Domäne T18, kann es zur Wiederherstellung einer funktionsfähigen Adenylatcyclase kommen, da eine Interaktion der Proteine X und Y dazu führt, dass die Domänen T25 und T18 zueinanderfinden und so cAMP gebildet werden kann (C). Zyklisches AMP bindet an dem Kataboliten-Aktivator-Protein (CAP) resultierend in einem Komplex, der nun an die DNA bindet und die Transkription diverser Gene in *E. coli* reguliert (D). Zu diesen Genen gehören u.a. auch die Gene der *lac* und *mal* Operone, die für die Regulation des Lactose- und Maltose-Katabolismus zuständig sind. Diese Tatsache macht sich das Testsystem zunutze, indem so Bakterien aufgrund ihrer

Fähigkeit Lactose bzw. Maltose als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwerten, durch Wachstum auf Indikatorplatten und in Selektionsmedien voneinander unterschieden werden können. Eine weitere Voraussetzung des "Bacterial Two Hybrid" Systems ist die Verwendung von *E. coli* Stämmen (hier BTH101) mit chromosomaler *cyaA* Deletion.

Das "Bacterial Two Hybrid" System sollte in diesem Teil der Arbeit angewendet werden, um eine Interaktion zwischen der Sensor kinase KdpD und dem Antwortregulator KdpE des Zweikomponentensystems aufzuzeigen. Desweiteren sollten mögliche Interaktionen mit dem K^+ -Transportkomplex KdpFABC detektiert und charakterisiert werden. Da sich aus vorangegangenen Studien und Experimenten weitere Proteine als mögliche Interaktionspartner für die Sensor kinase KdpD herausgestellt haben, wurden auch diese Kandidaten mithilfe des "Bacterial Two Hybrid" Systems getestet.

3.1.1 Interaktion der Sensor kinase KdpD mit dem Antwortregulator KdpE

Die Antwort auf den durch die Sensor kinase KdpD detektierten Reiz ist eine Autophosphorylierung des Proteins, infolgedessen die Phosphatgruppe auf den Antwortregulator KdpE übertragen wird. KdpE~P dimerisiert und kann schließlich mit hoher Affinität an die DNA in der Promotorregion des *kdpFABC*-Operons binden. Eine Interaktion zwischen zwei KdpD Proteinen bzw. zwischen zwei KdpE Proteinen sowie eine Interaktion zwischen der Sensor kinase und dem Antwortregulator sollte im Rahmen der bekannten Signaltransduktionskaskade stattfinden und ist daher eine wichtige Positivkontrolle dieses Testsystems. Aus diesem Grunde wurden die Gene *kdpD* und *kdpE* im Leseraster an die T18 und T25 Sequenzen des *cyaA* Gens kloniert, resultierend in den Plasmiden pKdpD18 und pKdpD25 sowie pKdpE18 und pKdpE25. Da sich sowohl der N- als auch der C-Terminus des KdpD Proteins im Cytoplasma befindet, konnten die Ursprungsplasmide pUT18C und pKNT25 gewählt werden, um zu gewährleisten, dass im Fusionsplasmid pKdpD25 der N-Terminus des Proteins für eine Interaktion mit dem Partnerprotein frei verfügbar ist während im Fusionsplasmid pKdpD18 der C-Terminus von KdpD für Interaktionen zur Verfügung steht (Abb. 3.2). Das *kdpE* Gen wurde in die Ursprungsplasmide pKT25 und pUT18C kloniert, womit sich das T25 bzw. T18 Fragment der Adenylatcyclase am N-Terminus des Proteins befindet. Da KdpE ein kleineres cytoplasmatisches Protein ist, sollte eine Interaktion mit dem Partnerprotein unabhängig von einem frei verfügbaren N- und C-Terminus gewährleistet sein (Abb. 3.2).

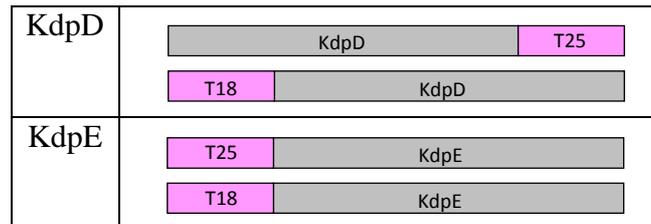


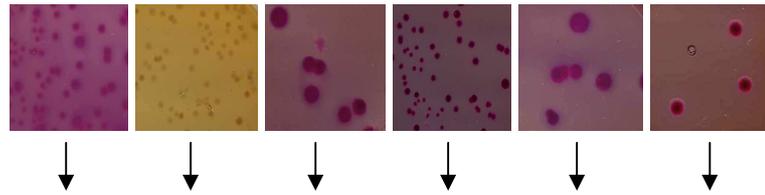
Abb. 3.2: Übersicht der hergestellten Fusionsproteine von KdpD und KdpE im “BTHS“.

Jeweils zwei Fusionsplasmide, deren Gene für die zu testenden Interaktionspartner kodieren, wurden in den $\Delta cyaA$ Stamm BTH101 transformiert und auf Komplementation der Adenylatcyclase getestet. Das Screening positiver Klone erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf MacConkey/Maltose Agarplatten. Nach 48stündiger Inkubation bei 30°C zeigten Kolonien deren Zellen eine aktive Adenylatcyclase besaßen eine Rotfärbung. Die Färbung liegt der Verstoffwechslung der Maltose und der damit verbundenen Säurebildung zugrunde, die für einen Farbumschlag des Indikators Neutralrot von weiss/lassrosa zu pink sorgt (Abb. 3.3a). Als Positivkontrolle des “Bacterial Two Hybrid“ Systems dienten die Fusionsplasmide pUT18C zip und pKT25 zip. Hier wurden die T18 bzw. T25 Fragmente mit dem Leuzinzipper-Motiv GNC4 aus *Saccharomyces cerevisiae* fusioniert, deren Interaktion durch Karimova *et al.* (1998) nachgewiesen wurde. Als Negativkontrolle wurden die Ursprungsplasmide pKT25 und pUT18 eingesetzt, deren T25 und T18 Fragmente ohne interagierende Proteine räumlich getrennt voneinander vorliegen.

Mittels Screening auf MacConkey/Maltose-Agarplatten konnten Interaktionen bei dem Transformationsansatz mit den Kontrollplasmiden des Leuzinzippers sowie bei Proben mit den Plasmidkombinationen pKdpD18/pKdpE25, pKdpD25/pKdpE18, pKdpD18/pKdpD25 und pKdpE18/pKdpE25 gezeigt werden (Abb.3.3a). Die Negativkontrolle zeigt wie vermutet helle Kolonien auf den Indikatorplatten.

Von jeweils drei unterschiedlichen Transformationsansätzen wurden Kolonien in KML-Medium angezogen und die Kulturen auf ihre β -Galaktosidase-Aktivitäten hin getestet (Abb.3.3b).

a)



b)

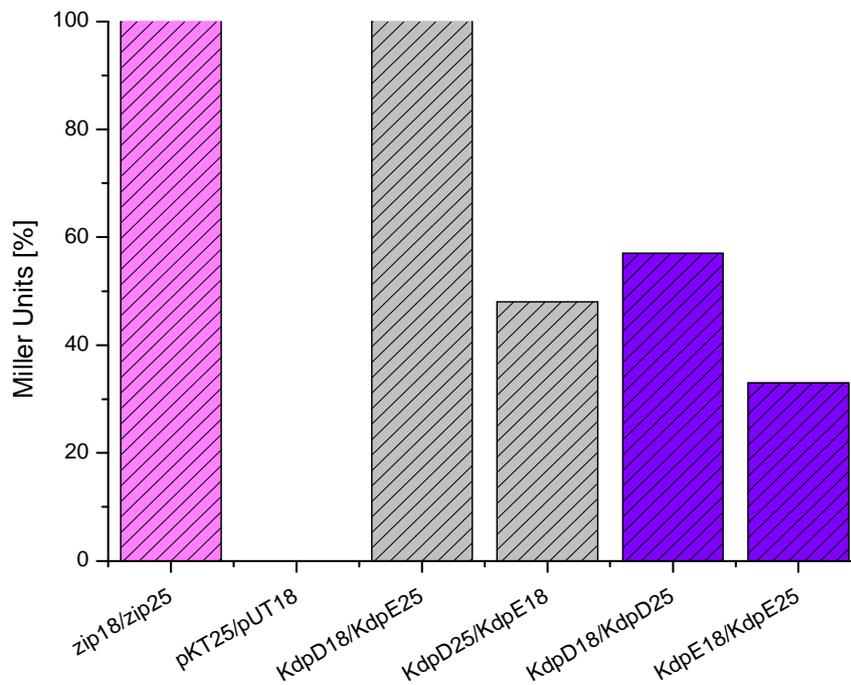


Abb. 3.3: a) Screening auf MacConkey/Maltose-Agarplatten. Gezeigt ist die unterschiedliche Färbung der Kolonien auf den Selektionsplatten nach Transformation verschiedener Kombinationen von Fusionsplasmiden. **b) β -Galaktosidase-Aktivitäten von *E.coli* BTH101 transformiert mit den verschiedenen Fusionsplasmid-Kombinationen bezüglich des Zweikomponentensystems KdpD/KdpE.** Für den β -Galaktosidase-Test wurden die Zellen in KML bis zu einer $OD_{600} \sim 1$ angezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte in Prozent Miller Units aus mindestens drei verschiedenen Testreihen und Transformationsansätzen. Die Hintergrundaktivität des β -Galaktosidase-Tests der Negativkontrolle wurde von allen anderen Werten subtrahiert, um die Aktivität der Positivkontrolle auf 100% und die der Negativkontrolle auf 0% setzen zu können.

Gezeigt sind die β -Galaktosidase-Aktivitäten des BTH101 *E. coli* Stammes durch Interaktion der KdpD- und KdpE-Dimere (blau) sowie der Sensorkinase mit dem Antwortregulator (grau). Die höchste Aktivität findet man bei der Probe mit der Plasmidkombination pKdpD18 und pKdpE25, wohingegen die Probe mit der Kombination pKdpD25 und pKdpE18 50% Miller Units im Vergleich zur Positivkontrolle aufweist. Auch die KdpD und KdpE Dimere zeigen Interaktion im β -Galaktosidase-Test mit Aktivitäten von ca. 55% und 35% Miller

Units. Somit erweist sich das “BTHS“ als anwendbar um nach möglichen Interaktionspartnern des KdpD/KdpE-Systems zu suchen.

3.1.2 Interaktion der Sensorkinase KdpD mit dem KdpFABC-Komplex

Die Gene des *kdpFABC*-Operons kodieren für die vier Untereinheiten des K^+ -Transportkomplexes KdpFABC. Eine Interaktion zwischen einer oder mehrerer Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes mit der Sensorkinase KdpD konnte bisher nicht nachgewiesen werden, wäre jedoch durchaus denkbar bezüglich einer Feedback-Regulation von KdpD durch den Komplex. Immer häufiger findet man in komplexen Regulationssystemen eine Modulierung der Zellantwort auf verschiedene Umweltreize durch negative Feedback-Hemmung wie z.B. im Zweikomponentensystem PhoQ/PhoP (Lippa & Goulian, 2009). Auch im Falle des DcuS/DcuR Zweikomponentensystems wird eine Interaktion mit dem C_4 -Dicarboxylat Uptake Transporter B (DcuB) diskutiert (Kleefeld *et al.*, 2009).

Aus diesem Grund wurden die Gene des *kdpFABC*-Operons gemäß Abb. 3.4 in die “BTHS“-Vektoren kloniert. Dabei wurde berücksichtigt, wie auch in allen weiteren “Bacterial Two Hybrid“ Klonierungen, dass die N- bzw. C-terminalen Enden der Proteine an denen jeweils das Fragment T18 bzw. T25 fusioniert ist, zum Cytoplasma gewandt vorliegen. Eine Wechselwirkung zwischen KdpF und KdpD wurde aufgrund der Funktion und Topologie des Peptids eher ausgeschlossen und nicht untersucht.

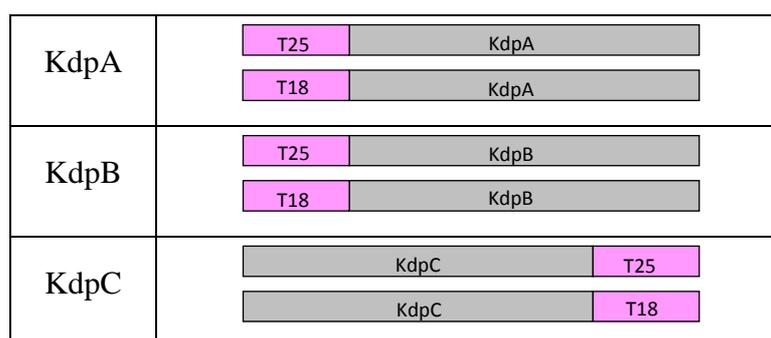


Abb. 3.4: Übersicht der hergestellten Fusionsproteine zum Testen von Interaktionen zwischen Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes und der Sensorkinase KdpD.

In dieser Testreihe ergab das Screening auf MacConkey/Maltose-Agarplatten pinkfarbene Kolonien für die Positivkontrolle Zip18/ Zip25 sowie für den Transformationsansatz KdpB18/

KdpD25 und KdpB25/KdpD18. Alle anderen Transformationsansätze ergaben weiße Kolonien vergleichbar mit der Negativkontrolle pKT25/pUT18 (Daten nicht gezeigt). Auch hier wurden von jeweils drei voneinander unabhängigen Transformationen Kolonien gewählt und für den β -Galaktosidase-Aktivitätstest Kulturen in Vollmedium angezogen. Das Ergebnis des β -Galaktosidase-Aktivitätstests ist in Abb. 3.5 gezeigt und spiegelt auch in diesem Falle das Resultat des Plattentests wider. Im Vergleich zur Positivkontrolle mit einer Aktivität von 100%, findet man eine Interaktion zwischen der Sensor kinase (KdpD25) und der KdpB Untereinheit mit einer Aktivität von ~60% Miller Units (grau), außerdem besteht in der umgekehrten Klonierung mit KdpD18 und KdpB25 eine schwache Interaktion mit einer Aktivität von ca. 20% Miller Units.

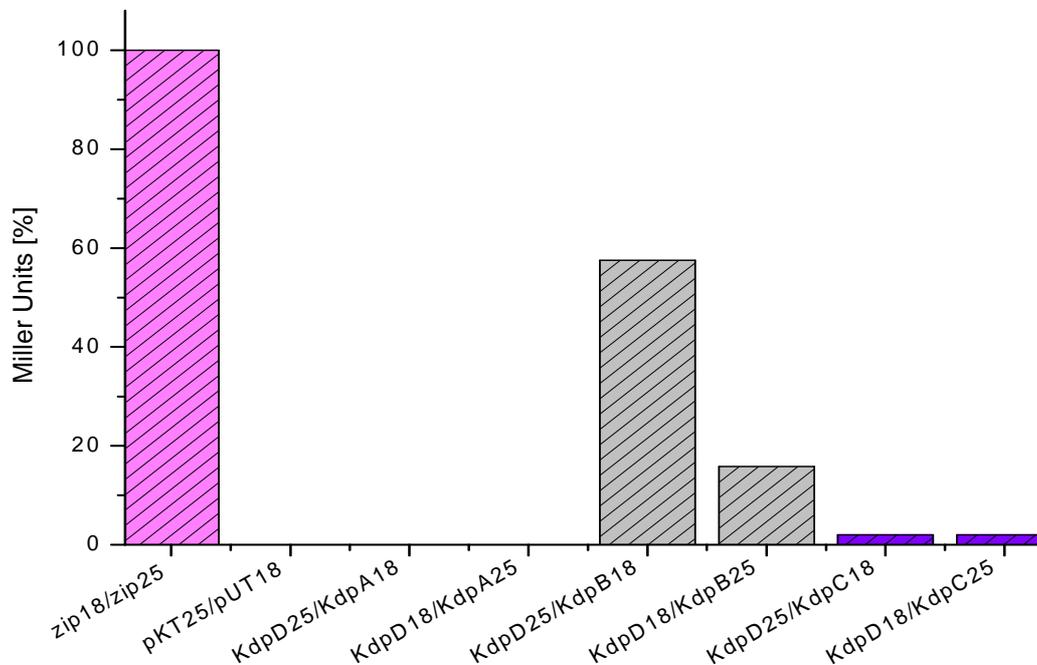


Abb. 3.5: β -Galaktosidase-Aktivitäten von *E.coli* BTH101 transformiert mit verschiedenen Fusionsplasmid-Kombinationen bezüglich der verschiedenen Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes und der Sensor kinase KdpD. Für den β -Galaktosidase-Test wurden die Zellen in KML bis zu einer $OD_{600} \sim 1$ angezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte in Prozent Miller Units aus mindestens drei verschiedenen Testreihen und Transformationsansätzen.

3.1.3 Interaktion der Sensorkinase KdpD mit Lipidsynthasen

Da die Frage nach dem Reiz, der durch die Sensorkinase KdpD detektiert wird, noch immer ungeklärt ist, wurden in vorangegangenen Arbeiten verschiedene Hypothesen aufgestellt. Eine dieser Hypothesen sollte in der folgenden Versuchsreihe näher untersucht werden. Es wurde von Hamann *et al.* (2008) vorgeschlagen, dass eine Interaktion von KdpD mit den Lipidsynthasen PlsB und PssA möglich wäre, da diese beiden Proteine in einem Komplex in bzw. an der inneren Membran vorliegen, wo die Phospholipidsynthese stattfindet (Gully & Bouveret, 2006). So könnte KdpD den ständigen Einbau von Phospholipiden in die Membran detektieren, der bei ausreichender Kaliumkonzentration konstant stattfinden sollte. Veränderungen in der Kaliumkonzentration könnten Veränderungen in der Phospholipidsyntheserate nach sich ziehen, ausgedrückt durch verlangsamtes Zellwachstum unter Kaliumlimitation und so die Signaltransduktionskaskade von KdpD über Interaktion mit den Lipidsynthasen induzieren. Daher wurden die Gene *plsB* und *pssA* in die “BTHS“-Vektoren kloniert (Abb. 3.6) und auf Interaktion mit der Sensorkinase KdpD getestet.

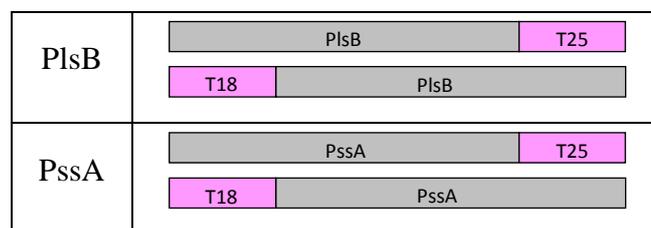


Abb. 3.6: Übersicht der hergestellten Fusionsplasmide zum Testen von Interaktionen zwischen verschiedenen Lipidsynthasen und der Sensorkinase KdpD.

Wie man in Abb. 3.7 a) und b) sehen kann, konnte mittels Screening auf MacConkey/ Maltose-Agarplatten sowie β -Galaktosidase-Aktivitätstest eine Interaktion der Sensorkinase KdpD25 mit der Lipidsynthase PlsB18 festgestellt werden. Die gemittelte Aktivität lag hier bei ~ 80% Miller Units im Vergleich zur Positivkontrolle (blau). Eine Interaktion mit der Lipidsynthase PssA konnte nicht gefunden werden.

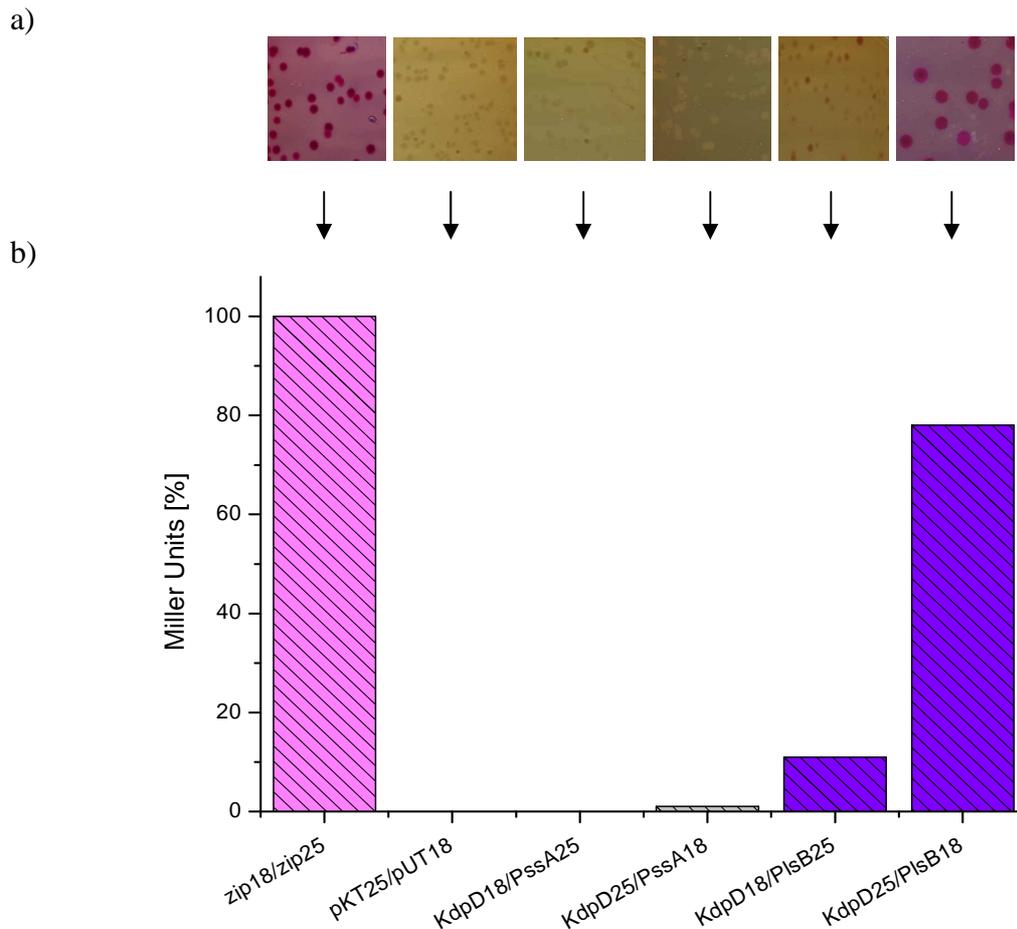


Abb. 3.7: a) Screening auf MacConkey/Maltose-Agarplatten. Gezeigt ist die unterschiedliche Färbung der Kolonien auf den Selektionsplatten nach Transformation verschiedener Kombinationen von Fusionsplasmiden. b) β -Galaktosidase-Aktivitäten von *E.coli* BTH101 transformiert mit verschiedenen Fusionsplasmid-Kombinationen bezüglich Lipidsynthesen und der Sensorkinase KdpD. Für den β -Galaktosidase-Test wurden die Zellen in KML bis zu einer $OD_{600} \sim 1$ angezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte in Prozent Miller Units aus mindestens drei verschiedenen Testreihen und Transformationsansätzen.

3.1.4 Interaktion von KdpD-Derivaten mit KdpD, KdpE, KdpB und PlsB

Da anhand der bisher gezeigten Ergebnisse Interaktionen der Sensorkinase mit den Proteinen KdpE, KdpB und PlsB gezeigt werden konnten, wurde der Schwerpunkt in der folgenden Testreihe auf die Untersuchung der Interaktion dieser Proteine mit Derivaten von KdpD gelegt, um die strukturellen Wechselwirkungen dieser Proteine miteinander näher zu bestimmen. Dazu wurden die in Abb. 3.8 dargestellten mit T18 bzw. T25 fusionierten KdpD-Derivate im "Bacterial Two Hybrid" System getestet.

KdpD1-395 (N-terminale Domäne) = NTD	KdpD/1-395	T18
	T25	KdpD/1-395
KdpD396-894 (TM1-4 + C-terminale Domäne) =TMC	T25	KdpD/396-894
	T18	KdpD/396-894
KdpD E509K (Punktmutation im Arg-Cluster)	KdpD/E509K	T25
KdpD Δ TM1-4	KdpD/ Δ TM1-4	T25
KdpD Δ Arg1 (Δ 498-530)	KdpD/ Δ Arg1	T25
KdpD Δ Arg2 (Δ 499-513)	KdpD/ Δ Arg2	T25

Abb. 3.8: Übersicht der hergestellten Fusionsproteine zum Testen von Interaktionen zwischen Derivaten der Sensorkinase KdpD und den Partnern KdpD, KdpE, KdpB und PlsB. Für eine genaue schematische Darstellung der einzelnen Domänen siehe auch Abb. 1.4 in der Einleitung.

Zunächst wurden Wechselwirkungen der Derivate KdpD1-395 und KdpD396-894 mit KdpD, KdpE, KdpB und PlsB getestet. Bei diesen Derivaten handelt es sich um die cytoplasmatisch vorliegende N-terminale Domäne (AS 1-395) und die C-terminale Domäne inklusive der Transmembrandomänen 1-4 (AS 396-894) der Sensorkinase. Das Ergebnis des Screenings auf pinkfarbene Kolonien nach Transformation ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Zip18/ Zip25	++	KdpE18/ NTD25	-	PlsB18/ NTD25	+
pUT18/pKT25	-	KdpE18/ TMC25	-	PlsB18/CTD25	-
KdpD18/ NTD25	++	KdpE25/ NTD 18	+	NTD18/ NTD25	++
KdpD18/ TMC25	+	KdpE25/ TMC18	-	TMC18/ TMC25	-
KdpD25/ NTD18	+	KdpB18/ NTD25	+	NTD18/ TMC25	++
KdpD25/ TMC18	++	KdpB18/ TMC25	+	NTD25/ TMC18	++

Tab.3.1:Zusammenfassung des Plattentests. Die Färbung der Kolonien auf den Selektionsplatten nach Transformation verschiedener Kombinationen von Fusionsplasmiden ist symbolisch dargestellt. Pinkfarbene Kolonien nach Transformation sind als ++ dargestellt, während das Auftreten schwach gefärbter Kolonien mit + gekennzeichnet ist. Das Minuszeichen kennzeichnet das Auftreten heller Kolonien nach Transformation der Fusionsplasmide.

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den Aktivitäten des β -Galaktosidase-Tests wider. Aktivitäten von 100% Miller Units konnten bei den Ansätzen KdpD18/NTD25 (grau), KdpD25/TMC18 (grau), NTD18/NTD25 (gelb) und NTD25/TMC18 (gelb) beobachtet werden. Bei Ansätzen KdpD25/NTD18 (grau), KdpE25/NTD18 (hellblau), KdpB18/NTD25 (grau), PlsB18/NTD25 (lila) und NTD18/TMC25 (gelb) konnten Aktivitäten von ca. 40-60% Miller Units festgestellt werden. Während die Proben, der im Screen schwächer gefärbten Kolonien von Ansatz KdpD18/TMC25 (grau) und KdpB18/TMC25 (dunkelgrau) noch ca. 20% Aktivität aufwiesen, zeigten die übrigen Ansätze nur schwache Aktivitäten unter 10% liegend bis hin zu keiner Aktivität (Abb. 3.9).

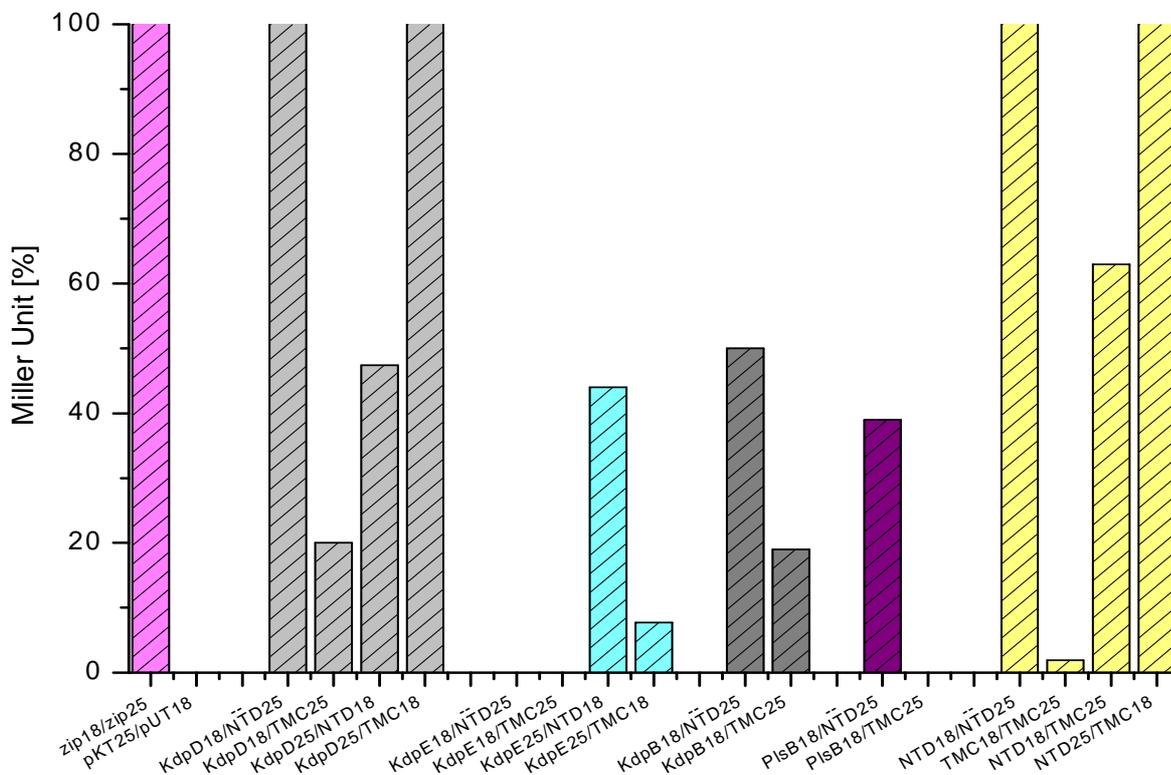


Abb. 3.9: β -Galaktosidase-Aktivitäten von *E.coli* BTH101 transformiert mit verschiedenen Fusionsplasmid-Kombinationen bezüglich verkürzter Formen der Sensorkinase KdpD (NTD, TMC) und bereits positiv auf Interaktion getesteter Proteine. Für den β -Galaktosidase-Test wurden die Zellen in KML bis zu einer $OD_{600} \sim 1$ angezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte in Prozent Miller Units aus mindestens drei verschiedenen Testreihen und Transformationsansätzen.

Als nächstes wurden Wechselwirkungen zwischen den KdpD-Derivaten KdpD E509K, KdpD Δ TM1-4, KdpD Δ Arg1 und KdpD Δ Arg2 mit Wildtyp KdpD, KdpB und PlsB getestet, um nähere Aussagen darüber treffen zu können, welche Domänen bzw. Bereiche innerhalb der Sensor kinase wichtig für die Interaktion mit den Partnerproteinen sind. Dabei handelt es sich bei KdpD E509K um ein Derivat mit einer Punktmutation, die einen semikonstitutiven KdpD Phänotyp bezüglich Kaliumlimitation hervorruft. Die übrigen KdpD Derivate besitzen Teildeletionen der Transmembrandomänen bzw. des positiv geladenen Argininclusters und zeichnen sich im Falle von KdpD Δ TM1-4 durch einen ebenfalls semikonstitutiven Phänotyp aus, im Falle von KdpD Δ Arg1 und KdpD Δ Arg2 durch einen nicht induzierbaren, inaktiven KdpD Phänotyp bezüglich Kaliumlimitation. Das Screening auf pinkfarbene Kolonien zeigte überwiegend positive Klone. Schwach gefärbte Kolonien zeigten sich nach Transformation der Plasmidkombinationen pKdpB18 und pKdpD Δ Arg1-25 bzw. pKdpD Δ Arg2-25 und pKdpB18 und KdpD Δ TM1-4-25, die Negativkontrolle zeigte helle Kolonien (Daten nicht gezeigt). Betrachtet man das Ergebnis des β -Galaktosidase-Aktivitätstests (Abb. 3.10), lassen sich durchaus Unterschiede in dem Interaktionsverhalten der Partnerproteine mit Derivaten der Sensor kinase im Vergleich zu den Wechselwirkungen dieser Proteine mit dem KdpD Wildtypprotein erkennen. Besonders die Interaktionen zwischen KdpB und den KdpD Mutanten zeigen unterschiedliche Aktivitäten. Während die Probe mit der Plasmidkombination pKdpDE509K-25 und pKdpB18 ähnliche Aktivität (~60% Miller Units) wie die Probe mit der WT-Kombination pKdpD25/pKdpB18 aufweist, zeigen die Proben mit den Plasmidkombinationen pKdpB18/pKdpD Δ Arg1-25, pKdpB18/pKdpD Δ Arg2-25 und pKdpB18/pKdpD Δ TM1-4-25 nur geringe Aktivitäten im Bereich von 10-20% Miller Units. Im Vergleich mit der Aktivität der Probe mit der WT-Plasmidkombination pPlsB18/pKdpD25 (~80% Miller Units), nimmt die β -Galaktosidase-Aktivität der Probe mit der Plasmidkombination pPlsB18/pKdpDE509K-25 um ca. 25% ab. Auch die Proben mit den Kombinationen pPlsB18/pKdpD Δ Arg1-25, pPlsB18/pKdpD Δ Arg2-25 und pPlsB18/pKdpD Δ TM1-4-25 zeigen verminderte Aktivitäten zwischen 30 und 55% Miller Units im Vergleich zur Probe mit der WT-Kombination. Ein anderes Ergebnis zeigt der Test anhand der Proben mit den Plasmidkombinationen pKdpD18 und den entsprechenden KdpD-Mutanten. Hier zeigen sich in allen Fällen höhere β -Galaktosidase-Aktivitäten von 85-100% Miller Units als im Vergleich bei der Probe mit der Plasmidkombination pKdpD18/pKdpD25.

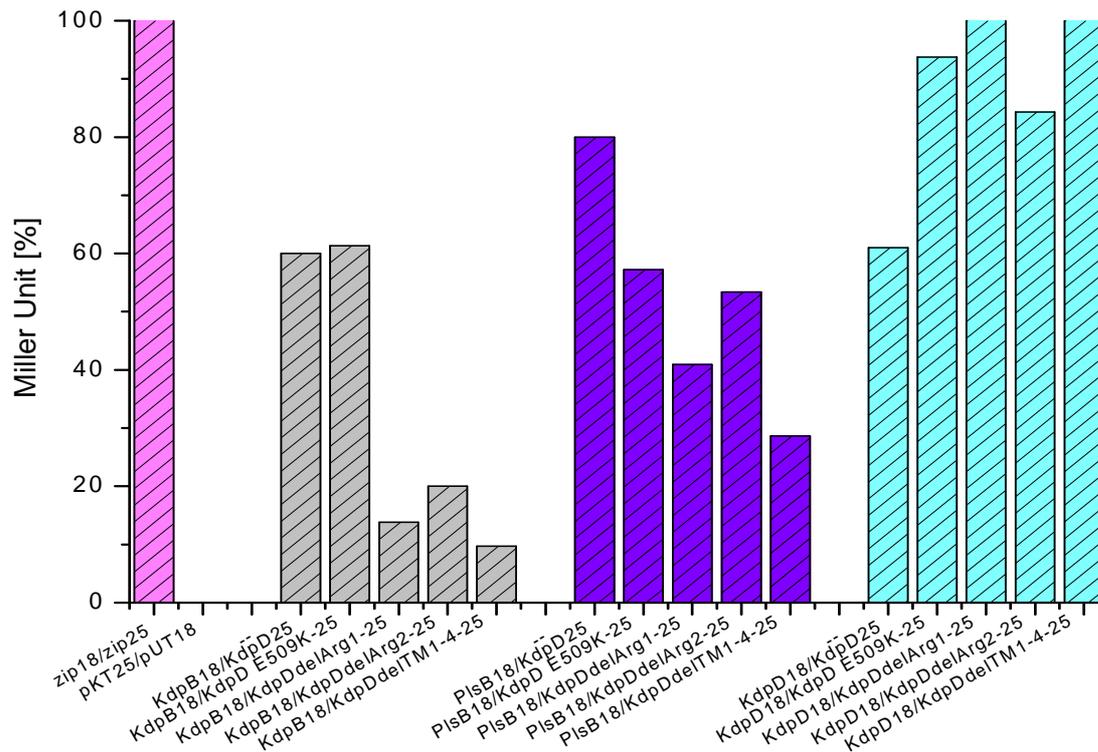


Abb. 3.10: β -Galaktosidase-Aktivitäten von *E.coli* BTH101 transformiert mit verschiedenen Fusionsplasmid-Kombinationen bezüglich verschiedener Mutanten der Sensorkinase KdpD und bereits positiv auf Interaktion getesteter Proteine. Für den β -Galaktosidase-Test wurden die Zellen in KML bis zu einer $OD_{600} \sim 1$ angezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte in Prozent Miller Units aus mindestens drei verschiedenen Testreihen und Transformationsansätzen.

Aus den Ergebnissen der “Bacterial Two Hybrid“ Testreihen mit KdpD, den Proteinen des KdpFABC-Komplexes sowie den Lipidsynthasen lassen sich zusammengefasst folgende Schlüsse ziehen. Es wurden positive Ergebnisse gezeigt, die auf Protein-Protein Interaktionen zwischen der Sensorkinase und KdpB sowie der Sensorkinase und PlsB hinweisen. Zusätzliche Informationen auf die Art und Weise der Wechselwirkungen dieser Proteine miteinander liefern dazu die Ergebnisse der “Bacterial Two Hybrid“ Testreihen mit Derivaten der Sensorkinase KdpD und KdpB bzw. PlsB.

3.1.5 Interaktion der Sensorkinase KdpD mit co-eluierten Proteinen

Während der Etablierung eines verbesserten Reinigungsprotokolles (siehe Punkt 3.2.6) für KdpD fiel auf, dass immer wieder Proteine mitaufgereinigt wurden, bei denen es sich laut

massenspektrometrischer Analyse um das Universalstressprotein UspG und die Untereinheit I der Cytochrom-o-Ubiquinol-Oxidase (CyoB) handelte. Ob es sich bei diesen Proteinen um mögliche Interaktionspartner der Sensor kinase handelt, wurde in einer weiteren Testreihe mit Hilfe des "Bacterial Two Hybrid" Systems untersucht. Die Gene der hypothetischen Interaktionspartner wurden in die "BTHS"-Vektoren kloniert und nach Transformation auf pinkfarbene Kolonien getestet. Dabei konnten keine positiven Klone bezüglich einer möglichen Interaktion beobachtet werden, auch die Analyse mittels β -Galaktosidase-Aktivitätstest zeigte nur schwache Aktivitäten unterhalb von 10% Miller Units verglichen mit der Positivkontrolle (Daten nicht gezeigt). Somit konnte mittels des "Bacterial Two Hybrid" Systems keine Interaktion zwischen KdpD und UspG bzw. KdpD und CyoB nachgewiesen werden.

3.2 Reinigung der Sensorkinase KdpD

Zur biochemischen Charakterisierung der Sensorkinase KdpD sollte (neben dem bestehenden Protokoll von Jung *et al.*, 1997) ein verbessertes Reinigungsprotokoll etabliert werden, welches nicht nur einen hohen Reinheitsgrad des Proteins garantiert, sondern außerdem die Funktionalität der Sensorkinase erhält. Neben der Reinigung des Proteins aus Membranen von *E. coli* wurde KdpD zusätzlich in *Lactococcus lactis* überproduziert und anschließend im Vergleich aufgereinigt. *Lactococcus lactis* ist ein Gram positives Milchsäurebakterium, welches in der Molkereiindustrie genutzt wird. Aufgrund des industriellen Interesses an diesem Organismus, ist die Physiologie von *L. lactis* gut untersucht. Es gibt bereits viele Beispiele für erfolgreiche funktionelle Überexpressionen von eukaryotischen und prokaryotischen Membranproteinen in *L. lactis*, die in *E. coli* nicht erreicht werden konnten (Kunji *et al.*, 2003; 2005; Monne *et al.*, 2005a; 2007; Quick & Javitch, 2007). Zu den Vorteilen von *Lactococcus lactis* zählen hierbei u.a. die im Vergleich zu *E. coli* langsamere Wachstumsrate, die förderlich für die Expression von Proteinen sein könnte, welche sich aufgrund ihrer Tertiär- und Quartärstruktur nicht einfach falten. Weiterhin ist dieses Bakterium Gram positiv, was die funktionelle Charakterisierung dieser Proteine erleichtert. Das Fehlen starker proteolytischer Aktivität ist ein weiteres positives Merkmal von *L. lactis*, was einen Beitrag dazu leisten könnte, Abbau der Proteine zu verhindern (Schlegel *et al.*, 2009).

3.2.1 Überproduktion von KdpD-His

Die Überproduktion des KdpD Proteins erfolgte im Stamm TKR2000 nach Transformation mit dem Plasmid pKJ2-6His. Die Verwendung dieses *atp*⁻-Stammes ist für spätere Phosphorylierungstests unerlässlich, da radioaktives Phosphat folglich nicht durch die ATPase abgebaut werden kann. Desweiteren wurde der *E. coli* Wildtypstamm MC1061 mit den Plasmiden pBAD-kdpDnLIC und pBAD-kdpDcLIC transformiert. Neben dem veränderten *E. coli* Stamm lag ein weiterer Unterschied hier in der Nutzung des Überexpressionssystems. Während sich im Plasmid pKJ2-6His das *kdpD* Gen unter Kontrolle des IPTG induzierbaren *tac*-Promotors befindet, liegt das *kdpD* Gen in den pBAD-Plasmiden unter Kontrolle des Arabinose induzierbaren Promotors. Desweiteren kodieren die pBAD-Plasmide für ein KdpD Protein mit absplaltbarem 10er His-Tag, welcher im Fall von kdpDnLIC N-terminal bzw. im Fall von kdpDcLIC am C-Terminus des Proteins vorliegt

(siehe 2.4.9). Die verschiedenen *E. coli* Stämme transformiert mit den *kdpD* Überexpressionsvektoren wurden bis zu einer OD_{600} von ~1-2 angezogen. Zusätzlich wurde MC1061/pBAD-kdpDnLIC bzw. pBAD-kdpDcLIC bei einer OD_{600} von ~0,5 standardgemäß mit 0,2% Arabinose induziert.

Die Analyse der Überproduktion von KdpD mittels SDS-PAGE zeigte, dass sich KdpD(+His-Tag) in den Membranfraktionen der Zellen befindet, es traten weder sogenannte "Inclusion bodies" auf, noch konnte das Protein im Cytoplasma nachgewiesen werden. Auch die Position des His-Tags übte keinen Einfluß auf die Überproduktion von KdpD aus, was durch den Vergleich der Membranpräparationen aus MC1061/pBAD-kdpDnLIC bzw. pBAD-kdpDcLIC deutlich wurde (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 3.12 zeigt den Vergleich von Membranvesikeln präpariert aus TKR2000/pKJ2-6His und MC1061/pBAD-kdpDcLIC mittels SDS-PAGE. Die Banden auf der Höhe von 100kDa entsprechen dem KdpD(+His-Tag) Protein. Die Spuren 1-3 zeigen Membranvesikel aus TKR2000/pKJ2-6His, wobei Proteinmengen von 10µg, 20µg und 30µg aufgetragen wurden. Zum Vergleich sind die gleichen Proteinmengen in den Spuren 4-6 aufgetragen, wobei es sich um Membranvesikel aus MC1061/pBAD-kdpDcLIC handelt. Es zeigt sich, dass die Menge an KdpD(+His-Tag) im Vergleich zum Gesamtproteingehalt in den Spuren 1-3 etwas größer ist, als in den Spuren 4-6, was bedeutet, dass die *kdpD*-Überexpression am besten in pKJ2-6His zu funktionieren scheint. Somit wurden alle nachfolgenden Versuche mit Membranvesikeln, welche aus TKR2000 pKJ2-6His präpariert wurden, durchgeführt.

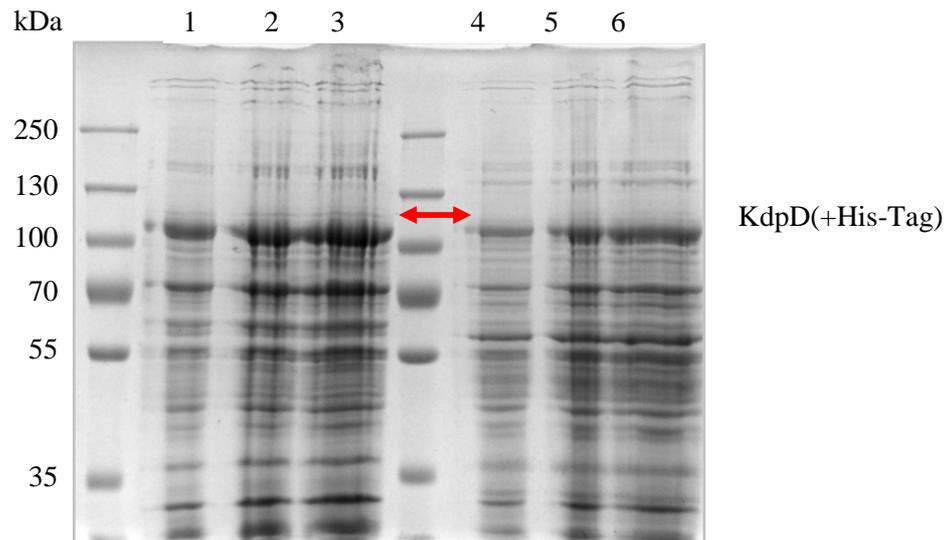


Abb. 3.12: Vergleich der KdpD(+His-Taq) Überproduktion mittels der Überexpressionssysteme pKJ2-6His und pBAD-kdpDcLIC. Die Abbildung zeigt ein mit Coomassie Blau gefärbtes 10% SDS-Gel. Zellen von *E. coli* TKR2000 pKJ2-6His und MC1061 pBAD-kdpDcLIC wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 1$ angezogen und die Membranvesikel wie unter 2.5.6 beschrieben präpariert. **Spur 1-3:** Membranvesikel von TKR2000/pKJ2-6His, mit einem aufgetragenen Proteingehalt von 10µg, 20µg und 30µg. **Spur 4-6:** Membranvesikel von MC1061/pBAD-kdpDcLIC, mit einem zum Vergleich aufgetragenen Proteingehalt von 10µg, 20µg und 30µg. KdpD(+His-Tag) hat ein Molekulargewicht von ca. 100kDa (siehe Pfeil).

3.2.2 Überproduktion von KdpD-10His in *Lactococcus lactis*

Die Überproduktion von KdpD-10His in *Lactococcus lactis* fand auf Basis eines Nisin induzierbaren Genexpressionssystems (NICE) statt, welches in Abbildung 3.13 genauer dargestellt ist.

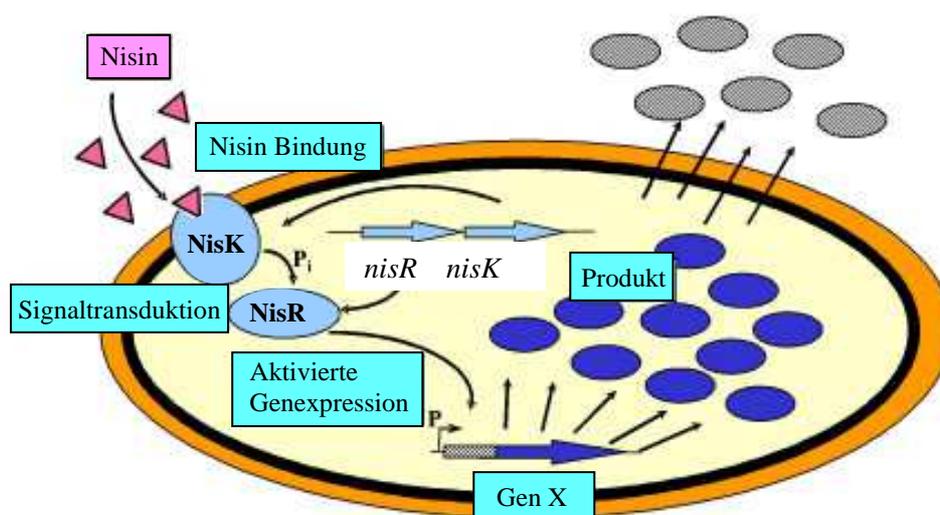


Abb. 3.13: Schematische Übersicht des NICE Systems (verändert nach Mierau, 2005). Das Nisin aktiviert die Sensorkinase NisK, diese autophosphoryliert daraufhin und überträgt die Phosphatgruppe auf den Antwortregulator NisR. Der Antwortregulator bindet nun mit hoher Affinität an den Promotor P_{nis} , unter dessen Kontrolle das *kdpD* Gen liegt und induziert somit die Überexpression von *kdpD*.

Dazu wurde das *E. coli kdpD* Gen über die VBEx-Methode in den *Lactococcus lactis* Vektor pERL kloniert und stand fortan im resultierenden Plasmid pNZ kdpDnLIC unter Kontrolle des Nisin induzierbaren Promotors P_{nis} . *Lactococcus lactis* Zellen des Stammes NZ9000 transformiert mit diesem Plasmid wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 0.5$ angezogen und mit Nisin für ca. zwei Stunden induziert. Zur Induktion wurde zunächst käuflich erworbenes Nisin eingesetzt und in verschiedenen Konzentrationen von 0,5-5ng/ml getestet. Nachdem eine Induktion der Überexpression des *kdpD* Gens nicht erreicht werden konnte, wurde von *Lactococcus* natürlich sekretiertes Nisin im Verhältnis 1:1000 zur Induktion eingesetzt. Mittels natürlich sekretiertem Nisin konnte eine Überproduktion des KdpD-10His Proteins in *Lactococcus lactis* NZ9000 erreicht werden, jedoch war die Menge an KdpD-10His in den Membranen begrenzt und verglichen mit der Menge des Proteins in *E. coli* Membranen reduziert. Die Banden in Abbildung 3.14 auf Höhe der 100kDa Marke in den Spuren 1-3 zeigen außerdem, dass KdpD-10His hier auch im Cytosol und in den Zelltrümmern detektiert werden konnte. Die KdpD-10His Überproduktion ließ sich auch dann nicht verbessern, wenn man die Zellen zur Gewinnung von mehr Membranvesikeln auf erhöhte optische Dichten $OD_{600} \leq 4$ anzog. Der Gesamtproteingehalt war zwar dadurch erhöht, die KdpD-10His Menge blieb jedoch die gleiche wie die, in Membranen präpariert aus Zellen, die bei geringerer optischer Dichte geerntet wurden. Da das Protein nicht zum eigentlichen Proteom der *L. lactis* Zellen gehört, könnte eine mögliche Erklärung für die schlechtere KdpD-Überproduktion darin bestehen, dass die *L. lactis* Zellen große Mengen KdpD-10His einfach nicht tolerieren und das Protein abgebaut wird. Desweiteren wurde hier nur KdpD mit N-terminalem His-Tag getestet, der bei der Überproduktion des Proteins in *L. lactis* vielleicht einen negativen Einfluß auf den Einbau des Proteins in die Membran ausübt, wodurch auch der KdpD-10His Anteil in den Zelltrümmern und im Cytosol erklärt werden könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Produktion von KdpD-10His in *L. lactis* erreicht werden konnte, jedoch ist die KdpD-10His Menge deutlich geringer, verglichen mit der Überproduktion von KdpD-6His in *E. coli*.

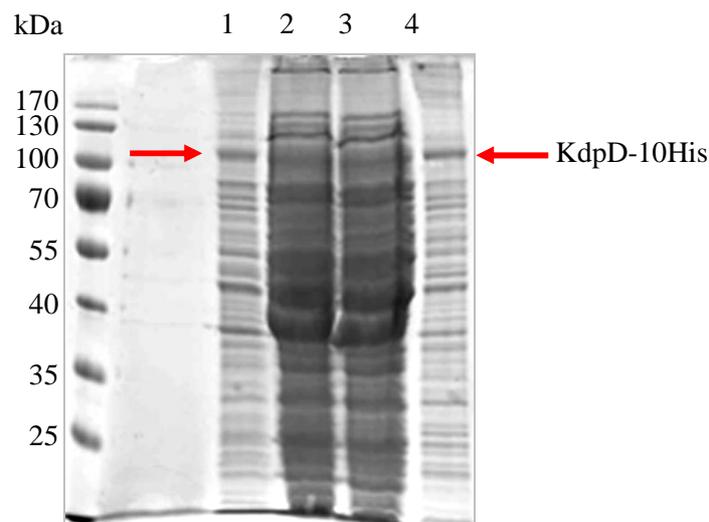


Abb. 3.14: Membranpräparation von NZ900/ pNZ kdpDnLIC. Die Abbildung zeigt ein mit Coomassie Blau gefärbtes 11% SDS-Gel. Zellen von *Lactococcus lactis* pNZ kdpDnLIC wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 1$ angezogen und die Membranvesikel wie unter Punkt 2.5.6 beschrieben, präpariert. Das durch niedertourische Zentrifugation gewonnene Pellet wurde in gleichem Volumen resuspendiert wie der Überstand. Es wurden in Spur 1-3 jeweils 30 μ l Probe aufgetragen, die Spuren 4-5 sind auf genaue Proteinmengen eingestellt. **Spur 1:** Pellet nach niedertouriger Zentrifugation (Zelltrümmer); **Spur 2:** Überstand nach niedertouriger Zentrifugation; **Spur 3:** Cytoplasma; **Spur 4:** Membranvesikel eingestellt auf Proteinmengen von 10 μ g/Spur.

3.2.3 Solubilisierung von KdpD(+His-Tag)

Der wichtigste Schritt bei der Reinigung eines integralen Membranproteins ist das Solubilisieren des Proteins mittels Detergenzien. Ihr amphiphiler Charakter erlaubt es ihnen, mit hydrophoben Membranproteinen zu interagieren und diese außerhalb der nativen Lipiddoppelschicht der Zellmembran in Lösung zu halten. Dabei ist es von großer Bedeutung, ein Detergenz für die Reinigung und spätere Charakterisierung des Proteins auszuwählen, welches aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften am besten mit dem Membranprotein interagiert, um dieses in möglichst aktiver Konformation in Lösung zu halten. Aus diesem Grund wurde die Solubilisierung von KdpD(+His-Tag) mit verschiedenen Detergenzien (Tab.3.2), die sich in ihrer Hydrophobizität und elektrischen Ladung (auf ionische Detergenzien wurde aufgrund ihrer denaturierenden Wirkung verzichtet) unterscheiden, getestet.

Detergenz	Typ	CMC (%)	MW (Da)	Aggregationsnummer
n-Nonyl- β - D- Maltopyranosid	nicht ionisch	0,28	468,5	55
n-Decyl- β - D- Maltopyranosid	nicht ionisch	0,087	482,6	69
n-Undecyl- β - D- Maltopyranosid	nicht ionisch	0,029	496,6	74
n-Dodecyl- β - D- Maltopyranosid	nicht ionisch	0,0087	510,6	78-149
n-Tridecyl- β - D- Maltopyranosid	nicht ionisch	0,0017	524,6	105
n-Octyl- β - D- Glucopyranosid	nicht ionisch	0,53	292,4	78
n-Nonyl- β - D- Glucopyranosid	nicht ionisch	0,2	306,4	n.d.
CYMAL 5	nicht ionisch	0,12	494,5	66
CYMAL 6	nicht ionisch	0,028	508,5	63
FOS- Cholin 10	zwitterionisch	0,35	323,4	n.d.
FOS- Cholin 12	zwitterionisch	0,047	351,5	n.d.
FOS- Cholin 14	zwitterionisch	0,0046	379,5	n.d.
Cyglu 4	nicht ionisch	0,058	318,4	n.d.
LDAO	zwitterionisch	0,023	229,41	76

Tab. 3.2: Eigenschaften der getesteten Detergenzien. Die Wasserlöslichkeit der Detergenzmoleküle wird durch die hydrophilen Kopfgruppen gewährleistet, die als ionisch (anionisch bzw. kationisch), nicht ionisch oder zwitterionisch kategorisiert werden. Die Konzentration eines Detergenz ,ab welcher sich Detergenzmonomere zu nicht kovalenten Aggregaten, Micellen genannt, zusammenschließen, wird kritische Micellenkonzentration (CMC) genannt. Eine weitere physikalische Eigenschaft ist die Aggregationsnummer von Detergenzien, die die Anzahl an Detergenzmonomeren innerhalb einer Micelle beschreibt (Detergent Handbook, Calbiochem)

Für jeden Solubilisierungsansatz wurden Membranvesikel von TKR2000/pKJ2-6His mit einer Proteinkonzentration von 5mg/ml eingesetzt. Neben 50mM Tris/HCl, pH8 und 300mM NaCl (= Puffer A), wurden die jeweiligen Detergenzien (siehe Tab.) in einer Konzentration von 1% (w/v) eingesetzt. Die Solubilisierung erfolgte eine Stunde auf Eis, anschließend wurden die Solubilisierungsansätze für 20min bei 444.000 x g zentrifugiert. Dabei erfolgte die Trennung von Solubilisat und Membranen. Die Membranen wurden im gleichen Volumen Puffer A aufgenommen und es wurden Aliquots von Solubilisat und Membranen für eine spätere SDS-PAGE aufbewahrt. Um die Interaktionen der verschiedenen Detergenzien mit KdpD-6His weiter zu untersuchen, wurde das Protein in Anwesenheit der einzelnen Detergenzien über

eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dabei wurden die Detergenzien in Konzentrationen eingesetzt, die dem vierfachen ihrer kritischen Micellenkonzentrationen entsprachen (siehe Tab.3.2). Das genaue Protokoll der Ni²⁺-NTA- Affinitätschromatographie mit KdpD(+His-Tag) wird unter 2.5.7 beschrieben. Da hier die Interaktion zwischen Detergenz und Protein genauer beobachtet werden sollte, wurde ein besonderes Augenmerk auf eine mögliche Oligomerisierung bzw. Aggregatbildung von KdpD nach den Elutionsschritten der Affinitätschromatographie gelegt, was sich negativ für weitere Arbeiten an dem Protein auswirken könnte. Bei Betrachtung der SDS-Gele der Proben des Detergenztests zeigte sich, dass KdpD-6His mit fast jedem getesteten Detergenz gut aus der Membran solubilisiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Lediglich die Detergenzien n-Octyl- β -D-Glucopyranosid und Cyglu 4 zeigten eine derart schlechte Solubilisierung der Proteine, dass von einer weiterführenden Affinitätschromatographie abgesehen wurde. Das Aufreinigen des Proteins mittels Affinitätschromatographie sollte den weiteren Interaktionsverlauf von Protein und Detergenz näher beschreiben. So konnte man Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufreinigungen bezüglich höher liegenden Banden im Gel erkennen, welche im Immunoblot mit einem Antikörper gegen KdpD, auf KdpD-6His Oligomere bzw. Aggregate hinwiesen (Abb. 3.15b). Die Sensorkinase ließ sich gut mit den sich in ihren Kohlenwasserstoffkettenlängen unterscheidenden Maltopyranosiden aus der Membran solubilisieren und ohne große Verluste per Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie aufreinigen, jedoch konnte man bei der anschließenden SDS-PAGE auch starke Banden oberhalb der ca. 100kDa großen KdpD-6His Bande beobachten. Ein ähnliches Ergebnis, wenn auch nicht ganz so stark ausgeprägt, zeigten die Tests mit den zwitterionischen Detergenzien der FOS Cholin-Gruppe. Hierbei handelt es sich jedoch um aggressivere Detergenzien, die die aktive Konformation des Proteins beeinflussen können. Aus diesem Grund wurden die nicht ionischen Detergenzien CYMAL 5 und 6 diesen Detergenzien schließlich vorgezogen. Die Menge des Proteins nach Affinitätschromatographie ist hier unter Verwendung von CYMAL 5 zwar etwas reduziert verglichen mit den Aufreinigungen unter Verwendung der Maltopyranoside, dennoch eignet sich dieses Detergenz für die Reinigung des Proteins, da es dieses ebenfalls wie die Maltopyranoside zu einem hohen Anteil aus der Membran solubilisiert (Abb. 3.15a). Die Verwendung von n-Nonyl- β -D-Glucopyranosid als Detergenz zur Reinigung der Sensorkinase führte zu eher schwachen Ausbeuten gereinigten Proteins und wurde daher ebenfalls ausgeschlossen. Die Ergebnisse des Detergenztests lieferten eine

Auswahl an verschiedener Detergenzien, die sich alle für die Reinigung der Sensorkinase anboten, so dass letztlich frei entschieden wurde möglichst milde Detergenzien für weiterfolgende Schritte der Aufreinigung des Proteins zu verwenden. Die Solubilisierung von KdpD-6His mittels n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid (DDM) resultierte in früheren Studien von Jung *et al.* (1997) in einem aktiven Protein und wurde daher zur Solubilisierung des Proteins aus der Membran benutzt und anschließend ein Detergenzwechsel zu CYMAL 5 während der Reinigungsschritte vollzogen. Die Wahl dieser milden Detergenzien zur Solubilisierung und Reinigung der Sensorkinase steht im Gegensatz zur letztendlichen Verwendung des härteren, zwitterionischen Detergenz LDAO für die Solubilisierung des Proteins gemäß des Reinigungsprotokolls für KdpD nach Jung *et al.* (1997).

Zusätzlich wurde die Solubilisierung mittels Maltopyranosiden verschiedener Kohlenwasserstoffkettenlängen (DM und DDM) mit dem KdpD Protein der Membranvesikel aus dem *Lactococcus lactis* Stamm NZ9000/pNZ kdpDnLIC getestet. Auch hier konnten in beiden Fällen große Mengen des Proteins aus der Membran solubilisiert werden. Schließlich wurden diese Detergenzien auch bei der Reinigung des Proteins aus Membranvesikeln von *Lactococcus lactis* NZ9000/pNZ kdpDnLIC eingesetzt.

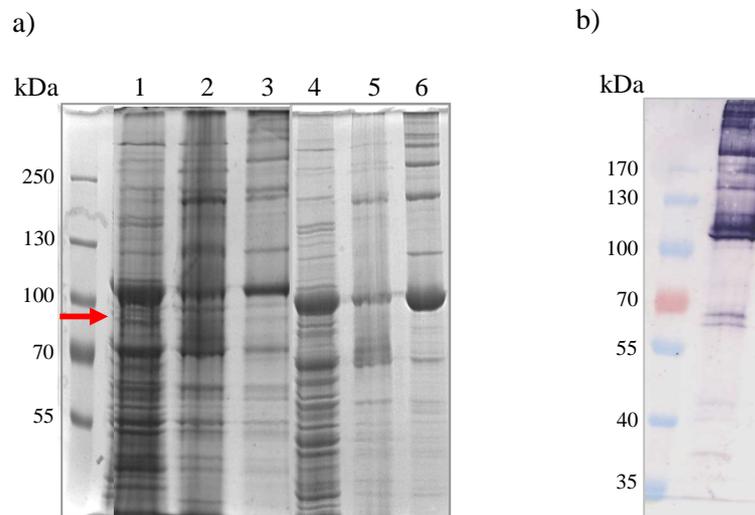


Abb. 3. 15: Immunodetektion von gereinigtem KdpD-6His und Solubilisierung mittels CYMAL 5 und Dodecyl- β -D-Maltopyranosid. a) Gezeigt ist ein 7,5% SDS-Gel mit Coomassie Blau gefärbt. Aufgetragen wurden jeweils 25 μ l Probe zum quantitativen Vergleich. **Spur 1-3:** Solubilisat, Membranen nach Solubilisierung und Elution der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie unter Verwendung von CYMAL 5. **Spur 4-6:** Solubilisat, Membranen nach Solubilisierung und Elution 2 der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie unter Verwendung von Decylmaltopyranosid.

b) Die Abbildung zeigt die Immunofärbung eines 11% Gels nach SDS-PAGE mit einem spezifischen Antikörper gegen KdpD. KdpD-6His wurde als Kontrolle nach dem Protokoll von Jung *et al.* (1997) aufgereinigt und für die Immunodetektion eingesetzt. Die Bande bei ca. 100kDa entspricht der monomeren Form von KdpD. Die höheren Banden zeigen, dass es sich hierbei ebenfalls um KdpD in oligomeren Formen bzw. um unspezifische Aggregate von KdpD zu handeln scheint.

3.2.4 Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Das Ergebnis der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 2.5.7) ist in Abbildung 3.16 gezeigt. Die ersten beiden Spuren des mit Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gels, zeigen zum einen die nicht gebundenen Proteine und zum anderen die Waschfraktion. Die Spuren 3-6 zeigen die stufenweise eluierten Proteine. Zum quantitativen Vergleich der KdpD-6His Konzentration in den Elutionsproben, wurden gleiche Mengen Probe von jeweils 10µl aufgetragen. KdpD-6His scheint mit hoher Affinität an die Ni²⁺-NTA Agarose zu binden. Anhand der Bande bei 100kDa, lässt sich deutlich erkennen, dass sich der Hauptanteil des KdpD-6His Proteins im vierten Elutionsschritt mit 250mM Imidazol, pH7 von der Ni²⁺-NTA Agarose ablösen lässt, während sich in den Proben der ungebundenen Proteine und der Waschfraktion kaum KdpD-6His detektieren lässt. Die höheren Banden oberhalb der 170kDa Bande des Proteinstandards weisen auf KdpD-6His Oligomere hin, deren Vorkommen bereits in 3.15a gezeigt wurde. Weiterhin lassen sich Banden unterhalb der KdpD-6His Bande detektieren, bei denen es sich um Verunreinigungen handelt. Somit lässt sich KdpD-6His mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie zu einem hohen Anteil von den Proteinen des Solubilisats trennen. Folglich müssen in einem zweiten Reinigungsschritt die verbleibenden Kontaminationen in den KdpD-6His enthaltenen Proben entfernt werden und die Proteinaggregate bzw. -oligomere genauer untersucht werden

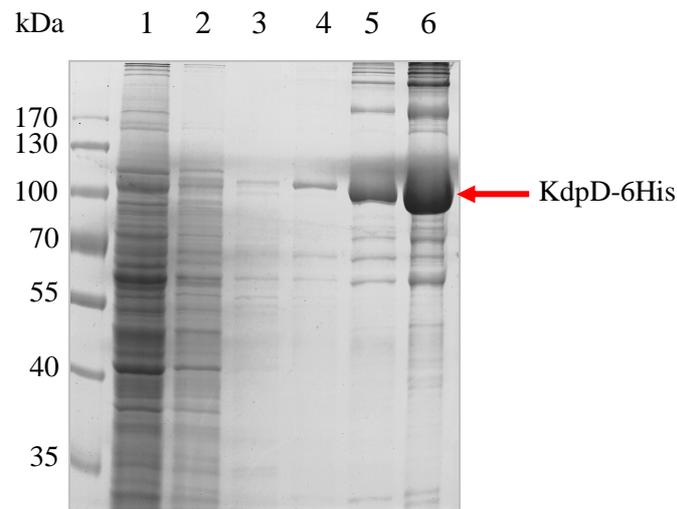


Abb. 3.16: Reinigung von KdpD-6His mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie. Die Abbildung zeigt ein mit Coomassie-Blau gefärbtes 10% SDS-Gel. Zum quantitativen Vergleich der KdpD-6His Menge wurden jeweils 25 μl Probe pro Spur aufgetragen. **Spur 1:** nicht gebundene Proteine. **Spur 2:** Waschfraktion. **Spur 3:** mit 100mM Imidazol eluiertes Protein. **Spur 4:** mit 187mM Imidazol eluiertes Protein. **Spur 5 und 6:** mit 250mM Imidazol eluiertes Protein.

KdpD-10His aus Membranvesikeln von *Lactococcus lactis* konnte ebenfalls mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie in Anlehnung an bestehende Protokolle der Abteilung für Membran Enzymologie der Universität Groningen aufgereinigt werden. Auch hier wurden die KdpD-10His enthaltenden Membranvesikel mit Puffer A auf eine Proteinkonzentration von 5mg/ml eingestellt und durch Zugabe von 1% (w/v) DDM für eine Stunde auf Eis solubilisiert. Nach dem Zentrifugationschritt (siehe 2.5.7) erfolgte die Bindung von KdpD-10His an in diesem Falle Ni^{2+} -Sephrose im Batchverfahren. Die Sephrose wurde zuvor mit dem 20fachen Säulenvolumen Wasser gewaschen und mit Puffer A äquilibriert. Auch hier fand die Bindung unter Zugabe von 15mM Imidazol, pH7 bei 4°C und leichtem Schwenken statt. Nach einer Stunde wurde die Ni^{2+} -Sephrose mit dem 20fachen Säulenvolumen Puffer A inklusive 60mM Imidazol, pH7 und 0,04% (w/v) DDM gewaschen. Abschließend erfolgten drei Elutionsschritte mit jeweils 500mM Imidazol im einfachen Säulenvolumen, wobei der Hauptanteil KdpD-10His im zweiten Elutionsschritt von der Ni^{2+} -Sephrose abgelöst wurde (siehe Abb.3.17). Zusätzlich wurde auch hier den Elutionsfraktionen 5mM EDTA zum Abfangen von Ni^{2+} Ionen zugegeben. Gleiche Reinigungsergebnisse wie in Abbildung 3.17, wurden auch unter Verwendung des Detergenz n-Decyl- β -D-Maltopyranosid erreicht.

Auch hier zeigen die Spuren 1 und 2 die nicht an die Ni^{2+} -Sephrose gebundenen Proteine, sowie die Waschfraktion. Die Spuren 3-5 zeigen die von der Ni^{2+} -Sephrose abgelösten Proteine der drei Elutionsschritte. Zum quantitativen Vergleich der KdpD-10His Menge wurden jeweils 25 μl Probe pro Spur aufgetragen. KdpD-10His lässt sich im Vergleich mit der Reinigung von KdpD-6His aus Membranen von *E. coli* in deutlich geringerer Menge auf Höhe der 100kDa Bande detektieren. Die Detektion von vielen Banden unterhalb der 100kDa Bande weist darauf hin, dass sich noch viele Proteinkontaminationen in den Fraktionen befinden. Die Affinität von KdpD-10His scheint daher deutlich schwächer zu sein, als die von KdpD-6His. Somit scheint das Standardprotokoll für die Proteinreinigung aus Membranen von *L. lactis* für KdpD nicht gut zu funktionieren. Um bessere Reinigungsergebnisse für KdpD-10His zu erlangen, müsste nicht nur die Überproduktion des Proteins in den Membranvesikel, sondern auch das Protokoll zur Affinitätschromatographie weiter ausgearbeitet werden.

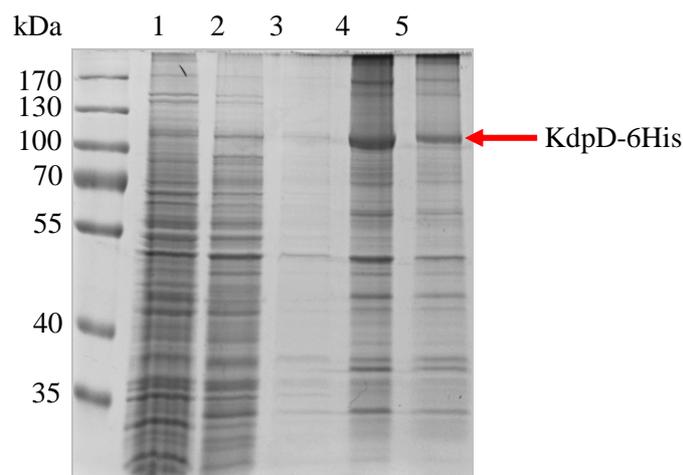


Abb. 3.17: Reinigung von KdpD-10His mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie. Die Abbildung zeigt ein mit Coomassie Blau gefärbtes 10% SDS- Gel. Zum quantitativen Vergleich der KdpD-10His Menge wurden jeweils 25 μl Probe pro Spur aufgetragen. **Spur 1:** nicht gebundene Proteine. **Spur 2:** Waschfraktion. **Spur 3:** erste Elution mit 500mM Imidazol. **Spur 4:** zweite Elution mit 500mM Imidazol. **Spur 5:** dritte Elution mit 500mM Imidazol.

3.2.5 Größenausschlusschromatographie

Um nun die restlichen Proteinkontaminationen aus den KdpD-Fractionen nach der Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie zu entfernen, sowie die Oligomerisierung von KdpD-6His näher zu untersuchen, wurde als zweiter Reinigungsschritt die Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Superdex 200 Säule gewählt. Hierzu wurden die KdpD-6His bzw. KdpD-

10His enthaltenden Fraktionen vereinigt und mittels einer Amicon 100K Filtereinheit auf 500µl eingengt, bevor sie auf die Säule geladen wurden. Die Filtereinheit wird nicht nur zum Einengen der Proben genutzt, sondern führt gleichzeitig auch zu einer teilweisen Entfernung kleinerer Proteine. Als Puffersystem wurde erneut 50mM Tris/HCl, pH8 mit 300mM NaCl unter Zugabe von 0,24% (w/v) CYMAL 5 für KdpD-6His aus *E. coli* Membranen bzw. 0,04% (w/v) DDM (0,35% (w/v) DM) für KdpD-10His aus *Lactococcus lactis* Membranen verwendet. In beiden Fällen kam es zu einem immer wiederkehrenden Laufverhalten von KdpD-6His bzw. -10His, resultierend in der Detektion dieser Proteine in den Fraktionen kurz hinter dem Ausschlussvolumen (7,5ml) der Superdex 200 Säule. Das Maximum des Proteinpeaks befindet sich bei ~8ml, was die Einschätzung erschwert, ob es sich bei den Proteinen aus dem Hauptpeak um Aggregate oder spezifische Oligomere handelt (Abb.3.18).

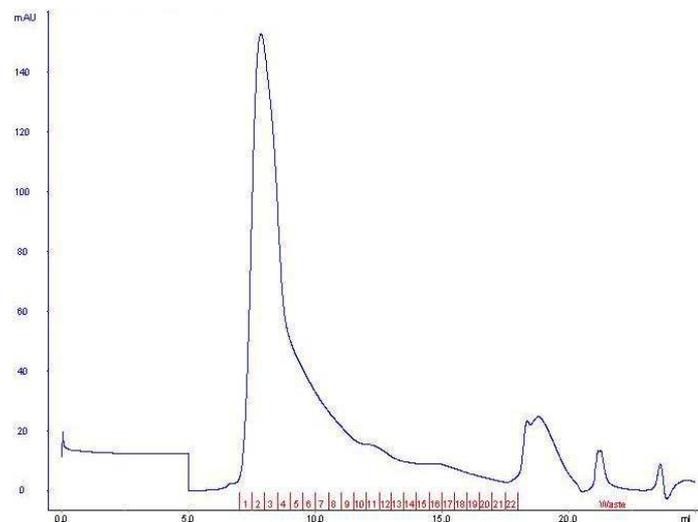


Abb.3.18: Chromatogramm der Proteinprobe mit den KdpD(+His) enthaltenden Fraktionen. Das Ausschlussvolumen dieser Säule befindet sich bei 7,5ml. Das Volumen an Puffer, welches benötigt wird, um Makromoleküle mit einem Molekulargewicht, das der Ausschlussgrenze entspricht oder diese übersteigt, zu eluieren, wird Ausschlussvolumen (=v₀) genannt. Kleinere Moleküle eluieren dagegen mit höheren Elutionsvolumina.

Um dieses Laufverhalten zu ändern, wurden diverse Puffersysteme (Kaliumphosphatpuffer, Tris/HCl Puffer unterschiedlicher NaCl bzw. KCl Konzentrationen, Tris/HCl Puffer mit ATP-Zugabe und Lipidzugabe) getestet. Da diese Tests zu keiner Verbesserung führten und um dem Hinweis nachzugehen, ob es sich bei den Aggregaten auch um spezifische Oligomere der Sensor kinase handeln könnte, wurde schließlich eine Sephacryl S400 Säule zur

Größenausschlusschromatographie eingesetzt, die eine Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 800kDa bis 80kDa ermöglicht. Aufgrund des grösseren Säulenvolumens war es allerdings notwendig, größere Proteinkonzentrationen auf die Säule zu laden, um trotz Verdünnungseffekt deutliche Peaks zu erhalten. Da die Anzucht von *E. coli* Zellen effizienter verlief und die Ausbeute an Membranvesikeln dadurch höher war als nach Anzucht von *Lactococcus lactis* wurde von nun an nur noch mit Membranvesikeln aus *E. coli* weitergearbeitet und somit auch alle weiteren Schritte nur mit gereinigtem KdpD-6His aus *E. coli* vollzogen. Das Laufverhalten des Proteins auf der Sephacryl S400 Säule und das dazugehörige SDS-Gel ist in Abbildung 3.19 gezeigt. Das Ausschlussvolumen dieser Säule liegt bei ca. 40ml. Der größte Peak zeigt sich von 50-70ml und umfasst die Fraktionen 29-31. Ein weiterer Doppelpeak lässt sich von 75-95ml beobachten, der die Fraktionen 54 und 62 umfasst. Betrachtet man nun das dazugehörige SDS-Gel, fällt auf, dass sich in den Fraktionen 29-31 keine Proteine befinden. Auch das Absorptionsspektrum dieser Fraktionen zeigt, dass sich die maximale Absorption der einzelnen Proben nicht bei der Wellenlänge befindet, bei der der Tryptophananteil von Proteinen absorbiert (280nm), sondern bei 260nm (schwarz, rot, braun). Es ist bekannt, dass bei dieser Wellenlänge Nukleinsäuren absorbieren. Lediglich bei Fraktionen 54 und 62 (dunkel- und hellgrün) findet man ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280nm und im SDS-Gel Proteinbanden auf der Höhe von ca. 100kDa, was dem KdpD-6His Protein entspricht.

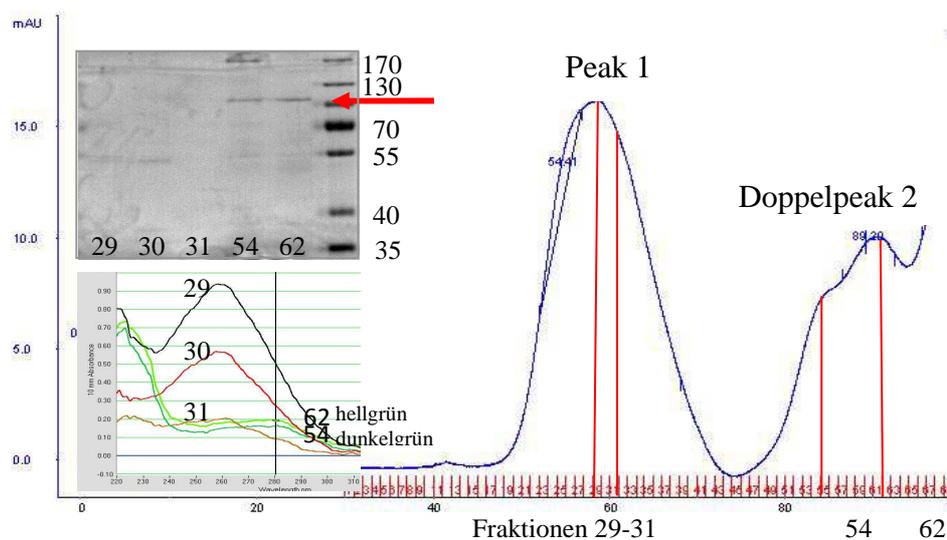


Abb. 3.19: Reinigung von KdpD-6His mittels Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Sephacryl S400 Säule. Gezeigt ist das Chromatogramm der Probe mit Peak 1 (Fraktionen 29-31) und Doppelpeak 2 (Fraktionen 54 und 62). **Links oben** ist das dazugehörige 11% SDS-Gel, mit Coomassie-Blau gefärbt, abgebildet. **Links unten** ist die Messung der Absorptionsmaxima der angegebenen Fraktionen gezeigt.

In einer zweiten Größenausschlusschromatographie wurden die KdpD-6His enthaltenden Fraktionen wieder vereinigt, mittels einer Amicon 100K Filtereinheit auf 500 μ l eingengt und erneut auf die Superdex 200 Säule geladen. Auf dieser Säule zeigte KdpD-6His nun ein geändertes Laufverhalten und eluierte in einem Hauptpeak bei ca. 12ml von der Säule. Auch der kleinere Peak bei ca. 11ml enthielt KdpD-6His und oligomere Formen des Proteins, was sich in der anschließenden SDS-PAGE unter denaturierenden und nativen Bedingungen zeigte (Abb.3.20a-c). Bei Betrachtung der SDS-PAGE sieht man in den Spuren der Fraktionen A1-A3, welche der Fraktion des Ausschlussvolumens und den Fraktionen des Peaks bei 11ml entsprechen, neben der KdpD-6His Bande bei 100kDa noch weitere Banden oberhalb von 100kDa. In den Spuren von A4 und A5, den Fraktionen des Hauptpeaks bei 12ml, befindet sich nur noch eine weitere stärkere Bande oberhalb der 100kDa KdpD-6His Bande. Dafür lassen sich zusätzliche schwache Banden unterhalb der 100kDa Marke detektieren. Passende Beobachtungen dazu liefert das native Gel. Trägt man eine Probe von Fraktion A3 des ersten Peaks auf ein natives Gel auf, zeigen sich drei Banden auf Höhe von ~450kDa, 350kDa und 272kDa, die einem KdpD Dimer und höheren Oligomeren des Proteins entsprechen könnten. Trägt man eine Probe von Fraktion A4 des Hauptpeaks auf ein natives Gel auf, lassen sich zwei Banden auf Höhe 272kDa und ~150kDa detektieren, wobei es sich, wenn man die zusätzliche Detergenzmicelle, die sich um das Protein herum befindet, hinzuaddiert, um ein KdpD-6His Monomer und Dimer handeln könnte.

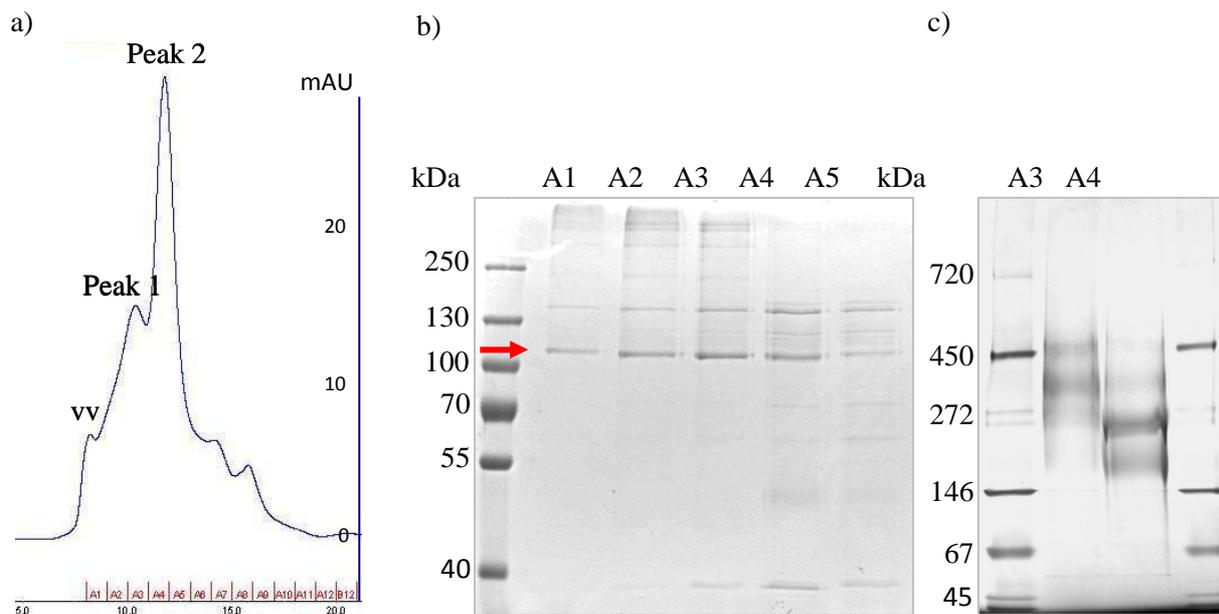


Abb. 3.20: Reinigung von KdpD-6His mittels zweiter Größenausschlußchromatographie unter Verwendung einer Superdex 200 Säule. a) Gezeigt ist das Chromatogramm der Probe mit Peak 1 (Fraktionen A2 und A3) und Peak 2 (Fraktionen A4 und A5). b) 11% SDS-Gel mit Coomassie gefärbt der Fraktionen A1-A5. Pro Spur wurden jeweils 50µl Probe zum quantitativen Vergleich der KdpD-6His Menge aufgetragen. c) Blue Native-Gelelektrophorese der Fraktionen A3 und A4. Pro Spur wurden hier 25µl eingengte Probe (~5µg Protein) aufgetragen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Reinigungsprotokoll für KdpD erstellt werden konnte, was einen relativ hohen Reinheitsgrad des Proteins gewährleistet, jedoch auf Kosten der Proteinmenge. Aus ~10g Zellen (Feuchtgewicht) ergab sich ~500µg gereinigtes Protein. Wichtig ist nun zu testen, ob auch die Funktionalität der Sensorkinase erhalten werden konnte. Desweiteren stellt sich die Frage, in welcher Form KdpD funktionell aktiv ist, da sich während der Reinigung Hinweise auf verschiedene Oligomerisierungszustände des Proteins ergeben haben.

3.2.6 Rekonstitution und Kinase-Aktivität von gereinigtem KdpD-6His

Um die Kinase-Aktivität des gereinigten Proteins genauer zu untersuchen, musste KdpD-6His zunächst funktionell rekonstituiert werden. Nachdem die Rekonstitution wie unter Punkt 2.5.8 beschrieben durchgeführt wurde, musste die Einbaurate des Proteins in die Liposomen abgeschätzt werden. Dazu wurde eine SDS-PAGE durchgeführt um die Proben vor und nach der Rekonstitution miteinander zu vergleichen. Das entsprechende SDS-Gel ist in Abbildung

3.21a gezeigt. Im Vergleich zum gereinigten KdpD Protein (Spur 2), konnte im Falle einer 1:100 Rekonstitution eine Einbaurate von ~20-30% KdpD-6His in Leerliposomen (Spur 3) per Augenmaß abgeschätzt werden. Desweiteren konnte man zwei weitere Banden bei ca. 50 und 30kDa nach der Rekonstitution detektieren, die auch schon während des gesamten Reinigungsprozesses immer wieder auftauchten. Eine mehrfache massenspektrometrische Analyse dieser Banden ergab, dass es sich bei diesen scheinbar bevorzugt eingebauten Proteinen um Untereinheiten der Cytochrome bo Endoxidase (CyoB) von *E. coli* handelt.

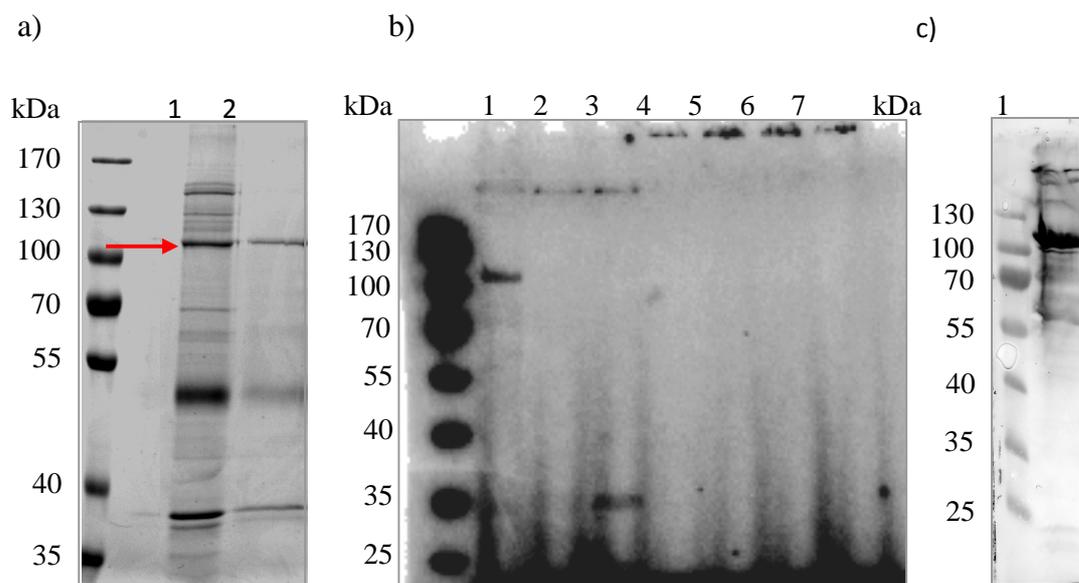


Abb. 3.21: a) **SDS-PAGE** zur Kontrolle der Einbaurate von KdpD-6His in Leerliposomen bei der Rekonstitution. Aufgetragen wurden dieselben Proteinmengen sowohl von gereinigtem (**Spur 1**) als auch von 1:100 rekonstituiertem Protein (**Spur 2**). b) **Autoradiogramm der Kinaseaktivitäten**. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm eines 11% SDS- Gels. **Spur 1:** Membranvesikel von TKR2000 pKJ2-6His. **Spur 2:** Solubilisat vor Abzentrifugieren der Membranen. **Spur 3:** Solubilisat nach Abzentrifugieren der Membranen. **Spur 4:** Elution 3 der Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie. **Spur 5:** Probe nach der Gelfiltration **Spur 6:** Probe nach weiterem Einengen. **Spur 7:** 1:100 rekonstituiertes Protein. c) **Immunodetektion der Membranvesikel**. Die Abbildung zeigt die Immunofärbung mit einem spezifischen Antikörper gegen KdpD eines 11% Gels nach SDS-PAGE. Es wurde hier die gleiche Proteinmenge wie in Spur 1b) aufgetragen.

Anschließend wurde mittels Phosphorylierung mit [γ -³²P]-ATP (siehe 2.5.9) überprüft, ob das KdpD-6His Protein im Solubilisat, im gereinigten und löslichen Zustand und nach Rekonstitution in die Liposomen funktionell aktiv war. Als Positivkontrolle wurden Membranvesikel von TKR2000/pKJ2-6His verwendet (Abb.3.21b). Das Autoradiogramm der Kinaseaktivitäten zeigt, dass bei der Positivkontrolle eine Phosphorylierung von KdpD-6His

detektiert werden konnte. Das Gel zeigt eine Bande auf Höhe von ~100kDa, die dem KdpD-6His Monomer in phosphoryliertem Zustand entspricht und eine Bande oberhalb von 170kDa (Spur 1), die dem KdpD Dimer entsprechen könnte. In die Spuren 2 und 3 wurden Proben des Solubilisats aufgetragen, wobei es sich bei der Probe in Spur 2 um das Solubilisat vor dem Abzentrifugieren der Membranen handelt, bei der Probe in Spur 3 wurde das Solubilisat von den Membranen getrennt. Beide Spuren zeigen im Autoradiogramm eine Bande oberhalb der 170kDa Markerbande, die auch bereits in Spur 1 detektiert werden konnte. Die beiden detektierten Banden der Spuren 1-3 lassen sich auch im Immunoblot (Abb.3.21c) nachweisen. Die Proben von KdpD-6His im löslichen, gereinigten Zustand nach Elution der Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie (~0,4mg/ml), nach der Gelfiltration mittels S400 Sephacryl Säule (KdpD-6His enthaltende Fraktionen vereinigt und eingengt auf eine Proteinkonzentration von ~0,8mg/ml) und nach weiterer Einengung dieser Probe auf eine Proteinkonzentration von >1mg/ml sind in den Spuren 4-6 aufgetragen. Spur 7 enthält dagegen die Probe von 1:100 rekonstituiertem KdpD-6His. Eine Phosphorylierung der Sensorkinase konnte bei diesen Proben nicht detektiert werden. Abbildung 3.21c zeigt die Immunofärbung der Membranvesikel mit einem spezifischen Antikörper gegen KdpD-6His eines 11% Gels nach SDS-PAGE. Um das Ergebnis der Phosphorylierung der Membranvesikel zu überprüfen, wurden gleiche Proteinmengen wie bei der Phosphorylierungsprobe auf das Gel aufgetragen. Es lässt sich erkennen, dass die Phosphorylierung nicht so stark ist wie die Detektion von KdpD-6His mittels Immunoblot, wobei diese beiden Methoden aufgrund der unterschiedlichen Durchführungen auch nicht unbedingt miteinander vergleichbar sind. Was sich jedoch im Immunoblot ebenfalls deutlich zeigt, sind die Banden oberhalb der 170kDa Markerbande, die sich somit auch von dem KdpD spezifischen Antikörper detektieren lassen.

3.2.7 Charakterisierung der Interaktion von KdpD-6His mit Nukleotiden mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die fluoreszierende Eigenschaft der Aminosäure Tryptophan bietet eine nützliche Grundlage für fluorometrische Messungen. Da die Tryptophanfluoreszenz bemerkenswert sensitiv gegenüber der Polarität der Umgebung reagiert, kann sie in diesem Falle genutzt werden um die Affinität von Nukleotiden zu Tryptophan enthaltenden Proteinen zu bestimmen. Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass die Sensorkinase KdpD 14 Tryptophane enthält, die in diesem Versuch die Grundlage zur Detektion der Nukleotid-Bindung an das Protein

bilden. Die zu testende Nukleotid-Bindung an das Protein sollte mit einem Konformationswechsel des Proteins einhergehen, so dass sich im Zuge dessen die Umgebungspolarität einzelner Tryptophane verändert. Diese Änderungen können schließlich über Änderungen der Tryptophanfluoreszenz detektiert werden.

Zunächst wurden Emissionsspektren von 125nM wie zuvor beschriebenen gereinigtem KdpD-6His in An- und Abwesenheit von unterschiedlichen ATP(Mg²⁺) Konzentrationen, wie in Punkt 2.5.10 beschrieben, aufgenommen (Abb.3.22).

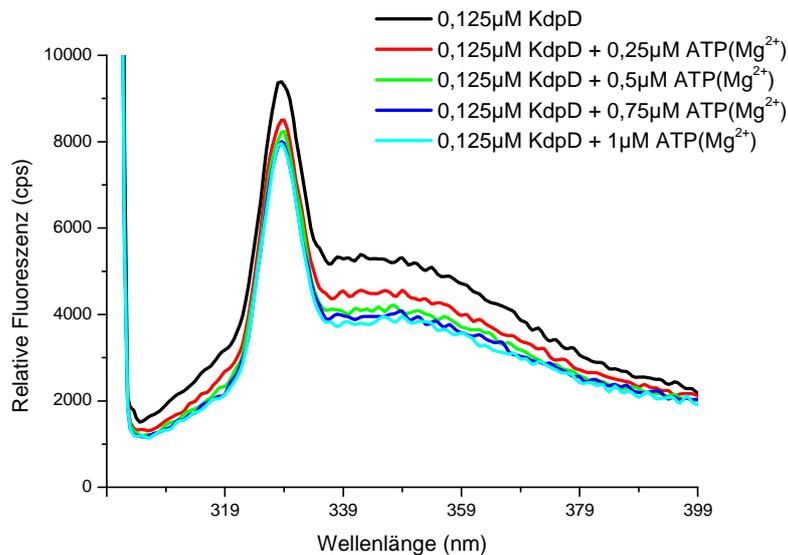


Abb. 3.22: Emissionsspektren von 125nM KdpD-6His in An- und Abwesenheit unterschiedlicher ATP(Mg²⁺) Konzentrationen. Die Spektren wurden in Puffer (50mM Tris/HCl, pH8; 300mM NaCl und 0,24% (w/v) CYMAL 5) bei RT aufgenommen . Die Anregungswellenlänge betrug 295nm.

Wie in der Abbildung zu sehen ist, nimmt die Höhe des Emissionssignals nach Zugabe von 0,25µM ATP(Mg²⁺) ab. Auch die erneute Zugabe von ATP(Mg²⁺) bis zu einer Endkonzentration von 0,5µM führte zu einer weiteren Abnahme des Emissionssignals. ATP(Mg²⁺)-Konzentrationen über 0,5µM führten schließlich zu keiner weiteren Signaländerung. Somit kann man Abbildung 3.22 entnehmen, dass es sich bei dem maximalen Effekt bei gesättigter ATP(Mg²⁺)-Konzentration um eine ca. 25%ige Reduktion der Emissionssignalintensität zwischen 200 und 400nm handelt. Zu vernachlässigen ist der sogenannte Raman-Peak bei einer Wellenlänge von 330nm. Dieser lässt sich durch die, für diese Messungen eingesetzte, geringe Proteinkonzentration erklären. Um zu zeigen, dass die Abnahme des Emissionssignals

durch eine Bindung von $\text{ATP}(\text{Mg}^{2+})$ an KdpD-6His verursacht wird, wurde als Negativkontrolle der gleiche Versuch mit dem Glutamatransporter Glt_{Ph} durchgeführt, welcher keine ATP-Bindestelle besitzt. Es konnten hierbei keine Änderungen des Emissionssignals aufgezeichnet werden. Aufgrund der fehlenden ATP-Bindung änderte sich die Tryptophanumgebung des Glutamatransporters nicht, was sich in einer Überlagerung der einzelnen Emissionsspektren zeigte (Daten nicht gezeigt).

Auf Basis dieser Beobachtungen wurden nun Titrations mit verschiedenen Nukleotiden und KdpD-6His durchgeführt, um die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D der Komplexe aus Protein und Nukleotid zu ermitteln. Abbildung 3.23 zeigt die Ergebnisse der Titrations von KdpD-6His mit ATP und ADP in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen.

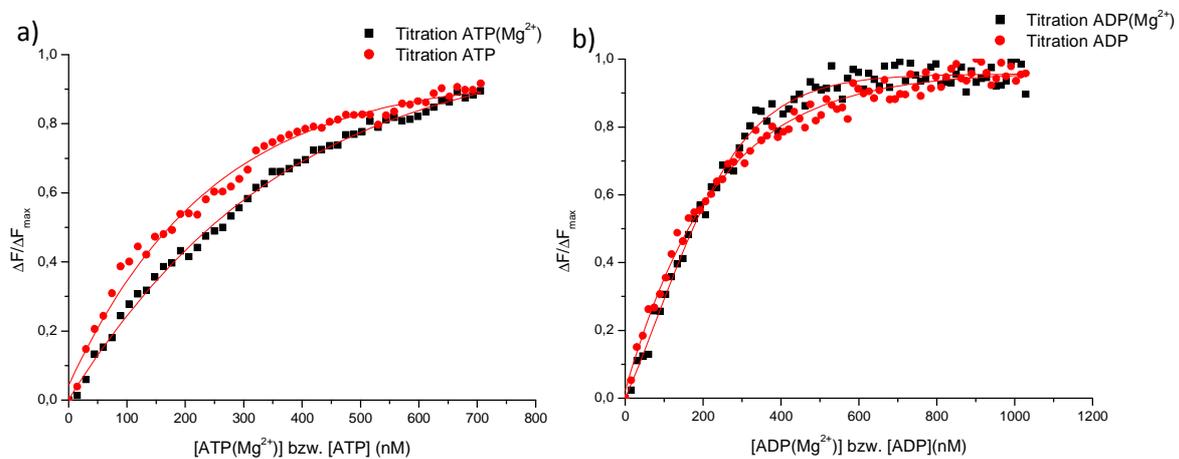


Abb. 3.23: Bindetitrations von KdpD-6His mit a) $\text{ATP}(\text{Mg}^{2+})$ bzw. ATP und b) $\text{ADP}(\text{Mg}^{2+})$ bzw. ADP. Die Tryptophanfluoreszenzänderungen aufgrund der Bindung von Nukleotiden in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 295nm gemessen. Sigmoidale Boltzmann Fittings wurden zur Datenanalyse verwendet. Die K_D -Werte sind zusammengefasst in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Die Auswertung der Titration gemäß 2.5.13 von KdpD-6His mit $\text{ATP}(\text{Mg}^{2+})$ ergab einen K_D -Wert von $\sim 200 \text{ nM}$, im Vergleich zu einem K_D -Wert von $\sim 150 \text{ nM}$, welcher aus der Analyse der Titrationsdaten von KdpD-6His mit ATP ohne Magnesiumionen hervorgeht. Auch die ermittelten K_D -Werte nach Titration des gereinigten Proteins mit ADP in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen liegen im Bereich von 140-160nM. Die An- bzw. Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen hat somit in diesem Experiment keinen großen Einfluss auf die Affinität der Sensor kinase für die Nukleotide ATP und ADP. Desweiteren wurde nach dem gleichen Versuchsprinzip eine mögliche Bindung zwischen KdpD-6His und GTP untersucht. Die

Analyse von Titrationsdaten zeigte hier einen K_D -Wert von $\sim 625\mu\text{M}$. Im Vergleich hat die Sensorkinase damit eine ~ 4000 fach höhere Affinität zu ATP und ADP, als zu GTP.

Zusätzlich wurde die Bindung eines fluoreszierenden ATP-Analogons an gereinigtem KdpD-6His getestet. TNP-ATP [2'(3')-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-Adenosin-5'-Triphosphat] besitzt Ether verlinkte Trinitrophenylgruppen am 2' und 3' Ribosesauerstoff (Abb. 3.24) und ist in wässrigen Lösungen schwach fluoreszierend.

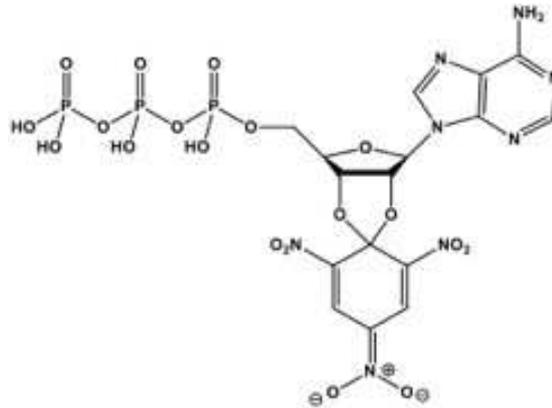


Abb. 3.24: Chemische Struktur des ATP-Analogons TNP-ATP.

Die Trinitrophenyl-Verbindungen zeigen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität, wenn sie durch Bindung an Proteine abgesondert von der wässrigen Lösung in hydrophoberer Umgebung vorliegen (Bilwes *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 1998). Dieser Effekt ermöglicht die Anwendung von TNP-ATP als spektroskopischer Detektor in Untersuchungen bezüglich der Bindung von ATP an Proteinkinasen wie CheA (Stewart *et al.*, 1998) und EnvZ (Plesniak *et al.*, 2002), ATPasen (Weber & Senior, 1996; Faller, 1990), Myosin (Hiratsuka, 1982) und an weitere Nukleotid bindende Proteine (Bujalowski *et al.*, 1993; Van der Wolk *et al.*, 1995).

Zunächst wurden die Fluoreszenzemissionsspektren von TNP-ATP in An- und Abwesenheit von gereinigtem KdpD-6His aufgenommen (Abb. 3.25). Hierbei zeigte das Fluoreszenzemissionsspektrum von TNP-ATP eine ca. 25%ige Zunahme der Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von KdpD-6His, die darauf hinweist, dass sich ein KdpD-6His:TNP-ATP Komplex gebildet hat.

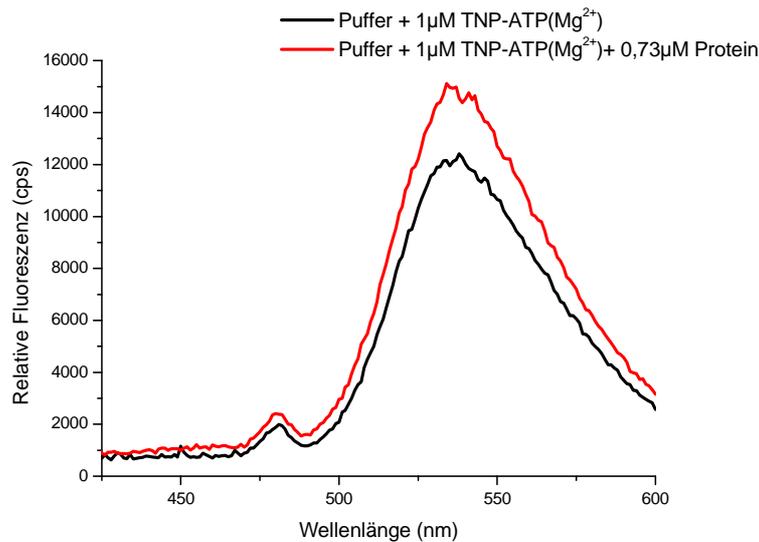


Abb. 3.25: Fluoreszenzemissionsspektren von TNP-ATP(Mg²⁺) in An- und Abwesenheit von KdpD-6His. Die Spektren wurden in Puffer (50mM Tris/HCl, pH8; 300mM NaCl und 0,24% (w/v) CYMAL 5) bei RT aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 412nm.

In Abbildung 3.26 ist das Ergebnis der Bindetitration von TNP-ATP(Mg²⁺) und KdpD-6His gezeigt. Der ermittelte K_D -Wert beträgt ca. 4µM, die Affinität des Proteins für TNP-ATP ist somit 26fach geringer als zu ATP und ADP. Die Bindetitrations wurden außerdem mit TNP-ATP in Abwesenheit von Mg²⁺-Ionen durchgeführt, wobei sich die Messwerte kaum unterschieden (Daten nicht gezeigt) und der K_D -Wert ebenfalls bei ca. 4µM lag.

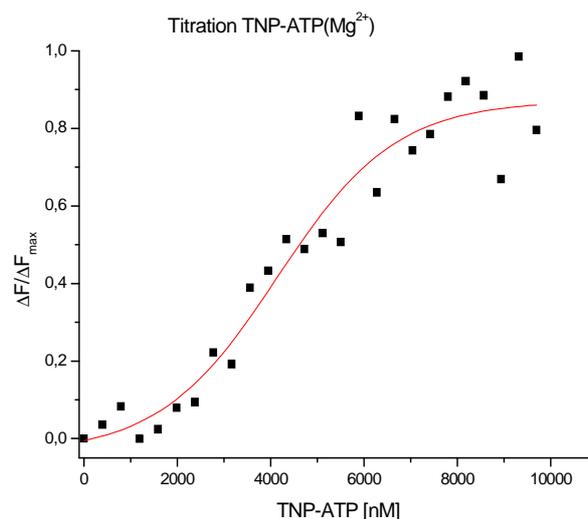


Abb. 3.26: Bindetitration von KdpD-6His mit TNP-ATP(Mg²⁺). Die Fluoreszenzänderungen aufgrund der Bindung von TNP-ATP(Mg²⁺) an KdpD-6His wurde bei einer Anregungswellenlänge von 412nm gemessen. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 543nm aufgenommen. Ein sigmoidales Boltzmann Fitting wurde zur Datenanalyse verwendet. Der K_D -Wert ist ebenfalls in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Um als nächstes zu testen, ob ATP und TNP-ATP an der gleichen Stelle innerhalb des KdpD-6His Proteins binden, wurden erneut Fluoreszenzemissionsspektren von TNP-ATP(Mg²⁺) aufgenommen in An- und Abwesenheit von KdpD-6His und 1mM ATP (Abb. 3.27).

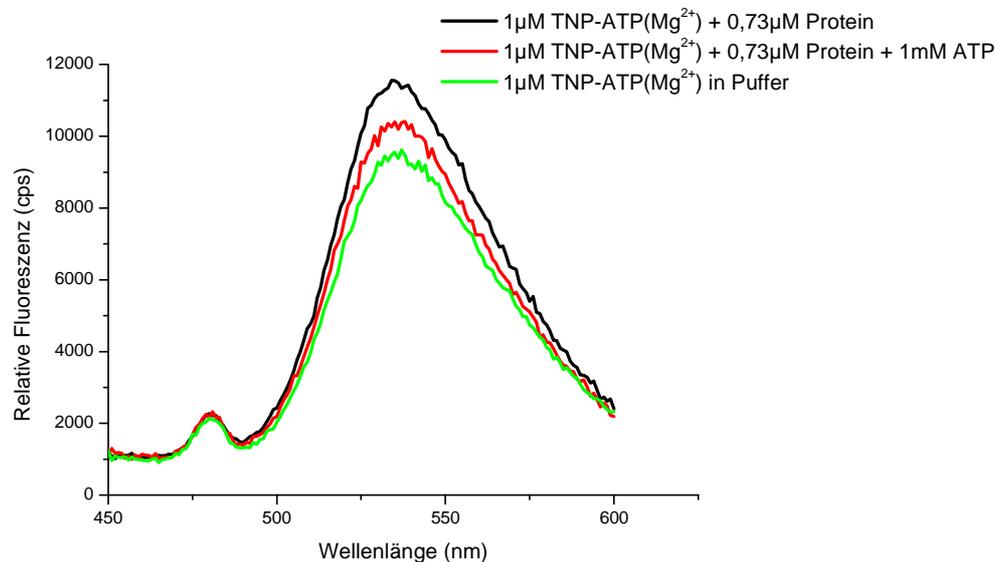


Abb. 3.27: Fluoreszenzemissionsspektren von TNP-ATP(Mg²⁺) in An- und Abwesenheit von KdpD-6His und 1mM ATP. Die Spektren wurden in Puffer (50mM Tris/HCl, pH8; 300mM NaCl und 0,24% CYMAL 5) bei RT aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 412nm.

Die Abbildung zeigt zum einen die ca. 25%ige Zunahme der Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von KdpD-6His, die darauf hinweist, dass sich ein KdpD-6His:TNP-ATP Komplex gebildet hat. Bei vorheriger Inkubation von gereinigtem KdpD-6His mit 1mM ATP und anschließender Zugabe von TNP-ATP(Mg²⁺), zeigt sich nur noch eine ca.12,5%ige Zunahme der Fluoreszenzintensität. Da diese Beobachtung darauf hinweist, dass das TNP-ATP(Mg²⁺) mit dem ATP um die Bindestelle am Protein konkurriert und dieses versucht zu verdrängen, wurden Bindetitrations von KdpD-6His mit TNP-ATP(Mg²⁺) unter vorheriger Zugabe von verschiedenen ATP Konzentrationen durchgeführt. Die dazu ermittelten K_D-Werte liegen bei 4μM bezüglich der Kontrolltitration ohne Zugabe von ATP, bei ~ 4,5μM TNP-ATP(Mg²⁺), wenn zuvor 250nM ATP zum Titrationsansatz hinzugegeben wurden und bei ~8μM TNP-ATP(Mg²⁺), wenn der Titrationsansatz mit dem gereinigtem Protein vorher mit 500nM ATP inkubiert wurde. Abbildung 3.28 zeigt dazu die Anfangswerte der Titrations mit speziellem Augenmerk auf die verzögerte Zunahme der Fluoreszenzintensitätsänderungen zu Beginn der TNP-ATP(Mg²⁺) Zugaben.

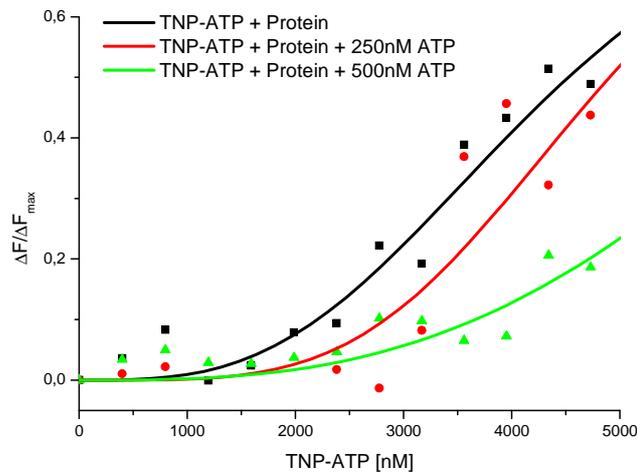


Abb. 3.28: Bindetitrations von KdpD-6His + ATP mit TNP-ATP(Mg²⁺). Die Fluoreszenzänderungen aufgrund der Bindung von TNP-ATP(Mg²⁺) an KdpD-6His wurde bei einer Anregungswellenlänge von 412nm gemessen. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 543nm aufgenommen. Sigmoidale Boltzmann Fits wurden zur Datenanalyse verwendet. Gezeigt ist eine Vergrößerung der Kurve in die Anfangswerte der Bindetitrations.

Die Sensorkinase KdpD enthält neben der ATP-Bindestelle innerhalb der Transmitterdomäne des Proteins noch weitere Sequenzmotive innerhalb der N-terminalen Domäne, an denen ATP binden könnte. So fallen zwei Sequenzmotive auf, die den für eine ATP-Bindung charakteristischen “Walker A“- und “Walker B“-Motiven, ähneln. Zusätzlich wurde mit Hilfe von Strukturmodellierungen die Usp-Domäne entdeckt und als eine weitere mögliche ATP-Bindedomäne charakterisiert (Strahl & Greie, 2008). Um einen möglichen Einfluss dieser zusätzlichen ATP-Bindedomänen auf die ATP-Bindung innerhalb der Transmitterdomäne des Proteins zu untersuchen, wurden KdpD-Mutanten bezüglich dieser Domänen (KdpD-6His-G37A, K38A, T39C und KdpDcLIC-ΔUsp) nach dem oben bereits beschriebenen Protokoll aufgereinigt. Außerdem wurde eine KdpD-Mutante, der die Phosphorylierungsstelle fehlt (KdpDcLIC-H673Q) aufgereinigt und auf die Erhaltung der ATP-Bindung getestet.

Die Mutationen in KdpD zeigten keinen negativen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins in den Membranen und auf das Verhalten des Proteins während der einzelnen Reinigungsschritte. Abbildung 3.29 zeigt die SDS-PAGE von Proben der Reinigung der einzelnen KdpD-Mutanten. Die Bande auf Höhe von 100kDa in Spur 1 zeigt KdpD-6His G37A, K38A, T39C nach der Gelfiltration. Proben des Solubilisats, der Elution der Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie und der Hauptfraktion der Gelfiltration des KdpDcLIC-ΔUsp

Proteins sind in Spuren 2-4 aufgetragen und der KdpDcLIC-H673Q Mutante in Spuren 5-7. Aufgrund der deletierten Usp-Domäne liegt die Proteinbande der KdpDcLIC- Δ Usp Mutante im Gel etwas niedriger als die KdpD Banden der anderen Mutanten. Die beiden zusätzlichen Banden bei 50kDa und 30kDa, die während der Reinigung von KdpD-6His nicht beseitigt werden konnten, ließen sich auch nach Reinigung der Mutanten im Gel detektieren.

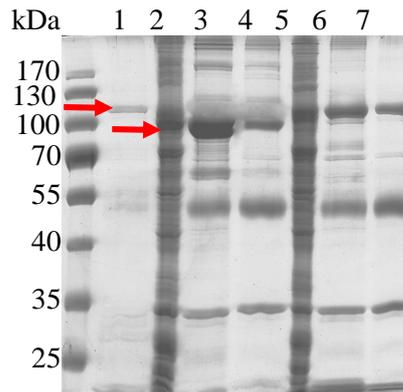


Abb. 3.29: Reinigung der KdpD-Mutanten. Die Abbildung zeigt ein mit Coomassie Blau gefärbtes 11% SDS-Gel. Zum quantitativen Vergleich der KdpD-6His Menge wurden jeweils 25 μ l Probe pro Spur aufgetragen. In Spur 1 wurden nur ca. 2 μ g Protein aufgetragen. **Spur 1:** KdpD-6His- G37A, K38A, T39C nach der Gelfiltration. **Spur 2:** Solubilisat KdpDcLIC Δ Usp. **Spur 3:** KdpDcLIC Δ Usp Elution der Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie. **Spur 4:** KdpDcLIC Δ Usp Hauptfraktion der Gelfiltration. **Spur 5:** Solubilisat KdpDcLIC H673Q. **Spur 6:** KdpDcLIC H673Q Elution der Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie. **Spur 7:** KdpDcLIC H673Q Hauptfraktion der Gelfiltration.

Als nächstes wurden Bindetitrations mit den Mutanten-Proteinen und ATP(Mg²⁺) sowie TNP-ATP(Mg²⁺) durchgeführt. Auf die Bindetitrations in Abwesenheit von Mg²⁺-Ionen wurde in diesen Versuchen verzichtet, da schon beim Wildtyp-Protein keine großen Unterschiede bezüglich der An- und Abwesenheit von Mg²⁺-Ionen aufgetreten sind. Die ermittelten K_D-Werte sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

	K _D ATP	K _D TNP-ATP	K _D ADP
Wildtyp KdpD-6His	150-200nM	4 μ M	140-160nM
KdpD cLIC H673Q	~ 230nM	keine Bindung	-
KdpD-6His-G37A, K38A, T39C	~260nM	~7 μ M	-
KdpDcLIC Δ Usp	~ 250nM	~ 5 μ M	-

Tab.3.3: Die Interaktionen von KdpD-6His und KdpD-Mutanten mit Nukleotiden.

Vergleicht man die verschiedenen K_D -Werte für ATP, sieht man, dass die Werte der KdpD-Mutanten nur geringfügig höher sind, als der Wert des Wildtyp-Proteins. Der K_D -Wert von 150-200nM für ATP, sowie 140-160nM für ADP des Wildtyp-Proteins ergibt sich aus der Zusammenfassung der Ergebnisse in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen. Größere Unterschiede zeigen sich bei den K_D -Werten von TNP-ATP. Wo der Wert der KdpDcLIC ΔUsp Mutante noch relativ vergleichbar ist mit dem K_D -Wert des Wildtyp KdpD, liegt der K_D -Wert für TNP-ATP der Walker A-Mutante deutlich höher. Bei KdpD cLIC H673Q konnte sogar keine TNP-ATP-Bindung festgestellt werden, woraus interessante Schlussfolgerungen gezogen werden könnten (siehe 4.5).

4. Diskussion

4.1 Interaktionsstudien des Zweikomponentensystems KdpD/KdpE durch Etablierung des “Bacterial Two Hybrid“ Systems

Die Frage nach dem Stimulus, welcher von der Sensorkinase KdpD detektiert wird, ist noch immer unbeantwortet. Aus diesem Grund sollte sich die Suche nach dem Reiz, der die Signaltransduktionskaskade aktiviert oder an anderen Stellen das Signal in seiner Stärke moduliert, in dieser Arbeit auf eine mögliche Interaktion von KdpD mit einem bisher unbekanntem Protein richten. Als Testverfahren wurde hierzu das “Bacterial Two Hybrid“ System verwendet. Diese Methode ermöglicht ein einfaches *in vivo* Screening und die Selektion von funktionellen Interaktionen zwischen zwei Proteinen (Karimova *et al.*, 1998). Vermieden werden hierbei Solubilisierungs- und Aufreinigungsschritte von KdpD die zu Beeinträchtigungen bei *in vitro* Interaktionsstudien wie z.B. dem Pull-down Assay führen könnten. Die sich teilende Zelle mit ihrem komplexen Proteinnetzwerken bleibt somit erhalten.

Grundsätzlich wurden alle Anzuchten im “Bacterial Two Hybrid“ System in Vollmedium durchgeführt. Da die Gene, die für die Fusionsproteine kodieren, in den “BTHS“-Vektoren unter Kontrolle des *lac*-Promotors liegen, werden diese Gene expremiert, unabhängig davon, ob sich die Zellen in Kaliumlimitation, also das Kdp-System induzierenden Bedingungen, befinden. Desweiteren handelt es sich bei den “BTHS“-Vektoren zwar um “low copy“ Plasmide, man muss jedoch beachten, dass die Menge an synthetisiertem Protein wahrscheinlich nicht die gleiche ist, wie die Menge an Protein in der Zelle von den entsprechenden chromosomal kodierten Genen. Die Funktionalität der Fusionsproteine konnte mittels normalerweise durchgeführten Komplementationsstudien nicht gezeigt werden. Im Falle der Fusionsproteine, die die Sensorkinase KdpD betreffen, wurde schon in früheren “Bacterial Two Hybrid“ Studien von Feuerbaum (2008) gezeigt, dass die “BTHS“-Vektoren nicht den geeigneten Plasmidhintergrund liefern, um das Wachstum eines *ΔkdpD*-Stammes unter Kaliumlimitation zu komplementieren. Im Falle der Fusionsproteine der einzelnen Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes sowie der Lipidsynthasen musste auf Komplementationsstudien aufgrund von nicht vorhandenen, den einzelnen Genen entsprechenden Deletionsstämmen verzichtet werden. Es muss also im Rahmen der Analyse der Testergebnisse grundsätzlich beachtet werden, dass negative Ergebnisse, die auf keine

vorhandene Interaktion zwischen zwei Proteinen hinweisen, auch durch nicht-funktionelle Proteine zustande kommen könnten.

Um das "Bacterial Two Hybrid" System für den Zweck dieser Arbeit zu etablieren, wurden zunächst bereits bekannte Interaktionen zwischen Proteinen getestet. Tatsächlich konnten in dieser Arbeit Interaktionen zwischen den Mitgliedern des Zweikomponentensystems KdpD/KdpE detektiert werden, die bisher hauptsächlich über Phosphorylierungsexperimente gezeigt wurden (Zimmann, 1995). Interessant ist hierbei der Unterschied, der sich in den Aktivitäten der Plasmidkombinationen KdpD18/KdpE25 und KdpD25/KdpE18 zeigt. Während die Kombination KdpD18/KdpE25 in einer β -Galaktosidase-Aktivität von 100% Miller Units resultierte, kam es bei der umgekehrten Plasmidkombination KdpD25/KdpE18 nur zu einer Aktivität von 50% Miller Units. Diese Beobachtung könnte sich durch die unterschiedliche Lokalisation der T18 und T25 Fragmente der katalytischen Untereinheit der Adenylatzyklase, welche mit den zu testenden Proteinen fusioniert vorliegen, erklären lassen. Das T18 Fragment ist in der Kombination KdpD18/KdpE25 an den zum Cytoplasma gewandten N-Terminus von KdpD fusioniert. Damit liegt der ebenfalls cytoplasmatisch vorliegende C-Terminus frei und kann wie im Rahmen der Phosphatübertragung während der Signaltransduktionskaskade mit dem Antwortregulator KdpE interagieren. Das T25 Fragment ist in der Kombination KdpD25/KdpE18 an den C-Terminus der Sensorkinase gekoppelt, was dazu führen könnte, dass der Antwortregulator KdpE nun nicht mehr frei mit dem C-Terminus der Sensorkinase interagieren kann und es somit zu einer Reduktion der Aktivität kommt. Die Tatsache, dass die T18 bzw. T25 Fusionen auch eine sterische Hinderung bei der Interaktion zweier Proteine sein können, muss somit in der Analyse des "Bacterial Two Hybrid" Systems berücksichtigt werden. Dabei gilt auch, dass je mehr Proteinkombinationen getestet werden, desto gezielter lassen sich Rückschlüsse auf die Interaktionen der zu testenden Protein ziehen, wie z.B. bei KdpD18/KdpE25 und KdpD25/KdpE18.

Als weitere Kontrollen wurden die Plasmidkombinationen KdpD18/KdpD25 und KdpE18/KdpE25 getestet, da es sich hier ebenfalls um bekannte Proteininteraktionen handelt. Wie in Abbildung 1.3 gezeigt und auch bereits von Heermann *et al.*, (1998) beschrieben, sollte die Sensorkinase KdpD als Homodimer funktionell aktiv sein, während es beim Antwortregulator KdpE im Laufe der Signaltransduktionkaskade zu einer Dimerisierung des Proteins kommt (Lucassen, 1998), infolgedessen KdpE~P mit höherer Affinität als KdpE an die DNA-Sequenz stromaufwärts des *kdpFABC*-Promotors bindet (Sugiura *et al.*, 1992;

Nakashima *et al.*, 1993). Mittels des "BTHS" konnten in der vorliegenden Arbeit diese Interaktionen bestätigt werden. Die *E. coli* Zellen mit der Proteinkombination KdpD18/KdpD25 wiesen eine β -Galaktosidase-Aktivität von ~55% Miller Units auf, wogegen die Plasmidkombination KdpE18/KdpE25 nur ~30% Aktivität in Miller Units zeigten. Die geringere β -Galaktosidase-Aktivität von KdpD18/KdpD25 verglichen mit der Positivkontrolle des Leucin-Zippers, könnte durch die zusätzlichen T18 und T25 Fragmente am Protein erklärt werden, welche die Dimerisierung des Gesamtproteins beeinflussen könnten. Bei Interaktionsstudien von KdpE und somit auch KdpE18/KdpE25 muss berücksichtigt werden, dass die Dimerisierung des Antwortregulators erst nach Phosphorylierung der einzelnen Monomere stattfindet. Durch die Phosphorylierung des Antwortregulators, kommt es wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung des Proteins, welche schließlich die Dimerisierung von KdpE begünstigt. Da dieser Test jedoch unter nicht induzierenden Bedingungen durchgeführt wurde, liegt hier die Interaktion von zwei nicht-phosphorylierten Proteinen vor. Somit ist es wahrscheinlich, dass die beiden KdpE Monomere in abgeschwächter Form miteinander wechselwirken, was erneut die verminderte Aktivität im β -Galaktosidase-Test erklären könnte.

Nachdem das "Bacterial Two Hybrid" System somit erfolgreich für das KdpD/KdpE-Zweikomponentensystem etabliert werden konnte, sollten weitere Ansätze getestet werden, um nach Analyse der β -Galaktosidase-Aktivitäten, Rückschlüsse auf strukturelle Wechselwirkungen einzelner KdpD Domänen mit dem KdpD Wildtypprotein und dem Antwortregulator KdpE ziehen zu können. Dabei zeigte sich eine funktionelle Interaktion von KdpE nur im Falle der Fusionsproteine KdpE25/NTD18. Diese Beobachtung erweist sich als interessant, berücksichtigt man frühere Studien zur N-terminalen Domäne der Sensorkinase. Heermann *et al.* (2003) konnten *in vivo* zeigen, dass die N-terminale Domäne von KdpD eine semikonstitutive *kdpFABC*-Expression verursacht. Dieses Phänomen trat jedoch nur in Anwesenheit des Antwortregulators KdpE mit intakter Phosphorylierungsstelle auf, wobei jedoch auch gezeigt wurde, dass die N-terminale Domäne allein nicht in der Lage war KdpE zu phosphorylieren. KdpE scheint hier *in vivo* auf eine andere Art und Weise phosphoryliert zu werden. Schließlich wurden zwei mögliche Modelle zur Interaktion der N-terminalen Domäne von KdpD mit KdpE aufgestellt. Das erste Modell besagt, dass die Interaktion zu einer Stabilisierung von phosphoryliertem KdpE führt, während das zweite Modell eine Stabilisierung der Bindung von KdpE~P an die DNA durch die N-terminale Domäne

diskutiert (Heermann *et al.*, 2003). Eine Wechselwirkung zwischen der N-terminalen Domäne von KdpD und dem Antwortregulator KdpE konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Eine Interaktion mit der CTD inklusive den Transmembrandomänen (=TMC) von KdpD mit KdpE konnte überraschenderweise nicht nachgewiesen werden, obwohl es sich hierbei um die Transmitterdomäne handelt, die außerdem die Phosphorylierungsstelle enthält. Scheinbar ist auch hier die Anwesenheit der NTD der Sensor kinase notwendig, um das Protein eventuell richtig zu positionieren bzw. zu stabilisieren. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die TMC von KdpD phosphoryliert vorliegen muss, um mit KdpE interagieren zu können, was unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht der Fall war.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten in allen getesteten Plasmidkombinationen bezüglich des Wildtyp KdpD und der Domänen NTD und TMC β -Galaktosidase-Aktivitäten im Bereich von 50-100% Miller Units ermittelt werden, die demzufolge auf Interaktionen zwischen dem Wildtyp KdpD mit den jeweiligen Domänen hinweisen. Die strukturellen Homologien der Domänen des Proteins scheinen auszureichen, um mit KdpD zu dimerisieren. Lediglich die Plasmidkombination KdpD18/TMC25 zeigt nur eine schwache Interaktion, was jedoch im Einklang mit den bereits oben diskutierten Ergebnissen der Plasmidkombination KdpD18/KdpD25 steht. Heermann *et al.* (2000) konnten außerdem zeigen, dass die N-terminale Domäne die membranverankerte C-terminale Domäne von KdpD komplementiert. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden.

Desweiteren wurden Interaktionen zwischen KdpD-Derivaten mit Teildeletionen bzw. einer Punktmutation und dem Wildtyp KdpD Protein getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass in allen Fällen Interaktionen zwischen den Proteinen auftreten, was darauf hinweist, dass trotz kleinerer Teildeletionen, die daraus möglicherweise resultierenden Konformationsänderungen nicht die Dimerisierung der Sensor kinase beeinflussen. Die Homologiebereiche der interagierenden Proteine scheinen auszureichen um die fusionierten T18 und T25 Fragmente in enge Nachbarschaft miteinander zu bringen. Im Einklang mit den detektierten Interaktionen sind die Ergebnisse der Transdominanzstudien dieser Mutanten bezüglich des KdpD Wildtypproteins von Andreeßen (2007). Hierbei zeigten die Mutanten KdpD Δ Arg1 und KdpD Δ Arg2 einen rezessiven Phänotyp gegenüber dem WT-Protein. Die Mutanten allein konnten ein Fehlen des WT KdpD nicht komplementieren, werden sie jedoch in der Zelle neben dem WT KdpD synthetisiert, ordnet sich der inaktive Phänotyp dieser Mutanten dem aktiven Phänotyp des WT KdpD unter und das aus dem WT-Protein und dem

Mutantenprotein zusammengesetzte KdpD Dimer zeigt einen Phänotyp vergleichbar mit dem WT-Protein. Der Transdominanztest mit der Mutante KdpD Δ TM1-4 zeigte, dass sich diese Mutante dominant gegenüber dem WT verhält. Da diese KdpD Mutation zu einem semi-konstitutiven Phänotyp führt, scheint diese Mutante auf jeden Fall aktiv zu sein und der veränderte Phänotyp eher mit einer deregulierten Phosphatase-Aktivität zusammenzuhängen.

4.2 Die Interaktion der Sensorkinase KdpD mit der KdpB Untereinheit des KdpFABC-Komplexes

Mittels des "Bacterial Two Hybrid" Systems wurden weiterhin mögliche Interaktionen der Sensorkinase KdpD mit den verschiedenen Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes getestet. Hierbei zeigte sich nur im Fall von KdpB eine Interaktion, welche in hohen β -Galaktosidase-Aktivitäten (Proteinkombination KdpD25/KdpB18) resultierte. Um eine Interaktion dieser beiden Proteine in Betracht zu ziehen, sollte zunächst die Funktion von KdpB näher erläutert werden. KdpB stellt die katalytische Untereinheit des KdpFABC-Systems dar und umfasst die vier allgemeinen funktionellen und strukturellen Domänen von P-Typ ATPasen (Greie & Altendorf, 2007). Dazu gehören die Transmembrandomäne (TM-Domäne) mit sieben Transmembranhelices (Bramkamp & Altendorf, 2004), welche die Hydrolyse von ATP mit dem Ionentransport koppelt und die Phosphorylierungsdomäne (P-Domäne) mit dem konservierten DKTGT Motif (Axelsen & Palmgreen, 1998). Dieses Motif enthält den Aspartatrest D307, welcher durch die γ -Phosphorylgruppe von ATP reversibel phosphoryliert wird. Die Phosphorylierungsdomäne ist strukturell mit der Transmembrandomäne verbunden, wobei die fünfte Transmembranhelix in die Phosphorylierungsdomäne hineinragt und knapp unter der Phosphorylierungsstelle endet. Desweiteren findet man die Attenuator-domäne (A-Domäne), welche durch kurze Linkersequenzen an die Transmembrandomäne gekoppelt ist und ebenfalls ein konserviertes Motif trägt, welches einen Einfluss auf die Dephosphorylierung des E2~P Zustands von P-Typ ATPasen hat. In der Nukleotidbindedomäne (N-Domäne) von KdpB (KdpBN) liegt das Nukleotid in einer Bindetasche so orientiert vor, dass das γ -Phosphat aus der Tasche herausragt und somit zum konservierten Aspartatrest der Phosphorylierungsdomäne gerichtet ist. Einen Einfluss auf die korrekte Orientierung scheint hier außerdem die Untereinheit KdpC auszuüben. Als katalytisches Chaperon bindet es das ATP an der Ribose und sorgt so für die richtige Positionierung des ATP innerhalb der Bindetasche (Greie & Altendorf, 2007).

Die verschiedenen Funktionen der einzelnen KdpB Domänen und die zum größten Teil cytoplasmatische Lokalisation dieser Domänen könnte Ansatzpunkt für eine Interaktion mit KdpD sein. Eine erste Aussage zur Art und Weise einer möglichen Interaktion liefern die Plasmidkombinationen. Nur die Proben mit der Proteinkombination KdpD25/ KdpB18 zeigen hohe β -Galaktosidase-Aktivitäten, was bedeuten könnte, dass nur der C-Terminus von KdpD mit dem N-Terminus von KdpB interagiert. Ist das T18 Fragment mit dem N-Terminus der Sensorkinase fusioniert, nehmen die β -Galaktosidase-Aktivitäten der Proben mit der entsprechenden Proteinkombination KdpD18/KdpB25 auf ~15% Aktivität in Miller Units ab. Dies schließt eine mögliche Interaktion über den N-Terminus jedoch nicht aus, die N-terminale Domäne von KdpD muss eventuell im nativen Zustand vorliegen, um mit KdpB interagieren zu können. Da nur die N-terminale Domäne von KdpB zum Cytoplasma gewandt vorliegt, scheidet hier der C-Terminus als Interaktionspartner für KdpD automatisch aus. Um nun nähere Aussagen bezüglich der möglichen Interaktionsstelle treffen zu können, wurden weitere Proteinkombinationen getestet. Hierfür wurden das Plasmid pKdpB18 und Derivate des pKdpD25 Plasmides getestet, welche zum einen für einzelne Domänen der Sensorkinase (NTD25 bzw. TMC25) oder aber für Deletionen in KdpD (KdpD Δ TM1-4, KdpD Δ Arg1/2) sowie für die Punktmutante KdpD E509K kodieren. Bei der Verwendung der Proteinkombinationen KdpB18/NTD25 und KdpB18/TMC25 konnten hohe β -Galaktosidase-Aktivitäten im Bereich von ca. 40% Miller Units nur bei KdpB18/NTD25 ermittelt werden, was somit einen Hinweis liefern könnte, dass die N-terminale Domäne von KdpD wichtig für eine Interaktion mit KdpB18 ist. Die Transmembrandomänen und die C-terminale Domäne (TMC) von KdpD scheinen für eine Interaktion mit KdpB also nicht auszureichen. Betrachtet man das Ergebnis des β -Galaktosidasetests bezüglich der Plasmidkombination KdpD E509K 25 und KdpB18, zeigte sich, dass die Punktmutation scheinbar keinen negativen Einfluss auf die Interaktion hat, da die β -Galaktosidase-Aktivität verglichen mit Proteinkombination KdpD25/KdpB18 identisch ist (60%). Bei den Proteinkombinationen von KdpB18 und den KdpD-Teildeletionen konnten hingegen nur niedrige β -Galaktosidase-Aktivitäten (10-20%) detektiert werden, weshalb den Transmembrandomänen und dem Arginincluster für die Interaktion mit KdpB neben der N-terminalen Domäne eine Bedeutung zugeschrieben werden könnte.

Hinweise auf Interaktionen zwischen Sensorkinasen und Proteintransportern wurden auch schon in anderen Systemen untersucht und diskutiert (Tetsch & Jung, 2009). Ein Beispiel ist

der hoch affine Phosphattransporter PstSCAB₂, welcher in *E. coli* unter Phosphat limitierenden Bedingungen als primärer P_i-Transporter fungiert und unter anderem über das periphere Membranprotein PhoU mit dem Zweikomponentensystem PhoR/PhoB interagiert (Steed & Wanner, 1993; Wanner, 1996). Bei Phosphatlimitation im Medium aktiviert das Zweikomponentensystem die Expression des *pho*-Regulons, bestehend aus den Genen, die nicht nur für das Zweikomponentensystem kodieren, sondern auch für den Phosphattransporter PstSCAB₂ und die alkalische Phosphatase. Bei ausreichender Phosphatkonzentration im Medium wird die Phosphatase-Aktivität von PhoR durch den Transporter PstSCAB₂ aktiviert, was in der Dephosphorylierung des Antwortregulators und somit der Repression des *pho*-Regulons resultiert (Carmany *et al.*, 2003). Wie genau die Interaktion zwischen dem Transporter und der Sensorkinase des Systems verläuft ist noch unbekannt. Ein weiteres Beispiel liefert das Zweikomponentensystem DcuS/DcuR und der Fumarat/Succinat Antiporter DcuB. Die Deletion des *dcuB* Gens führte zu einer konstitutiven Expression der *dcuS* und *dcuR* Gene, sowie weiterer Gene, die wiederum unter Kontrolle des Antwortregulators stehen, was darauf hinweist, dass das Zweikomponentensystem durch den Antiporter reguliert werden könnte. Nach weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Aminosäuren im C-terminalen Teil des Antiporters wichtig für die Regulation der Sensorkinase sind (Kleefeld *et al.*, 2009). Der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen der Sensorkinase und dem Antiporter ist auch hier noch unklar. Nichtsdestotrotz wird auch in diesem Falle ein "Fine-tuning" bezüglich der Sensitivität des Zweikomponentensystems durch den Antiporter diskutiert. Während die Sensorkinase die C₄-Dicarboxylat Konzentration im Periplasma detektiert, könnte der Antiporter eher den metabolischen C₄-Dicarboxylat Fluss durch die Membran detektieren, wobei beide Signale schließlich auf dem Level der Transkription miteinander integriert werden (Kleefeld *et al.*, 2009).

Somit könnte sich auch ein Modell für die Interaktion der Sensorkinase KdpD mit der KdpB-Untereinheit des KdpFABC-Komplexes aufstellen lassen (Abb.4.1). Die Sensorkinase autophosphoryliert und überträgt den Phosphatrest auf den Antwortregulator. Im dimerisierten und phosphorylierten Zustand weist KdpE eine hohe Affinität für eine DNA-Sequenz stromaufwärts des *kdpFABC*-Promotors auf und initiiert so die Transkription des *kdpFABC*-Operons. Steigt die Kaliumkonzentration im Medium wieder an beziehungsweise nimmt die Konzentration an K⁺-Ionen im Cytoplasma der Zelle zu, könnte dies von KdpB oder einer anderen Untereinheit des KdpFABC-Komplexes detektiert und durch eine Interaktion der N-

terminalen Domäne von KdpB mit der N-terminalen Domäne von KdpD über die Transmembrandomänen und dem sich anschliessenden Arginincluster weitergeleitet werden. Das Ergebnis könnte ein Wechsel von der Kinase- zur Phosphatase-Aktivität des Proteins sein. Bisher ist dazu bekannt, dass es sich hierbei um einen durch Konformationsänderungen des Proteins verursachten elektrostatischen Wechselmechanismus handelt (Jung & Altendorf, 1998a). Die Analyse fünf verschiedener konstitutiver KdpD-Mutanten von Brandon *et al.* (2000) zeigte, dass während die Kinase-Aktivität unverändert war, bei zwei dieser Mutanten die Phosphatase-Aktivität reduziert vorlag und bei drei dieser Mutanten eine Aktivität der Phosphatase nicht detektiert werden konnte. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Initiation der Signaltransduktion durch KdpD durch eine Inhibierung der Phospho-KdpE spezifischen Phosphatase-Aktivität von KdpD vermittelt wird, was dazu führt, dass sich Phospho-KdpE anhäuft und so die Expression des KdpFABC-Systems aktiviert.

Die Ansammlung positiv geladener Argininreste, die für die Interaktion der Sensorkinase mit KdpB als wichtig erscheinen, da Deletionen dieses Bereiches von KdpD die Interaktion mit KdpB verhindern, könnten ebenso für den Wechsel von Kinase- und Phosphatase-Aktivität von Bedeutung sein (Jung & Altendorf, 1998a). KdpD Proteine mit einer Deletion im Arginincluster zeichnen sich durch einen inaktiven Phänotyp aus, welcher die *kdpFABC* Gene nicht mehr induziert (Andreeßen, 2007). Ist das Arginincluster essentiell für die Regulation der Kinase- und Phosphatase-Aktivität, wäre es verständlich, dass das Protein keinen aktiven Phänotyp mehr aufzeigt, da bei Deletion des Argininclusters nun weder die elektrostatischen Voraussetzungen für die Kinase- noch für die Phosphatase-Aktivität des Proteins gegeben wären. Auch die Transmembrandomänen von KdpD scheinen nach Ergebnissen mit dem "BTHS" für die Interaktion von KdpB wichtig zu sein, was ein weiterer Hinweis dafür sein könnte, dass es sich bei der Interaktion um eine Regulation der Kinase- und Phosphataseaktivität handelt. Die Deletion der vier Transmembranhelices führt zu einem konstitutiven KdpD Phänotyp *in vivo* mit Kinase-Aktivität *in vitro* (Jung *et al.*, 1998; Heermann *et al.*, 2003b; Zimmann *et al.*, 2007). Der konstitutive Phänotyp ließe sich mit einer denkbaren Interaktion zwischen der N- und C-terminalen Domäne von KdpD erklären, die Transmembranhelices scheinen allerdings für die korrekte Positionierung des Proteins in der Membran verantwortlich zu sein (Heermann *et al.*, 2003b). Ist diese Positionierung nicht mehr gegeben, könnte es möglich sein, dass auch das Arginincluster nicht mehr an der korrekten Stelle liegt, und so der Wechsel zwischen der Kinase- und Phosphatase-Aktivität

nicht mehr gewährleistet ist, was in einer ständigen Kinase-Aktivität des Proteins resultieren könnte.

Befinden sich die Zellen in einem Medium ausreichender K^+ -Konzentration könnte sich die Sensorkinase stets im Phosphatasemodus befinden, was bedeuten würde, dass KdpB solange mit KdpD interagiert. Ändern sich die Wachstumsbedingungen der Zelle aufgrund von K^+ -Limitation könnte auch dies durch einen unbekanntem Mechanismus detektiert werden, resultierend in einer Konformationsänderung von KdpB und der Freigabe von KdpD. Voraussetzung für dieses Modell ist ein niedriges Grundniveau der Proteine des KdpFABC-Komplexes. Erste Hinweise auf ein solches Grundniveau liefern Proteomanalysen von Hammer *et al.* (Zimmann, persönliche Mitteilung).

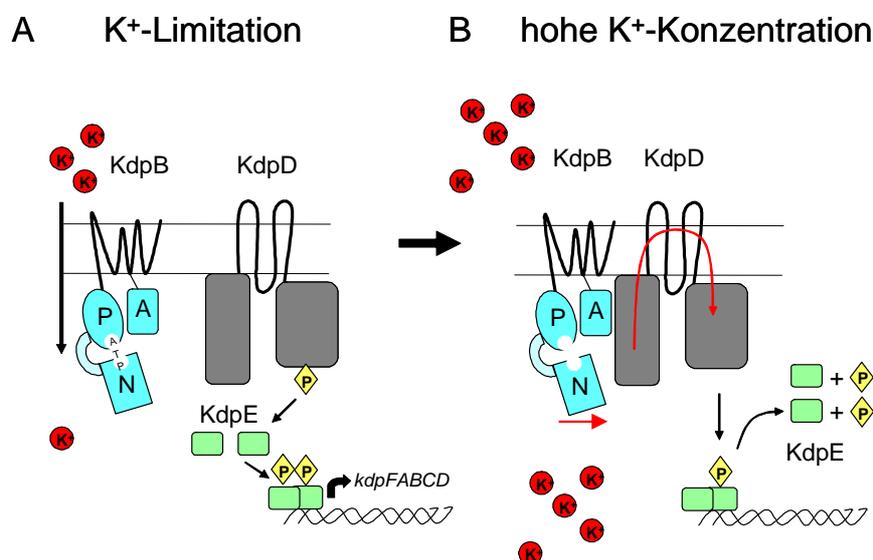


Abb. 4.1 Schematische Darstellung des Modells für die mögliche Interaktion von KdpD mit KdpB.

A) Unter K^+ limitierenden Bedingungen findet die Autophosphorylierung von KdpD statt. Der Phosphatrest wird auf KdpE übertragen, welches nun dimerisiert und durch Bindung an die DNA stromaufwärts des *kdpFABC*-Promotors, die *kdpFABC*-Transkription induziert. Eine Interaktion zwischen KdpB und KdpD findet unter diesen Bedingungen nicht statt.

B) Steigt die K^+ Konzentration im Medium oder im Cytoplasma an, könnte dies vom KdpFABC-Komplex durch einen noch nicht bekannten Mechanismus detektiert werden. Ein Konformationswechsel von KdpB könnte nun dazu führen, dass die N-terminale Domäne von KdpB mit der N-terminalen Domäne von KdpD wechselwirkt und dieses Signal über die Transmembrandomänen zum Arginin-Cluster weitergeleitet wird. Das Resultat dieser Interaktion könnte eine Konformationsänderung von KdpD sein, die mit einem elektrostatischen Wechselmechanismus von der Kinase- zur Phosphatase-Aktivität des Proteins verbunden ist. Somit würde der Antwortregulator dephosphoryliert werden und von der DNA dissoziieren. Die Transkription der *kdpFABC* Gene findet schließlich nicht mehr statt.

4.3 Die Interaktion der Sensorkinase KdpD mit der Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase PlsB

Auf der Suche nach dem Reiz, der von KdpD detektiert wird, beschäftigten sich Hamann *et al.* (2008) mit einem möglichen Zusammenhang von Turgoränderungen und der *kdp*-Expression mit dem Ergebnis, dass unter Kalium limitierenden Bedingungen Turgor nicht der Reiz zu sein scheint. Hierzu wurden cytoplasmatische Volumenmessungen unter den Bedingungen Kaliumlimitation und erhöhte Osmolarität durchgeführt und festgestellt, dass ein Schrumpfen des Cytoplasmas wie bei osmotisch gestressten Zellen, unter Kaliumlimitation nicht zu beobachten ist, wobei die *kdpFABC*-Expression aber maximal vorlag. Bei dem Reiz der erhöhten Osmolarität konnte hingegen eine Reduktion des cytoplasmatischen Volumens der Zelle beobachtet werden, die *kdpFABC*-Expression lag aber diesmal nur moderat und transient vor. Größere Änderungen des cytoplasmatischen Volumens wurden auch durch eine Erhöhung der Osmolarität mittels 0.4M KCl erreicht, mit dem Ergebnis einer nichtinduzierten *kdpFABC*-Expression, was schließlich gegen die Theorie sprach, dass Änderungen des Zellurgors der Reiz für die Sensorkinase sein könnte. Auf dieser Grundlage diskutierte Hamann (2008), dass der Reiz, den die Sensorkinase wahrnimmt, von Prozessen abhängig ist, die mit der Zellelongation während des Wachstums verbunden sind. Es könnte also sein, dass KdpD Vorgänge detektiert, die bei ausreichender Kaliumkonzentration in der Zelle kontinuierlich ablaufen, wie z.B. der Einbau von Phospholipiden in die Cytoplasmamembran bei stetigem Turgordruck. Die Wahrnehmung eines solch konstanten Prozesses würde die Sensorkinase in einem "Off" Status halten, während eine Unterbrechung dieses Prozesses KdpD anschalten würde. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Bedeutung, dass die *kdpFABC*-Expression im Falle einer erhöhten Osmolarität im Medium transient ist und unter Kaliumlimitation nach Zugabe kleiner Mengen Kalium zum Medium abgeschaltet wird. Dies könnte bedeuten, dass so lange die Zelle in der Lage ist sich stetig zu vergrößern, die *kdpFABC*-Expression uninduziert bleibt. Nach einem osmotischen "Upshift" könnten die Zellen zunächst weniger eine Reduktion des Turgors erfahren, sondern eher eine Zeitperiode wahrnehmen, in der der Turgordruck nicht stetig ansteigt. Sobald der Turgordruck wieder etwas über dem Niveau wie vor dem "Upshift" liegt, nimmt das Niveau der *kdpFABC*-Expression ab, was durch RT-PCR Daten gezeigt werden konnte. Hamann (2008) konnte zusätzlich die Beobachtung machen,

dass bei stationären Zellen unter K^+ -Limitation keine Zellvergrößerung mehr stattfinden, wie es bei stationären Zellen in Medium mit ausreichender K^+ -Konzentration der Fall war.

Zu diesen Beobachtungen ist nun ein Modell erforderlich, das erklärt, wie KdpD die permanente Insertion von Phospholipiden in die Cytoplasmamembran detektiert. Aufgrund dieser Theorie sind die Lipidbiosyntheseenzyme PlsB und PssA von Bedeutung (Abb.4.2).

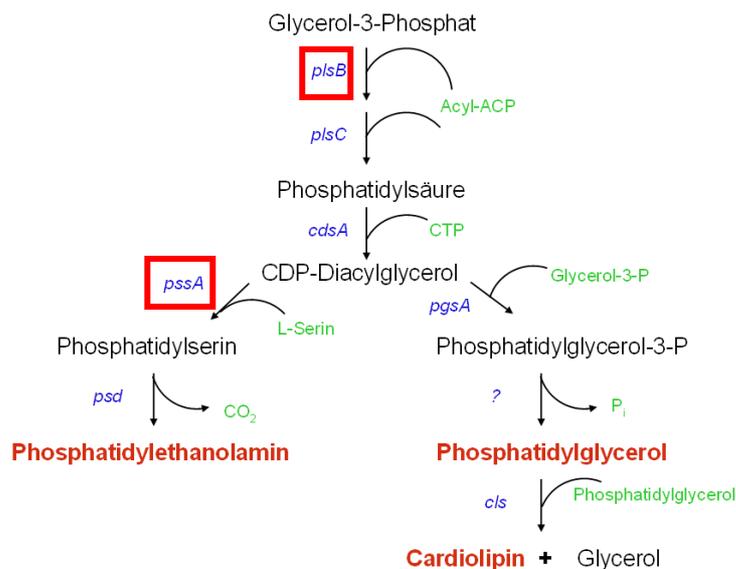


Abb. 4.2: Biosyntheseweg der Phospholipide von *E. coli* (verändert nach Cronan, 2003). Der Phospholipidgehalt in *E. coli* setzt sich aus den drei Phospholipiden Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Cardiolipin zusammen, deren Synthese aus dem Vorstufenmolekül CDP-Diacylglycerol stattfindet. Die Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase PlsB katalysiert neben PlsC den ersten Schritt des Biosynthesewegs, wo über das Zwischenprodukt Phosphatidylsäure schließlich das Vorläufermolekül gebildet wird. PlsB überträgt eine Acylgruppe auf Glycerolphosphat, 1-Acylglycerolphosphat wird dann durch PlsC erneut acyliert. Die Acyl-ACP Endprodukte der Fettsäuresynthese bilden hier die primären Acyldonore. Somit wird auf dieser Stufe der Phospholipidsynthese, diese mit der Fettsäuresynthese koordiniert. Die Phosphatidylserin-Synthase PssA katalysiert den ersten Schritt in der Umwandlung des CDP-Diacylglycerols zu Phosphatidylethanolamin, was final einen Anteil von 75% des Gesamtlipidgehaltes in *E. coli* ausmacht.

Wie das Schema des Biosyntheseweges der Phospholipide in Abbildung 4.2 zeigt, nehmen die Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (PlsB) und die Phosphatidylserin-Synthase (PssA) bedeutsame Stellungen im Syntheseweg der Phospholipide ein und könnten somit als Interaktionspartner der Sensor kinase KdpD zur Detektion der Phospholipidinsertion in die Membran in Frage kommen. Während PlsB den ersten Schritt zur Bildung des

Vorläufermoleküls aller Phospholipide katalysiert, ist PssA an der Umwandlung des Vorläufermoleküls CDP-Diacylglycerol zu dem Hauptphospholipid der *E.coli* Membranen Phosphatidylethanolamin beteiligt. Es wurde nun von Hamann (2008) das Modell zur Reizwahrnehmung aufgestellt, dass diese Enzyme im aktiven Zustand mit KdpD interagieren und in einem "Off" Status halten. Tritt der Fall auf, dass der Turgor konstant bleibt und die Zellmembran somit nicht vergrößert werden muss, könnte sich die Aktivität dieser Enzyme ändern bzw. reduzieren, was wiederum einen Einfluss auf die Sensorkinase KdpD haben könnte. KdpD könnte diese Veränderung wahrnehmen und in einen "On" Status übergehen. Somit würde die *kdpFABC*-Expression induziert werden und Kalium in die Zelle gelangen. Die Aufnahme von Kaliumionen in die Zelle wäre mit einer Erhöhung des Turgors verbunden, was zur Folge hat, dass die Zelle dazu tendiert sich auszudehnen. Mittels Einbau von Phospholipiden in die Membran würde diese Zellerweiterung stattfinden können. Durch die nun wieder aktivierten Proteine PlsB und PssA würde die Sensorkinase letztlich wieder in den "Off" Status zurückkehren. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine mögliche Interaktion der Sensorkinase mit PlsB und PssA mittels des "BTH" Systems getestet. Tatsächlich konnte im Falle von PlsB eine Interaktion mit KdpD festgestellt werden. *E. coli* Zellen transformiert mit der Plasmidkombination pKdpD25/pPlsB18 zeigten β -Galaktosidase-Aktivitäten von ca. 80% Miller Units. Ferner zeigten die Plasmidkombinationen der KdpD Teildeletionen bzw. der Punktmutante mit PlsB18 Aktivitäten im Bereich von 30-60% Miller Units. Die Interaktion zwischen der Sensorkinase und der Acyltransferase scheint somit unabhängig von der Anwesenheit der Transmembrandomänen bzw. des Argininclusters von KdpD zu sein. Interessant ist das Ergebnis des β -Galaktosidasetests bei denen *E. coli* Zellen mit den Proteinkombinationen der einzelnen Domänen von KdpD und PlsB18 getestet wurden. Hier zeigt sich, dass für eine Interaktion die N-terminale Domäne von KdpD ausreicht, um mit dem PlsB Protein zu interagieren. Bei Verwendung der Proteinkombination der C-terminalen Domäne und den Transmembrandurchgängen (TMC25) und PlsB18 konnte hingegen keinerlei Aktivität im β -Galaktosidasetest nachgewiesen werden. Desweiteren zeigten Proben mit der umgekehrten Plasmidkombination KdpD18/PlsB25 ebenfalls kaum Aktivität. Das fusionierte T18 Fragment am N-Terminus von KdpD könnte hier Wechselwirkungen mit PlsB stören, so dass es zu keiner Interaktion zwischen den beiden Proteinen kommen würde. Im PlsB18 Plasmid ist das T18 Fragment ebenfalls mit dem N-Terminus des Proteins fusioniert, wobei das T25 Fragment im Plasmid PlsB25 mit dem C-

Terminus des Proteins fusioniert ist. Es handelt sich bei PlsB um ein integrales Membranprotein mit zwei Transmembrandurchgängen und beide N- und C-terminalen Domänen liegen cytoplasmatisch vor (Gonzalez-Bato *et al.*, 2001; Pellon-Maison *et al.*, 2006). Aussagen zu Interaktionen störenden Fusionen lassen sich hier eher nicht treffen, da nur das PlsB Wildtypprotein getestet wurde und nicht einzelne Domänen oder Derivate des Proteins, was nähere Information dazu liefern könnten. So ergibt sich schließlich das Fazit, dass eine Interaktion der N-terminalen Domäne der Sensorkinase KdpD mit der Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase PlsB tatsächlich stattfinden könnte. Ein Modell der Reizwahrnehmung von KdpD über die Detektion der Phospholipidinsertion in die Membran durch PlsB könnte somit durchaus in Frage kommen. Von Bedeutung wäre in diesem Falle auch die übergeordnete Regulation des PlsB Proteins, die damit einen indirekten Einfluß auf KdpD ausüben könnte. Guanosin-3`5`-Bispyrophosphat (ppGpp) ist ein globaler Regulator der Genexpression und RNA-Synthese (Magnusson *et al.*, 2005), welcher auch für die Regulation der PlsB Aktivität verantwortlich ist. Die PlsB Aktivität wird *in vivo* durch erhöhte ppGpp Mengen inhibiert, was in der Anhäufung von Acyl-ACP (siehe auch Abb.4.2) resultiert und mit dieser verbunden, eine Reduzierung der Fettsäuresynthese verursacht. Die Inhibierung des Fettsäure- und Phospholipidsynthese durch ppGpp kann durch eine Überexpression von PlsB aufgehoben werden (Heath *et al.*, 1994). Somit funktioniert die Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase als Koordinator der Bildung der Phospholipide mit der makromolekularen Biosynthese und dem Zellwachstum (Zhang & Rock, 2008). Der globale Regulator ppGpp wiederum setzt sich aus GTP und ATP zusammen, als Antwort auf Nährstoffmangel und Stress (Magnusson *et al.*, 2005). ppGpp bindet an die RNA-Polymerase und inhibiert die Transkription von Genen, die am Zellwachstum beteiligt sind und induziert die Transkription von Genen die für Stressresistenz und dem Überdauern während Nährstoffmangels wichtig sind. Somit könnte ein Modell zur Interaktion von KdpD und PlsB aufgestellt werden, in welchem sich diese beiden Proteine in einem ganzen Netzwerk von Proteinen befinden könnten, die sich gegenseitig unter verschiedenen Bedingungen beeinflussen und unter der globalen Kontrolle von ppGpp stehen.

4.4 Die Reinigung der Sensorkinase KdpD und das Oligomerisierungsverhalten des Proteins

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Sensorkinase KdpD biochemisch näher charakterisiert werden. Dazu sollte ein effizientes Reinigungsprotokoll entwickelt werden, welches die native Form der Sensorkinase erhält und im Optimalfall die Grundlage zu Kristallisationsexperimenten bildet.

Zu Beginn wurden verschiedene Expressionssysteme getestet, wie unter Punkt 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben. In diesem Zusammenhang konnte die Expression von *kdpD-10His* in *Lactococcus lactis* mit Hilfe des Nisin induzierbaren Genexpressionssystem NICE (Geertsma & Poolman, 2007; MoBiTec 2010) erfolgreich etabliert werden. Die Vorteile, die dieses System liefert sind bereits unter Punkt 3.2 beschrieben. Nach Präparation der Membranvesikel konnte KdpD-10His mittels der Detergenzien Decylmaltopyranosid oder Dodecylmalto-pyranosid weiterhin gut aus der Membran von *L. lactis* solubilisiert werden. Da sich in den darauffolgenden Schritten allerdings herausstellte, dass KdpD-10His aus *L. lactis* Zellen das gleiche Verhalten während der Reinigung zeigte, wie KdpD-6His aus *E. coli* und sich die Anzucht von *E. coli* Zellen unter aeroben Bedingungen im großen Maßstab als praktischer und effizienter erwies, wurde auf weitere vergleichende Reinigungsschritte mit KdpD-10His aus *L. lactis* verzichtet.

Die Solubilisierung von KdpD-6His mittels verschiedener Detergenzien einprozentiger Konzentration zeigte zunächst, dass sich das Protein gut aus der Membran herauslösen lässt. In früheren Versuchen resultierte die Solubilisierung der Sensorkinase entweder in einem inaktiven Protein (Nakashima *et al.*, 1993) oder KdpD-6His konnte unter Verwendung von Dodecylmaltopyranosid nur zu 50% aus der Membran solubilisiert werden und mit 2-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP markiert werden (Jung *et al.*, 1997). Da die Solubilisierung mittels der in Tabelle 3.2 zusammengefassten verschiedenen Detergenzien fast in jedem Fall sehr hoch lag und die Verwendung von Dodecylmaltopyranosid laut Jung *et al.* zumindest zu einer Markierung des Proteins mit 2-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP führte, wurde auch in dieser Arbeit Dodecylmaltopyranosid benutzt, um KdpD-6His aus der Membran zu lösen. In einem anschließenden Kinase-Aktivitätstest mit radioaktivem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP konnte die Autophosphorylierungsaktivität des membrangebundenen Proteins detektiert werden. Das Autoradiogramm in Abbildung 3.21 zeigte hier unter denaturierenden Bedingungen zum einen eine Bande auf Höhe von ca. 100kDa, die dem Monomer von KdpD-6His entspricht, zum anderen eine schwächere Bande

oberhalb der 170kDa Marke, welche der dimeren oder höher oligomeren Formen der Sensorkinase entsprechen könnte. Die Proben des Solubilisats zeigten im Autoradiogramm ebenfalls eine Bande oberhalb der 170kDa Marke, auf gleicher Höhe mit der schwächeren Bande der Membranvesikel-Probe. Die Detektion dieser Bande könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Autophosphorylierungsaktivität des solubilisierten Proteins noch vorhanden ist, jedoch in der dimeren oder höher oligomeren Form des Proteins und aufgrund der einzelnen schwachen Bande, nur in reduzierter Form.

Während der Reinigung von KdpD-6His zeigte sich desweiteren zunächst ein immer wiederkehrendes Laufverhalten des Proteins auf der Superdex 200 Säule, resultierend in einem Peak innerhalb des Ausschlussvolumens der Säule. Zusätzlich zeigte sich eine Verschiebung des Absorptionsspektrums der KdpD-6His enthaltenden Fraktionen in Richtung einer Wellenlänge von 260nm. Diese Beobachtungen könnten durch DNA-Verunreinigungen in den Proteinproben erklärt werden, obwohl während des Zellaufschlusses DNase zur Hydrolyse der DNA eingesetzt wurde. Nach Gelfiltration mit der Sephacryl S400 Säule konnte dieses Problem gelöst werden, indem dieses Säulenmaterial in der Lage war, die DNA von der Proteinlösung zu trennen. Wurden schließlich die DNA-freien Proteinfractionen erneut auf eine Superdex 200 Säule auftragen, zeigte sich ein kleiner Peak bei ca. 11ml (~440kDa) und ein Hauptpeak bei ca. 12ml (~200kDa). Das Ergebnis der SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen dieser Peaks sowie des nativen Gels dieser Proben liefert erneut Hinweise, dass es sich um verschiedene Oligomerisierungszustände der Sensorkinase handeln könnte. Da die über die Aminosäuresequenz kalkulierte molekulare Masse von KdpD bei 99.6kDa liegt, würde es sich bei den Banden der Probe des 11ml Peaks hauptsächlich um trimere und tetramere Formen des Proteins handeln, während es sich bei den Banden der Probe des Hauptpeaks um Dimere und Monomere von KdpD handeln würde. Es wurde bereits von Heermann *et al.* (1998) postuliert, dass es sich bei KdpD um ein Homodimer handelt. Diese Aussage basiert auf Bestimmungen der molekularen Masse des Proteins mittels Gelfiltration und Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation. Ergebnisse nativer Gele, die auch hier drei Banden zeigten, die für monomere, dimere und tetramere Formen von KdpD stehen würden, wurden hier mit der Tendenz des Proteins zu aggregieren erklärt. Diese Erklärung könnte auch in diesem Falle zutreffen und es würde sich bei den oligomeren Formen der Sensorkinase des 11ml Peaks hauptsächlich um unspezifische Proteinaggregate handeln. Im Allgemeinen wurde bisher von Sensorkinasen wie u.a. EnvZ, CheA, ArcB oder NtrB

angenommen, dass sie als Homodimere funktionieren (Dutta *et al.*, 1999; Surette *et al.*, (1996); Tanaka *et al.*, 1998; West & Stock, 2001). In den neuesten Studien zur Sensorkinase DcuS von Scheu *et al.*, (2010) aber konnten erstmals mittels FRET und Crosslinking Daten oligomere Formen von DcuS, darunter neben der dimeren, die tetramere Form des Proteins, in lebenden Zellen, bakteriellen Membranen und Proteoliposomen gezeigt werden. Diese Daten zeigen somit, dass es nicht auszuschliessen ist, dass es sich bei den tetrameren Formen der Sensorkinase KdpD um spezifische Oligomere handeln könnte und ähnliche Experimente genaueren Aufschluß dazu geben könnten. Das Autoradiogramm der KdpD-6His Proben der unterschiedlichen Reinigungsschritte (nach der Affinitätschromatographie, nach der Gelfiltration und nach der Rekonstitution) zeigte, dass die Autophosphorylierungsaktivität des Proteins scheinbar während des Reinigungsprozesses verloren gegangen ist. Zumindest lassen sich keine Banden detektieren, die vergleichbar wären mit der Positivkontrolle der Membranvesikel. Zwar könnten die Banden, die sich fast auf Höhe der Geltaschen befinden, hoch oligomere aktive Formen von KdpD-6His sein, jedoch ist diese Aussage höchst spekulativ. Es könnte sich auch um unspezifische Aggregate handeln, die nicht in das Gel eingelaufen sind und an denen sich das ATP schliesslich unspezifisch gebunden hat.

Neben dem KdpD-6His Protein traten während der Reinigung immer wieder zwei zusätzliche Banden in der SDS-PAGE auf, welche sich schließlich sogar nach Rekonstitution des gereinigten KdpD-6His in den Liposomen detektieren liessen. Massenspektrometrische Analysen dieser Banden ergaben, dass es sich dabei um die 75kDa große katalytische Untereinheit der Cytochrom bo(3) Ubiquinol Oxidase (CyoB) handelt, welche sich im SDS-Gel in zwei Domänen auftrennen könnte. Dieses integrale Membranprotein ist eine der zwei Quinoloxidasen der Atmungskette von *E. coli* und gehört zur Gruppe der Häm-Kupfer-Oxidasen (Trumpower & Gennis, 1994). Es katalysiert die terminale Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser durch die Übertragung von vier Elektronen aus Donorsubstraten und erzeugt damit die Protonenantriebskraft über der Membran (Kita *et al.*, 1982; Puustinen *et al.*, 1989 und 1991). Eine direkte Interaktion zwischen diesem Protein und der Sensorkinase KdpD konnte mittels des "Bacterial Two Hybrid" Systems nicht nachgewiesen werden, trotzdem könnte es sein, dass die Cytochrom bo(3) Ubiquinol Oxidase eine Bedeutung für ein mögliches oben diskutiertes Netzwerk an Proteinen rund um KdpD hat. Laut LC/MS (Liquid chromatography mass spectrometry) Studien und Computeranalysen konnte eine mögliche Wechselwirkung von CyoB und der Adenylatkinase Adk festgestellt werden (Hu *et al.*, 2009).

Die Adenylatkinase katalysiert die Übertragung des endständigen Phosphatrestes von ATP auf AMP, resultierend in zwei Molekülen ADP (Schulz *et al.*, 1986). Aufgrund ihrer Funktionen im Energiestoffwechsel wurde eine Interaktion der Adenylatkinase mit der Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (PlsB) schon früh diskutiert (Ray *et al.*, 1975) und Pulldown-Experimente von Arifuzzaman *et al.*, (2006) weisen außerdem auf eine mögliche Interaktion zwischen der Adenylatkinase und KdpB hin. Diese Möglichkeiten der Protein-Interaktionen lassen somit Spekulationen auf einen möglichen Multiproteinkomplex aus Proteinen der Atmungskette, der Phospholipidsynthese und des Kdp-Systems zu (Abb.4.3).

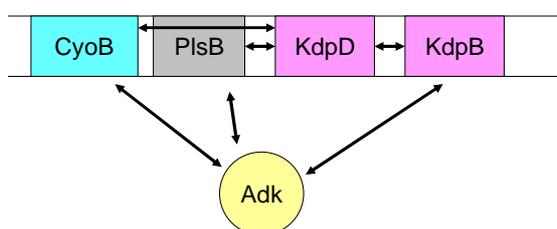


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Proteininteraktionen rund um KdpD.

4.5 Die Interaktion der Sensorkinase KdpD mit Nukleotiden

Die Transmitter Domäne des KdpD Proteins weist die charakteristischen Sequenzmotive „H“, „N“, „G“, „F“ und „G2“ auf, die in allen Histidinkinasen konserviert vorliegen (Parkinson & Kofoed, 1992) (Abb. 4.4). Das H-Motif enthält dabei die Phosphorylierungsstelle mit dem hoch konservierten Histidinrest H673 und befindet sich in der DHp Domäne, während in der katalytischen ATP-Bindedomäne (CA-Domäne), die übrigen Sequenzmotive lokalisiert sind. Histidinkinasen werden in zwei Unterklassen eingeteilt. Bei Klasse I Histidinkinasen wie EnvZ befindet sich das H-Motif in einer Domäne, direkt am N-Terminus der N, G1, F und G2 Motive. Im Falle von Klasse II Histidinkinasen wie zB. CheA liegt die H-Box in einer Domäne, die von den anderen Sequenzmotiven separiert vorliegt. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der Transmitterdomäne von KdpD mit EnvZ (Abb.4.4a), kann man KdpD zu den Klasse I Histidinkinasen zählen. Da außerdem die NMR-Struktur der Kinasedomäne von EnvZ mit gebundenem ATP-Analog AMP-PNP gelöst wurde (Tanaka *et al.*, 1998), lässt sich mit Hilfe dieser Struktur auch die Struktur der ATP-Bindedomäne von KdpD darstellen (Abb.4.4b). Die Domäne zeichnet sich durch eine α/β -Sandwich Faltung aus, wobei die ATP-Bindecavität durch die konservierten Reste der N-, G1-, F- und G2-Motive gebildet wird. Zwischen dem F- und G2-Motiven befindet sich eine flexible Sequenzregion, die auch als

ATP-Deckel bezeichnet wird. Diese Sequenz kann verschiedene Konformationen durch die Bindung von Nukleotiden in der Bindecavität einnehmen. In Strukturen von PhoQ und CheA (Bilwes *et al.*, 2001; Marina *et al.*, 2001) jeweils inklusive gebundenen ATP-Analogen, konnte eine relativ geordnete Konformation des ATP-Deckels festgestellt werden, die das Nukleotid verdeckt, während es im Nukleotid-freien Zustand frei beweglich bleibt (Bilwes *et al.*, 1999). Es wird daher diskutiert, dass Konformationsänderungen des ATP-Deckels die Bindung von ATP mit Wechselwirkungen von Proteindomänen oder regulatorischen Protein-Protein Interaktionen koppeln (Gao & Stock, 2009).

Die Struktur der DHp-Domäne von EnvZ besteht aus einem Paar aus zwei antiparallelen Helices und bildet so ein Vier-Helix-Bündel. Dabei befindet sich die konservierte H-Box in der Mitte der exponierten Oberfläche der ersten Helix (Tomomori *et al.*, 1999).

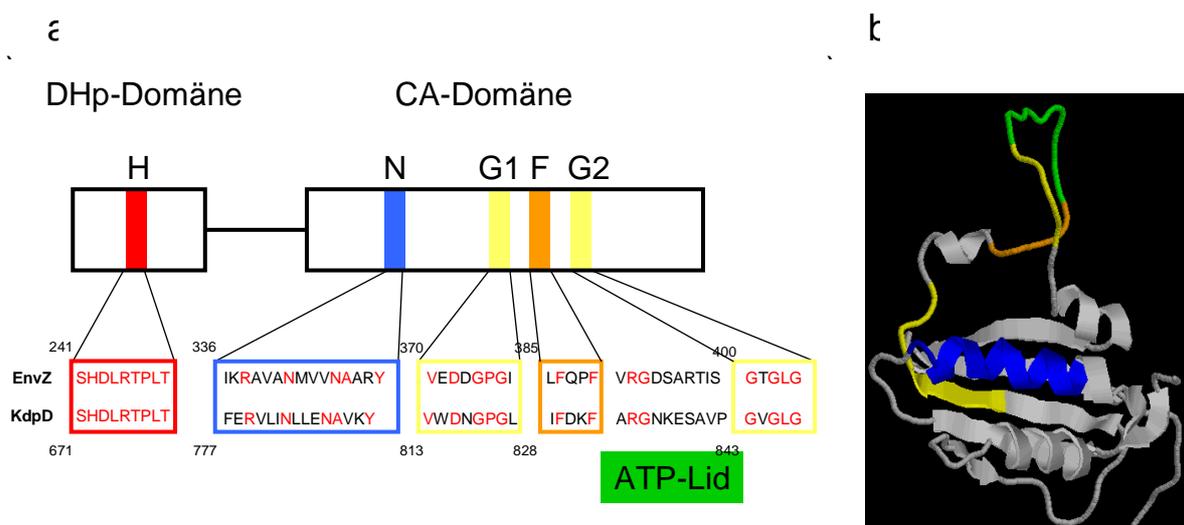


Abb.4.4: Primär- und Tertiärstruktur der Nukleotidbindetasche von KdpD im Vergleich mit EnvZ (verändert nach Plesniak *et al.*, 1998). a) Sequenzalignment der verschiedenen Motive innerhalb der DHp- und CA-Domänen von EnvZ und KdpD. Homologe Aminosäuren sind in rot dargestellt. Die Zahlen stellen die Positionen innerhalb der Aminosäuresequenzen von EnvZ bzw. KdpD da. b) Mit Hilfe des Computerprogrammes SWISS-PROT wurde die Struktur der CA-Domäne von KdpD durch Vergleich mit der bereits gelösten Struktur der ATP-Bindedomäne modelliert. Die farbigen Bereiche innerhalb der Struktur entsprechen den Farben der in A) dargestellten Sequenzmotive.

Die Bindeaffinitäten des gereinigten KdpD Proteins zu verschiedenen Nukleotiden und dem Nukleotid-Analogen TNP-ATP wurden in dieser Arbeit analysiert. Dabei stellte sich heraus,

dass ATP und ADP in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen von dem gereinigten KdpD-6His Protein mit hoher Affinität gebunden werden. Die K_D -Werte befinden sich im Bereich von 150-200nM. Die Affinität zum ATP-Analogon TNP-ATP in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen ist dagegen im Vergleich schwächer und zeichnet sich durch einen K_D -Wert von 4 μ M aus. Mit Hilfe der Verdrängungstitrationen mit ATP, TNP-ATP und gereinigtem Protein konnte desweiteren gezeigt werden, dass es sich in beiden Fällen um die gleiche Bindestelle handelt. Diese Beobachtungen konnten auch bei ähnlichen Versuchen mit den Sensorkinasen EnvZ (Plesniak *et al.*, 2002) und CheA (Stewart *et al.*, 1998) gemacht werden.

Durch die Modellierung der CA-Domäne von KdpD sowie durch Vergleich mit ATP-Bindungen innerhalb von ATP-Bindetaschen anderer Proteine und EnvZ (Tanaka *et al.*, 1998; Lansky *et al.*, 2004; Trajtenberg *et al.*, 2010) ist es möglich, eine Vorstellung davon zu bekommen, wie ATP, ADP oder TNP-ATP in der Bindetasche vorliegen könnten. In Abbildung 4.5 wurden durch Sequenzvergleich mit EnvZ zusätzlich konservierte Aminosäuren in dem Molekülmodell von KdpD markiert, die wichtig für die Bindung von Nukleotiden wie ATP oder auch ADP sein könnten. Der Adeninring könnte mit dem Aspartat 816 des G1-Motives wechselwirken, wobei dieser tief in der Bindetasche liegen würde. Wechselwirkungen könnten in dem Fall zB durch Wasserstoffbrückenbindungen zustande kommen. Die Aminosäuren des G1- β -Stranges inklusive diesem Aspartat und den konservierten Aminosäuren Glutaminsäure 784 und 788 würden so den Boden der Bindetasche ausmachen, während die α -Helix des N-Motives mit ihren konservierten Aminosäuren (wie zB. Arginin 780), die mit dem ATP interagieren könnten, eine Seitenwand der Bindetasche bilden würde. Eine weitere Wechselwirkung des Adeninringes wäre mit Phenylalanin 830 des F-Motives möglich. Das ATP könnte über den Adeninring mit Asp816 auf der einen Seite und Phe830 auf der anderen Seite wechselwirken und so positioniert werden, dass die Phosphatgruppen nach außen zum ATP-Deckel ragen. Der ATP-Deckel enthält ebenfalls konservierte Aminosäuren, darunter ein positiv geladenes Arginin, welches nun mit den Phosphatgruppen des ATP interagieren könnte.

Die für ATP (oder auch ADP) beschriebene mögliche Bindung mittels der erwähnten konservierten Aminosäuren der einzelnen Sequenzmotive würde wahrscheinlich auf TNP-ATP nicht zutreffen. Die zusätzlichen Trinitrophenylgruppen am ATP würden vermutlich dazu führen, dass das Nukleotidanalogen aufgrund seiner Größe nicht die gleichen Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatischen Anziehungskräfte eingehen könnte. Es

ist vielleicht möglich, dass das Molekül somit weiter aus der Bindetasche herausragt, was dazu führen könnte, dass Interaktionen mit konservierten Aminosäuren des ATP-Deckels nicht mehr so gegeben sind, wie bei der Bindung von ATP. Damit würde sich der ATP-Deckel nicht in einer geordneten stabilen Konformation wie unter ATP-Bindung befinden, aber auch nicht frei und flexibel, als wenn kein Nukleotid gebunden wäre. Das Resultat wäre eine Bindung von TNP-ATP innerhalb der Bindetasche, aber aufgrund der nicht optimalen Wechselwirkungen mit geringerer Affinität.

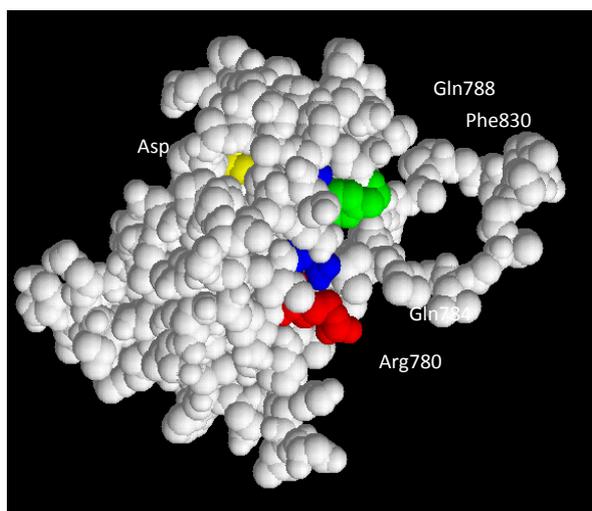


Abb.4.5: Konservierte Aminosäurereste der CA-Domäne. Die Abbildung zeigt ein Molekülmodell des CA-Domäne von KdpD. Farblich markiert wurden konservierten Aminosäurereste innerhalb der N-, G1- und F-Sequenzmotive, die eine Wechselwirkung mit ATP eingehen könnten. **Rot:** Arg780, **blau:** Gln784, Gln788, **gelb:** Asp816, **grün:** Phe830

Die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen scheint keinen Einfluss auf die Bindeaffinitäten zu haben, was im Kontrast zu Beobachtungen an eukaryotischen Proteinkinase von Adams (2001) steht. In Abwesenheit von divalenten Metallionen fand hier keine Bindung von ATP oder ADP statt. Dagegen beschreiben Stock *et al.* (2000), dass Mg^{2+} -Ionen essentiell für die Kinaseaktivität von Histidinkinasen sind.

Ähnliche Versuche zur Bestimmung von Nukleotidaffinitäten wurden auch mit der katalytischen Domäne der Sensorkinase EnvZ durchgeführt (Plesniak *et al.*, 2002). Mittels Fluoreszenzspektroskopie und “Stopped-Flow“ Experimenten wurden K_D -Werte von $\sim 60\mu M$ für ATP, $\sim 300\mu M$ für ADP und $\sim 1,9\mu M$ für TNP-ATP ermittelt. Die K_D -Werte für ATP und ADP liegen damit deutlich höher als die der Sensorkinase KdpD. Auch scheint hier im Falle

von ATP die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen einen Einfluss auf die Bindung zu nehmen, im Gegensatz zu den TNP Derivaten, wo ein Einfluss nicht beobachtet werden konnte. Plesniak *et al.* erklären diese Beobachtung damit, dass die TNP-Derivate wahrscheinlich andere Interaktionen in der Nukleotidbindetasche nutzen, die über die elektrostatischen Wechselwirkungen in der Nähe der Phosphatregion dominieren. Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Nukleotidaffinitäten der Sensorinasen KdpD und EnvZ lassen sich wahrscheinlich damit erklären, dass in dieser Arbeit das KdpD Protein in seiner nativen Konformation getestet worden ist. Alle elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ATP oder ADP mit dem Protein sollten dadurch gegeben sein. Testet man, wie im Falle von EnvZ, nur die katalytische Domäne, könnte es zwar sein, dass sich die Domäne richtig faltet, jedoch intermolekulare Wechselwirkungen mit anderen Domänen des Protein, die ebenfalls einen Einfluss auf die CA-Domäne haben könnten, würden nicht stattfinden. Im Falle des niedrigeren K_D -Werts für TNP-ATP zeigt sich, dass die katalytische ATP-Bindedomäne alleine wahrscheinlich locker gefaltet vorliegt, als wenn sie vom restlichen Protein beeinflusst wird. Somit passt der TNP-Rest besser in die Bindetasche als im Falle von KdpD.

Die K_D -Werte für die Bindung von ATP (und ADP) wurden außerdem bereits für die Sensorinasen FixL, CheA und DcuS bestimmt. Im Falle der Sensorinase FixL (Sousa *et al.*, 2005) wurde die Nukleotidbindung wie bei EnvZ nur mittels der katalytischen Domäne dieses Proteins ermittelt. Daraus ergibt sich ein mit EnvZ vergleichbarer K_D -Wert von $\sim 100\mu M$ für ATP. Bei der Sensorinase CheA wurden jeweils zwei K_D -Werte für ATP (260 und $1100\mu M$) und ADP (90 und $330\mu M$) ermittelt, die sich aus den verschiedenen Affinitäten der einzelnen Monomere eines CheA Dimers ergeben (Stewart *et al.*, 1998). Dabei bindet CheA mit höherer Affinität ADP als ATP. Außerdem wurden hier auch die Bindeaffinitäten für TNP-ATP bestimmt, welche bei $0,5\mu M$ für ein Monomer und bei $1,7\mu M$ für das andere Monomer lagen. Diese Ergebnisse stehen eher im Kontrast zu den in dieser Arbeit ermittelten K_D -Werte, was vielleicht dadurch erklärt werden könnte, dass es sich bei CheA um eine Histidinkinase der zweiten Unterklasse handelt und aufgrund von Sequenzunterschieden und daraus sich ergebenden Strukturunterschieden in der ATP-Bindedomäne (Plesniak *et al.*, 2002) nicht mit KdpD vergleichen lässt. Kinase-Aktivitätstests mit radioaktivem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und der Sensorinase DcuS ergaben einen K_D -Wert für die Bindung von ATP von $160\mu M$ (Janausch

et al., 2002). Dieser Wert zeigt, dass die Sensorkinase KdpD ebenfalls im Vergleich zur Sensorkinase DcuS eine deutlich höhere Affinität zu ATP aufweist.

Im besonderen Fall der Histidinkinase BA2291 aus *Bacillus anthracis* konnten Scaramozzino *et al.* (2008) zeigen, dass es sich hier um eine einzigartige Sensorkinase handelt, die mit höherer Affinität GTP anstatt von ATP bindet. Um zu testen, ob KdpD ebenfalls in der Lage ist dieses Nukleotid zu binden, wurden Titrationsen mit GTP durchgeführt, welche in einem K_D -Wert von $\sim 625 \mu\text{M}$ resultierten. Dieser Wert ist 4000fach höher als die K_D -Werte von ATP und ADP und lässt darauf schließen, dass unter nativen Bedingungen GTP nicht mit ATP oder ADP konkurrieren könnte, um mit KdpD zu interagieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die native Form des gereinigten KdpD Proteins eine höhere Affinität zu ATP und ADP im Vergleich zu bisher untersuchten Nukleotidbindeaffinitäten in anderen Sensorkinasen aufweist. Desweiteren findet eine Bindung des ATP-Analogons TNP-ATP an die ATP-Bindedomäne von KdpD mit deutlich geringerer Affinität als zu ATP oder ADP statt.

Einen weiteren Einfluss auf die Affinität der Sensorkinase gegenüber der Bindung von ATP, könnten auch die zusätzlichen ATP-Bindestellen innerhalb der N-terminalen Domäne von KdpD haben. Dazu zählen zum einen die "Walker A und B" Motive (AS 31-39 und AS 106-110) und zum anderen die Usp-Domäne (AS 251-372). Eine Bindung von ATP an die membranassoziiert vorliegende N-terminale Domäne konnte zunächst von Heermann *et al.* (2000) gezeigt werden, jedoch wurde diese Bindung von Hamann (2008) nicht bestätigt, da sich bei neueren Experimenten herausstellte, dass es sich in diesem Fall der Bindung von ATP an die N-terminale Domäne nur um eine unspezifische Bindung handelte. Somit konnte bislang eine ATP-Bindung an die "WalkerA/B"-Motive oder an die Usp-Domäne noch nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wurde argumentiert, dass die "Walker A und B"-Motive eher keinen Einfluss auf die ATP-Bindung innerhalb der CA-Domäne haben, da N-terminale Verkürzungen des Proteins das gleiche Phosphorylierungsverhalten wie das Wildtyp KdpD gezeigt haben (Jung & Altendorf, 1998b).

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen mit den KdpD-Mutanten KdpD-6His-G37A, K38A, T39C und KdpDcLIC Δ Usp durchgeführt. Die K_D -Werte für ATP dieser Mutanten lassen sich mit dem K_D -Wert des Wildtyp Proteins vergleichen, ein Einfluss scheint entweder nicht gegeben zu sein, oder aber

die noch bestehende zusätzliche ATP-Bindestelle kann die Fehlende komplementieren, in diesem Fall hätte eine KdpD-Mutante getestet werden müssen, die sowohl im “Walker A“-Motif mutiert, als auch in der Usp-Domäne deletiert ist.

Auch der K_D -Wert für TNP-ATP der KdpD Mutante KdpDcLIC Δ Usp zeigt keinen Unterschied zum K_D -Wert des Wildtyp Proteins. Einen fast doppelt so hohen K_D -Wert bezüglich TNP-ATP im Vergleich mit dem Wildtyp KdpD zeigt hingegen die “Walker A“-Mutante. Eine Konformationsänderung des Proteins, die durch die “Walker A“-Mutation hervorgerufen worden sein könnte, hätte in diesem Fall vielleicht doch einen Einfluss auf die CA-Domäne. Eine leichte Konformationsänderung der Nukleotidbindetasche verursacht durch eine mögliche Wechselwirkung mit der N-terminalen Domäne des Proteins könnte vielleicht schon ausreichen, die Bindung von TNP-ATP zu erschweren.

Somit schließen diese Ergebnisse eine mögliche Stabilisierung der Bindung von ATP in der CA-Domäne durch die N-terminalen ATP-Bindestellen, wie in Abbildung 4.6 dargestellt, nicht aus.

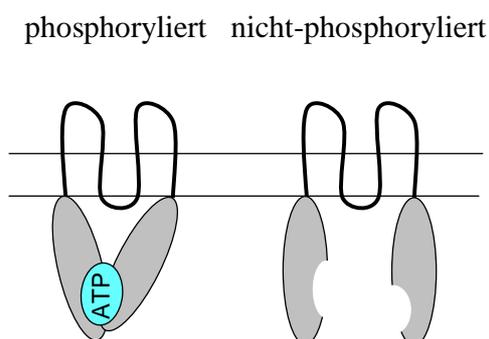


Abb. 4.6: Modell einer möglichen Stabilisierung der ATP-Bindung durch zusätzliche ATP-Bindemotive innerhalb der N-terminalen Domäne. Im nicht-phosphorylierten Zustand findet keine Wechselwirkung zwischen der N-terminalen Domäne und der C-terminalen Domäne von KdpD statt. Kommt es nun zu einer Phosphorylierung des Proteins, würde ATP in der CA-Domäne innerhalb der C-terminalen Domäne gebunden werden. Eine damit verbundene Konformationsänderung könnte die C-terminale Domäne in Richtung der N-terminalen Domäne bringen, was eine stabilisierende Wechselwirkung zwischen den zusätzlichen ATP-Bindestellen innerhalb der N-terminalen Domäne von KdpD und der CA-Domäne ermöglichen könnte.

Ein interessantes Ergebnis lieferten auch die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der KdpD-Mutante KdpDcLIC H673Q. Hier konnte ein K_D -Wert für ATP von 230nM ermittelt werden, der ebenfalls vergleichbar mit dem des Wildtyps ist. Im Gegensatz dazu

konnte keine Bindung mehr von TNP-ATP an das Protein detektiert werden. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da es sich bei KdpDcLIC H673Q lediglich um eine Punktmutante handelt, die eigentlich keinen großen Einfluss auf Konformationsänderungen des Proteins haben sollte. Vielmehr weist dieses Ergebnis auf eine koordinierte Wechselwirkung des Histidins innerhalb der DHp-Domäne mit der ATP-Bindetasche hin. Die Struktur der kompletten cytoplasmatischen Domäne der Histidinkinase HK853 liefert dazu erste strukturelle Hinweise bezüglich Wechselwirkungen zwischen der CA- und der DHp-Domäne (Marina *et al.*, 2005). Ausgehend davon, dass Histidinkinasen drei verschiedene enzymatische Zustände (Kinase-, Phosphotransferase- und Phosphatase-Aktivität) einnehmen können, sollten auch die CA-Domäne und die DHp-Domäne verschiedene Konformationen einnehmen können. Bezüglich der Histidinkinase HK853 wird angenommen, dass die CA- und DHp-Domänen miteinander interagieren und das Protein in einem Zustand halten, in dem Phosphotransferase- und Phosphatase-Aktivitäten überwiegen. Erst bei der Wahrnehmung eines Signals kommt es zur Autophosphorylierung des Proteins, wobei vermutet wird, dass die "Coiled Coil"-Sequenz des Proteins das Signal von der Transmembranregion zur Kinasedomäne weiterleitet.

Die CA-Domäne ist über einen flexiblen Linker mit dem C-Terminus der DHp-Domäne verbunden und kann so verschiedene Positionen zum Histidin in der DHp-Domäne einnehmen (Casino *et al.*, 2009, Albanesi *et al.*, 2009) (Abb.4.7). Wie auch oben schon erwähnt, weist bei Bindung von ATP das γ -Phosphat nach außen und ist so während der Autophosphorylierung frei für eine Reaktion mit dem ebenso exponiertem Histidin. Auch der ATP-Deckel ist wahrscheinlich in diese Reaktion involviert (Casino *et al.*, 2010). Aus diesen Beobachtungen könnte sich die Erklärung für die nicht mehr gegebene Bindung von TNP-ATP herleiten lassen. Es scheint so, als wäre der ATP-Deckel in der His-Mutante eventuell in einem geschlossenen Zustand, so dass zwar ATP aufgrund der optimalen Größe noch binden könnte, TNP-ATP aber aufgrund der zusätzlichen Trinitrophenylgruppen so nicht mehr in die Bindetasche hineinkommt. Ist das native Histidin ausgetauscht, so würde die Interaktion der DHp-Domäne mit der CA-Domäne nicht mehr, bzw. verändert gegeben sein, was sich auch auf eine Wechselwirkung mit dem ATP-Deckel auswirken könnte und diesen in einem geschlossenem Zustand hält.

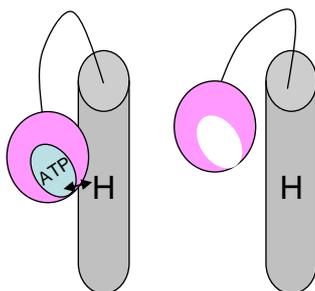


Abb. 4.7: Schematische Darstellung der CA- und DHp-Domäne von KdpD. Die CA-Domäne ist über einen flexiblen Linker mit dem C-Terminus der DHp-Domäne verbunden. Je nach Bindung eines Liganden kann die CA-Domäne verschiedene Positionen zum Histidin in der DHp-Domäne einnehmen.

Bei Betrachtung der gefitteten Kurven zur Ermittlung der K_D -Werte fällt desweiteren ein sigmoider Kurvenverlauf auf, der analytisch gesehen für kooperative Enzyme steht. Wendet man bei den erhaltenen Daten nicht nur einen Boltzman Fit an, sondern auch einen Hill Fit, ergeben sich zwar gleiche K_D -Werte, jedoch lässt hier die computergestützte Ermittlung eines Hillkoeffizienten auch Spekulationen zur Anzahl von möglichen Substratbindestellen und der Kooperativität eines Proteins zu. Im Fall von KdpD und auch der KdpD-Mutanten wurden bezüglich ATP, ADP und TNP-ATP Hillkoeffizienten größer eins ermittelt, was auf die Kooperativität von KdpD hinweist. Diese Kooperativität könnte sich auf die *trans* Phosphorylierung des Proteins beziehen, was beispielsweise im Falle eines KdpD Dimers bedeuten würde, dass wenn ein Nukleotid an dem einen Monomer gebunden ist, die Bindestelle am zweiten Monomer eine höhere Affinität für das entsprechende Nukleotid besitzt. Die Kooperativität könnte aber auch etwas über die Wechselwirkung zwischen der ATP-Bindestelle innerhalb der CA-Domäne des Proteins mit den regulatorischen ATP-Bindestellen innerhalb der N-terminalen Domäne von KdpD aussagen. Dies könnte im Einklang mit dem bereits oben diskutierten Modell zur Konformationsänderung, resultierend aus der ATP-Bindung innerhalb der CA-Domäne, stehen. Die positive Kooperativität würde aufgrund dieser Konformationsänderung dazu führen, dass die Bindestellen innerhalb der N- und C-terminalen Domänen eine höhere Affinität zu ATP entwickeln, resultierend in der Interaktion der beiden KdpD Domänen (NTD und CTD) miteinander.

5. Ausblick

Um die Interaktionen zwischen der Sensorkinase KdpD und der katalytischen Untereinheit des KdpFABC-Komplexes KdpB sowie der Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase PlsB weiter zu untersuchen, könnten mittels des "Bacterial Two Hybrid" Systems KdpB und PlsB Mutanten bzw. Proteinderivate auf Interaktionen mit KdpD getestet werden, um nähere Informationen zu den strukturellen Wechselwirkungen der jeweiligen Proteine zu erhalten. Um den möglichen Einfluss dieser Proteine auf die Aktivität der Sensorkinase zu untersuchen, könnten KdpB und PlsB Mutanten mit verändertem Phänotyp dazu verwendet werden, die Induktion bzw. Aktivität von KdpD im Zusammenhang mit diesen Mutationen zu testen. Charakterisieren ließen sich diese Einflüsse mit Hilfe von Wachstumstests in Medien unterschiedlicher K^+ -Konzentration, β -Galaktosidasetests und RT-PCR. Desweiteren wäre es wichtig, die Interaktionen der Proteine auch mittels eines zweiten Nachweisverfahrens zu bestätigen. Eine Möglichkeit dazu wäre ein Affinitäts-Pulldown-Experiment. Da es sich hier jedoch neben KdpD auch bei KdpB und PlsB um Membranproteine handelt, die solubilisiert werden müssen und als Grundlage für Wechselwirkungen mit KdpD dabei ihre native Konformation beibehalten sollten, wäre es von Vorteil, KdpB und PlsB vorher mittels bereits veröffentlichter Protokolle (Heitkamp *et al.*, 2009; Green *et al.*, 1981) einzeln aufzureinigen. Im Anschluß daran könnte KdpD über den His-Tag an die Ni^{2+} -NTA Agarose gebunden werden und durch Zugabe des zweiten Proteins (KdpB oder PlsB) eine Bindung an KdpD mittels eines zusätzlichen Tags oder eines spezifischen Antikörpers getestet werden.

Bezüglich der Reinigung von KdpD könnte die Solubilisierung des Proteins durch weiteres Testen von Detergenzien mit unterschiedlichen Konzentrationen verbessert werden. Die Reinigung könnte außerdem durch die Verwendung einer Sephacryl-Säule mit vermindertem Säulenvolumen effizienter verlaufen, da durch die breiten Peaks bei Verwendung der Sephacryl S400 Säule KdpD stark verdünnt wird und immer wieder eingengt werden muss, was zu Proteinverlusten führt. Unter Verwendung dieser Säule könnte so auch die Reinigung von KdpD aus *Lactococcus lactis* weiter getestet werden.

Genauere Aussagen zum Oligomerisierungszustand könnten mittels "Light Scattering" getroffen werden. Die Grundlage dieser Methode liegt darin, dass wenn Licht auf Materie trifft, die einfallenden Photonen einen oszillierenden Dipol in der Elektronenwolke der Moleküle induzieren. Ändert sich der Dipol, wird Energie abgestrahlt bzw. gestreut. Die

Frequenzwechsel, die winkelförmige Verteilung, die Polarisation und die Intensität des gestreuten Lichts werden durch die Größe, die Form und die molekularen Interaktionen im streuenden Material bestimmt. Proteinaggregate würde so zB. stärker streuen als monomere oder dimere Formen des Proteins.

Die Bedeutung der ATP-Bindestellen innerhalb des KdpD Proteins könnte durch Tryptophanfluoreszenzmessungen und Titrationsanalysen an weiteren Mutanten getestet werden. Wichtig wäre hierbei eine Mutante zu testen, die sowohl im "Walker A"-Motif mutiert ist, als auch eine Deletion der Usp-Domäne aufweist. Einzelaustausche konservierter Aminosäuren der ATP-Bindetasche könnten zudem nähere Aufschlüsse geben, welche Aminosäuren wichtig für die Bindung von Nukleotiden innerhalb der Bindetasche sind.

Die Interaktion zwischen der Sensor kinase und Nukleotiden könnte desweiteren mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) genauer untersucht werden. Hierbei macht man sich die Wärme zunutze, die bei der Bindung von zwei Komponenten entsteht oder absorbiert wird. Die Messung dieser Wärme ermöglicht die Bestimmung von Bindekonstanten (K_B), der Reaktionsstöchiometrie (n), der Enthalpie (ΔH) und der Entropie (ΔS). Somit könnte mit einem einzigen Experiment ein komplettes thermodynamisches Profil der Interaktion von KdpD mit einem Nukleotid (oder auch einem anderen Liganden, wie zB. KdpE) bestimmt werden.

6. Zusammenfassung

Die membrangebundene Sensorkinase KdpD und der cytoplasmatische Antwortregulator KdpE regulieren die Expression des *kdpFABC*-Operons, welches für das hoch affine Kaliumaufnahme-system KdpFABC von *Escherichia coli* kodiert. Aktiviert wird die Signaltransduktionskaskade zum einen durch Kalium limitierende Bedingungen im Medium und zum anderen aber weniger stark durch erhöhte Osmolarität.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern der Sensorkinase KdpD gesucht, die einen Einfluss auf die Regulation des Zweikomponentensystems haben könnten. In diesem Zusammenhang konnte das "Bacterial Two Hybrid" System erfolgreich für das KdpD/KdpE Zweikomponentensystem etabliert werden. Die bekannten Proteininteraktionen zwischen der Sensorkinase und dem Antwortregulator im Rahmen der Phosphorylierungskaskade sowie zwischen zwei KdpD Proteinen bzw. zwei KdpE Proteinen im Zuge einer Dimerisierung während der Signaltransduktion konnten bestätigt werden.

Desweiteren konnte eine Interaktion zwischen KdpD und der katalytischen Untereinheit des KdpFABC-Komplexes gefunden werden, woraus sich ein Modell aufstellen lässt, was einen möglichen Abschaltmechanismus der Sensorkinase durch KdpB diskutiert.

Eine weitere Interaktion wurde zwischen KdpD und der Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase PlsB festgestellt. Durch diese Interaktion wird die Kaliumaufnahme durch das Kdp System mit der Lipidbiosynthese gekoppelt. Diese Beobachtung stützt zum einen die Hypothese von Hamann (2008), zum anderen weist diese Interaktion auf ein regulatorisches Proteinnetzwerk hin, in welchem sich u.a. die Kdp Proteine befinden könnten.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit biochemischen Untersuchungen der Sensorkinase. Neben der Etablierung der *kdpD*-Expression in *Lactococcus lactis*, wurde ein neues Reinigungsprotokoll für KdpD erstellt. Das gereinigte KdpD konnte im Anschluss rekonstituiert werden. Kinase-Aktivitätstests zeigten, dass das Protein innerhalb der Membran aktiv ist, wogegen das solubilisier-te Protein nur in oligomeren Zuständen vorkommt und kaum aktiv zu sein scheint.

Mittels spektroskopischer Messungen wurde die ATP-Bindung an KdpD untersucht. Dabei zeigte sich, dass KdpD ATP und ADP mit hoher Affinität (K_D -Werte $\sim 150\text{-}200\text{nM}$) bindet. Desweiteren wurde die Bindung des ATP-Analogons TNP-ATP an KdpD untersucht. Mit einem K_D -Wert von $\sim 4\mu\text{M}$ konnte nachgewiesen werden, dass KdpD das TNP-ATP mit schwächerer Affinität bindet. Messungen von KdpD-Mutanten zeigten, dass die zusätzlichen ATP-Bindestellen innerhalb der N-terminalen Domäne des Proteins einen stabilisierenden Einfluß auf die ATP-Bindung innerhalb der C-terminalen Domäne haben könnten. Eine Punktmutation der Phosphorylierungsstelle resultierte in einer dem Wildtyp ähnlichen ATP-Bindung, dagegen konnte TNP-ATP nicht mehr gebunden werden. Mittels dieser Ergebnisse lässt sich ein Modell zur ATP-Bindung innerhalb der katalytischen Domäne des Proteins aufstellen.

Summary

The membrane bound sensor kinase KdpD and the cytoplasmic response regulator KdpE regulate the expression of the *kdpFABC* operon coding for the high affinity potassium uptake system KdpFABC of *Escherichia coli*. The signal transduction cascade is activated under potassium limitation in the medium or, to a lower extent, under conditions of high external osmolality.

The first part of the present work deals with the search for unknown interaction partners of the sensor kinase KdpD that could have an influence on the regulation of the two component system. In this context, the bacterial two hybrid system has successfully been established for the two component system KdpD/KdpE. So far known protein interactions between the sensor kinase and the response regulator in the context of the phosphorylation cascade and in the course of a dimerisation during signal transduction between two KdpD and KdpE monomers, respectively, could be confirmed.

An interaction between KdpD and the catalytical subunit of the KdpFABC complex, KdpB, could be found, from which a model was deduced that discusses a possible modulation of the sensor kinase by KdpB.

Another interaction could be detected between KdpD and the glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsB. By means of a certain interaction, the uptake of potassium by the KdpFABC system is connected to lipid synthesis. This study supports the hypothesis of Hamann (2008) and suggests a possible regulatory protein network, extending beyond the Kdp proteins.

The second part of this work deals with biochemical studies of the sensor kinase. In addition to the establishment of *kdpD* expression in *Lactococcus lactis*, a new protocol for the purification of KdpD has been developed. Subsequently, the purified protein has been reconstituted. Kinase activity assays could show that the protein within the membrane is active, whereas the solubilised protein could only be found in higher oligomeric states and seems to have only weak kinase activity.

The ATP binding capability of KdpD has been studied by means of spectroscopic measurements. It could be shown that KdpD binds ATP and ADP with high affinity (K_D

values of 150-200nM). Furthermore, the binding of the ATP analog TNP-ATP to KdpD has been investigated. With a K_D value of $\sim 4\mu\text{M}$, it has been demonstrated that KdpD binds TNP-ATP with lower affinity than ATP or ADP. Measurements of KdpD mutants indicate a stabilising effect of ATP binding sites within the N-terminal domain on ATP binding in the C-terminal domain. A point mutation within the phosphorylation site resulted in a wildtype like ATP binding, whereas TNP-ATP was abolished. Based on these results, a model of ATP binding within the C-terminal domain of the protein was proposed.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, J. A (2001).** Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem Rev* 101: 2271-2290.
- Ahnert, F.; Schmid, R.; Altendorf, K.; Greie, J. C. (2008).** ATP binding properties of the soluble part of the KdpC subunit from the *Escherichia coli* K(+)-transporting KdpFABC P-type ATPase. *Biochemistry*. 2006 Sep 12;45(36):11038-46.
- Albanesi, D.; Martín, M.; Trajtenberg, F.; Mansilla, M. C.; Haouz, A.; Alzari, P. M.; de Mendoza, D.; Buschiazzo, A. (2009).** Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 22;106(38):16185-90.
- Alix, E.; Blanc-Potard, A. B. (2009).** Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membrane. *Mol Microbiol*. 2009 Apr;72(1):5-11
- Altendorf, K. & Epstein, W. (1996).** The KdpATPase of *Escherichia coli*, in: *Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles* (Dalbey, R.E., ed.), Vol. 5, pp 401-418, JAI Press Inc., Greenwich, London.
- Altendorf, K.; Gabel, M.; Puppe, W.; Möllenkamp, T.; Zeeck, A.; Boddien, C.; Fendler, K.; Bamberg, E.; Drosse, S. (1998).** Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*, *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643, 137-146.
- Andreeßen, B. (2007).** Einfluss des C-terminalen Bereichs der Sensordomäne auf die Reizperzeption der Histidinkinase KdpD von *Escherichia coli*. *Masterarbeit*, Universität Osnabrück.
- Aravind, L.; Ponting, C.P. (1997).** The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci*. 1997 Dec;22(12):458-9.
- Arifuzzaman, M.; Maeda, M.; Itoh, A.; Nishikata, K.; Takita, C.; Saito, R.; Ara, T.; Nakahigashi, K.; Huang, H. C.; Hirai, A.; Tsuzuki, K.; Nakamura, S.; Altaf-Ul-Amin, M.; Oshima, T.; Baba, T.; Yamamoto, N.; Kawamura, T.; Ioka-Nakamichi, T.; Kitagawa, M.; Tomita, M.; Kanaya, S.; Wada, C.; Mori, H. (2006).** Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res*. 2006 May;16(5):686-91.
- Asha, H. & Gowrishankar, J. (1993).** Regulation of the *kdp* operon expression in *Escherichia coli*: evidence against turgor as signal for transcriptional control, *J. Bacteriol.* 175 (14), 4528-4537.
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1987).** Current Protocols in Molecular Biology, Edited by *Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience John Wiley and Sons, New York, 1987 Core volume 1987.*
- Axelsen, K. B.; Palmgren, M. G. (1998).** Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol*. 1998 Jan;46(1):84-101.
- Bachmann, B. J. (1990).** Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8, *Microbiol. Rev.* 54, 130-197.
- Bakker, E. P. (1993).** Cell K⁺ & K⁺-transport systems in prokaryotes, Alkali cation transport systems in prokaryotes (Bakker, E. P. ed.), *CRC Press*, 205-224, Boca Raton, Florida.

- Bakker, E. P.; Borchard, A.; Michels, M.; Altendorf, K.; Siebers, A. (1987).** High affinity potassium uptake system in *Bacillus acidocaldarius* showing immunological cross-reactivity with the Kdp system from *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 147, 820-826.
- Balaji, B.; O'Connor, K.; Lucas, J. R.; Anderson, J. M.; Csonka, L. N. (2005).** Timing of induction of osmotically controlled genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, determined with quantitative real-time reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Dec;71(12):8273-83.
- Bamber, L.; Harding, M.; Monné, M.; Slotboom, D. J.; Kunji, E. R. (2007).** The yeast mitochondrial ADP/ATP carrier functions as a monomer in mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 26;104(26):10830-4.
- Becker, D.; Fendler, K.; Altendorf, K.; Greie, J. C. (2007).** The conserved dipole in transmembrane helix 5 of KdpB in the *Escherichia coli* KdpFABC P-type ATPase is crucial for coupling and the electrogenic K⁺-translocation step. *Biochemistry.* 2007 Dec 4;46(48):13920-8.
- Bell, B. L.; Mohapatra, N. P.; Gunn, J. S. (2010).** MglA/SspA Interaction Phosphorylation and Evidence of Response Regulator PmrA: Role of by the *Francisella novicida* Orphan Regulation of Virulence Gene Transcripts. *Infect. Immun.* 2010, 78(5):2189.
- Bilwes, A. M.; Alex, L. A.; Crane, B. R.; Simon, M. I. (1999).** Structure of CheA, a signal transducing histidine kinase. *Cell.* 1999 Jan 8;96(1):131-41.
- Bilwes, A. M.; Quezada, C. M.; Croal, L. R.; Crane, B. R.; Simon, M. I. (2001).** Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nat Struct Biol.* 2001 Apr;8(4):353-60.
- Booth, I. R. (1985).** Regulation of cytoplasmic pH in bacteria, *Microbiol. Rev.* 49, 359-378.
- Booth, I.R. & Higgins, C. F. (1990)** Enteric bacteria and osmotic-stress - intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic-stress, *Fems Microbiol Rev.* 75, 239-246.
- Booth, I. R.; Jones, M. A.; McLaggan, D.; Nikolaev, Y.; Ness, L. S.; Wood, C. M.; Miller, S.; Töttemeyer, S.; Ferguson, G. P. (1996).** Bacterial ion channels, *Handbook of Biological Physics* Vol. 2 (Koning, W. N.; Kaback, H. R.; Lolkema, J. S.; eds.) 693-729, Elsevier Science, Amsterdam.
- Bossemeyer, D.; Schlösser, A.; Bakker, E. P. (1989).** Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K⁺-uptake system, *J. Bacteriol.* 171, 2219-2221.
- Bramkamp, M. & Altendorf, K. (2003).** Mutational analysis of charged residues in the putative KdpB-TM5 domain of the kdp-ATPase of *Escherichia coli*, *Ann. NY Acad. Sci.* 986, 351-353.
- Bramkamp, M.; Altendorf, K.; Greie, J. C. (2007).** Common patterns and unique features of P-type ATPases: a comparative view on the KdpFABC complex from *Escherichia coli*. *Mol Membr Biol. Sep-Dec;24(5-6):375-86.*
- Brandon, L.; Dorus, S.; Epstein, W.; Altendorf, K.; Jung, K. (2000).** Modulation of KdpD phosphatase implicated in the physiological expression of the Kdp ATPase of *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 38 (5), 1086-1092.
- Bujalowski, W.; Klonowska, M. M. (1993).** Negative cooperativity in the binding of nucleotides to *Escherichia coli* replicative helicase DnaB protein. Interactions with fluorescent nucleotide analogs. *Biochemistry.* 1993 Jun 8;32(22):5888-900.

- Buurman, E. T.; Kim, K.-T.; Epstein, W. (1995).** Genetic evidence of two sequentially occupied K⁺ binding sites in the Kdp transport ATPase, *J. Biol. Chem.* 270, 6678-6685.
- Carmany, D. O.; Hollingsworth, K.; McCleary, W. R. (2003).** Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *J. Bacteriol.* 2003 Feb;185(3):1112-5.
- Casadaban, M. J.; Cohen, S. N. (1980).** Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 1980 Apr;138(2):179-207.
- Casino, P.; Rubio, V.; Marina, A. (2010).** The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr Opin Struct Biol.* 2010 Dec;20(6):763-71.
- Casino, P.; Rubio, V.; Marina, A. (2009).** Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell.* 2009 Oct 16;139(2):325-36.
- Cronan, J. E. (2003).** Bacterial membrane lipids: where do we stand? *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:203-24.
- Dosch, D. C.; Helmer, G. L.; Sutton, S. H.; Salvacion, F. F.; Epstein, W. (1991).** Genetic analysis of potassium transport loci in *Escherichia coli*: Evidence for three constitutive systems mediating uptake of potassium, *J. Bacteriol.* 173,687-696.
- Durell, S. R.; Bakker, E. P.; Guy, H. R. (2000).** Does the KdpA subunit from the high affinity K⁺-translocating P-type kdp-ATPase have a structure similar to that of K⁺ channels? *Biophys. J.* 78 (1), 188-199.
- Dutta, R.; Qin, L.; Inouye, M. (1999).** Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol Microbiol.* 1999 Nov;34(4):633-40.
- Epstein, W. (1986).** Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 73-78.
- Epstein, W. & Kim, B. S. (1971).** Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* 108, 639-644..
- Euromedex (2000).** www.euromedex.com
- Faller, L.D. (1990).** Binding of the fluorescent substrate analogue 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenylcyclohexadienylidene)adenosine 5'-triphosphate to the gastric H⁺,K(+)-ATPase: evidence for cofactor-induced conformational changes in the enzyme. *Biochemistry.* 1990 Apr 3;29(13):3179-86
- Feuerbaum, E. (2008).** In vivo Lokalisations- und Interaktionsstudien der Sensorkinase KdpD aus *Escherichia coli*. *Dissertation*, Universität Osnabrück.
- Gao, R.; Stock, A. M. (2009).** Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63:133-54.
- Gaßel, M. & Altendorf, K. (2001).** Analysis of KdpC of the K⁺-transporting KdpFABC complex of *Escherichia coli*. *FEBS J* 268, 1772-1781.

- Gaßel, M.; Möllenkamp, T.; Puppe, W; Altendorf, K. (1999).** The KdpF subunit is part of the K⁺-translocating Kdp complex of *Escherichia coli* and is responsible for the stabilization of the complex *in vitro*, *J. Biol. Chem.* 274 (53), 37901-37907.
- Gaßel, M.; Siebers, A.; Epstein, W; Altendorf, K. (1998).** Assembly of the Kdp complex, the multi-subunit K⁺-transport ATPase of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 1415, 77-84.
- Geertsma, E. R.; Poolman, B.(2007).** High-throughput cloning and expression in recalcitrant bacteria. *Nat Methods.* 2007 Sep;4(9):705-7.
- Gonzalez-Baro, M. R.; Granger, D. A.; Coleman, R. A. (2001).** Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase contains two transmembrane domains with the active site in the N-terminal domain facing the cytosol. *J Biol Chem.* 2001 Nov 16;276(46):43182-8.
- Gowrishankar, J. (1985).** Identification of osmoresponsive genes in *Escherichia coli*: evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation, *J. Bacteriol.* 164, 434-445.
- Greie, J. C.; Altendorf K. (2007).** The K⁺-translocating KdpFABC complex from *Escherichia coli*: a P-type ATPase with unique features. *J Bioenerg Biomembr.* 39(5-6):397-402.
- Gully, D.; Bouveret, E. (2006).** A protein network for phospholipid synthesis uncovered by a variant of the tandem affinity purification method in *Escherichia coli*. *Proteomics.* 2006 Jan;6(1):282-93.
- Gustavsson, N.; Diez, A.; Nyström T. (2002).** The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage. *Mol.Microbiol.* 43:107-117.
- Hamann, K.; Zimmann, P.; Altendorf, K. (2008).** Reduction of Turgor Is Not the Stimulus for the Sensor Kinase KdpD of *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Apr. 2008, Vol. 190, No. 7: 2360–2367.
- Harold, F.; Altendorf, K.; Hirata, H. (1974).** Probing membrane transport mechanisms with ionophores, *Ann. NY Acad. Sci.* 235, 149-160.
- Heath, R. J.; Jackowski, S.; Rock, C. O. (1994).** Guanosine tetraphosphate inhibition of fatty acid and phospholipid synthesis in *Escherichia coli* is relieved by overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsB). *J Biol Chem.* 1994 Oct 21;269(42):26584-90.
- Heermann, R. (2001).** Funktionelle und strukturelle Eigenschaften der Sensorkinase KdpD aus *Escherichia coli* unter besonderer Berücksichtigung der N-terminalen Domäne, *Dissertation*, Universität Osnabrück.
- Heermann, R.; Altendorf, K.; Jung, K. (1998).** The turgor sensor KdpD of *Escherichia coli* is a homodimer, *Biochim. Biophys. Acta* 1415, 114-124.
- Heermann, R.; Altendorf, K.; Jung, K. (2000).** The hydrophilic N-terminal domain complements the membrane-anchored C-terminal domain of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 275 (22), 17080-17085.
- Heermann, R.; Altendorf, K.; Jung, K. (2003a).** The N-terminal input domain of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* stabilizes the interaction between the cognate response regulator KdpE and the corresponding DNA-binding site, *J. Biol. Chem.* 278 (51), 51277-51284.

- Heermann, R.; Fohrmann, A.; Altendorf, K.; Jung, K. (2003b).** The transmembrane domains of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* are not essential for sensing K⁺ limitation, *Mol. Microbiol.* 47 (3), 839-848.
- Heermann, R.; Weber, A.; Mayer, B.; Ott, M.; Hauser, E.; Gabriel, G.; Pirch, T.; Jung, K. (2008).** The universal stress protein UspC scaffolds the KdpD/KdpE signaling cascade of *Escherichia coli* under salt stress. *J Mol Biol.* 2009 Feb 13;386(1):134-48.
- Heermann, R.; Lippert, M. L.; Jung, K. (2009).** Domain swapping reveals that the N-terminal domain of the sensor kinase KdpD in *Escherichia coli* is important for signaling. *BMC Microbiol.* 2009 Jul 9;9:133.
- Heginbotham, L.; Kolmakova-Partensky, L.; Miller, C. (1998).** Functional reconstitution of a prokaryotic K⁺ channel. *Journal of General Physiology* 111: 741-749
- Heitkamp, T.; Kalinowski, R.; Böttcher, B.; Börsch, M.; Altendorf, K.; Greie, J. C. (2008).** K⁺-translocating KdpFABC P-type ATPase from *Escherichia coli* acts as a functional and structural dimer. *Biochemistry.* 2008 Mar 18;47(11):3564-75.
- Heitkamp, T.; Böttcher, B.; Greie, J. C. (2009).** Solution structure of the KdpFABC P-type ATPase from *Escherichia coli* by electron microscopic single particle analysis. *J Struct Biol.* 2009 Jun;166(3):295-302.
- Hesse, J. E.; Wiczorek, L.; Altendorf, K.; Reicin, A. S.; Dorus, E.; Epstein, W. (1984).** Sequence homology between two membrane transport ATPases, the Kdp-ATPase of *Escherichia coli* and the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 4746-4750.
- Hidaka, Y.; Park, H.; Inouye, M. (1997).** Demonstration of dimer formation of the cytoplasmic domain of a transmembrane osmosensor protein, EnvZ, of *Escherichia coli* using Ni-histidine tag affinity chromatography, *FEBS Letts.* 400, 238-242.
- Hiratsuka, T. (1982).** Biological activities and spectroscopic properties of chromophoric and fluorescent analogs of adenine nucleoside and nucleotides, 2',3'-O-(2,4,6-trinitrocyclohexadienylidene) adenosine derivatives. *Biochim Biophys Acta.* 1982 Dec 17;719(3):509-17.
- Hu, P.; Janga, S. C.; Babu, M.; Díaz-Mejía, J. J.; Butland, G.; Yang, W.; Pogoutse, O.; Guo, X.; Phanse, S.; Wong, P.; Chandran, S.; Christopoulos, C.; Nazarians-Armavil, A.; Nasser, N. K.; Musso, G.; Ali, M.; Nazemof, N.; Eroukova, V.; Golshani, A.; Paccanaro, A.; Greenblatt, J. F.; Moreno-Hagelsieb, G.; Emili, A. (2009).** Global functional atlas of *Escherichia coli* encompassing previously uncharacterized proteins. *PLoS Biol.* 2009 Apr 28;7(4):e96.
- Jung, K. & Altendorf, K. (1998a).** Individual substitutions of clustered arginine residues of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* modulate the ratio of the kinase to phosphatase activity, *J. Biol. Chem.* 273 (41), 26415-26420.
- Jung, K. & Altendorf, K. (1998b).** Truncation of Amino Acids 12-128 causes deregulation of the phosphatase activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 273, 17406-17410.

- Jung, K.; Heermann, R.; Meyer, M.; Altendorf, K. (1998).** Effect of cysteine replacements on the properties of the turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 1372, 311-322.
- Jung, K.; Krabusch, M.; Altendorf, K. (2001a).** Cs⁺ induces the *kdp* operon of *Escherichia coli* by lowering the intracellular K⁺ concentration, *J. Bacteriol.* 183 (12), 3800-3803.
- Jung, K.; Tjaden, B.; Altendorf, K. (1997).** Purification, reconstitution and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem* 272, 10847-10852.
- Jung, K.; Veen, M.; Altendorf, K. (2000).** K⁺ and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 275, 40142-40147.
- Karimova, G.; Pidoux, J.; Ullmann, A.; Ladant, D. (1998).** A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 12;95(10):5752-6.
- Karimova, G.; Ullmann, A.; Ladant, D. (2001).** Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001 Jan;3(1):73-82.
- Karimova, G.; Dautin, N.; Ladant, D. (2005).** Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol.* 2005 Apr;187(7):2233-43.
- Kita, K.; Kasahara, M.; Anraku, Y. (1982).** Formation of a membrane potential by reconstructed liposomes made with cytochrome b562-o complex, a terminal oxidase of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem.* 1982 Jul 25;257(14):7933-5.
- Kleefeld, A.; Ackermann, B.; Bauer, J.; Krämer, J.; Unden, G. (2009).** The fumarate/succinate antiporter DcuB of *Escherichia coli* is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression. *J Biol Chem.* 2009 Jan 2;284(1):265-75.
- Kollmann, R.; Altendorf, K. (1993).** ATP-driven potassium transport in right-side-out membrane vesicles via the Kdp system of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 1993 Jun 10;1143(1):62-6.
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. J., Kleerebezem, M.; de Vos, W. M. (1998).** Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J Biotechnol* 64, 15–21.
- Kunji, E.R.; Slotboom, D.J.; Poolman, B. (2003).** *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Feb 17;1610(1):97-108.
- Kunji, E. R.; Chan, K. W.; Slotboom, D. J.; Floyd, S.; O'Connor, R.; Monné, M. (2005).** Eukaryotic membrane protein overproduction in *Lactococcus lactis*. *Curr Opin Biotechnol.* 2005 Oct;16(5):546-51.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 – 685.
- Laimins, L. A.; Rhoads, D. B.; Epstein, W. (1981).** Osmotic control of *kdp* operon expression in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1), 464-468.

- Lánský, Z.; Kubala, M.; Ettrich, R.; Kutý, M.; Plásek, J.; Teisinger, J.; Schoner, W.; Amler, E. (2004).** The hydrogen bonds between Arg423 and Glu472 and other key residues, Asp443, Ser477, and Pro489, are responsible for the formation and a different positioning of TNP-ATP and ATP within the nucleotide-binding site of Na(+)/K(+)-ATPase. *Biochemistry*. 2004 Jul 6;43(26):8303-11.
- Lee, S. J. & Gralla, J. D. (2004).** Osmo-Regulation of bacterial transcription via poised RNA-Polymerase, *Molecular cell* 14, 153-162.
- Lee, C. R.; Cho, S. H.; Kim, H. J.; Kim, M.; Peterkofsky, A.; Seok, Y. J. (2010).** Potassium mediates Escherichia coli enzyme IIA(Ntr) -dependent regulation of sigma factor selectivity. *Mol Microbiol*. 2010 Dec;78(6):1468-83.
- Lippa, A. M.; Goulian M. (2009).** Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet*. 2009 Dec;5(12).
- Lowry, O. H.; Rosebrough N. J.; Farr A.L.; Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem*. 193: 265-275.
- Lucassen, M. (1998).** Regulation des Kdp-Systems aus *Escherichia coli*: Biochemische Charakterisierung des Antwortregulators KdpE und Nachweis von Konformationsänderungen im Zuge der Aktivierung, *Dissertation*, Universität Osnabrück.
- Lüttmann, D.; Heermann, R.; Zimmer, B.; Hillmann, A.; Rampp, I.S.; Jung, K.; Görke, B. (2009).** Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA(Ntr) in Escherichia coli. *Mol Microbiol*. 2009 May;72(4):978-94.
- Magnusson, L. U.; Farewell, A.; Nyström, T. (2005).** ppGpp: a global regulator in Escherichia coli. *Trends Microbiol*. 2005 May;13(5):236-42.
- Makino, K.; Shinagawa, H.; Amemura, M.; Kawamoto, T.; Yamada, M.; Nakata, A. (1989).** Signal transduction in the phosphate regulon of Escherichia coli involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol*. 1989 Dec 5;210(3):551-9.
- Malli, R.; Epstein, W. (1998).** Expression of the Kdp ATPase is consistent with regulation by turgor pressure. *J Bacteriol*. 1998 Oct;180(19):5102-8.
- Marina, A.; Mott, C.; Auyzenberg, A.; Hendrickson, W. A.; Waldburger, C. D. (2001).** Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism. *J Biol Chem*. 2001 Nov 2;276(44):41182-90.
- Marina, A.; Waldburger, C. D.; Hendrickson, W. A. (2005).** Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J*. 2005 Dec 21;24(24):4247-59.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor.
- Mierau, I.; Kleerebezem, M. (2005).** 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005 Oct;68(6):705-17.

- Møller, J. V.; Juul, B.; Le Maire, M. (1996).** Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1286:1-51.
- Nakashima, K.; Sugiura, A.; Kanamaru, K.; Mizuno, T. (1993).** Signal transduction between the two regulatory components involved in the regulation of the *kdpABC* operon in *Escherichia coli*: phosphorylation-dependent functioning of the positive regulator, KdpE, *Mol. Microbiol.* 7 (1), 109-116.
- Nakashima, K.; Sugiura, A.; Momoi, H.; Mizuno, T. (1992).** Phosphotransfer signal transduction between two regulatory factors involved in the osmoregulated *kdp* operon in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 6, 1777-1784.
- Nimigean, C. M. (2006).** A radioactive uptake assay for the measurement of ion transport across ion channel-containing liposomes. *Nature Protocols*, 1.3:1207-1212.
- Parish, T.; Smith, D. A.; Kendall, S.; Casali, N.; Bancroft, G. J. (2003).** Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 71: 1134-1140
- Parkinson, J. S. & Kofoed, E. C. (1992).** Communication modules in bacterial signaling proteins, *Annu. Rev. Genet.* 26, 71-112.
- Pedersen, P.; Carafoli, E. (1987).** Ion motive ATPases. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends in Biochemical Sciences* 12, 146-150.
- Pellon-Maison, M.; Coleman, R. A.; Gonzalez-Baró, M. R. (2006).** The C-terminal region of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 interacts with the active site region and is required for activity. *Arch Biochem Biophys.* 2006 Jun 15;450(2):157-66.
- Plesniak, L.; Horiuchi, Y.; Sem, D.; Meininger, D.; Stiles, L.; Shaffer, J.; Jennings, P. A.; Adams, J. A. (2002).** Probing the nucleotide binding domain of the osmoregulator EnvZ using fluorescent nucleotide derivatives. *Biochemistry.* 2002 Nov 26;41(47):13876-82.
- Polarek, J. W.; Williams, G.; Epstein, W. (1992).** The products of the *kdpDE* operon are required for expression of the Kdp ATPase of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 174 (7), 2145-2151.
- Poolman, B.; Blount, P.; Folgering, J. H. A.; Friesen, R. H. E.; Moe, P. C.; Van der Heide, T. (2002).** How do membran proteins sense water stress?, *Mol. Microbiol.* 44 (4), 889-902.
- Puppe, W.; Zimmann, P.; Jung, K.; Lucassen, M.; Altendorf, K. (1996).** Characterization of truncated forms of the KdpD protein, the sensor kinase of the K⁺-translocating Kdp system of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 271 (40), 25027-25034.
- Puustinen, A.; Finel, M.; Virkki, M.; Wikström, M. (1989).** Cytochrome o (bo) is a proton pump in *Paracoccus denitrificans* and *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 1989 Jun 5;249(2):163-7.
- Puustinen, A.; Finel, M.; Haltia, T.; Gennis, R. B.; Wikström, M. (1991).** Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1991 Apr 23;30(16):3936-42.
- Quick, M.; Javitch, J. A. (2007).** Monitoring the function of membrane transport proteins in detergent-solubilized form. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 27;104(9):3603-8.

- Ray, T. K.; Cronan, J. E. Jr. (1975).** Acylation of sn-glycerol 3-phosphate in *Escherichia coli*. Study of reaction with native palmitoyl-acyl carrier protein. *J Biol Chem.* 1975 Nov 10;250(21):8422-7.
- Rhoads, D. B.; Waters, F. B.; Epstein, W. (1976).** Cation transport in *Escherichia coli*. VIII. Potassium transport mutants, *J. Gen. Physiol.* 67, 325-341.
- Roe, A. J.; McLaggan, D.; O'Byrne, C. O.; Booth, I. R. (2000).** Rapid inactivation of the *Escherichia coli* Kdp K⁺ uptake system by high potassium concentrations, *Mol. Microbiology* 35 (5), 1235-1243.
- Rothenbucher, M. C.; Facey, S.; Kiefer, D.; Kossmann, K.; Kuhn, A. (2005).** The Cytoplasmic C-Terminal Domain of the *Escherichia coli* KdpD Protein Functions as a K₊ Sensor. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Mar. 2006, Vol. 188, No. 5, 1950-1958.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY*, Vol. 1, 2, 3 (1989).
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Scaramozzino, F.; White, A.; Perego, M.; Hoch, J. A. (2008).** A unique GTP-dependent sporulation sensor histidine kinase in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 2009 Feb;191(3):687-92.
- Scheu, P. D.; Liao, Y. F.; Bauer, J.; Kneuper, H.; Basché, T.; Unden, G.; Erker, W. (2010).** Oligomeric sensor kinase DcuS in the membrane of *Escherichia coli* and in proteoliposomes: chemical cross-linking and FRET spectroscopy. *J Bacteriol.* 2010 Jul;192(13):3474-83.
- Schlegel, S.; Klepsch, M.; Gialama, D.; Wickström, D.; Slotboom, D. J.; de Gier, J. W. (2009).** Revolutionizing membrane protein overexpression in bacteria. *Microb Biotechnol.* 2010 Jul;3(4):403-11.
- Schlösser, A.; Hamann, A.; Schleyer, M.; Bakker, E. P. (1992).** The K⁺-uptake systems TrkG and TrkH from *Escherichia coli*: A pair of unusual transport systems involved in osmoregulation. In: *Molecular mechanism of transport* (Palmieri, F. & Quagliariello, E., eds.), Elsevier, Amsterdam, 51-58.
- Schniederberend, M.; Zimmann, P.; Bogdanov, M.; Dowhan, W.; Altendorf, K. (2009).** Influence of K⁺-dependent membrane lipid composition on the expression of the kdpFABC operon in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1798(1):32-9.
- Schulz, G. E.; Schiltz, E.; Tomasselli, A. G.; Frank, R.; Brune, M.; Wittinghofer, A.; Schirmer, R. H. (1986).** Structural relationships in the adenylate kinase family. *Eur J Biochem.* 1986 Nov 17;161(1):127-32.
- Siebers, A. & Altendorf, K. (1989).** Characterization of the phosphorylated intermediate of the K⁺-translocating Kdp-ATPase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 264, 5831-5838.
- Siebers, A. & Altendorf, K. (1993).** K⁺-translocating Kdp-ATPases and other bacterial P-type ATPases. In: *Alkali cation transport systems in prokaryotes* (Bakker, E.P., ed.), pp. 225-252, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Siegele, D. A. (2005).** Universal stress proteins in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 187, 6253-6254.

- Smith, P. K. (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 (1): 76–85.
- Sousa, E. H.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M. A. (2005).** Oxygen blocks the reaction of the FixL-FixJ complex with ATP but does not influence binding of FixJ or ATP to FixL. *Biochemistry.* 2005 Nov 22;44(46):15359-65.
- Stallkamp, I.; Dowhan, W.; Altendorf, K.; Jung, K. (1999).** Negatively charged phospholipids influence the activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 172, 295-302.
- Steed, P. M.; Wanner, B. L. (1993).** Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the pstSCAB-phoU operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *J Bacteriol.* 1993 Nov;175(21):6797-809.
- Stewart, R. C.; VanBruggen, R.; Ellefson, D. D.; Wolfe, A. J. (1998).** TNP-ATP and TNP-ADP as probes of the nucleotide binding site of CheA, the histidine protein kinase in the chemotaxis signal transduction pathway of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1998 Sep 1;37(35):12269-79.
- Steyn, A. J.; Joseph, J.; Bloom, B. R. (2003).** Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lrp family. *Mol. Microbiol.* 47, 1075-1089.
- Stock, A. M.; Robinson, V. L.; Goudreau, P. N. (2000).** Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:183-215.
- Strahl, H.; Greie, J. C. (2008).** The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* R1 responds to potassium limitation by expression of the K⁺-transporting KdpFABC P-type ATPase and by a decrease in intracellular K⁺. *Extremophiles.* 2008 Nov;12(6):741-52.
- Stumpe, S.; Schlösser, A.; Schleyer, M.; Bakker, E. P. (1996).** K⁺ circulation across the prokaryotic cell membrane: K⁺ uptake systems. In: *Handbook of Biological Physics* Vol. 2 (Konings, W.N., Kaback, H.R. and Lolkema, J.S., eds.), 473-499, Elsevier Science, Amsterdam.
- Suelter, C. H. (1970).** Enzymes activated by monovalent cations, *Science* 168 (933), 789-795.
- Sugiura, A.; Hirokawa, K.; Nakashima, K.; Mizuno, T. (1994).** Signal-sensing mechanisms of the putative osmosensor KdpD in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 14 (5), 929-938.
- Surette, M. G.; Levit, M.; Liu, Y.; Lukat, G.; Ninfa, E. G.; Ninfa, A.; Stock, J. B. (1996).** Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem.* 1996 Jan 12;271(2):939-45
- Sutherland, L.; Cairney, J.; Elmore, M. J.; Booth, I. R.; Higgins, C. F. (1986).** Osmotic regulation of transcription: Induction of the *proU* betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium, *J. Bacteriol.* 168, 805-814.
- Tanaka, T.; Saha, S. K.; Tomomori, R. I.; Ishima, R.; Liu, D.; Tong, K. I.; Park, H.; Dutta, R.; Qin, L.; Swindells, M. B.; Yamazaki, T.; Ono, A. M.; Kainosho, M.; Inouye, M.; Ikura, M. (1998).** NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature* 396, 88-92.

- Tatum, E. L. (1945).** X-Ray Induced Mutant Strains of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1945 Aug;31(8):215-9
- Tetsch, L.; Jung, K. (2009).** The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Mol Microbiol*. 2009 Sep;73(6):982-91.
- Tomomori, C.; Tanaka, T.; Dutta, R.; Park, H.; Saha, S. K.; Zhu, Y.; Ishima, R.; Liu, D.; Tong, K. I.; Kurokawa, H.; Qian, H.; Inouye, M.; Ikura, M. (1999).** Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat. Struct. Biol.* 6, 953-962.
- Trajtenberg, F.; Graña, M.; Ruétalo, N.; Botti, H.; Buschiazzi, A. (2010).** Structural and enzymatic insights into the ATP binding and autophosphorylation mechanism of a sensor histidine kinase. *J Biol Chem*. 2010 Aug 6;285(32):24892-903.
- Trumpower, B. L.; Gennis, R. B. (1994).** Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:675-716.
- Van Bogelen, R. A.; Hutton, M. E.; Neidhardt, F. C. (1990).** Gene-protein database of *Escherichia coli* K-12, edition 3, *Electrophoresis* 11,1131-1166.
- van der Wolk, J. P.; Klose, M.; de Wit, J. G.; den Blaauwen, T.; Freudl, R.; Driessen, A. J. (1995).** Identification of the magnesium-binding domain of the high-affinity ATP-binding site of the *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* SecA protein. *J Biol Chem*. 1995 Aug 11;270(32):18975-82.
- Vlisidou, I.; Eleftherianos, I.; Dorus, S.; Yang, G.; Constant, R. H.; Reynolds, S. E.; Waterfield, N. R. (2010).** The KdpD/KdpE two-component system of *Photobacterium aerophilum* promotes bacterial survival within *M. sexta* hemocytes. *J Invertebr Pathol*. 2010 Nov;105(3):352-62.
- Voelkner, P.; Puppe, W.; Altendorf, K. (1993).** Characterization of the KdpD protein, the sensor kinase of the K⁺-translocating system of *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem*. 217, 1019-1026.
- Walderhaug, M. O.; Polarek, J. W.; Voelkner, P.; Daniel, J. M.; Hesse, J. E.; Altendorf, K.; Epstein, W. (1992).** KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class regulators, *J. Bacteriol.* 174, 2152-2159.
- Wanner, B. L. (1996).** Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. *Kidney Int*. 1996 Apr;49(4):964-7.
- Weber, A. (2003).** Transkriptom- und Proteom-Analysen von *Escherichia coli* unter hyperosmotischen Stressbedingungen und biochemische Charakterisierung von UspG, *Dissertation*, Universität Osnabrück.
- Weber, A.; Jung, K. (2006).** Biochemical properties of UspG, a universal stress protein of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 45: 1620–1628.
- Weber, K.; Osborn, M. (1969).** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1969 Aug 25;244(16):4406-12.

- Weber, J.; Bowman, C.; Senior, A. E. (1996).** Specific tryptophan substitution in catalytic sites of *Escherichia coli* F1-ATPase allows differentiation between bound substrate ATP and product ADP in steady-state catalysis. *J. Biol. Chem.* 271, 18711–18718.
- West, A. H.; Stock, A. M. (2001).** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signalling systems, *Trends Biochem. Sci.* 26 (6), 369-376.
- Zimmann, P.; Puppe, W.; Altendorf, K. (1995)** Membrane topology analysis of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 270 (47), 28282-28288.
- Zhang, Y.M.; Rock, C. O. (2008).** Thematic review series: Glycerolipids. Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis. *J Lipid Res.* 2008 Sep;49(9):1867-74.
- Zhao,L.;Xue, T.; Shang, F.; Sun, H.; Baolin (2010).** Capsular Polysaccharide Synthesis and Two-Component System To Regulate Sensing Associates with the KdpDE *Staphylococcus aureus* AI-2 Quorum. *Infect. Immun.* 2010, 78(8):3506.
- Zimmann, P.; Steinbrügge, A.; Schniederberend, M.;Jung, K.; Altendorf, K. (2007).** The extension of the fourth transmembrane helix of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* is involved in sensing. *J Bacteriol.* 2007 Oct;189(20):7326-34.

8. Danksagung

Viele Menschen haben mich bei der Realisierung meiner Doktorarbeit unterstützt und ich kann nicht alle hier erwähnen. Obwohl diese Auflistung also nicht vollständig sein kann, so möchte ich dennoch folgenden Personen für ihre besondere Unterstützung danken:

Herrn Professor Altendorf für die intensive Betreuung und die guten Arbeitsbedingungen, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Besonders auch für die Ermöglichung an der Teilnahme zwei toller Konferenzen in Amerika und meines Forschungsaufenthaltes in Groningen. Und schließlich danke ich ihm für die kritische Durchsicht und Begutachtung dieser Arbeit.

Meinen herzlichen Dank möchte ich an meine Betreuerin Dr. Petra Zimmann für ihre sehr gute Betreuung, unermüdliche Unterstützung, die kritische Durchsicht dieser Arbeit und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen richten.

Für die herzliche Aufnahme in ihre Gruppe geht ein Dankeschön an die Arbeitsgruppe "Membrane Enzymology" der Universität Groningen. Besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Dirk Jan Slotboom für die intensive Betreuung und Aufnahme in sein Labor. Nicht zu vergessen ist natürlich Inga, die mich stets unterstützt und ermuntert hat und mir sogar einen Platz auf ihrer Couch für fünf Monate überlassen hat.

Ein riesiges Dankeschön geht an Dorthé und Vera für all die Unterstützung, aufmunternden Worte und den Spaß, den wir stets zusammen hatten. Ich werde die Zeit in unserem Mädelslabor im Keller vermissen.

Nicht zu vergessen sind aber auch alle Mitarbeiter der ehemaligen Arbeitsgruppe Mikrobiologie, die mich über lange Jahre begleitet haben und stets für ein heiteres Arbeitsklima gesorgt haben, in dem es nie langweilig wurde.

Natürlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt und motiviert hat. Ohne sie wäre das alles nicht möglich gewesen.

Zu guter Letzt danke ich meiner Muckelfamilie, die mir so viel bedeutet und mich jeden Tag aufs neue erheitert und glücklich macht.

Curriculum vitae

First Name	Kerstin
Surname	Kipschull
Date of Birth	28.03.1981
Place of Birth	Hamm, Germany
Citizenship	German
Marital status	Single

Education

Since 05/2006	Doctoral thesis in biological science at the Department of Microbiology in the research group of Prof. Karlheinz Altendorf, University of Osnabrück Ph.D. thesis: Die Sensorkinase KdpD aus <i>Escherichia coli</i> : Funktionelle Reinigung, Nukleotidbindestudien und <i>in vivo</i> Protein-Protein Interaktionen
06/2005–03/2006	Diploma thesis at the Department of Microbiology, University of Osnabrück in the research group of Prof. Karlheinz Altendorf: Die Sensorkinase KdpD aus <i>Escherichia coli</i> : Konstruktion und Charakterisierung chromosomaler Mutationen im <i>kdpD</i> Gen, diploma thesis, University of Osnabrück”
10/2000–03/2006	Biology studies at the University of Osnabrück, major subjects: microbiology, biochemistry, animal physiology degree: biologist (diploma)
08/2003–12/2003	Exchange semester at the University of South Florida, USA
08/1991–06/2000	Beisenkamp Gymnasium Hamm, general qualification for university entrance (Abitur)

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. 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 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.

Osnabrück, 21.11.2011

(Ort, Datum)

(Unterschrift)