



**Untersuchungen zur Stimulus-Wahrnehmung und
Regulation des Zweikomponenten-Systems KdpD/KdpE aus
*Escherichia coli***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines

„Doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat)

des Fachbereiches Biologie / Chemie

an der Universität Osnabrück

von

Vera Laermann

Osnabrück, Mai 2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	A
Danksagung.....	B
Abkürzungen	C
1. Generelle Einleitung.....	1
1.1. Bedeutung von K^+ für die Zelle.....	1
1.2. K^+ -Transport in <i>Escherichia coli</i>	2
1.3. Zweikomponenten-Systeme	7
1.4. Das Zweikomponenten-System KdpD/KdpE aus <i>E. coli</i>	10
1.5. Die Sensorkinase KdpD	13
1.6. Natur des Stimulus von KdpD	17
1.7. Struktur und Zielsetzung dieser Arbeit	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Materialien	21
2.2. Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	22
2.3. Medien.....	24
2.4. Kultivierung	25
2.4.1. Kultivierung in Flüssigkultur	25
2.4.2. Kultivierung auf Festmedien.....	25
2.4.3. Mediumshift.....	25
2.5. Molekularbiologische und genetische Methoden.....	26
2.5.1. Plasmidisolierung.....	26
2.5.2. Isolierung genomischer DNA	26
2.5.3. Herstellung kompetenter Zellen nach der RbCl-Methode	26
2.5.4. Transformation nach der RbCl-Methode	27
2.5.5. Herstellung elektrokompenter Zellen.....	27
2.5.6. Elektroporation	27
2.5.7. DNA-Restriktion.....	27
2.5.8. DNA-Ligation	28
2.5.9. PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	28
2.5.10. Elektrophoretische Auftrennung von DNA	28
2.5.11. Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	29
2.5.12. DNA-Sequenzanalyse	29
2.5.13. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	29
2.5.14. Q-RT-PCR	29
2.5.15. ortsgerichtete Mutagenese von <i>kdpD</i> ^{D424} und <i>kdpD</i> ^{D474}	30
2.5.16. <i>counter-selection</i> Methode	31
2.5.16.1. Konstruktion von LB2240 Δ <i>kdpD</i>	33
2.5.16.2. Konstruktion von LB2240 Δ <i>kdpD</i> .KdpE-D52N	34
2.5.16.3. Konstruktion von LB2240 Δ <i>kdpD</i> . Δ <i>pta</i> . Δ <i>ackA</i>	34
2.6. Biochemische und analytische Methoden	35
2.6.1. Flammenphotometrische K^+ -Bestimmung.....	35
2.6.2. Bestimmung des intrazellulären pH-Werts	35
2.6.3. β -Galaktosidase Aktivitätstest	36
2.6.4. Bestimmung der zellulären Proteinkonzentration.....	36
2.6.5. MRM (<i>multiple reaction monitoring</i>).....	37

2.6.5.1. Probenvorbereitung	37
2.6.5.2. Absolute Quantifizierung mit schweren Standard-Peptiden	37
2.6.5.3. MRM und Analyse	38
3. Untersuchungen zur Natur des Stimulus für KdpD	40
3.1. Einleitung	40
3.2. Ergebnisse	42
3.2.1. Einfluss der externen K ⁺ -Konzentration und des pH-Werts auf das Kdp-System ..	42
3.2.2. Ursache der Inhibierung des Kdp-Systems bei hohen K ⁺ -Konzentrationen.....	46
3.2.3. Einfluss der Aspartat-Austausche in KdpD auf die Regulation der <i>kdpFABC</i> -	
Expression.....	50
3.2.4. Expressionskinetik des <i>kdpFABC</i> -Operons nach einer Abnahme der externen K ⁺ -	
Konzentration.....	53
3.3. Diskussion	55
3.4. Ausblick	64
4. Quantifizierung der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes und des KdpD/KdpE-	65
Systems	65
4.1. Einleitung	65
4.2. Ergebnisse	66
4.2.1. Absolute Quantifizierung von KdpFABC und KdpD/KdpE	66
4.2.2. Untersuchungen zur Autoregulation von KdpD/KdpE.....	71
4.3. Diskussion	75
4.4. Ausblick	81
5. Deletion von <i>kdpD</i> in <i>E. coli</i>.....	82
5.1. Einleitung	82
5.2. Ergebnisse	83
5.2.1. Konstruktion einer chromosomalen <i>kdpD</i> -Deletion in <i>E. coli</i> LB2240	83
5.2.2. Charakterisierung von LB2240Δ <i>kdpD</i>	84
5.2.3. Charakterisierung der Verzögerung des Wachstums von LB2240Δ <i>kdpD</i>	90
5.3. Diskussion	92
5.4. Ausblick	98
6. A. Zusammenfassung	100
6. B. Summary	102
7. Literaturverzeichnis.....	104
Anhang 1. Lebenslauf	115
Anhang 2. Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen	
Leistung	116

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Insbesondere bedanke ich mich bei Prof. Dr. Karlheinz Altendorf für die Möglichkeit, an dem interessanten Thema arbeiten zu können und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Außerdem möchte ich mich für die intensive Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken, aber auch dafür, eigenständig forschen zu können. Schließlich möchte ich mich an dieser Stelle herzlich für die außergewöhnlich angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Gottfried Uden bedanke ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Bei unseren Kooperationspartnern Kristin Surmann und Dr. Elke Hammer möchte ich mich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit und die interessanten Einblicke in die Massenspektrometrie bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Petra Zimmann für ihre sehr gute Betreuung und die Einführung in das Thema, aber auch für ihr fortwährendes Interesse an meiner Arbeit, nachdem sie die AG Altendorf verlassen hat.

Ein großes Dankeschön geht an meine ehemalige Kollegin und gute Freundin Dorthe Kixmüller für die unzähligen konstruktiven Gespräche und ihre stete Hilfsbereitschaft. Ganz besonders möchte ich mich aber für die vielen aufmunternden Worte und für die schöne Zeit im Labor (und abseits des Labors) bedanken.

Bei Dr. Gabi Deckers-Hebestreit bedanke ich mich für das Lesen vieler Manuskripte und Teile dieser Arbeit, sowie für ihre stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Bei meinen jetzigen Kollegen, den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe molekulare Mikrobiologie, sowie den ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mikrobiologie, bedanke ich mich für das familiäre Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft. Hier seien insbesondere Kerstin Kipschull und Inga Hänel genannt. Außerdem möchte ich mich bei meinen Kollegen und Freunden Emina Ćudić und Dominik Liße dafür bedanken, dass die letzten Jahre nicht nur eine lehrreiche, sondern auch eine tolle Zeit waren.

Zu guter Letzt möchte ich mich für die bedingungslose Unterstützung und die „Rückendeckung“ bei meinen Eltern, meiner Schwester und Lars bedanken.

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ap ^r	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
Bp	Basenpaare
ddH ₂ O	bidestilliertes H ₂ O
CA	<i>catalytic ATP-binding</i>
cDNA	komplementäre DNA
Cm ^r	Chloramphenicolresistenz
c _t	<i>cycle threshold</i>
DHp	Dimerisierungs- und Histidin-Phosphotransfer
K _x	Minimalmedium mit der K ⁺ -Konzentration x in mM
Kan ^r	Kanamycinresistenz
Kan ^s	Kanamycinsensitivität
kdp	K ⁺ -dependent
Da	Dalton
KdpD~P	Phospho-KdpD
KdpE~P	Phospho-KdpE
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ori	<i>origin of replication</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Q-RT-PCR	Quantitative Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
RBS	Ribosomen-Bindestelle
RT	Raumtemperatur

Sc ^r	Spectinomycinresistenz
Strep ^r	Streptomycinresistenz
Strep ^s	Streptomycinsensitivität
TG	Trockengewicht
TM	Transmembran
TMH	Transmembran-Helix
Usp	<i>universal stress protein</i>
WT	Wild-Typ

1. Generelle Einleitung

1.1. Bedeutung von K^+ für die Zelle

K^+ ist das wichtigste monovalente, intrazelluläre Kation in Prokaryoten und Eukaryoten (Epstein, 2003). Die cytoplasmatischen K^+ -Konzentrationen in Prokaryoten reichen von 18 mM in dem Süßwasserthermophilen *Thermoplasma acidophilum* (Searcy, 1976) bis zu 4 M in *Halobacterium halobium* (Walderhaug *et al.*, 1987). In dem Gram-negativen Enterobakterium *Escherichia coli* liegen die K^+ -Konzentration zwischen 150-600 mM vor (Epstein und Schultz, 1965). K^+ übernimmt folgende Funktionen in der Zelle: K^+ ist (i) ein osmotisch wirksames Solut, (ii) ein *second messenger*, (iii) ein Aktivator von Enzymen und Transportern und (iv) ein Regulator des intrazellulären pH-Werts (Epstein, 2003). Diese Funktionen werden im Folgenden erläutert.

Bakterien sind häufig Schwankungen der Osmolarität der Umwelt ausgesetzt, wobei ihre Toleranz gegenüber hoher Osmolarität der Umwelt variiert. Obligat halophile Spezies verfolgen eine sogenannte *salt-in* Adaption (Oren, 1999). Diese Spezies sind in Lebensräumen mit hohen NaCl-Konzentrationen zu finden und akkumulieren K^+ und, in einem geringeren Maße, Na^+ als intrazelluläres Osmolyt. Daher sind diese Spezies an eine hohe intrazelluläre Ionenstärke adaptiert. Im Gegensatz dazu benötigen nicht-halophile Spezies wie *E. coli*, die nicht an eine hohe Osmolarität der Umwelt adaptiert sind, eine effiziente Osmoregulation, um bei einem Wechsel der Umweltbedingungen osmotischem Stress entgegenwirken zu können. Dies ist erforderlich, da unter hyperosmotischen Bedingungen der zelluläre Wasserverlust Plasmolyse zur Folge hat, während massiver Wasserinflux unter hypoosmotischen Bedingungen zum Platzen der Zelle führen kann (Poolmann *et al.*, 2002). Die meisten nicht-halophilen Spezies verfolgen unter hyperosmotischem Stress die sogenannte *salt-out* Strategie, welche einen mehrstufigen Prozess umfasst. Eine erste Antwort auf hyperosmotischen Stress wird spezifisch durch eine intrazelluläre Anreicherung von K^+ bewerkstelligt (Harold *et al.*, 1974), während Na^+ aus der Zelle hinaus geschleust wird (Bakker, 1993). Der Anreicherung von positiven Ladungen wirkt die Zelle durch Synthese des Gegenions Glutaminsäure entgegen (Epstein, 2003). Aus der K^+ -Akkumulation resultiert eine Erhöhung der cytoplasmatischen Ionenstärke, die zu einer Beeinträchtigung der Enzymaktivitäten führen kann. Daher wird der K^+ -Glutamat-Komplex anschließend zur Daueranpassung gegen elektroneutrale, polare „kompatible Solute“ ausgetauscht, wobei diese entweder aus dem Medium aufgenommen oder durch die Zelle neu synthetisiert werden (Csonka, 1989; Epstein, 1986). Die am häufigsten vorkommenden

1. Generelle Einleitung

„kompatiblen Solute“ sind Polyole (wie z.B. Glycerol), nichtreduzierende Zucker (Saccharose und Trehalose), Aminosäuren (Glutamat, Prolin und Betain), sowie die Tetrahydropyrimidin-Derivate Ectoin und Hydroxyectoin (Csonka, 1989; Csonka und Hanson, 1991). K^+ -Glutamat wirkt dabei als *second messenger*, welcher die inhibitorische Interaktion der RNA-Polymerase mit dem σ^{38} -Promotor aufhebt und somit die Transkription von Genen, welche für „kompatible Solute“ kodieren, induziert, während die Transkription durch σ^{70} inhibiert wird (Lee und Gralla, 2004). Gleichzeitig aktivieren hohe, intrazelluläre K^+ -Konzentrationen die Aktivität von Transportsysteme, wie zum Beispiel dem Glycin-Betain Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum*, OpuA aus *Lactobacillus lactis* und ProP aus *E. coli* (Farwick *et al.*, 1995; Mahmood *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2005), als Antwort auf den hyperosmotischen Stress.

Im Zuge einer Ansäuerung der Umwelt müssen, zur Wahrung der intrazellulären Neutralität, Protonen aus dem Cytoplasma entfernt werden und somit ein pH-Gradient (ΔpH) über der Cytoplasmamembran aufgebaut werden. Die Fähigkeit von *E. coli* einen pH-Gradienten (intern alkalisch) aufzubauen, ist dabei von der K^+ -Aufnahme der Zelle abhängig (Kroll und Booth, 1981; Kroll und Booth, 1983; Booth, 1985). Dementsprechend konnte in K^+ -freien Zellen kein pH-Gradient generiert werden. Die Zugabe von K^+ stellte die Fähigkeit dieser Zellen wieder her, einen pH-Gradienten aufzubauen (Kroll und Booth, 1981; Kroll und Booth, 1983).

1.2. K^+ -Transport in *Escherichia coli*

Zur Bewerkstelligung einer schnellen Antwort auf eine Veränderung der Osmolarität des Mediums besitzt *E. coli* verschiedene K^+ -Transportsysteme und K^+ -Kanäle. K^+ -Efflux erfolgt über die homologen K^+ -Kanäle KefB und KefC (Bakker *et al.*, 1987; Booth *et al.*, 1996), sowie einen K^+/H^+ -Antiporter (Booth, 1985). Im Zuge einer plötzlichen, starken Erniedrigung der Osmolarität der Umwelt, öffnen sich gröÙenselektive, mechanosensitive Kanäle (MscS, MscM, MscL), über die K^+ und andere Ionen, sowie „kompatible Solute“ aus der Zelle herausströmen können (Sukharev *et al.*, 1997).

Die K^+ -Aufnahmesysteme von *E. coli* sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Die K^+ -Aufnahme erfolgt hauptsächlich über die konstitutiv exprimierten Trk- und Kup-Transportsysteme (Bossemeyer *et al.*, 1989; Dosch *et al.*, 1991; Schlösser *et al.*, 1992) und wird durch Protonen-Symport energetisiert (Stumpe *et al.*, 1996). Das Trk-Transportsystem umfasst die Membran-integralen Proteine TrkG/TrkH, wobei TrkG und TrkH in 41% der Aminosäuresequenz übereinstimmen (Schlösser *et al.*, 1995) und das NAD(H) bindende, periphere

1. Generelle Einleitung

Membranprotein TrkA (Schlösser *et al.*, 1993). Die K^+ -Aufnahme über Trk benötigt die protonenmotorische Kraft (pmf), sowie ATP (Rhoads *et al.*, 1977), wobei der K^+ -Transport durch die pmf energetisiert wird und die ATP-Bindung eine regulatorische Rolle übernimmt (Stewart *et al.*, 1985). Der Trk-Transportkomplex weist eine relativ geringe K^+ -Affinität ($K_m \sim 1 \text{ mM}$; Rhoads *et al.*, 1976) aber eine hohe K^+ -Transportrate auf ($v_{\max} \sim 500 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ Trockengewicht; Rhoads *et al.*, 1976).

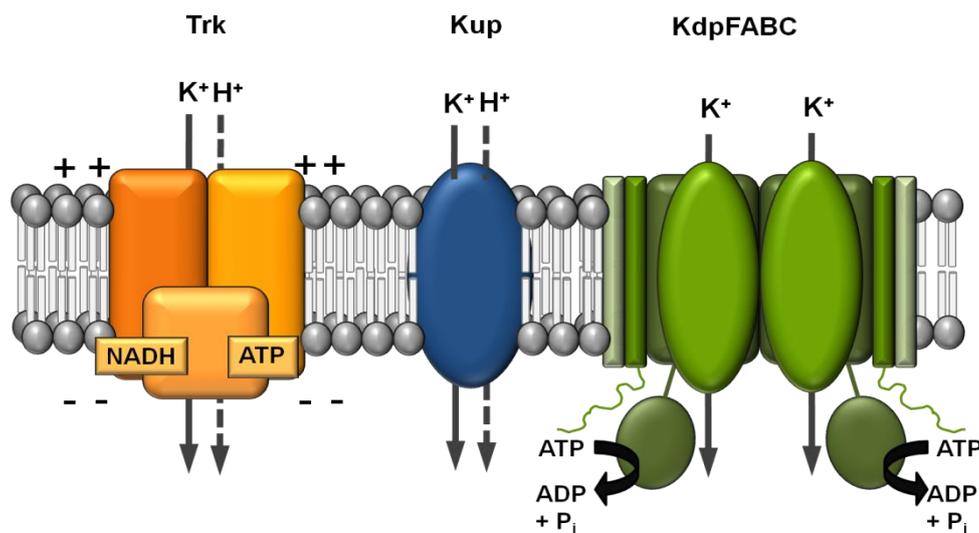


Abb. 1.1. Wege der K^+ -Aufnahme in *Escherichia coli*.

Kup ist ebenfalls ein konstitutiv exprimierter K^+ -Transporter mit einer relativ geringen K^+ -Affinität ($K_m \sim 1 \text{ mM}$; Rhoads *et al.* 1976). Im Gegensatz zu Trk weist Kup jedoch lediglich eine geringe K^+ -Transportrate auf ($v_{\max} \sim 40 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ Trockengewicht; Rhoads *et al.*, 1976). Unter hyperosmotischem Stress und gleichzeitig einem niedrigen externen pH-Wert wird der K^+ -Transport in *E. coli* überwiegend durch Kup bewerkstelligt (Trchounian und Kobayashi, 1999).

Sinkt die externe K^+ -Konzentration unter 1 mM, ist die Affinität der konstitutiv exprimierten K^+ -Transporter nicht mehr ausreichend, um die Zelle mit K^+ zu versorgen. Unter diesen Bedingungen wird die Synthese des hoch-affinen K^+ -Transportkomplexes KdpFABC (K^+ -dependent) induziert, welcher unter K^+ -limitierten Wachstumsbedingungen einen K^+ -Gradienten von 4×10^6 über der Cytoplasmamembran erzeugen kann (Walderhaug *et al.*, 1987). Der KdpFABC-Komplex umfasst vier membranständige Untereinheiten und besitzt eine außergewöhnlich hohe K^+ -Affinität ($K_m \sim 0,002 \text{ mM}$; Rhoads *et al.*, 1976).

1. Generelle Einleitung

Der KdpFABC-Komplex gehört zu den P-Typ ATPasen, primäre Ionenpumpen, welche Kationen unter ATP-Hydrolyse über die Membran transportieren. Kennzeichnend für P-Typ ATPasen ist die Bildung eines transienten Phosphointermediats durch die Autophosphorylierung eines konservierten Aspartatrests, welche mit dem Translokationsprozeß von Ionen verbunden ist (Møller *et al.*, 1995). Eine für P-Typ ATPasen charakteristische Eigenschaft ist ein katalytischer Reaktionszyklus zwischen zwei Konformationszuständen, E1 und E2 (Møller *et al.*, 1995). Diese zwei Konformationszustände weisen unterschiedliche strukturelle Eigenschaften und Bindungsaffinitäten für ATP und das spezifische Substrat auf. Der zyklische Wechsel von E1 und E2 wird durch die Bildung und Hydrolyse des Phosphointermediats getrieben und resultiert in der Translokation des Substrats. Ein weiteres Charakteristikum von P-Typ ATPasen ist die spezifische Hemmbarkeit durch mikromolare Konzentrationen von ortho-Vanadat, welches die Ausbildung des Phosphointermediats inhibiert (Sørensen *et al.*, 2004). Innerhalb der P-Typ ATPasen nimmt der KdpFABC-Komplex eine Sonderstellung ein, da die katalytische Aktivität (ATP-Hydrolyse) und der Substrattransport (Ionentransport) in zwei verschiedenen Untereinheiten, KdpB und KdpA, lokalisiert ist (Bramkamp *et al.*, 2007). Diese Sonderstellung wird weiterhin durch das Vorhandensein zweier zusätzlicher Untereinheiten, KdpC und KdpF, im KdpFABC-Komplex untermauert. Die Untereinheiten KdpF, KdpA, KdpB und KdpC liegen im KdpFABC-Komplex in einer 1:1:1:1-Stöchiometrie vor, wobei der KdpFABC-Komplex vermutlich als Dimer aktiv ist (Heitkamp *et al.*, 2008). Die KdpB-Untereinheit zeigt deutliche Homologien zu anderen P-Typ ATPasen und energetisiert den K⁺-Transport des KdpFABC-Komplexes durch die Bindung und Hydrolyse von ATP (Siebers und Altendorf, 1989; Siebers und Altendorf, 1993). KdpB besitzt ein Molekulargewicht von 72 kDa und umfasst vermutlich sieben Transmembran-Helices (TMHs) (Altendorf *et al.*, 1998), sowie die für P-Typ ATPasen typische Nukleotidbinde-Domäne (N-Domäne), Phosphorylierungs-Domäne (P-Domäne) und Attenuator-Domäne (A-Domäne; Abb. 1.2. A) (Greie und Altendorf, 2007). Zwischen TMH4 und TMH5 befindet sich eine cytoplasmatische Schleife, die die konservierte P- und N-Domäne beinhaltet (Bramkamp *et al.*, 2007). Die N-Domäne ist dabei über einen flexiblen Linker in die P-Domäne integriert. Die P-Domäne enthält den Aspartatrest, welcher reversibel durch Hydrolyse des in der N-Domäne gebundenen ATPs phosphoryliert wird (Abb. 1.2. A). Hierdurch wird das transiente Phosphointermediat (β -Aspartylphosphat) gebildet, welches namensgebend für P-Typ ATPasen ist. Die A-Domäne hingegen ist zwischen TMH2 und TMH3 lokalisiert und umfasst ein hoch konserviertes TGE-Motiv, welches eine Rolle bei der

1. Generelle Einleitung

Dephosphorylierung von ATPasen spielt (Møller *et al.*, 1995). Während des (De-) Phosphorylierungs-Kreislaufes werden innerhalb von P-Typ ATPasen Domänen-Bewegungen vollzogen, die in einem Ionen-Transport resultieren (Bramkamp *et al.*, 2007).

Die KdpA-Untereinheit besitzt ein Molekulargewicht von 59 kDa und ist für die K^+ -Translokation verantwortlich (Buurmann *et al.*, 1995). KdpA weist eine strukturelle und funktionelle Homologie zu K^+ -Kanälen vom MPM-Typ auf (*membrane helix-P-loop-membrane helix*; Durell *et al.*, 2000) und ist mit 10 TMHs in der Cytoplasmamembran verankert. KdpA besitzt vier mutmaßliche MPM-Motive, wobei jedes MPM-Motiv ein sogenanntes P-Segment umfasst, welches von zwei TMHs flankiert wird. Die P-Segmente besitzen jeweils eine kurze, absteigende α -Helix, gefolgt von einem aufsteigenden Bereich konservierter Reste, die den Selektivitäts-Filter bilden (Doyle *et al.*, 1998). Die hohe Sequenzhomologie zwischen dem gut charakterisierten K^+ -Kanal KcsA aus *Streptomyces lividans* und KdpA erlaubte die Erstellung eines entsprechenden Struktur-Modells von KdpA (Abb. 1.2. B). In diesem Modell weisen die MPM-Motive eine symmetrische, tetramere Anordnung auf, so dass die P-Segmente eine zentrale, Ionen-selektive Transmembran-Pore ausbilden (Greie und Altendorf, 2007).

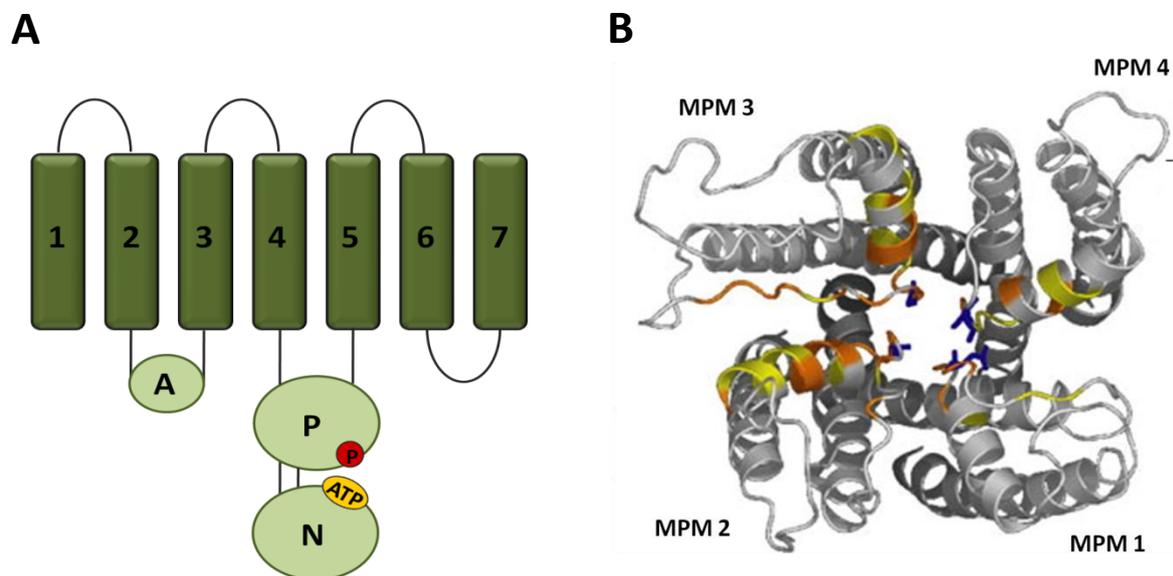


Abb. 1.2. Schematische Topologie der Untereinheit KdpB (A) und K^+ -Kanal Modell der Untereinheit KdpA (B) (verändert nach Bramkamp *et al.*, 2007).

A. Die sieben TMHs der Untereinheit KdpB sind in dunkelgrün dargestellt. Die erste cytoplasmatische Schleife zwischen TMH2 und TMH3 beinhaltet die A-Domäne. Die zweite cytoplasmatische Schleife ist zwischen TMH4 und TMH5 lokalisiert und umfasst die P- und N-Domäne. Die ATP-Bindestelle in der N-Domäne ist durch ATP gekennzeichnet. Der konservierte Aspartatrest in der P-Domäne, welcher reversibel phosphoryliert wird, ist durch einen roten Kreis gekennzeichnet.

1. Generelle Einleitung

B. Die vier MPM-Domänen der Untereinheit KdpA wurden basierend auf den Koordinaten des KcsA K⁺-Kanals aus *S. lividans* (Zhou *et al.*, 2001) modelliert. Aminosäurereste, deren Mutagenese die K⁺-Bindung und K⁺-Selektivität des KdpFABC-Komplexes beeinträchtigten, sind farbig gekennzeichnet: gelb: geringer Effekt, orange: mittlerer Effekt, blau: großer Effekt.

Die Kopplung von ATP-Hydrolyse (KdpB) und K⁺-Transport (KdpA) wird wahrscheinlich durch zwei konservierte, polare Reste (D583 und K586) in der fünften TMH von KdpB vermittelt. Eine gerichtete Mutagenese dieser Aminosäuren (AS) zeigte, dass ein Verlust dieser Ladungen in einer Entkopplung von ATP-Hydrolyse und K⁺-Transport resultierte (Bramkamp und Altendorf, 2005). Es wird daher vermutet, dass D583 und K586 einen starken Dipol ausbilden, der wiederum Auswirkungen auf ein von KdpA gebundenes K⁺ haben könnte und dieses durch die Pore bewegt (Becker *et al.*, 2007). Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass mittels Einzelmolekül-Transmissions-Elektronenmikroskopie ein Kontakt zwischen KdpA und der fünften TMH von KdpB gezeigt werden konnte (Heitkamp *et al.*, 2009).

Die Untereinheit KdpC (20 kDa) besteht aus einer N-terminalen TMH und einer darauf folgenden C-terminalen, cytoplasmatischen Domäne. Es wurde gezeigt, dass KdpC essentiell für die Funktion des KdpFABC-Komplexes ist (Gaßel und Altendorf, 2001). Hierfür scheint insbesondere der konservierte, C-terminale Bereich von Bedeutung zu sein, da der Komplex durch eine in diesem Bereich lokalisierte Deletion von 11 AS inaktiviert werden konnte (Gaßel und Altendorf, 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass die isolierte, cytoplasmatische Domäne spezifisch ATP binden kann (Ahnert *et al.*, 2006). Daher wird angenommen, dass KdpC eine regulatorische Funktion innerhalb des KdpFABC-Komplexes einnimmt. Da die ATP-Bindestelle im C-terminalen Segment von KdpC lokalisiert ist, wäre ein Kontakt mit der katalytischen Domäne von KdpB vorstellbar. Möglicherweise fungiert KdpC als katalytisches Chaperon, welches an der ATP-Bindung beteiligt ist und somit die ATP-Bindungsaffinität der hoch konservierten Phosphorylierungsstelle von KdpB erhöht (Greie und Altendorf, 2007).

KdpF (3 kD) ist ein aus 29 Aminosäuren bestehendes, die Membran überspannendes Peptid und stabilisiert vermutlich den Komplex, ist jedoch für die Transportaktivität *in vivo* nicht essentiell (Gaßel *et al.*, 1999). Im Gegensatz hierzu zeigte der isolierte KdpFABC-Komplex in der Abwesenheit von KdpF keine ATPase-Aktivität. Die Aktivität konnte jedoch durch das Hinzufügen von gereinigtem KdpF oder *E. coli* Lipiden wiederhergestellt werden (Gaßel *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wird angenommen, dass das stark hydrophobe KdpF-Polypeptid eine Lipid-ähnliche, stabilisierende Wirkung auf den KdpFABC-Komplex ausübt (Bramkamp *et al.*, 2007).

1. Generelle Einleitung

Da der Transport von K^+ über den KdpFABC-Komplex an die Hydrolyse von ATP gekoppelt ist, wird das zugehörige *kdpFABC*-Operon nicht konstitutiv exprimiert, sondern ausschließlich unter extremen Bedingungen induziert. Die Regulation der *kdpFABC*-Expression unterliegt dem Zweikomponenten-System KdpD/KdpE.

1.3. Zweikomponenten-Systeme

Ständig wechselnde Umweltbedingungen erfordern effiziente Adaptationsmechanismen von Bakterien, welche unter anderem durch Zweikomponenten-Systeme vermittelt werden. Ein prototypisches Zweikomponenten-System besteht aus einer Sensorkinase und einem Antwortregulator (Abb. 1.3). Ein spezifischer Stimulus der Umwelt wird durch die in der Cytoplasmamembran lokalisierten Sensorkinase detektiert und in Form einer Phosphorylgruppe auf einen cytoplasmatischen Antwortregulator übertragen. Typischerweise reguliert der Antwortregulator daraufhin als Transkriptionsfaktor die Expression von Zielgenen, die eine adaptive Antwort auf den Stimulus ermöglicht (Hoch und Silhavy, 1995). Sensorkinasen und Antwortregulatoren können funktionell in zwei verschiedene Domänen unterteilt werden; je eine variable, Stimulus-spezifische Domäne, sowie eine hoch konservierte Domäne, die an der Phosphorylierung und an dem Phosphotransfer zwischen Sensorkinase und Antwortregulator beteiligt ist (Abb. 1.3).

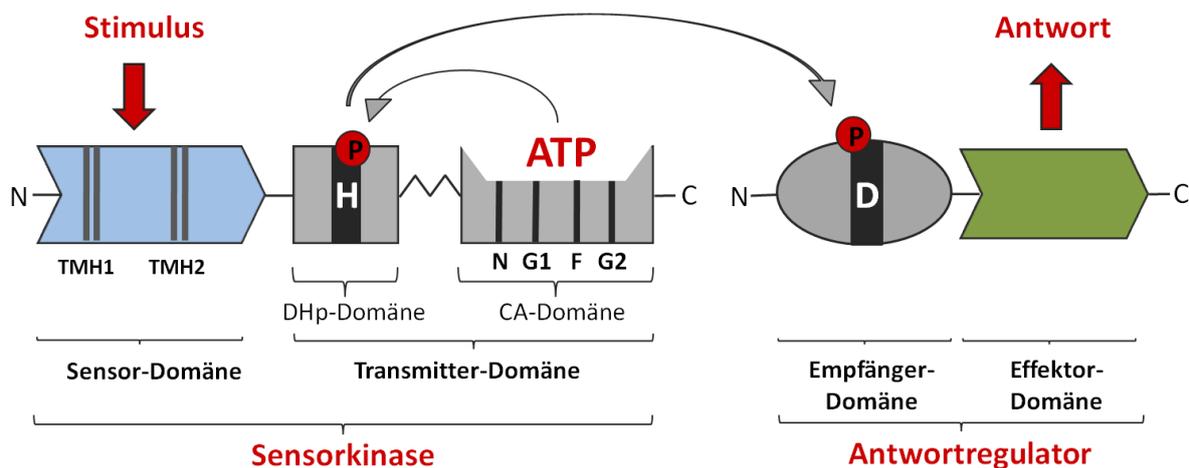


Abb. 1.3. Schematische Darstellung der Domänenstruktur eines prototypischen Zweikomponenten-Systems (verändert nach Stewart, 2010). Die konservierten Sequenzmotive sind mit H, N, G1, F, G2 und D gekennzeichnet. Der Informationsfluss ist durch Pfeile dargestellt. Die Transmembran-Helices (TMH1 und TMH2) sind gekennzeichnet. Konservierte Domänen sind in grau, Stimulus-spezifische Domänen farbig dargestellt.

1. Generelle Einleitung

Die Sensorkinase besitzt eine N-terminale, an den spezifischen Stimulus adaptierte Sensor-Domäne, die in der Cytoplasmamembran verankert ist und somit üblicherweise eine extracytoplasmatische Domäne für die Stimulus-Wahrnehmung aufweist (Cheung und Hendrickson, 2010). Ein Stimulus kann dabei entweder physikalischer (z.B. Osmolarität), oder chemischer (z.B. Konzentration von Nährstoffen) Natur sein. Die variable Sensor-Domäne ist über einen Linker mit der konservierten, im Cytoplasma lokalisierten Transmitter-Domäne verbunden, welche das Signal (Phosphorylgruppe) auf den Antwortregulator überträgt (Abb. 1.3).

Viele Sensorkinasen können drei verschiedene Phosphotransfer-Reaktionen katalysieren: (i) Autophosphorylierung (auch Autokinase genannt; Phosphotransfer von ATP auf einen konservierten Histidinrest), (ii) Phosphorylierung des zugehörigen Antwortregulators (Phosphotransfer von His~P auf einen konservierten Aspartatrest) und (iii) Dephosphorylierung des Antwortregulators (Freisetzung der Phosphorylgruppe) (Stewart *et al.*, 2010).

Die Transmitter-Domäne besitzt in einer DHP-Domäne (Dimerisierungs- und Histidin-Phosphotransfer) einen hoch konservierten Histidinrest (H-Motiv), von welchem aus die Phosphorylierungskaskade gestartet wird. Außerdem bilden viele Sensorkinasen, wie z.B. KdpD oder EnvZ, über diese DHP-Domäne Dimere (Tomomori *et al.*, 1999). DHP-Domänen bestehen aus zwei antiparallelen Helices und bilden so ein vier Helix-Bündel im Sensorkinase-Dimer (Abb. 1.4). Der DHP-Domäne folgt eine CA-Domäne (*catalytic ATP-binding*) mit den vier konservierten Sequenzmotiven N, G1, F und G2 (Parkinson und Kofoid, 1992), die eine ATP-Bindestelle formen (Abb. 1.4) und an der Translokation der Phosphorylgruppe beteiligt sind (Tanaka *et al.*, 1998). Die CA-Domäne weist eine α/β -sandwich Faltung auf, in welcher die Sequenzmotiven N, G1, F und G2 die ATP-Bindecavität ausbilden. Ein flexibler *P-loop* zwischen den Sequenzmotiven F und G2 (G1 und G2 in Abb. 1.4) formt dabei den sogenannten ATP-Deckel, welcher durch die Bindung von Nukleotiden in der Bindecavität verschiedene Konformationen annehmen kann (Bilwes *et al.*, 2001). Für die Autophosphorylierung muss eine transiente Interaktion zwischen der DHP- und der CA-Domäne ausgebildet werden, um die Phosphorylgruppe von ATP (gebunden in der CA-Domäne) auf den Histidinrest (in der DHP-Domäne lokalisiert) zu übertragen (Abb. 1.4). Um zu gewährleisten, dass eine Autophosphorylierung ausschließlich nach erfolgter Stimulus-Wahrnehmung erfolgt, muss diese Interaktion wiederum mechanistisch durch die Sensor-Domäne kontrolliert werden (Stewart, 2010).

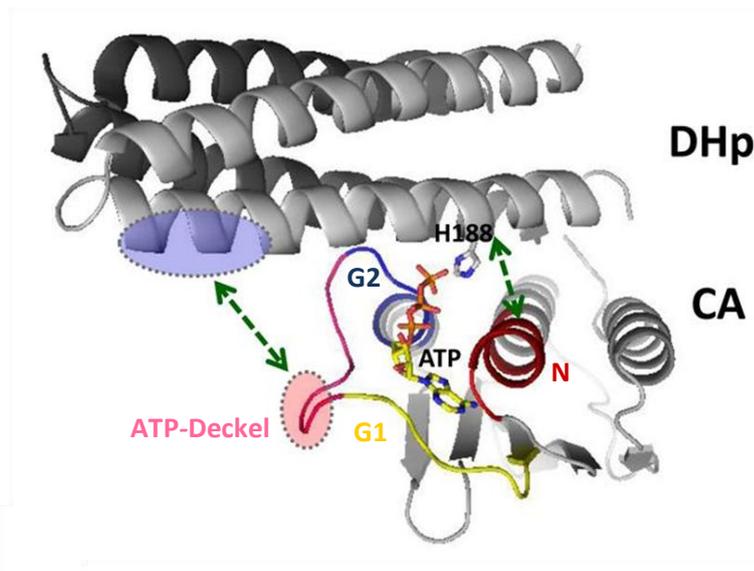


Abb. 1.4. Modell der DHp- und CA-Domäne der Sensorkinase DesK im Autokinase-Modus (verändert nach Albanesi *et al.*, 2009). Das Modell wurde durch eine manuelle Kopplung einer monomeren CA-Domäne von DesK an die dimere DesK DHp-Domäne generiert. Hierbei wurde der konservierte Histidinrest (H188) in engen Kontakt mit der γ -Phosphorylgruppe des in der CA-Domäne gebundenen ATPs gebracht. Diese Kopplung ermöglicht weiterhin elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der DHp- und CA-Domäne (durch grüne Pfeile gekennzeichnet). In der CA-Domäne sind die konservierten Sequenzmotive, die die ATP-Bindecaevität bilden, nach folgendem Farbcode gekennzeichnet: N: rot, G1: gelb, G2: blau. Das Sequenzmotiv F ist in DesK nicht vorhanden.

Der Antwortregulator besitzt eine N-terminale, konservierte Empfänger-Domäne. Die Phosphorylgruppe wird, ausgehend von dem konservierten Histidinrest der Transmitter-Domäne der Sensorkinase, auf einen konservierten Aspartatrest in der Empfänger-Domäne transferiert (Abb. 1.3). Die Empfänger-Domäne ist wiederum mit einer variablen, DNA-bindenden Effektor-Domäne verbunden. Es wird davon ausgegangen, dass Empfänger-Domänen von Antwortregulatoren in einem Gleichgewicht zwischen einer „aktiven“ und „inaktiven“ Konformation in der Zelle vorliegen. Die Phosphorylierung des konservierten Aspartatrests in der Empfänger-Domäne stabilisiert die „aktive“ Konformation des Antwortregulators, die eine Dimerisierung der Empfänger-Domänen zur Folge hat und daraufhin eine DNA-Bindung ermöglicht (Gao und Stock, 2010).

In vitro konnte gezeigt werden, dass viele Sensorkinasen den korrespondierenden Antwortregulator ebenfalls dephosphorylieren können. Diese Phosphatase-Aktivität (Song *et al.*, 2004) versetzt das Zweikomponenten-System wieder in einen neutralen Zustand und verhindert eine unerwünschte Phosphorylierung des Antwortregulators durch einen anderen Phosphodonator. Der Mechanismus der Phosphatase-Aktivität ist jedoch deutlich weniger gut

1. Generelle Einleitung

verstanden, als die Autophosphorylierungs- und Phosphotransferase-Aktivität (Kenney *et al.*, 2010; Huynh und Stewart, 2011).

1.4. Das Zweikomponenten-System KdpD/KdpE aus *E. coli*

Das Zweikomponenten-System KdpD/KdpE reguliert die Expression des *kdpFABC*-Operons, welches für den hoch-affinen KdpFABC-Komplex kodiert. Das KdpD/KdpE Zweikomponenten-System wird unter K^+ -limitierenden Umweltbedingungen, sowie, in einem deutlich geringeren Ausmaß, unter hyperosmotischem Stress aktiviert. Bei einem Wechsel zu diesen Umweltbedingungen induziert KdpD/KdpE die Expression des *kdpFABC*-Operons um die K^+ -Aufnahme der Zelle zu sichern.

Unter induzierenden Bedingungen wird der konservierte Histidinrest (H673) in der DHp-Domäne der Sensor kinase KdpD autophosphoryliert (Abb. 1.5. induzierende Bedingungen).

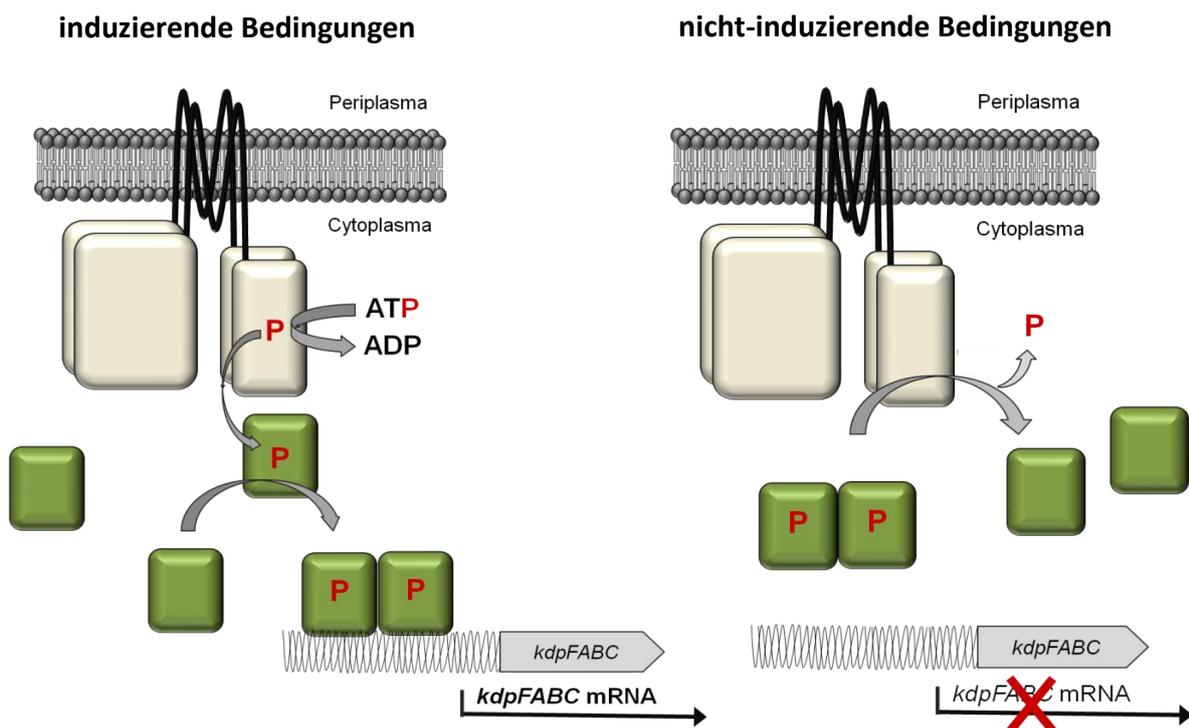


Abb. 1.5. Modell der KdpD/KdpE-Signaltransduktionskaskade unter induzierenden Bedingungen bzw. nicht-induzierenden Bedingungen.

KdpD liegt in der Zelle als Homo-Dimer vor, wobei ein Monomer im Zuge einer trans-Phosphorylierung eine Phosphorylgruppe auf H673 des anderen Monomers überträgt (Heermann *et al.*, 1998). Anschließend wird die Phosphorylgruppe durch die Phosphotransferase-Aktivität von KdpD auf einen konservierten Aspartatrest (D52) der

1. Generelle Einleitung

Empfänger-Domäne (AS 1-120) des Antwortregulators KdpE übertragen (Nakashima *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 1997; Lucassen, 1998). Die Phosphorylierung von KdpE wird wahrscheinlich durch KdpE selbst katalysiert, da gezeigt werden konnte, dass KdpE *in vitro* durch Acetylphosphat phosphoryliert werden kann (Lucassen, 1998). Die Phosphorylierung von KdpE stabilisiert die „aktive“ Konformation und induziert die Dimerisierung der Empfänger-Domänen. Jedes KdpE-Monomer bindet im dimeren KdpE-Komplex über ein *helix-turn-helix* Motiv in der Effektor-Domäne (AS 129-225) an jeweils eine Halbseite S1 (TTTATA) bzw. S2 (TTTACA) der entsprechenden DNA-Bindestelle. Diese zwei Halbseiten sind durch 5 Basenpaare (Bp) separiert. Die Bindung des KdpE-Dimers an die etwa 20 Bp stromaufwärts des *kdpFABC*-Promotors lokalisierte DNA-Bindestelle induziert die *kdpFABC*-Expression (Sugiura *et al.*, 1992). Die Struktur des KdpE-DNA-Komplexes konnte kürzlich gelöst werden (Narayanan *et al.*, 2014). Interessanterweise zeigt sich, dass der KdpE-Komplex eine asymmetrische Konformation aufweist, wobei ein KdpE-Monomer (KdpE_A) eine kompakte Struktur ausbildet, im Gegensatz zu einer ausgedehnten Struktur des zweiten Monomers (KdpE_B) (Abb. 1.6). Die kompakte Struktur von KdpE_A resultiert aus polaren Kontakten zwischen Aminosäureresten der Empfänger-Domäne (D66 und W70) und der Effektor-Domäne (R141 und R158) dieses Monomers. Eine gerichtete Mutagenese dieser Aminosäurereste führte zu einer signifikanten Reduktion oder vollständigem Verlust der Transkriptionsaktivierung durch das KdpE-Dimer (Narayanan *et al.*, 2014). Aufgrund der

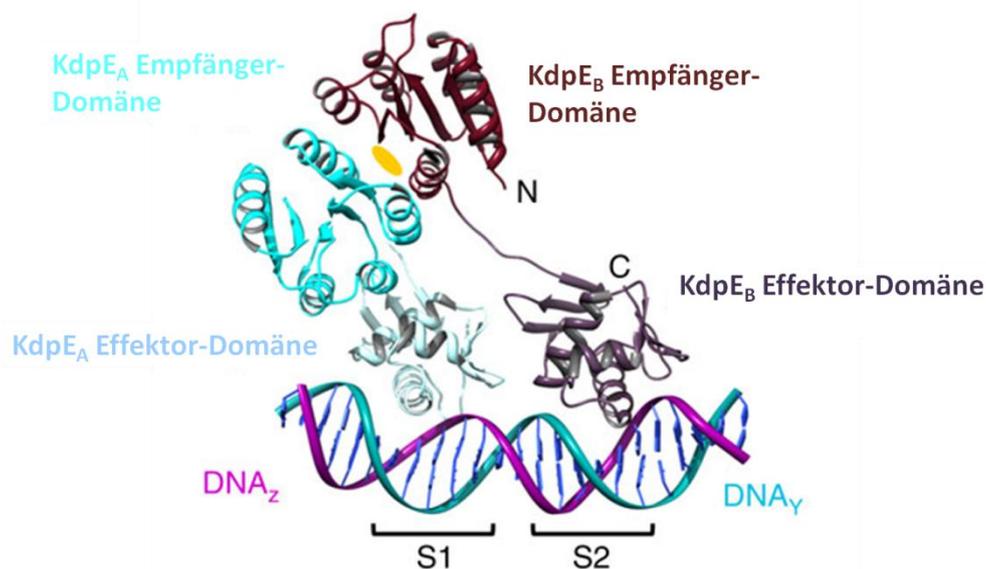


Abb. 1.6. Struktur des KdpE-DNA-Komplexes (verändert nach Narayanan *et al.*, 2014). Das kompakte KdpE_A Molekül ist in blaugrün (Empfänger-Domäne) bzw. hellblau (Effektor-Domäne) dargestellt. Das ausgedehnte KdpE_B Molekül ist in rot (Empfänger-Domäne) bzw. violett (Effektor-Domäne) dargestellt. S1 und S2 kennzeichnen jeweils die Halbseiten der DNA-Bindestelle. Der gelbe Kreis markiert die Symmetrie-Achse.

1. Generelle Einleitung

symmetrischen Anordnung der KdpE-Monomere im KdpE-Komplex ist die Ausbildung dieser Kontakte in KdpE_B nicht möglich (Narayanan *et al.*, 2014).

Neben der Autokinase- und der Phosphotransferase-Funktion besitzt KdpD ebenfalls eine Phosphatase-Aktivität (Jung *et al.*, 1997) und ist somit in der Lage, KdpE zu dephosphorylieren (Abb. 1.5, nicht-induzierende Bedingungen). Der dephosphorylierte, monomere Antwortregulator KdpE weist eine signifikant niedrigere Affinität zu der DNA-Bindestelle stromaufwärts des *kdpFABC*-Operons auf und die *kdpFABC*-Expression findet nicht mehr statt (Nakashima *et al.*, 1993).

Die Gene *kdpD* und *kdpE*, die für die Sensorkinase KdpD bzw. den Antwortregulator KdpE kodieren, sind in einem Operon *kdpDE* organisiert, welches stromabwärts des *kdpFABC*-Operons lokalisiert ist (Abb. 1.7) und bei 16,5 min auf dem *E. coli* Chromosom liegt (Bachmann, 1990). Das *kdpDE*-Operon besitzt einen konstitutiven Promotor, der ähnliche Consensus-Sequenzen wie die „-35“- und die „-10“-Region von typischen, vegetativen Promotoren in *E. coli* aufweist (Polarek *et al.*, 1992). Daher findet auch unter nicht-induzierenden Bedingungen eine basale *kdpDE*-Expression und, daraus folgend, eine basale Synthese von KdpD und KdpE statt. Der *kdpDE*-Promotor, sowie das Startkodon von *kdpD* sind innerhalb des *kdpC*-Gens lokalisiert, so dass die Leseraster von *kdpD* und *kdpC* mit acht Nukleotiden überlappen (Polarek *et al.*, 1992; Walderhaug *et al.*, 1992). Das *kdpFABC*-Operon besitzt, wie bereits erwähnt, einen durch das Zweikomponenten-System KdpD/KdpE induzierbaren Promotor, der stromaufwärts des Gens *kdpF* liegt. Es wird diskutiert, dass die *kdpDE*-Transkription unter induzierenden Bedingungen durch ein „Durchlesen“ der RNA-Polymerase durch das *kdpFABC*-Operon in das *kdpDE*-Operon hinein, ebenfalls erhöht wird (Abb. 1.7) (Polarek *et al.*, 1992; Voelkner *et al.*, 1993).

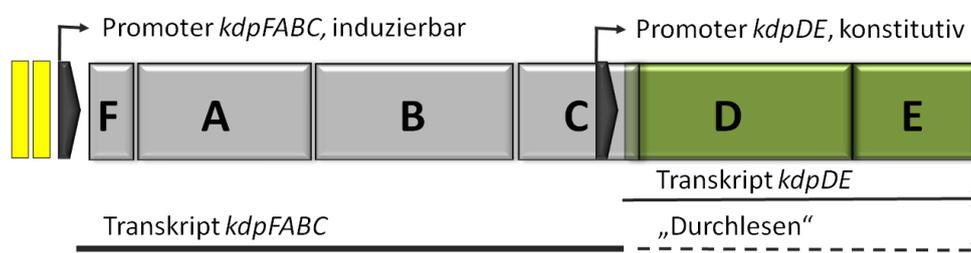


Abb. 1.7. Schematische Darstellung des *kdpFABC*- und *kdpDE*-Operons aus *E. coli*. Das *kdpFABC*-Operon ist in grau, das *kdpDE*-Operon in grün dargestellt. Die Pfeile symbolisieren den *kdpFABC*- bzw. den *kdpDE*-Promotor. Stromaufwärts des *kdpFABC*-Promotors ist der *kdpFABC*-Operator in gelb dargestellt, wobei jeder Kasten eine Halb-Seite der DNA-Bindestelle repräsentiert.

1.5. Die Sensorkinase KdpD

Die Sensorkinase KdpD besitzt ein Molekulargewicht von 98,9 kDa, umfasst 894 Aminosäuren und liegt in der Cytoplasmamembran als Homodimer vor (Heermann *et al.*, 1998). Die Topologie von KdpD konnte durch Untersuchungen mit LacZ- und PhoA-Fusionsproteinen, sowie durch Hydrophobizitäts-Profile bestimmt werden (Walderhaug *et al.*, 1992; Zimmann *et al.*, 1995). KdpD ist mit vier TMHs (TM1-TM4) in der Cytoplasmamembran verankert und umfasst eine große N-terminale und C-terminale Domäne, die jeweils im Cytoplasma lokalisiert ist.

Die Sensor-Domäne von KdpD umfasst 660 Aminosäuren und setzt sich aus den 400 N-terminalen Aminosäuren, den vier TMHs, einer darauf folgenden Arginin-reichen Region (Arginin-Cluster) und weiteren 140 Aminosäuren zusammen (Abb. 1.8). Die Sensor-Domäne ist über einen *coiled-coil* Linker mit der konservierten Transmitter-Domäne verbunden. Die C-terminale Transmitter-Domäne beinhaltet die für Sensorkinasen typische DHp- und CA-Domäne, inklusive der Sequenzmotive N, G1, F und G2 (Parkinson und Kofoid, 1992).

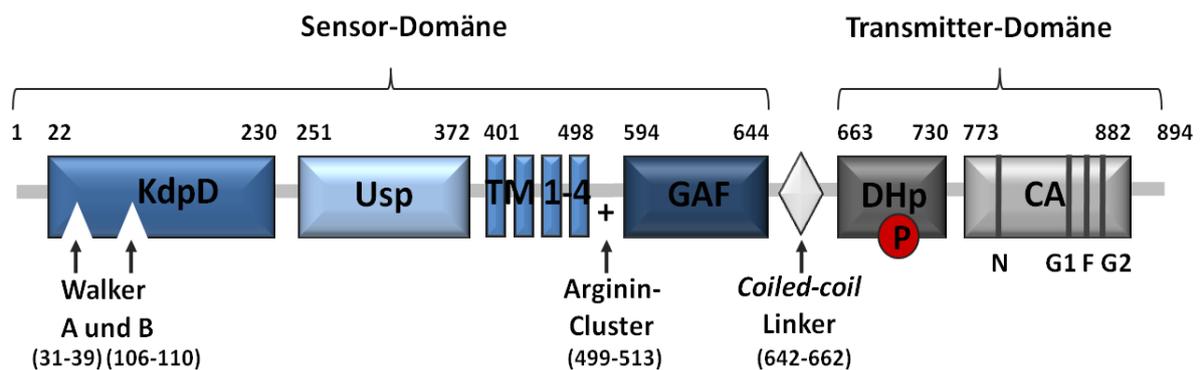


Abb. 1.8. Schematische Darstellung der Sensorkinase KdpD aus *E. coli*.

Die cytoplasmatische, N-terminale Domäne der Sensor-Domäne ist mit 400 Aminosäuren außergewöhnlich groß, wobei die Aminosäuresequenz innerhalb verschiedener KdpD-Proteine hoch konserviert, jedoch unter den Sensorkinasen einzigartig ist (Heermann *et al.*, 2003a). Die N-terminale Domäne liegt aufgrund der hydrophoben Aminosäuren 27-43 vermutlich Membran-assoziiert vor (Zimmann *et al.*, 1995). Es wurde gezeigt, dass ein stark verkürztes KdpD-Derivat KdpD/1-395, welches ausschließlich diese N-terminale Domäne umfasst (AS 1-395), eine KdpE~P abhängige, konstitutive *kdpFABC*-Expression induziert (Heermann *et al.*, 2003a). KdpD/1-395 zeigt jedoch *in vitro* weder Kinase- noch Phosphatase-Aktivität. Im Gegensatz hierzu vermittelt ein KdpD-Derivat mit einer inaktiven

1. Generelle Einleitung

Phosphorylierungsstelle (KdpD/H673Q) oder eine *kdpD*-Deletion keine *kdpFABC*-Expression (Heermann *et al.*, 2003a). *In vitro* konnte eine gesteigerte *kdpFABC*-Transkription in Anwesenheit der rekonstituierten N-terminalen Domäne beobachtet werden. Weiterhin zeigten *mobility shift* Experimente, dass die Menge an DNA-gebundenen KdpE~P in Gegenwart von KdpD/1-395 signifikant steigt. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Modell aufgestellt, in dem die N- und C-terminale Domäne von KdpD unter induzierenden Bedingungen interagieren und dadurch ein stabilisierender Effekt der N-terminalen Domäne (AS 1-395) auf die Bindung des phosphorylierten Antwortregulators KdpE~P an die entsprechende DNA-Bindestelle stromaufwärts des *kdpFABC*-Operons ermöglicht wird (Abb. 1.9. A). Weiterhin wurde postuliert, dass das Derivat KdpD/1-395

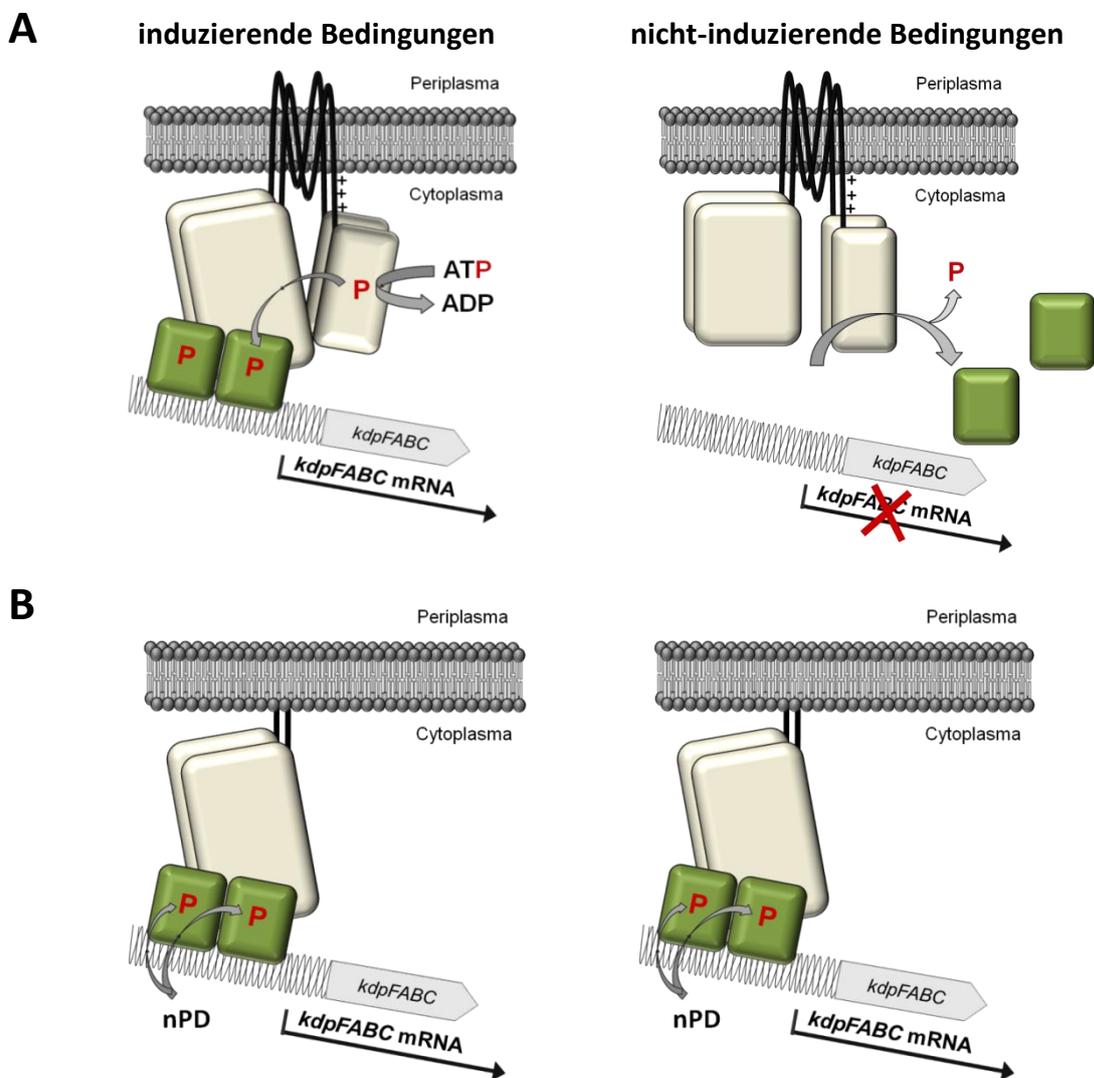


Abb. 1.9. Modell der KdpD/KdpE-Signaltransduktionskaskade (A) bzw. KdpD 1-395/KdpE-Signaltransduktionskaskade (B) (verändert nach Heermann *et al.*, 2003a).

nPD: niedermolekulare Phosphodonor.

1. Generelle Einleitung

diese stabilisierende Konformation einnimmt, wobei KdpE in Abwesenheit der Transmitter-Domäne von KdpD durch niedermolekulare Phosphodonor phosphoryliert werden kann (Abb. 1.9. B) (Heermann *et al.*, 2003a).

Die N-terminale Domäne beinhaltet ein konserviertes Sequenzmotiv, das klassischen ATP-Bindestellen (Walker A, Walker B) ähnelt (Jung und Altendorf, 1998a). Eine Deletion der Aminosäuren 12-128, welche diese Sequenzmotive beinhaltet, resultiert in einer erhöhten Phosphatase-Aktivität des verkürzten KdpD-Derivats und daraus folgend, in einer reduzierten *kdpFABC*-Expression unter induzierenden Bedingungen (Jung und Altendorf, 1998a). Die Phosphatase-Aktivität von KdpD wird durch ATP stimuliert (Jung und Altendorf, 1998a). Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Phosphatase-Aktivität dieses Derivats nicht länger von ATP abhängig ist. Daher wurde diskutiert, dass über eines der Sequenzmotive (Walker A) eine regulatorische ATP-Bindung erfolgt, die die Phosphatase-Aktivität von KdpD moduliert. Eine spezifische ATP-Bindung konnte jedoch *in vivo* nicht nachgewiesen werden (Hamann, 2008). Basierend auf einer Sequenzanalyse und einer Strukturmodellierung wurde in der N-terminale Domäne von KdpD weiterhin eine Usp-Domäne (*universal stress protein*) vorhergesagt (AS 253-373; Hermann *et al.*, 2009a). *E. coli* kodiert sechs verschiedene Usp-Proteine UspA, UspC, UspD, UspE, UspF und UspG, die aufgrund von Sequenzhomologien in zwei verschiedene Subgruppen unterteilt werden können (Gustavsson *et al.*, 2002). UspA, UspC und UspD werden in der UspA-Subfamilie zusammengefasst, während UspF und UspG die UspFG-Subfamilie bilden. UspE umfasst zwei Usp-Domänen, wobei eine dieser Usp-Domänen der UspA-Subfamilie zugehörig ist, während die andere enger mit der UspFG-Subfamilie verwandt ist. Die Synthese von Usp-Proteinen wird in *E. coli* als Antwort auf diverse Stressfaktoren erhöht, wie z. B. Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphat-Mangel, Hitzestress, oxidativer Stress oder osmotischer Stress (van Bogelen *et al.*, 1990). Die Usp-Domäne in KdpD zeigt Homologien zu der UspA-Subfamilie (Heermann *et al.*, 2009a) und beinhaltet ein sechs AS umfassendes Motiv, welches eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Heterodimeren von Usp-Proteinen der UspA-Subfamilie spielt (Nachin *et al.*, 2008). Es wurde gezeigt, dass das Stress-Protein UspC spezifisch mit der Usp-Domäne von KdpD interagiert (Heermann *et al.*, 2009a). Die Autoren diskutierten, dass diese Interaktion den oben beschriebenen KdpD/KdpE~P/DNA-Komplex (Abb. 1.9) unter Salzstress stabilisiert und somit eine *kdpFABC*-Expression stimuliert wird. Weiterhin wurde durch einen Austausch der Usp-Domäne in KdpD gegen homologe Usp-Domänen anderer KdpD-Proteine gezeigt, dass Substitutionen dieser Domäne die Aktivierung von KdpD unter induzierenden Bedingungen unterbindet (Heermann *et al.*, 2009b). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse

1. Generelle Einleitung

wurde ein Modell aufgestellt, in dem die Aktivierung bzw. die Deaktivierung von KdpD durch elektrostatische Wechselwirkungen der N-terminalen und C-terminalen Domäne beeinflusst wird (Heermann *et al.*, 2009b).

Auf die Usp-Domäne folgen vier TMHs, sowie ein Arginin-reiches Cluster, welches in der cytoplasmatischen Verlängerung der vierten TMH lokalisiert ist. Basierend auf der Charakterisierung verkürzter KdpD-Derivate, denen die vier TMHs gänzlich oder teilweise fehlten, wurde postuliert, dass die Transmembran-Domäne (TM-Domäne) keinen Einfluss auf die Stimulus-Wahrnehmung von KdpD hat, jedoch für die korrekte Positionierung der cytoplasmatischen N-terminalen und C-terminalen Domäne von Bedeutung ist (Heermann *et al.*, 2003b). Im Gegensatz hierzu wird angenommen, dass das Arginin-Cluster eine wichtige Rolle bei der Stimulus-Wahrnehmung von KdpD spielt. Es konnte gezeigt werden, dass eine ortsgerichtete Mutagenese der Arginine 503, 506 und 508 *in vitro* zu einer Änderung des Phosphatase/Kinase-Verhältnisses führt (Jung und Altendorf, 1998b). Übereinstimmend hiermit zeigten Zimmann und Kollegen (2007), dass einzelne AS-Austausche im Arginin-Cluster eine annähernd konstitutive *kdpFABC*-Expression vermitteln und somit vermutlich einen „locked-on“ Zustand dieser KdpD-Derivate verursachen. Aufgrund der Lokalisierung des Arginin-Clusters in der cytoplasmatischen Verlängerung der TMH 4, wurde eine elektrostatische Interaktion der positiv geladenen Argininreste mit den anionischen Kopfgruppen der Phospholipide postuliert, welche unter induzierenden Bedingungen an der Aktivierung von KdpD beteiligt sein könnte (Jung und Altendorf, 1998b).

An das Arginin-Cluster schließt sich eine 109 AS umfassende Domäne an, bei der es sich nach Pfam (Protein families) um eine GAF-Domäne handelt. Das GAF-Akronym stammt von den Namen der ersten drei bekannten Protein-Klassen, die diese Domäne beinhalten (cGMP-regulierte Phosphodiesterasen, Adenylat-Cyclasen und der Transkriptionsfaktor FhlA; Aravind und Ponting, 1997). GAF-Domänen haben die Eigenschaft, Liganden wie z.B. zyklische Mononukleotide zu binden und so katalytische Aktivitäten innerhalb von Sensor-Systemen zu regulieren (Martinez-Argudo *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, dass Na⁺ spezifisch mit der GAF-Domäne der Adenylat-Cyclasen CyaB1 und CyaB2 aus *Anabaena* PCC 7120 interagiert und dadurch die Aktivität von CyaB1 und CyaB2 moduliert (Cann, 2007). Diese Beobachtung ist in Bezug auf die Sensorkinase KdpD, deren Stimulus-Wahrnehmung eng mit K⁺ assoziiert, von besonderem Interesse.

1.6. Natur des Stimulus von KdpD

Zu Beginn dieser Arbeit war noch immer unklar, welcher spezifische Stimulus durch die Sensorkinase KdpD detektiert wird. In der Vergangenheit wurden verschiedene, potentielle Stimuli kontrovers diskutiert.

Laimins *et al.* (1981) beobachteten, dass das Zweikomponenten-System KdpD/KdpE die Expression des *kdpFABC*-Operons induziert, wenn die externe K^+ -Konzentration gering ist. Der externe K^+ -Grenzwert, unterhalb dessen eine *kdpFABC*-Expression induziert wird, ist jedoch von der Aktivität der konstitutiv exprimierten Trk- und Kup-Transportsysteme abhängig; in einem WT-Stamm wird die *kdpFABC*-Expression bei K^+ -Konzentrationen ≤ 2 mM induziert. In einem in Trk und Kup inaktiven Stamm hingegen, findet bereits bei signifikant höheren K^+ -Konzentrationen (≤ 40 mM) eine *kdpFABC*-Expression statt. Durch eine parallele Messung der Wachstumsrate wurde demonstriert, dass KdpD/KdpE die *kdpFABC*-Expression induziert, wenn die Wachstumsrate durch eine limitierte K^+ -Aufnahme zu sinken beginnt. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Osmolarität des Mediums die *kdpFABC*-Expression stimuliert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde erstmals vorgeschlagen, dass KdpD das „ K^+ -Bedürfnis“ der Zelle wahrnimmt (Laimins *et al.*, 1981). Basierend auf der überragenden Bedeutung von K^+ für den Aufbau des Zellurgors wurde weiterhin postuliert, dass das zelluläre K^+ -Bedürfnis in Form einer Reduktion des Zellurgors wahrgenommen wird (Laimins *et al.*, 1981; Malli und Epstein 1998). Diese Hypothese wurde jedoch aufgrund der Beobachtung angezweifelt, dass die *kdpFABC*-Expression ausschließlich durch hohe Konzentrationen ionischer Solute induziert wird, während dies bei hohen Konzentrationen nicht-ionischer Solute nicht der Fall ist (Gowrishankar, 1985; Sutherland *et al.*, 1986; Asha und Gowrishankar, 1993). Außerdem beeinflusst die Akkumulation von „kompatiblen Soluten“ die Induktion der *kdpFABC*-Expression unter hyperosmotischem Stress nicht, obwohl diese den Zellurgor wiederherstellt. Weiterhin verglichen Hamann und Kollegen (2008) das Ausmaß der *kdpFABC*-Expression unter K^+ -Limitation und Salzstress, sowie die physiologischen Konsequenzen dieser Wachstumsbedingungen. Es stellte sich heraus, dass K^+ -Limitation die *kdpFABC*-Expression signifikant stärker stimuliert ($\times 10$) als Salzstress. Außerdem konnte entgegen der Annahme von Laimins *et al.* (1981) gezeigt werden, dass es unter K^+ -Limitation nicht zu einer Reduktion des Zellurgors kommt. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass eine Reduktion des Zellurgors nicht als Stimulus für KdpD dient (Hamann *et al.*, 2008).

Asha und Gowrishankar (1993) stellten ein Modell auf, in dem KdpD den K^+ -Flux über der Cytoplasmamembran detektiert, wobei KdpD die *kdpFABC*-Expression induziert, wenn die

1. Generelle Einleitung

Rate des K^+ -Influx abnimmt. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass der externe pH-Wert das Ausmaß der *kdpFABC*-Expression beeinflusst, wobei die *kdpFABC*-Expression bei einer gegebenen K^+ -Konzentration mit zunehmender Ansäuerung der Umwelt steigt. Es ist bekannt, dass eine erhöhte K^+ -Aufnahme für die zelluläre pH-Homöostase unter sauren Wachstumsbedingungen essentiell ist (Booth *et al.*, 1985). Daher diskutierten die Autoren, dass die erhöhte *kdpFABC*-Expression unter sauren Bedingungen das erhöhte K^+ -Bedürfnis der Zelle reflektiert.

Sugiura und Kollegen (1994) konstruierten KdpD-Derivate, welche einzelne AS-Substitutionen in der TMH 3 oder TMH 4 trugen und eine veränderte Stimulus-Wahrnehmung aufwiesen. Diese KdpD-Derivate zeichnen sich durch eine hohe, konstitutive *kdpFABC*-Expression aus, welche unabhängig von der externen K^+ -Konzentration erfolgt. Im Gegensatz hierzu sind diese KdpD-Derivate in der Lage, auf hyperosmotischen Stress zu reagieren, wobei die Natur des Osmolyts (ionisch oder nicht-ionisch) irrelevant ist. Aus diesen Ergebnissen folgerten die Autoren, dass KdpD zwei mechanistisch verschiedene Stimuli wahrnimmt (Sugiura *et al.*, 1994). Gleichzeitig wurde aus diesen Beobachtungen geschlussfolgert, dass die TM-Domäne eine wichtige Rolle bei der Stimulus-Wahrnehmung von KdpD spielt. Im Gegensatz hierzu postulierten Heermann *et al.* (2003b), wie bereits erwähnt, dass die TM-Domäne keinen Einfluss auf die Stimulus-Wahrnehmung von KdpD ausübt und daher ein intrazellulärer Parameter als Stimulus für KdpD in Frage kommt (Heermann *et al.*, 2003b).

Der Einfluss der intrazellulären K^+ -Konzentration auf die Aktivierung der KdpD/KdpE-Signaltransduktions-Kaskade wurde ebenfalls kontrovers diskutiert. Einerseits konnte gezeigt werden, dass die Induktion der *kdpFABC*-Expression *in vivo* unabhängig von der intrazellulären K^+ -Konzentration erfolgt (Malli und Epstein, 1998); wird die intrazelluläre K^+ -Konzentration durch eine Veränderung der Osmolarität des Medium variiert, kann die Induktion der *kdpFABC*-Expression durch eine entsprechende Anpassung der externen K^+ -Konzentration aktiviert oder deaktiviert werden. Andererseits zeigten Untersuchungen mittels *right-side-out*-Membranvesikeln, dass intrazelluläres K^+ *in vitro* die Kinase-Aktivität von KdpD inhibiert (Jung *et al.*, 2000). Dieser Effekt trat jedoch bereits bei K^+ -Konzentrationen auf ($\geq 1\text{mM}$), die erheblich geringer sind, als die physiologische, intrazelluläre K^+ -Konzentration von *E. coli* (150-600 mM). Zusätzlich konnte in dieser Studie eine Stimulierung der Autokinase-Aktivität durch eine erhöhte, intrazelluläre Ionenstärke demonstriert werden. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass die Durchlässigkeit der Membranvesikel für ATP durch die Zugabe von 20 mM Mg^{2+} erreicht wurde. Diese Methode

1. Generelle Einleitung

ist aus heutiger Sicht fragwürdig, da hohe Mg^{2+} Konzentrationen einen starken Effekt auf Membranen ausüben. Es ist daher vorstellbar, dass die KdpD-Aktivität durch diese Behandlung beeinträchtigt wurde.

Die Hypothese, dass KdpD einen intrazellulären Stimulus detektiert, wurde durch die Beobachtung gestützt, dass ein verkürztes KdpD-Derivat, welches ausschließlich die C-terminale, cytoplasmatische Domäne umfasst, eine gesteigerte *kdpFABC*-Expression unter K^+ -limitierenden Wachstumsbedingungen vermittelte (Rothenbücher *et al.*, 2006).

Zusammengefasst wird derzeit angenommen, dass KdpD den K^+ -Bedarf der Zelle wahrnimmt, welcher durch einen oder mehrere intrazelluläre Parameter vermittelt wird (Heermann *et al.*, 2009a; Heermann und Jung, 2010).

1.7. Struktur und Zielsetzung dieser Arbeit

Die Ergebnisse dieser Arbeit, sowie die Diskussion der erzielten Ergebnisse, sind in drei Kapitel untergliedert. Zusätzlich umfasst jedes dieser drei Kapitel eine kurze thematische Einleitung, sowie einen Ausblick, in dem ein mögliches Vorgehen bei einer weitergehenden Untersuchung beschrieben wird.

Der Stimulus, der von der Sensorkinase KdpD detektiert wird, ist noch immer unbekannt und wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Daher war das übergeordnete Ziel dieser Arbeit, diesen Stimulus zu identifizieren.

Hierzu wurde die Stimulus-Antwort von KdpD (*kdpFABC*-Expression), sowie physiologische Parameter, welche durch die Stimulus-Antwort beeinflusst werden (cytoplasmatische K^+ -Konzentration, cytoplasmatischer pH-Wert und Wachstum), unter verschiedenen Umwelteinflüssen charakterisiert. Dabei wurde insbesondere die externe K^+ -Konzentration sowie der externe pH-Wert berücksichtigt. Weiterhin wurde durch einzelne Aminosäure-Substitutionen in KdpD untersucht, ob die Stimulus-Wahrnehmung durch spezifische Domänen von KdpD vermittelt wird. Die Ergebnisse zu dieser Aufgabenstellung sind in dem Kapitel „Untersuchungen zur Natur des Stimulus für KdpD“ dargestellt.

Das Kapitel „Quantifizierung der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes und des KdpD/KdpE-Systems“ befasst sich mit einem weiteren Aspekt der Stimulus-Wahrnehmung von KdpD. Es existieren Hinweise auf eine Interaktion der Sensorkinase KdpD mit dem K^+ -Transportkomplex KdpFABC, die möglicherweise eine regulatorische Rolle bei der Stimulus-Wahrnehmung von KdpD spielt. Eine Voraussetzung für eine solche regulatorische

1. Generelle Einleitung

Interaktion ist jedoch eine basale Synthese von KdpFABC auch unter nicht-induzierenden Bedingungen. Daher sollte eine Quantifizierung der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes und des KdpD/KdpE Zweikomponenten-Systems unter induzierenden, sowie unter nicht-induzierenden Bedingungen erfolgen. Hierdurch sollte ebenfalls geklärt werden, ob unter induzierenden Bedingungen eine erhöhte KdpD- und KdpE-Synthese beobachtet werden kann und somit das Zweikomponenten-System KdpD/KdpE einer Autoregulation unterliegt.

Außerdem sollte ein *E. coli* Stamm konstruiert werden, der eine vollständige, chromosomale Deletion des *kdpD*-Gens besitzt. Überraschenderweise zeigte der daraus hervorgegangene *E. coli* Stamm, nach einer zeitlichen Verzögerung, eine KdpD-unabhängige Expression des *kdpFABC*-Operons und damit einhergehend ein Wachstum unter K^+ -Limitation. Die Analyse dieses unerwarteten Phänotyps ist in dem Kapitel „Deletion von *kdpD* in *E. coli*“ dargestellt.

Die Ergebnisse des Kapitels „Untersuchungen zur Natur des Stimulus für KdpD“ sind bereits publiziert in:

Laermann, V., Čudić, E., Kipschull, K., Zimmann, P. und Altendorf, K. (2013) The sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* senses external K^+ . *Mol. Microbiol.* **88**: 1194-1204.

Teile der Ergebnisse des Kapitels „Quantifizierung der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes und des KdpD/KdpE-Systems“ sind eingereicht und akzeptiert:

Surmann, K*, Laermann, V*, Zimmann, P., Altendorf, K. und Hammer, E. (2014) Absolute Quantification of the Kdp subunits of *Escherichia coli* by Multiple Reaction Monitoring. *Proteomics*

* Both authors contributed equally to this work.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Für diese Arbeit wurden folgende Materialien verwendet:

Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Frankfurt)
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt)
Phusion HiFi DNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt)
GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
GelStar Nucleic Acid Gel Stain	Cambrex Bio Science (Rockland)
QIAprep-Spin-Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)
DNeasy-Tissue Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAquick-Gel-Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
iQ SYBRGreen Supermix	BioRad (München)
Elektroporationsküvetten, 0,1cm	BioRad (München)
96 Well Semi-Skirted Reaction Plate	BioStep (Jahnsdorf)
Optical Tape	BioRad (München)
Thomakammer	Assistent

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Bayer (Leverkusen), Biomol (Hamburg), Biorad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), Invitrogen (Karlsruhe), E. Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) im Reinheitsgrad „pro analysis“ bezogen.

2.2. Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *E. coli* 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. *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
K12	Wild Typ	
TK2240	<i>kdp⁺ trkA405 trkD1 nagA thi rha lacZ</i>	Epstein <i>et al.</i> (1978)
TK2281	$\Delta kdpFABCDE trkA405 trkD1 nagA thi rha lacZ$	Polarek <i>et al.</i> (1988)
TKV2208	$\Delta kdpD^{128-894} trkA405 trkD1 nagA thi rha lacZ$	Puppe <i>et al.</i> (1996)
TKV2209	$\Delta kdpD^{128-894} \Delta kdpE trkA405 trkD1 nagA thi rha lacZ$	Zimmann <i>et al.</i> (1995)
LB2240	<i>thi metE rpsL gal rha kup1 $\Delta trkA$</i>	P. Zimmann
LB2240 $\Delta kdpD$	$\Delta kdpD thi metE rpsL150 gal rha kup1 \Delta trkA$	diese Arbeit
LB2240 $\Delta kdpD$. KdpE-D52N	$\Delta kdpDkdpE^{D52N} thi metE rpsL150 gal rha kup1 \Delta trkA$	diese Arbeit
LB2240 $\Delta kdpD$. $\Delta pta. \Delta ackA$	$\Delta kdpD (pta ackA)::rpsL-kan thi metE rpsL150 gal rha kup1 \Delta trkA$	diese Arbeit

Alle Stämme die in dieser Arbeit verwendet wurden sind *E. coli* K12 Derivate. Die Stämme TK2240, TK2281, TKV2208 und TKV2209 tragen Mutationen in den Genen *trk* und *kup*, die die Funktion der entsprechenden K⁺-Transporter inaktivieren. Zur Vereinfachung werden die mutierten Gene *trkA405* und *trkD1* im Folgenden als Δtrk und Δkup bezeichnet.

Tab. 2.2. Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Genotyp	Referenz
pBD5-9	Ap ^r	<i>kdpD</i> in pBAD18 mit einzelner <i>EcoRV</i> -Restriktionsschnittstelle (562) und zusätzlicher Schnittstelle <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), <i>BsuI</i> (1767) und <i>HindIII</i> (2869)	Zimmann <i>et al.</i> , (2007)
pBD5-9- KdpD-D424*	Ap ^r	<i>kdpD</i> ^{D424*} in pBD5-9	diese Arbeit
pBD5-9- KdpD-D474*	Ap ^r	<i>kdpD</i> ^{D474*} in pBD5-9	diese Arbeit
pPV-2	Cm ^r	<i>kdpDE</i> im pSU19 Vektor	Walderhaug <i>et al.</i> (1992)

2. Material und Methoden

pPV-2-KdpD-D424*	Cm ^r	<i>kdpD</i> ^{D424*} in pPV-2	diese Arbeit
pPV-2-KdpD-D474*	Cm ^r	<i>kdpD</i> ^{D474*} in pPV-2	diese Arbeit
pPV-2/D52N	Cm ^r	<i>kdpE</i> ^{D52N} in pPV-2	R. Heermann
pMMB1311	Ap ^r	GFPmut3b	Kitko <i>et al.</i> , (2009)
pWPA1lacZ	Ap ^r	<i>kdpFA-lacZ</i> unter Kontrolle des <i>kdpFABC</i> -Promotors im pBR322 Vektor	Puppe <i>et al.</i> , (1996)
pRedET	Ap ^r	<i>araC-pBAD γ β α rep101ts recA repA bla</i>	Genebridges
pPV-5	Ap ^r	<i>kdpD</i> in pKK223-3	Walderhaug <i>et al.</i> (1992)
F' <i>kdpDE</i>	Sc ^r	<i>kdpDE</i> in F' ₈	Schniederberend (2004)

Tab. 2.3: Oligonukleotide-Primer

Oligonukleotide	Sequenz (5' --> 3')
SpeI_sense	CTCGATCAGGTACTAGTCGCGCTT
StuI_antisense	CCCGCAGGCAGGCCTTTATC
D424A sense	GATGGCGTTTGC GGCCGCCAAC
D424A antisense	GTTGGCGGCCGCAAACGCCATC
D424Y sense	GATGGCGTTTTATGCCGCCAAC
D424Y antisense	GTTGGCGGCATAAAAACGCCATC
D424E sense	GATGGCGTTTGAAGCCGCCAAC
D424E antisense	GTTGGCGGCTTCAAACGCCATC
D424N sense	TGGCGTTTAATGCCGCCAACCTG
D424N antisense	GCGGCATTAAACGCCATCAGCCACTGCA
D424G sense	TGGCGTTTGGTGCCGCCAACCTG
D424G antisense	GCGGCACCAAACGCCATCAGCCACTGCA
D474A sense	GCCGTCTCTGCGGTGCAATATC
D474A antisense	GATATTGCACCGCAGAGACGGC
D474C sense	GCCGTCTCTTGTGTGCAATATC
D474C antisense	GATATTGCACACAAGAGACGGC
D474Y sense	GCCGTCTCTTATGTGCAATATC
D474Y antisense	GATATTGCACATAAGAGACGGC

2. Material und Methoden

D474E sense	GCCGTCTCTGAAGTGCAATATC
D474E antisense	GATATTGCACTTCAGAGACGGC
D474N sense	CCGTCTCTAATGTCCAATATCTGCTGACCTTC
D474N antisense	ATATTGCACATAAGAGACGGC
50bpkdpD_rpsL-kan_sense	CCAGCCGGTTGTCAACATTGTTGAACTCAATCTGGCGCTCGACAA ACTTGACGAATAAGGCCTGGTGATGATGGCGGGATCGTTG
50bpkdpD_rpsL-kan_antisense	GCGCAGAAAGCGACGAATAGCCTGTTTCATCTTCAACAATCAGAAC GTTTGTTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAG
Δ kdpD_sense	GACGAATAACAAACGTTCTGATTGTTGAAGATG
Δ kdpD_antisense	CAGAACGTTTGTATTTCGTCAAGTTTGTGCGAGCGCCAGATTGAG
kdpCDforI_sense	CGCAAGCGGGCGGCCTGGC
kdpE_antisense	CCGGTGAATCACGCGGGCGGC
50bpkdpE_rpsL-kan_sense	CTGCGCACGGCGCTGGAGGGCGACGGGATGCGCGTCTTTGAGGCC GAAACGGCCTGGTGATGATGGCGGG
50bpkdpE_rpsL/kan_antisense	TTTACCAGCGGATCGGGCGCGGTGGTGGCAGAGTGGCGGCGTAAT GCGACTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
kdpE_sense	CCGGTGAATCACGCGGGCGGC
kdpE_antisense	CCGGAGCGGATGATTATCTG
50bpackApta_rpsL-kan_sense	TAACGATAACGCCGGTGATGTTGGTGTTTTTGGCACCGCCGAAGCT GTTGGGCCTGGTGATGATGGCGGG
50bpackApta_rpsL-kan_sense	GGCCTAAGTAGTACATATTCATTGAGTCGTCAAATTCATATACATT ATGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
KdpAfor2	GCCGCCAGCGGGATTGCGG
KdpArev2	CTTCAACGGTATTCACAGCCTG
KdpDfor	CGCCGCCATGCTGGAAGGGC
KdpDrev	GCTTCCAGCAGTTCTTCGATATC
GapAfor1	CTCCACTCACGGCCGTTTCG
GapArev1	CTTCGCACCAGCGGTGATGTG

2.3. Medien

Die Anzucht der in Tab. 2.1 aufgeführten *E. coli* Stämme erfolgte in KML-Komplexmedium (1% KCl; 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt) oder in phosphatgepufferten Minimalmedien mit definierten K^+ -Konzentrationen und pH-Werten (Epstein und Kim, 1971). Die Minimalmedien werden entsprechend ihrer K^+ -Konzentration in mM bezeichnet; K115 enthält 115 mM K^+ , K0 ist identisch zu K115 mit der Ausnahme, dass K^+ durch Na^+ ersetzt wurde. Durch Mischung von K0 und K115 kann jede beliebige K^+ -Konzentration im Bereich von 0-115 mM K^+ eingestellt werden, wobei die resultierenden Minimalmedien isoosmotisch

sind. Wenn nicht anders angegeben betrug der pH-Wert des Minimalmediums etwa pH 7,2. Festmedien wurden durch Zugabe von 1,5% Agar hergestellt. In Minimalmedien diente Glukose in einer Endkonzentration von 0,4% als C-Quelle. Bei der Kultivierung von Stämmen, die eine Deletion des *thi*-Gens tragen, wurde Thiamin in einer Endkonzentration von $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ zugesetzt. Zur genetischen Selektion wurden Antibiotika in einer Endkonzentration von $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Ampicillin, Carbenicillin), $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Kanamycin) bzw. $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Chloramphenicol) eingesetzt.

2.4. Kultivierung

Die Kultivierung von Zellen erfolgte aerob bei 37°C bzw. bei transformierten Zellen, deren Plasmide eine Temperatur-sensitive Replikation aufwiesen, bei 30°C . Die optische Dichte (OD_{600}) wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

2.4.1. Kultivierung in Flüssigkultur

Vorkulturen wurden in K115-Minimalmedium (K115) kultiviert. Aus der Vorkultur wurde frisches Minimalmedium mit definierter K^+ -Konzentration auf eine initiale OD_{600} von $\sim 0,1$ angeimpft. Zur Vermeidung von K^+ -Kontaminationen der Subkultur aus der K115-Vorkultur, wurden Zellen aus der Vorkultur in K0-Minimalmedium (K0) gewaschen, bevor diese in frisches Minimalmedium transferiert wurden. Dazu wurde 1 ml Vorkultur bei $9000\times g$ zentrifugiert, das Medium verworfen und das Zellpellet in K0 resuspendiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt, das Zellpellet in 1 ml K0 aufgenommen und die Subkultur hieraus angeimpft.

2.4.2. Kultivierung auf Festmedien

Für Wachstumstests auf Festmedien wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600} \sim 0,5$) einer K115-Vorkultur wie unter 2.4.1. beschrieben in K0 gewaschen und aufgenommen. Aus der gewaschenen Zellkultur wurden mit K0 verschiedene Verdünnungsstufen erstellt (10^0 – 10^{-4}) und $3 \mu\text{l}$ jeder Verdünnungsstufe auf die Agarplatten aufgetropft. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert und nach 24 Stunden zur Dokumentation gescannt.

2.4.3. Mediumshift

Um den Einfluss plötzlicher Veränderungen der externen K^+ -Konzentration auf die *kdpFABC*-Expression zu untersuchen, wurde eine Vorkultur filtriert, gewaschen und die Zellen in ein Medium mit veränderter K^+ -Konzentration überführt (Hamann *et al.*, 2008).

Hierzu wurden die Zellen in einer Vorkultur mit 60 mM K⁺ bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ~ 0,5) kultiviert und anschließend durch eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm vakuumfiltriert. Die filtrierten Zellen wurden mit dem gleichen Volumen vorgewärmten (37°C) und supplementierten (0,4% Glucose und 1 µg ml⁻¹ Thiamin) K0-Minimalmedium gewaschen und mitsamt des Filters in neues, vorgewärmtes Minimalmedium mit der gewünschten K⁺-Konzentration und einem der Vorkultur entsprechendem Volumen überführt. Diese Prozedur dauert etwa 30-60 Sekunden (Sek.). Der Zeitpunkt, in dem die Zellen in das neue Minimalmedium überführt wurden, wurde als Zeitpunkt 0 definiert. Als Kontrolle wurden Zellen in vorgewärmtes Medium mit derselben K⁺-Konzentration transferiert, um einen mögliche Einfluss der Filtrationsprozedur auf die gemessenen Parameter zu untersuchen.

2.5. Molekularbiologische und genetische Methoden

2.5.1. Plasmidisolierung

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml einer KML-Übernachtskultur mittels des „QIAprep Spin Miniprep“-Kit der Firma QIAGEN (Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.5.2. Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus 0,25 ml einer KML-Übernachtskultur mittels des „DNeasy Tissue“-Kit der Firma QIAGEN (Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Es wurde dabei nach dem empfohlenen Protokoll für Gram-negative Bakterien verfahren.

2.5.3. Herstellung kompetenter Zellen nach der RbCl-Methode

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 KML-Übernachtskultur 1:100 in frisches KML-Medium überimpft und aerob bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4500×g; 4°C; 10 Minuten (Min.)) und in dem halben Volumen kalter Lösung A (10 mM MOPS; 10 mM RbCl; pH 7,0) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (4500×g; 4°C; 10 Min.) wurden die Zellen in dem gleichen Volumen kalter Lösung B (100 mM MOPS; 50 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; pH 6,5) resuspendiert und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4500×g; 4°C; 10 Min.) wurden die Zellen in Lösung B (10% des Ausgangsvolumen) aufgenommen und dann direkt für die Transformation verwendet, oder, für eine längere Aufbewahrung, mit 10% Glycerin versetzt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

2.5.4. Transformation nach der RbCl-Methode

Für Transformationen wurden 200 µl kompetente Zellen mit 100-200 ng Plasmid-DNA oder einem kompletten Ligationsansatz mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1,5 Min.; 42°C) und 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde zu jedem Ansatz 0,8 ml KML-Medium gegeben und dieser für eine Stunde aerob bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zur Selektion der transformierten Zellen auf Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Bei Plasmid-Transformationen wurden 100 µl des Transformationsansatzes, bei Transformationen mit Ligationsansätzen wurde der gesamte Ansatz in einem Volumen von 200 µl ausplattiert. Es folgte eine Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C.

2.5.5. Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde eine Übernachtskultur 1:50 in frisches KML-Medium überimpft und unter aeroben Bedingungen bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von ~ 0,3 kultiviert. Die Transkription der Gene des λ-Red-Rekombinase-Systems wurde durch Zugabe von L-Arabinose in einer Endkonzentration von 0,35% und Inkubation bei 37°C für eine Stunde induziert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (11200×g; 2°C; 30 Sek.) und das Zellpellet dreimal in eiskaltem ddH₂O gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (11200×g; 2°C; 30 Sek.) wurden die elektrokompenten Zellen in 30 µl eiskaltem ddH₂O aufgenommen und direkt für die Elektroporation eingesetzt.

2.5.6. Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte mit einem MicroPulserTM Electroporator von Biorad (München). Pro Ansatz wurden 100-200 ng DNA zu 30 µl elektrokompenten Zellen gegeben und der Ansatz schließlich in gekühlte und sterile Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation fand bei 1,8 kV und 200 Ω statt. Sofort nach dem Elektroporationsimpuls wurde 1 ml KML-Medium zu dem Ansatz hinzugegeben und die Zellen für drei Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (11200×g; Raum-Temperatur (RT); 30 Sek.), die Zellpellets in 100 µl Restüberstand resuspendiert und auf Agarplatten mit geeignetem Antibiotika ausplattiert. Es folgte eine Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C.

2.5.7. DNA-Restriktion

DNA-Restriktionen wurden stets mit Restriktionsenzymen der Firma New England Biolabs (Frankfurt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in einem

enzymabhängigen Zeitintervall (5-120 Min.) bei enzymabhängiger Temperatur. Linearisierte Plasmide, die nach der Restriktion zur Ligation eingesetzt wurden, wurden während der letzten 30 Min. der Inkubation zusätzlich mit alkalischer Phosphatase behandelt, um eine Religation des linearisierten Plasmides zu verhindern.

2.5.8. DNA-Ligation

Ligationen erfolgten mit der T4-Ligase der Firma New England Biolabs (Frankfurt) und dem dazugehörigen T4-Ligase-Puffer. Das Verhältnis Vektor-DNA:Fragment-DNA wurde auf 1:3 eingestellt. Als Kontrolle diente der Vektor ohne Fragment-DNA. Ligationen erfolgten über Nacht bei 16°C.

2.5.9. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Amplifikation von DNA-Fragmenten und der Analyse von Klonen, welche mittels Transformation bzw. Elektroporation erzeugt worden sind. Im einzelnen bestanden die PCR-Ansätze aus folgenden Komponenten: ca. 10 ng Template, 15 pmol Primer sense und 15 pmol Primer antisense, 10 pmol dNTPs, 1/10 des Endvolumens 10 x PCR-Puffer, 1/100 des Endvolumens Phusion HiFi DNA-Polymerase und ddH₂O. Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgte pro Reaktionszyklus für 0,5 Min. bei 98°C, das Anlagern der Primer für 0,2 Min. bei entsprechender Annealing-Temperatur und die DNA-Amplifikation für 0,5 Min. kb⁻¹ bei 72°C. Nach 31 Zyklen wurde die Reaktion beendet und die Reaktionsansätze bis zur Weiterbearbeitung bei 4°C gekühlt.

2.5.10. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 0,75-1,5% (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) verwendet. Vor der Auftrennung im elektrischen Feld wurde den Proben 10 × DNA-Probenpuffer (50% Glycerin; 0,1 M EDTA; 1% SDS; 0,1% Bromphenolblau) zugegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße diente der „GeneRuler DNA Ladder Mix“ der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Der Gellauf wurde in einer „Mini Sub DNA Cell“-Agarose-Laufkammer (Biorad, München) bei konstant 100 V für 30-60 Min. durchgeführt. Die Agarose-Gele wurden anschließend für 30 Min. mit 0,005% (v/v) GelStar Nucleic Acid Gel (Cambrex Bio Science Rockland, Verviers) in TAE-Puffer gefärbt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte mit einem UV-Transilluminator bei 304 nm und die Dokumentation der Gele mit einer Gel-Dokumentationsanlage von Herolab (Wiesloch).

2.5.11. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

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

2.5.12. DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse wurde mit entsprechenden Oligonukleotid-Primern durch die Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

2.5.13. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Zur Bestimmung der Transkriptmenge von *kdpA* und *kdpD* wurde aus 1 ml Zellkultur die gesamte RNA mittels des „RNeasy Mini Kit“ (Quiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert und in 30 µl ddH₂O eluiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit einem NanoDrop 1000 (Fisher Scientific, Schwerte) bei 260 nm. Zur weiteren Verwendung wurde die Konzentration der isolierten RNA mit RNase freiem Wasser auf 20 µg ml⁻¹ eingestellt. Um die RNA von etwaigen Spuren genomischer DNA zu reinigen, wurde diese anschließend mittels „RNase freier DNase“ (New England Biolabs) einem DNase-Verdau unterzogen. Hierfür wurde die isolierte RNA (20 µg ml⁻¹) mit dem 5 × Puffer des „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fermentas) und DNase versetzt und 60 Min. im Thermocycler (Eppendorf) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase bei 70°C für 5 Min. hitzeinaktiviert und die RNA bei -20°C gelagert. Aus der isolierten RNA erfolgte die Synthese von cDNA mittels des “RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas) im Thermocycler (Eppendorf) nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt und sofort bei -20°C eingefroren.

2.5.14. Q-RT-PCR

Die Bestimmung der Transkriptmenge von *kdpA* und *kdpD* aus Zellkulturen erfolgte mittels Q-RT-PCR. Hierzu wurde zunächst RNA isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben (2.5.13). Zur Bestimmung der *kdpA*-Transkriptmenge (repräsentativ für die *kdpFABC*-Expression) wurde das Oligonukleotid-Primerpaar KdpAfor2/KdpArev2, zur Bestimmung der *kdpD*-Transkriptmenge (repräsentativ für die *kdpDE*-Expression) das Oligonukleotid-Primerpaar KdpDfor/KdpDrev eingesetzt. Als interner Standard wurde das Oligonukleotid-Primerpaar GapAfor1/GapArev1 verwendet, welches im *housekeeping*-Gen *gap* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) bindet. Die Durchführung erfolgte in einem iCycler von BioRad (München) unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreen (Biorad, München) nach folgendem Programm: initiale Denaturierung bei 95°C für 2 Min.,

pro Reaktionszyklus 15 Sek. bei 95°C, 30 Sek. bei 62°C, 30 Sek. bei 72°C. Es wurden 40 Reaktionszyklen durchgeführt. Um Fehlerabweichungen zu vermeiden, wurde das Expressions-Niveau von *kdpA* bzw. *kdpD*, welches durch den *cycle threshold* (c_t) bestimmt wurde, gegen das Expressions-Niveau des *housekeeping*-Gens *gap* normalisiert. Für die statistische Auswertung wurden die Daten von drei Messungen gemittelt. Als negative Kontrolle wurden Reaktionen ohne Zugabe eines cDNA-Templates durchgeführt.

2.5.15. ortsgerichtete Mutagenese von *kdpD*^{D424} und *KdpD*^{D474}

Kodon-Veränderungen, die einer Substitution von Aspartat 424 und Aspartat 474 in KdpD entsprechen, wurden in das Plasmid pBD5-9 (Zimmann *et al.*, 2007) eingeführt. Das Plasmid pBD5-9 trägt das *kdpD*-Gen unter der Kontrolle des nativen, sowie des induzierbaren und reprimierbaren *araBAD*-Promotors (Guzman *et al.*, 1995). Hierzu wurden synthetische Oligonukleotid-Primerpaare (KdpD-D424*sense/KdpD-D424*antisense; KdpD-D474*sense/KdpD-D474*antisense; * steht jeweils für die substituierende Aminosäure; Tab. 2.3) konstruiert, welche in dem Bereich von *kdpD* binden, der für Aspartat 424 bzw. Aspartat 474 in KdpD kodiert, die eine Punktmutation tragen, die die gewünschte Kodon-Veränderung in KdpD herbeiführt und die in mindestens 15 Basen zueinander komplementär sind.

Im ersten Schritt wurde mittels der Oligonukleotid-Primer KdpD-D424*sense bzw. KdpD-D474*sense und dem stromabwärts bindenden Oligonukleotid-Primer *StuI*_antisense, sowie KdpD-D424*antisense bzw. KdpD-D474*antisense und dem stromaufwärts bindenden Oligonukleotid-Primer *SpeI*_sense *kdpD*-Fragmente amplifiziert, die eine Substitution von jeweils einem Aspartatrest kodieren. Als Template diente hierfür das Plasmid pPV5-3, welches das Wild Typ (WT) *kdpD*-Gen trägt. In einem zweiten Schritt wurden *kdpD*-Fragmente, die die gleiche Aspartat-Substitution kodieren, in äquimolaren Konzentrationen als Template eingesetzt und das über die komplementären Bereiche zusammengelagerte, mutierte *kdpD*-Fragment mit dem Oligonukleotid-Primerpaar *SpeI*_sense/*StuI*_antisense amplifiziert. Die so entstandenen *kdpD*^{D424*}- und *kdpD*^{D474*}-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *StuI* geschnitten und in das ebenfalls mit *SpeI* und *StuI* geschnittene Plasmid pBD5-9 ligiert. Hieraus gingen die Derivate pBD5-9-D424* und pBD5-9-D474* hervor.

Die Mutationen in *kdpD* wurden zusätzlich in das Plasmid pPV-2 umgesetzt, welches die Gene *kdpDE* unter der Kontrolle des nativen, sowie des induzierbaren IPTG-Promotors kodiert. Hierzu wurden die Plasmide pBD5-9-D424* und pBD5-9-D474* mit den Restriktionsenzymen *XcmI* und *StuI* geschnitten und die DNA-Fragmente, die die entsprechende Mutation enthalten, in das ebenfalls mit *XcmI* und *StuI* geschnittene Plasmid

pPV-2 ligiert. Hieraus gingen die Derivate pPV-2-D424* und pPV-2-D474Y* hervor. Die geringe Menge an KdpD, die synthetisiert wird, wenn mit pBD5-9 transformierte Zellen in Abwesenheit des Induktors Arabinose und in Gegenwart des Repressors Glukose kultiviert werden, ist ausreichend, um eine chromosomale Deletion des *kdpD*-Gens zu komplementieren (Heermann *et al.*, 2003b; Zimmann *et al.*, 2007). Daher wurden Versuche, die eine Komplementation einer chromosomale Deletion von *kdpD* oder *kdpDE* durch pBD5-9 oder pPV-2 erforderten, ohne Arabinose- oder IPTG-Induktion durchgeführt.

Die Lokalisierung der entsprechenden KdpD-Derivate in der Zelle wurde überprüft. Hierzu wurden Zellen, welche die beschriebenen *kdpD*-Derivate exprimierten (TKV2208/pBD5-9-D424* und TKV2208/pBD5-9-D474*), zunächst aufgeschlossen und anschließend die Cytoplasmafraktion von den Membranvesikeln getrennt. Der mechanische Zellaufschluss erfolgte durch das Aufschlussgerät BasicZ (Düse: 0,18 mm; Aufschlussdruck: 1,35 kbar). Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch einen niedertourigen Zentrifugationsschritt (12000×g) entfernt. Anschließend wurde die Cytoplasmafraktion durch eine hochtourige Zentrifugation (235000×g) von den Membranvesikeln getrennt (Kipschull, 2011). Mittels eines KdpD-spezifischen Antikörpers wurde in einem Immunoblot-Assay überprüft und bestätigt, dass die KdpD-Derivate in den Membranvesikeln vorlagen und somit in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind (Daten nicht gezeigt).

2.5.16. counter-selection Methode (Genebridges, verändert nach Heermann *et al.*, 2008)

Chromosomale Modifikationen können nach der *counter-selection* Methode ausschließlich in Stämmen erfolgen, die über eine chromosomal kodierte Streptomycin-Resistenz verfügen. Mutationen im *rpsL*-Gen (*rpsL150*), welches für das S12 ribosomale Protein kodiert, vermitteln Resistenz gegenüber Streptomycin, wobei sich das mutierte Allel rezessiv gegenüber dem WT-Allel verhält. Ein Stamm der sowohl das WT *rpsL*-Allel, als auch das mutierte *rpsL*-Allel kodiert, ist Streptomycin-sensitiv.

Erste Stufe der *counter-selection* Methode:

Kompetente Zellen des zu modifizierenden *E. coli* Stamms wurden mit dem Plasmid pRedET transformiert. Das pRedET-Plasmid besitzt einen thermosensitiven pSC101 ori und kodiert für den Rekombinationsapparat des λ -Phagen, der die Rekombination von chromosomalen Zielgenen mit linearen DNA-Fragmenten ermöglicht. Die Expression dieser Gene steht unter einem Arabinose-induzierbaren Promotor. Nach Zugabe des Induktors Arabinose und einer Temperaturerhöhung von 30°C auf 37°C, findet eine zeitlich begrenzte Rekombinations-Aktivität statt, da das Plasmid pRedET aufgrund des thermosensitiven ori nicht repliziert werden kann und im Laufe von circa vier Generationen verloren geht.

2. Material und Methoden

Elektrokompetente Zellen des mit pRedET transformierten Ausgangsstamms wurden nach Zugabe von 0,35 % L-Arabinose (v/v) und einer Temperaturerhöhung auf 37°C mit 100-200 ng einer linearen Selektions-Kassette (Genebridges) elektroporiert, welche für eine Kanamycin-Kassette und das WT *rpsL*-Gen kodiert. Die Selektions-Kassette benötigt 50 Bp umfassende, flankierende DNA-Sequenzen, welche homolog zu der stromaufwärts- bzw. stromabwärts gelegenen Sequenz des Zielgens sind. Über diese Homologiebereiche findet die Red/ET-Rekombinase vermittelte, homologe Rekombination der Selektions-Kassette gegen das Zielgen statt. Integration der Selektions-Kassette in das Chromosom vermittelt Kanamycin-Resistenz, sowie - aufgrund der Dominanz des *rpsL* WT-Allels gegenüber dem *rpsL150*-Allel - Streptomycin-Sensitivität der Zelle. Positive Klone wurden daher auf Kanamycin-Resistenz und Streptomycin-Sensitivität selektiert (Abb. 2.1).

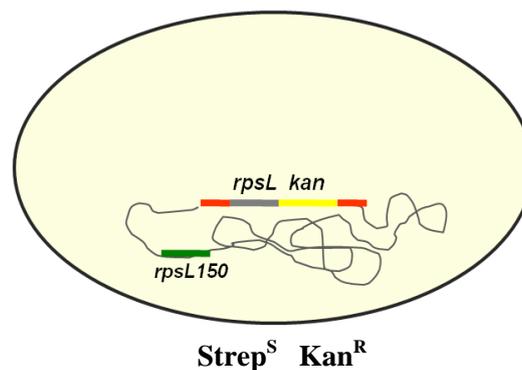


Abb. 2.1. Antibiotika-Resistenzen des modifizierten *E. coli* Stamms nach Austausch des Zielgens gegen die Selektions-Kassette. Nach Integration der Selektions-Kassette in das Chromosom ist der Stamm Kanamycin-resistent, sowie - aufgrund der Dominanz des WT *rpsL*-Allels gegenüber dem mutierten *rpsL150*-Allel - Streptomycin-sensitiv.

Zweite Stufe der *counter-selection* Methode:

Mittels eines zweiten Rekombinationsereignisses wurde die Selektions-Kassette gegen das modifizierte Zielgen ausgetauscht. Hierzu wurden kompetente Zellen des Stamms mit integrierter Selektions-Kassette mit pRedET transformiert. Elektrokompetente Zellen des mit pRedET transformierten Stamms wurde nach Zugabe von 0,35 % L-Arabinose (v/v) und einer Temperaturerhöhung auf 37°C mit 100-200 ng eines linearen DNA-Fragments elektroporiert, dass die gewünschte Modifikation des Zielgens, sowie 50 Bp umfassende Homologiebereiche zu der flankierenden DNA-Sequenz der Selektions-Kassette trägt. Nach erfolgreicher Rekombination konnten positive Klone auf Kanamycin-Sensitivität und, aufgrund des Verlustes des *rpsL* WT-Allels, auf Streptomycin-Resistenz selektiert werden (Abb. 2.2).

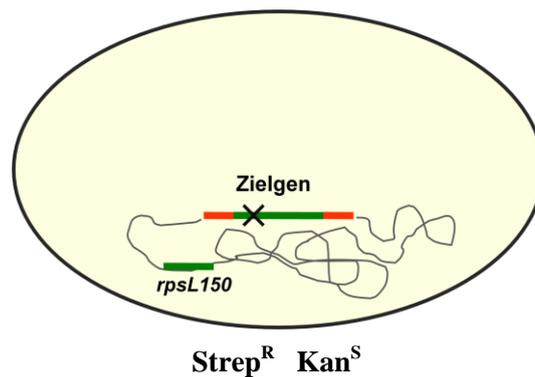


Abb. 2.2. Antibiotika-Resistenzen des modifizierten *E. coli* Stamms nach Austausch der Selektions-Kassette gegen das modifizierte Zielgen. Nach Verlust der Selektions-Kassette ist der Stamm Kanamycin-sensitiv und Streptomycin-resistent.

2.5.16.1. Konstruktion von LB2240 Δ *kdpD*

Für die Konstruktion der *kdpD*-Deletion in LB2240 wurde zunächst die Selektionskassette mit dem Oligonukleotid-Primerpaar 50bp*kdpD*_rpsL-kan_sense/50bp*kdpD*_rpsL-kan_antisense (Tab. 2.3) amplifiziert. Diese Oligonukleotid-Primer sind im 3'-Ende homolog zu der Selektions-Kassette und besitzen im 5'-Ende eine 50 Bp umfassende Sequenz, die homolog zu der stromaufwärts bzw. stromabwärts gelegenen, flankierenden DNA-Sequenz von *kdpD* sind. Das *kdpD*-Gen überlappt mit wenigen Nukleotiden mit den Leserastern von *kdpC* und *kdpE*. Daher war eine Deletion dieser Nukleotide, sowie der ebenfalls in *kdpC* lokalisierten Ribosomenbindestelle (RBS) von *kdpD*, in der ersten Stufe nicht möglich. Nach der Elektroporation wurde die amplifizierte Selektionskassette über homologe Rekombination gegen das *kdpD*-Gen in LB2240 ausgetauscht. In der zweiten Stufe wurde die Selektionskassette gegen ein lineares DNA-Fragment rekombiniert, welches die *kdpD*-Deletion enthielt, in dem jedoch zusätzlich die RBS und das Startkodon des *kdpD*-Gens inaktiviert wurde. Hierzu wurden Oligonukleotid-Primer konstruiert (Δ *kdpD*_sense und Δ *kdpD*_antisense), welche homolog zu der zusammengesetzten, flankierenden Sequenz von *kdpD* sind, sowie Punktmutationen besitzen, die die RBS und das Startkodon von *kdpD* inaktivieren. Außerdem sind die Oligonukleotid-Primer in 20 Nukleotiden zueinander komplementär. Mittels der Oligonukleotid-Primerpaare Δ *kdpD*_sense/*kdpE*_antisense, sowie *kdpCD*forI_sense/ Δ *kdpD*_antisense wurden DNA-Fragmente amplifiziert, die die *kdpD*-Deletion, sowie ausreichend homologe DNA-Sequenz stromaufwärts bzw. stromabwärts der *kdpD*-Deletion enthielten. Außerdem trugen diese DNA-Fragmente die entsprechenden Punktmutationen und waren in 20 Bp zueinander homolog. Als Template diente dabei

chromosomale DNA des Ausgangsstamms LB2240. Die homologen DNA-Fragmente wurden anschließend in äquimolaren Konzentrationen als Template eingesetzt und das zusammengelagerte, mutierte DNA-Fragment wurde mit dem Oligonukleotid-Primerpaar *kdpCDforI_sense/kdpE_antisense* amplifiziert. Das so konstruierte DNA-Fragment wurde anschließend, nach erfolgter Elektroporation, gegen die Selektionskassette im Zielbereich des Chromosoms von LB2240 rekombiniert.

2.5.16.2. Konstruktion von LB2240 Δ *kdpD*.KdpE-D52N

Zunächst wurde in LB2240 Δ *kdpD* ein Teil des *kdpE*-Gens, welches für das Aspartat 52 kodiert, gegen die Selektionskassette ausgetauscht. Hierzu wurde die Selektionskassette mit dem Oligonukleotid-Primerpaar *50bpkdpE_rpsL-kan_sense/50bpkdpE_rpsL-kan_antisense* (Tab. 2.3) amplifiziert. Nach Elektroporation der Selektionskassette wurde ein Teil des *kdpE*-Gens gegen die Selektionskassette ausgetauscht. In der zweiten Stufe wurde die Selektionskassette gegen ein lineares DNA-Fragment rekombiniert, welches für KdpE mit der gewünschten Substitution D52N kodiert. Hierfür wurde mittels des Oligonukleotid-Primerpaars *kdpE_sense/kdpE_antisense* ein *kdpE*-Fragment aus dem Plasmid pPV-2/D52N amplifiziert, welches eine Mutation in *kdpE* trägt, die die entsprechende Substitution (D52N) in KdpE herbeiführt. Nach erfolgter Elektroporation und Rekombination des linearen DNA-Fragments gegen die Selektionskassette, kodierte das *kdpE*-Gen in diesem Stamm für KdpE-D52N.

2.5.16.3. Konstruktion von LB2240 Δ *kdpD*. Δ *pta*. Δ *ackA*

Für eine Inaktivierung der Gene *ackA* und *pta* in LB2240 Δ *kdpD* wurden die entsprechenden Gene gegen die Selektionskassette ausgetauscht. Hierfür wurde die Selektionskassette zunächst mit dem Oligonukleotid-Primerpaar *50bpackApta_rpsL-kan_sense/50bpackApta_rpsL-kan_sense* (Tab. 2.3) amplifiziert. Diese Primer sind im 3'-Ende homolog zu der Selektions-Kassette und besitzen im 5'-Ende eine 50 Bp umfassende Sequenz, die homolog zu der stromaufwärts bzw. stromabwärts gelegenen, flankierenden DNA-Sequenz der Gene *ackA* und *pta* sind. Nach erfolgter Elektroporation und Rekombination ersetzte die Selektionskassette die Gene *ackA* und *pta* in LB2240 Δ *kdpD*. Δ *pta*. Δ *ackA*.

2.6. Biochemische und analytische Methoden

2.6.1. Flammenphotometrische K⁺-Bestimmung

Die flammenphotometrische Bestimmung des intrazellulären K⁺-Gehalts wurde nach einem Protokoll von Bakker und Harold (1980) durchgeführt. Zur Trennung von Zellen und Medium wurde 1 ml Zellkultur durch eine Schicht von 200 µl Silikonöl (Dichte von 1,04 kg l⁻¹; Wacker AR 200) abzentrifugiert (16000×g; 2 Min.; 4°C), wobei die Zellen pelletieren und das Medium über der Silikonöl-Schicht verbleibt. Das Reaktionsgefäß wurde kopfüber ausgeschüttelt und die Spitze mitsamt des Zellpellets mit einer scharfen Klinge abgetrennt. Zum Zellaufschluss wurde die Spitze mit dem Zellpellet in 1 ml 5% Trichloressigsäure-Lösung überführt, der Ansatz geschüttelt, bei -20°C gefroren und anschließend bei 100°C gekocht. Nach Zugabe von CsCl (Endkonzentration 5 mM) und Zentrifugation (4500×g; 5 Min.; 4°C) zur Pelletierung von Zelltrümmern, wurde der K⁺-Gehalt des Überstands flammenphotometrisch (ELEX 6361, Eppendorf) bestimmt. Die Ergebnisse wurden in nmol mg⁻¹ Trockengewicht angegeben und um den periplasmatischen K⁺-Gehalt korrigiert (Hamann, 2008).

Der K⁺-Gehalt der Minimalmedien wurde nach angemessener Verdünnung direkt bestimmt.

2.6.2. Bestimmung des intrazellulären pH-Werts

Der intrazelluläre pH-Wert von TK2240 und TK2281 wurde mit Hilfe des pH-sensitiven Derviats GFPmut3 nach dem Protokoll von Kitko *et al.* (2010) bestimmt. Hierzu wurde TK2240 und TK2281 mit dem Reporter-Plasmid pMMB1311 transformiert, welches für GFPmut3 kodiert. TK2240/pMMB1311 und TK2281/pMMB1311 wurden in K115 (pH 7,2) bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und anschließend in Minimalmedien mit definierter K⁺-Konzentration und pH 6,0 bzw. pH 7,8 gewaschen und subkultiviert (60 Min.). Für die Messung des intrazellulären pH-Werts wurden die Zellkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,4 eingestellt. Mittels eines Spektralfluorimeters (Jasco FP-6500) wurden Excitations-Spektren (480-510 nm) der Zellkulturen bei einer Emissions-Wellenlänge von 545 nm aufgenommen. Anschließend wurde der pH-Gradient (Δ pH) der Zellen durch die Zugabe von 30 mM Natriumbenzoat kollabiert und dadurch der intrazelluläre pH-Wert mit dem bekannten, extrazellulären pH-Wert gleichgesetzt. Nach der Aufnahme der Excitations-Spektren der Zellkulturen mit bekanntem pH-Wert, wurde der pH-Wert der Zellkulturen mit NaOH erhöht bzw. mit HCl erniedrigt und ein zweites Mal die Excitations-Spektren der Zellkulturen bei einem bekannten pH-Wert gemessen. Anhand von Standardkurven bekannter

pH-Wert/Fluoreszenzintensität-Punkte, konnte der unbekannte, intrazelluläre pH-Wert der Zellkulturen durch die aufgenommene Fluoreszenzintensität ermittelt werden.

2.6.3. β -Galaktosidase Aktivitätstest

Die Expression des *kdpFABC*-Operons wurde *in vivo* mittels einer transkriptionellen Fusion der *kdpFABC*-Promotorregion mit dem Reportegen *lacZ* nachgewiesen. Die mit dem β -Galaktosidase-Aktivitätstest nach Miller (1972) bestimmte Aktivität der von dem *lacZ*-Gen kodierten β -Galaktosidase, diente dabei als indirektes Maß für die *kdpFABC*-Expression. Für den β -Galaktosidase-Aktivitätstest wurden Zellen, die mit dem Reporter-Plasmid pWPA1*lacZ* (*PkdpFABC-lacZ*) transformiert wurden, in Minimalmedium mit definierter K^+ -Konzentration und definiertem pH-Wert bis zur exponentiellen Phase kultiviert ($OD_{600} \sim 0,5$). Anschließend wurde 1 ml einer Zellkultur abzentrifugiert ($16.000\times g$; 5 Min; $4^\circ C$) und in 1 ml Phosphatpuffer (200 mM; pH 7,0) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 100 μl Chloroform und 50 μl SDS (0,1% (w/v)). Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden 200 μl ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid (4 mg ml^{-1}) zu den Proben gegeben. Die Reaktion wurde nach 1-4 Min. durch Zugabe von 500 μl Natriumcarbonat (1M) gestoppt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation ($16.000\times g$; 10 Min.; $4^\circ C$) entfernt. Die Intensität der durch die Reaktion der β -Galaktosidase hervorgerufenen Färbung wurde photometrisch bei einer Absorption von 420 nm bestimmt. Die Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität [Miller Units]} = (A_{420} \times 1000) / (t \times V \times OD_{600})$$

Dabei ist A_{420} die Absorption der Reaktionslösung, OD_{600} die optische Dichte der Zellkultur zum Zeitpunkt der Probennahme, t die Reaktionszeit (in Min.) der β -Galaktosidase nach Zugabe des Substrats bis zum Abstoppen der Reaktion und V das Reaktionsvolumen.

Die Höhe der absoluten β -Galaktosidase-Aktivität des KdpD-WT oder eines KdpD-Derivats bei einer gegebenen K^+ -Konzentration variierte zwischen den Testreihen, während die relativen β -Gal Aktivitäten (β -Gal Aktivität bei einer gegebenen K^+ -Konzentration *versus* maximale β -Gal-Aktivität) konstant waren. Die β -Gal Testreihe eines KdpD-Derivats wurde immer zusammen mit dem KdpD-WT durchgeführt.

2.6.4. Bestimmung der zellulären Proteinkonzentration.

Die Zellzahl in 1 ml Zellkultur wurde mikroskopisch mittels einer Thomakammer entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Anschließend wurde der Proteingehalt einer bekannten Zellmenge in Abwandlung des Protokolls von Lowry *et al.* (1951) nach

Peterson *et al.* (1977) bestimmt. Für die Erstellung der Eichgraden wurde BSA (New England Biolabs) als Standardprotein verwendet.

2.6.5. MRM (*multiple reaction monitoring*)

Vorkulturen von *E. coli* K12 wurden über Nacht in K115 kultiviert. Die Zellen wurden dreimal in K0 bzw. K115 gewaschen und anschließend Subkulturen mit 115 mM K⁺ (K115) bzw. 0 mM K⁺ (K0) auf eine initiale OD von 0,1 angeimpft. Die Zellen wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert, abzentrifugiert (5.000xg; 4°C; 5 min), mit Tris-EDTA Puffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7.8) gewaschen und die Zellpellets nach erneuter Zentrifugation (5.000xg; 4°C; 5 min) bei – 80°C gelagert.

Die im Folgenden beschriebene, absolute Quantifizierung der Untereinheiten des KdpFABC-Komplex sowie KdpD und KdpE erfolgte in Kooperation mit Kristin Surmann und Dr. Elke Hammer an der Universität Greifswald mittels *multiple reaction monitoring* (MRM). Zur Vollständigkeit wird das Verfahren hier kurz erläutert:

2.6.5.1. Probenvorbereitung

Zellpellets wurden in Lysis-Puffer (8M Urea und 2M Thiourea) resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstands bestimmt. Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde durch entsprechende Verdünnung mit 20 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung auf 1µg µl⁻¹ eingestellt. Anschließend wurden die Proteine mit 2,5 mM Dithiothreitol reduziert und mit 10 mM Iodacetamid alkyliert. Die Proteine wurden über Nacht trypsinisiert, die Trypsinisierung durch Zugabe von 1% (v/v) Essigsäure gestoppt und die Proben zentrifugiert. Die Peptide aus dem Überstand wurden mittels µC₁₈-ZipTip Säulen (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) gereinigt und entsalzt. Nach Evaporation des Elutionspuffers in einer Vakuumzentrifuge, wurden die Peptide in Puffer (2% (v/v) Acetonitril (ACN) und 0.1% (v/v) Essigsäure in HPLC-grade H₂O) aufgenommen.

2.6.5.2. Absolute Quantifizierung mit schweren Standard-Peptiden

Eine absolute Quantifizierung der Untereinheiten des Kdp-Systems wurde durch die Zugabe eines internen Standards zu den zu analysierenden Proben ermöglicht. Als interner Standard dienten schwere, proteotypische Peptide für jedes Protein des Kdp-Systems. Proteotypische Peptide sind einzigartige Peptide eines Proteins, welche dieses eindeutig identifizieren und mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden können (Kuster *et al.*, 2005). Diese Peptide wurden vornehmlich auf Basis der Ergebnisse einer vorgeschalteten shotgun-

proteomic Analyse von *E. coli* K12-Zellen ausgewählt, die ebenfalls unter induzierenden bzw. nicht-induzierenden Bedingungen kultiviert wurden. Proteotypische Peptide von KdpA, KdpB, KdpC, KdpD und KdpE, welche ^{13}C und ^{15}N Arginin oder Lysin beinhalten, wurden durch JPT bezogen. 1 nmol jedes lyophilisierten Peptids wurde in 100 μl Puffer (80% (v/v) Ammoniumbicarbonate-Lösung (100 mM) und 20% (v/v) ACN) gelöst. Die zu analysierenden Proben wurden mit verschiedenen Verdünnungen der gelösten, schweren Standard-Peptide versetzt, entsprechend 10 bzw. 100 fmol μg^{-1} protein (Probe 0 mM K^+) und 0,5 bzw. 1 fmol μg^{-1} protein (Probe 115 mM K^+). Die Konzentrationen der schweren Standard-Peptide sollten in etwa mit der Konzentration der entsprechenden natürlichen Peptide in der zu analysierenden Probe übereinstimmen. Dementsprechend wurde der K0-Probe eine höhere Standard-Peptid Konzentration zugefügt als der K115-Probe. Um den technischen Fehler so gering wie möglich zu halten, wurden die Proben bereits vor der Trypsinisierung mit den schweren Standard-Peptiden versetzt.

2.6.5.3. MRM und Analyse

Die MRM-Analyse erfolgte mittels des Agilent 1200nanoLC und Triple Quad6410-Systems. Die chromatographische Auftrennung der Peptide erfolgte mit einem ACN-Gradienten von 5-100 % in einem nanoHPLC Chip (Large capacity chip; Agilent Technologies). Die Peptide wurden mittels Elektrosprays ionisiert (Vorläufer-Peptide) und im ersten Quadrupol-Massenanalysator anhand ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses analysiert. In der darauffolgenden Kollisionskammer wurden die Vorläufer-Peptide mittels Kollision-induzierter Dissoziation in unterschiedlich große Produkte fragmentiert, welche im zweiten Quadrupol-Massenanalysator anhand ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses analysiert wurden. Die benötigte Kollisionsenergie ist dabei von dem verwendeten Gerät und dem jeweiligen Masse-zu-Ladung-Verhältnisses des Peptides abhängig und wurde im Verlauf der Methodenentwicklung optimiert. Paare aus Vorläufer-Peptid und Produkt wurden im Chromatogramm zur selben Retentionszeit detektiert. Ausschließlich die 4 Vorläufer-Peptid/Produkt Paare mit der jeweils höchsten Intensität wurden zur MRM-Analyse herangezogen. Da der Analyse somit alle anderen möglichen Massen entzogen wurden, ergab sich eine hohe Sensitivität die es ermöglichte, auch niedrig konzentrierte Probenbestandteile zu detektieren. Eine absolute Quantifizierung wurde durch Zugabe definierter Mengen der Standardpeptide erreicht, welche zur gleichen Retentionszeit wie die entsprechenden natürlichen Peptide eluierten, jedoch durch die Markierung mit ^{13}C und ^{15}N eine andere Masse bei der Messung aufwiesen. Die Peak-Fläche der natürlichen Peptide und der entsprechenden schweren Standard-Peptide wurden verglichen und das Verhältnis der

2. Material und Methoden

Intensität von natürlichem/schwerem Peptid bestimmt. Da die Menge des schweren Standard-Peptids bekannt ist, konnten somit die absoluten Konzentrationen der natürlichen Peptide bestimmt werden.

3. Untersuchungen zur Natur des Stimulus für KdpD

3.1. Einleitung

Ziel dieses Kapitels war die Identifizierung des Stimulus, welcher von KdpD wahrgenommen wird und die KdpD/KdpE Signaltransduktions-Kaskade aktiviert. Es ist bekannt, dass das Zweikomponenten-System KdpD/KdpE bei niedrigen, externen K^+ -Konzentrationen die Expression des *kdpFABC*-Operons induziert (Laimins *et al.*, 1981). Weiterhin wurde festgestellt, dass der externe pH-Wert bei einer gegebenen K^+ -Konzentration einen Einfluss auf das Ausmaß der durch KdpD induzierten *kdpFABC*-Expression hat; je niedriger der pH-Wert, desto höher die *kdpFABC*-Expression (Asha und Gowrishankar, 1993). Außerdem haben Untersuchungen ergeben, dass der Grenzwert $[K^+]_{ex}$ (maximale externe K^+ -Konzentration), bei dem KdpD eine *kdpFABC*-Expression induziert, in einem Stamm, der in *Trk* und *Kup* inaktiv ist, vergleichsweise höher ist als in einem WT-Stamm (Rhoads *et al.*, 1976; Laimins *et al.*, 1981). Aufgrund dieser Feststellung wurde die extrazelluläre K^+ -Konzentration als Stimulus für KdpD ausgeschlossen. Weiterhin wurde aus diesen Feststellungen gefolgert, dass KdpD das K^+ -Bedürfnis der Zelle detektiert (Laimins *et al.*, 1981, Malli und Epstein, 1998) und dass dieses Bedürfnis durch einen intrazellulären Parameter vermittelt wird (Heermann *et al.*, 2009a; Heermann und Jung, 2010).

Um die Kdp-spezifische K^+ -Aufnahme einer Zelle untersuchen zu können, werden oft *E. coli* Stämme eingesetzt, die in den Genen *trk* und *kup* inaktiviert sind. Es ist jedoch wichtig zu berücksichtigen, dass die K^+ -Aufnahme in einem in *Trk* und *Kup* inaktiven Stamm nicht allein auf den KdpFABC-Komplex zurückgeführt werden kann, sondern ebenfalls auf unspezifischen K^+ -Transport (*TrkF*; Rhoads *et al.*, 1976), der auf molekularer Ebene uncharakterisiert ist (Abb. 3.1). Unter *TrkF* werden alle unbekanntenen Wege zusammengefasst, die, unabhängig von ihrer physiologischen Funktion, eine K^+ -Aufnahme erlauben (Buurmann *et al.*, 2004). Das Ausmaß des unspezifischen K^+ -Transports ist dabei von den Umweltbedingungen abhängig; die Rate der *TrkF*-Aktivität ist linear proportional zu der externen K^+ -Konzentration (Rhoads *et al.*, 1976) und steigt mit steigendem externen pH (Buurmann *et al.*, 2004). Daraus folgerten die Autoren, dass die Triebkraft für den unspezifischen K^+ -Transport das Membranpotential ist ($\Delta\Psi$).

Das elektrische Potential ($\Delta\Psi$) und der chemische Protonen-Gradient (ΔpH) über der Cytoplasmamembran bilden die protonenmotorische Kraft (pmf) entsprechend der Gleichung:

$$pmf = \Delta\Psi - Z \Delta pH \quad (Z = 2,303 RT/F; \text{konvertiert } \Delta pH \text{ in mV})$$

3. Untersuchungen zur Natur des Stimulus von KdpD

Die pmf nimmt eine zentrale Rolle in der Energie-Transduktion der Zelle ein (Mitchell, 1968). Außerdem besitzt *E. coli* zur Wahrung der Enzymaktivität, sowie der Protein- und Nukleinsäure-Stabilität, ein cytoplasmatisches pH-Optimum von 7,2 - 7,8 (Salmond *et al.*, 1984). Daher ist die Zelle bestrebt, die pmf, sowie den cytoplasmatischen pH-Wert konstant zu halten (Padan *et al.*, 1976).

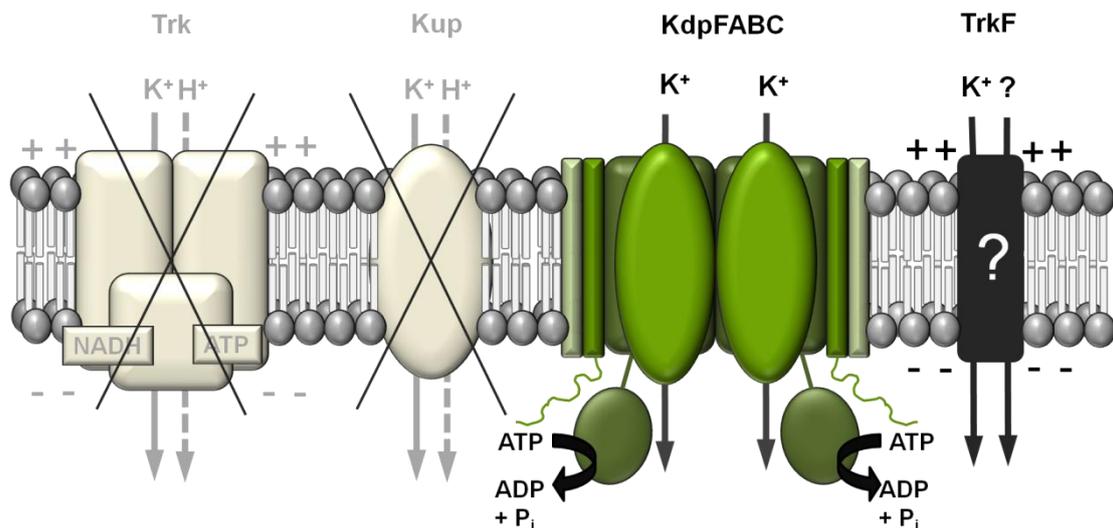


Abb. 3.1. Wege der K⁺-Aufnahme in *E. coli* mit inaktiviertem Trk- und Kup-Transporter.

Bei neutralem externen pH-Wert ist der pH-Gradient minimal und daher das elektrische Potential $\Delta\Psi$ maximal. Um im Zuge einer Senkung des externen pH-Werts einen neutralen intrazellulären pH bewahren zu können, werden Protonen aus dem Cytoplasma gepumpt und somit ein pH-Gradient (ΔpH) über der Cytoplasmamembran aufgebaut (Padan *et al.*, 1976). Es wurde gezeigt, dass die Fähigkeit einen pH-Gradienten aufzubauen (intern alkalisch), indirekt von der Fähigkeit abhängt K⁺ aufzunehmen; der Einstrom von K⁺ kompensiert das elektrische Potential $\Delta\Psi$ (innen negativ), welches durch den Protonen-Ausstrom erzeugt wird (Kroll und Booth, 1981; Bakker und Mangerich, 1981). Daher ist bei saurem externen pH-Wert der pH-Gradient ΔpH größer als das elektrische Potential $\Delta\Psi$ und somit die überwiegende Komponente der pmf (Bakker und Mangerich, 1981). Zellen, die in allen spezifischen K⁺-Transportern inaktiviert sind, sind unter sauren Umweltbedingungen nicht fähig einen neutralen cytoplasmatischen pH-Wert aufrecht zu erhalten und folglich sinkt ihre Wachstumsrate (White *et al.*, 1992).

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Einfluss der externen K^+ -Konzentration und des pH-Werts auf das Kdp-System

Im Folgenden wurde der Einfluss der externen K^+ -Konzentration und des externen pH-Werts auf das Wachstum, die zelluläre K^+ - und pH-Homöostase und die KdpD-induzierte *kdpFABC*-Expression des *E. coli* Stamms TK2240 (*kdp+*, Δtrk , Δkup) untersucht. Um weiterhin beurteilen zu können, ob das Wachstum und die zelluläre K^+ - und pH-Homöostase von TK2240 auf eine KdpFABC-vermittelte, oder aber auf eine TrkF-vermittelte K^+ -Aufnahme zurückzuführen ist, wurden die Versuche zusätzlich mit dem *E. coli* Stamm TK2281 (Δkdp , Δtrk , Δkup) durchgeführt, der keine spezifischen K-Aufnahmesysteme besitzt.

Das Wachstum von TK2281 und TK2240 wurde auf Minimalmedium-Platten mit definierter K^+ -Konzentration (1, 10, 20, 30, 50, 115 mM) und definiertem pH-Wert (pH 6.0 bzw. pH 7,8) getestet. Parallel wurden beide Stämme unter den gleichen Bedingungen in flüssigem Minimalmedium kultiviert und der cytoplasmatische K^+ -Gehalt, sowie der cytoplasmatische pH-Wert bestimmt. Um den Einfluss der externen K^+ -Konzentration und des pH-Werts auf die *kdpFABC*-Expression zu untersuchen, wurde der Stamm TK2240 mit dem Plasmid pWPA1lacZ transformiert, welches eine transkriptionelle Fusion der *kdpFABC*-Promotorregion mit *lacZ* trägt. Die β -Galaktosidase (β -Gal) Aktivität von TK2240/pWPA1lacZ diente als indirektes Maß für die *kdpFABC*-Expression. Das Ausmaß der *kdpFABC*-Expression wiederum diente als Maß für die Stärke des von KdpD wahrgenommenen Stimulus.

Bei einem pH-Wert von 7,8 wies TK2281, unabhängig von der externen K^+ -Konzentration, einen hohen cytoplasmatischen pH-Wert von $\sim 7,7$ auf (Tab. 3.1). Unter diesen Wachstumsbedingungen ist der pH-Gradient ΔpH minimal und somit das elektrische Potential $\Delta \Psi$ maximal. Da $\Delta \Psi$ die Triebkraft für die unspezifische K^+ -Aufnahme ist, ist bei einem externen pH-Wert von 7,8 die Rate der unspezifischen K^+ -Aufnahme maximal. Bei K^+ -Konzentration größer 10 mM war daher die cytoplasmatische K^+ -Konzentration von TK2281 - und folglich die unspezifische K^+ -Aufnahme in TK2281 - hoch genug, um Wachstum zu erlauben (Abb. 3.2. A+B).

Die Rate der TrkF-Aktivität ist linear proportional zu der externen K^+ -Konzentration, d.h. die Rate sinkt mit sinkenden K^+ -Konzentrationen. Daher war die cytoplasmatische K^+ -Konzentration und das Wachstum von TK2281 bei einer externen K^+ -Konzentration von 10 mM reduziert. Bei 1 mM K^+ war die cytoplasmatische K^+ -Konzentration von TK2281 so gering, dass kein Wachstum mehr stattfinden konnte (Abb. 3.2. A+B).

3. Untersuchungen zur Natur des Stimulus von KdpD

Tab. 3.1. Einfluss des externen pH-Werts (pH_{ex}) und der externen K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]_{\text{ex}}$) auf den cytoplasmatischen pH-Wert (pH_{in}) von TK2281 und TK2240.

pH_{ex} Stamm	pH_{in}				
	$[\text{K}^+]_{\text{ex}}$	K1	K20	K50	K115
pH 6.0					
TK2281		$6,27 \pm 0,10$	$6,72 \pm 0,13$	$7,13 \pm 0,15$	$7,36 \pm 0,06$
TK2240		$7,71 \pm 0,08$	$7,05 \pm 0,10$	$7,11 \pm 0,10$	$7,28 \pm 0,03$
pH 7.8					
TK2281		$7,63 \pm 0,08$	$7,77 \pm 0,06$	$7,77 \pm 0,10$	$7,71 \pm 0,03$
TK2240		$7,85 \pm 0,10$	$7,75 \pm 0,09$	$7,80 \pm 0,09$	$7,78 \pm 0,03$

Die Stämme TK2281 (Δkdp , Δtrk , Δkup) und TK2240 (kdp^+ , Δtrk , Δkup) wurden mit dem Reporterplasmid pMMB1311 transformiert, welches das pH-sensitive GFP-Derivat GFPmut3b kodiert. Die Zellen wurden in K115 (pH 7,2) bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert, in K0 gewaschen und anschließend in Minimalmedien mit den angezeigten K^+ -Konzentrationen (pH 6,0 bzw. pH 7,8) resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation wurden die Zellkulturen auf eine $\text{OD}_{600} = 0,4$ eingestellt und der cytoplasmatische pH-Wert mittels Fluoreszenzmessung bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Bei einem externen pH-Wert von 6,0 wird das elektrische Potential $\Delta\Psi$ durch K^+ -Aufnahme in einem hohen Maße in einen chemischen Gradienten ΔpH umgewandelt (Bakker und Mangerich, 1981; Kroll und Booth, 1981). Die Abnahme des elektrischen Potentials $\Delta\Psi$ bei einem externen pH-Wert von 6,0 verursacht eine verringerte Rate der TrkF-Aktivität. Durch die verringerte K^+ -Aufnahme ist eine weitere Absenkung des elektrischen Potentials $\Delta\Psi$ zur Generierung eines pH-Gradienten ΔpH nicht mehr möglich. Demzufolge ist in TK2281 unter diesen Wachstumsbedingungen der Aufbau eines pH-Gradienten ΔpH und gleichzeitig eine hohe Rate an unspezifischer K^+ -Aufnahme ausgeschlossen.

Damit übereinstimmend war bei einer gegebenen externen K^+ -Konzentration die cytoplasmatische K^+ -Konzentration - und somit die unspezifische K^+ -Aufnahme - von TK2281 bei einem pH-Wert von 6,0 signifikant niedriger als bei einem externen pH-Wert von 7,8 und stieg nur langsam mit steigenden K^+ -Konzentrationen (Abb. 3.2. B). Da die pH-Homöostase an die K^+ -Aufnahme gekoppelt ist, war der cytoplasmatische pH-Wert von TK2281 bei 1 mM K^+ ebenfalls gering und stieg mit steigenden K^+ -Konzentrationen (Tab. 3.1). Aufgrund des niedrigen cytoplasmatischen pH-Werts und der geringen cytoplasmatischen K^+ -Konzentration von TK2281 bei K^+ -Konzentrationen ≤ 50 mM, konnte unter diesen Bedingungen kein Wachstum von TK2281 beobachtet werden (Abb. 3.2. A). Erst eine hohe externe K^+ -Konzentration von 115 mM kompensierte das verminderte elektrische

3. Untersuchungen zur Natur des Stimulus von KdpD

Potential und erzeugte eine ausreichend hohe Rate an unspezifischer K^+ -Aufnahme, um eine pH-Homöostase und Wachstum von TK2281 zu erlauben (Tab. 3.1 und Abb. 3.2. A+B).

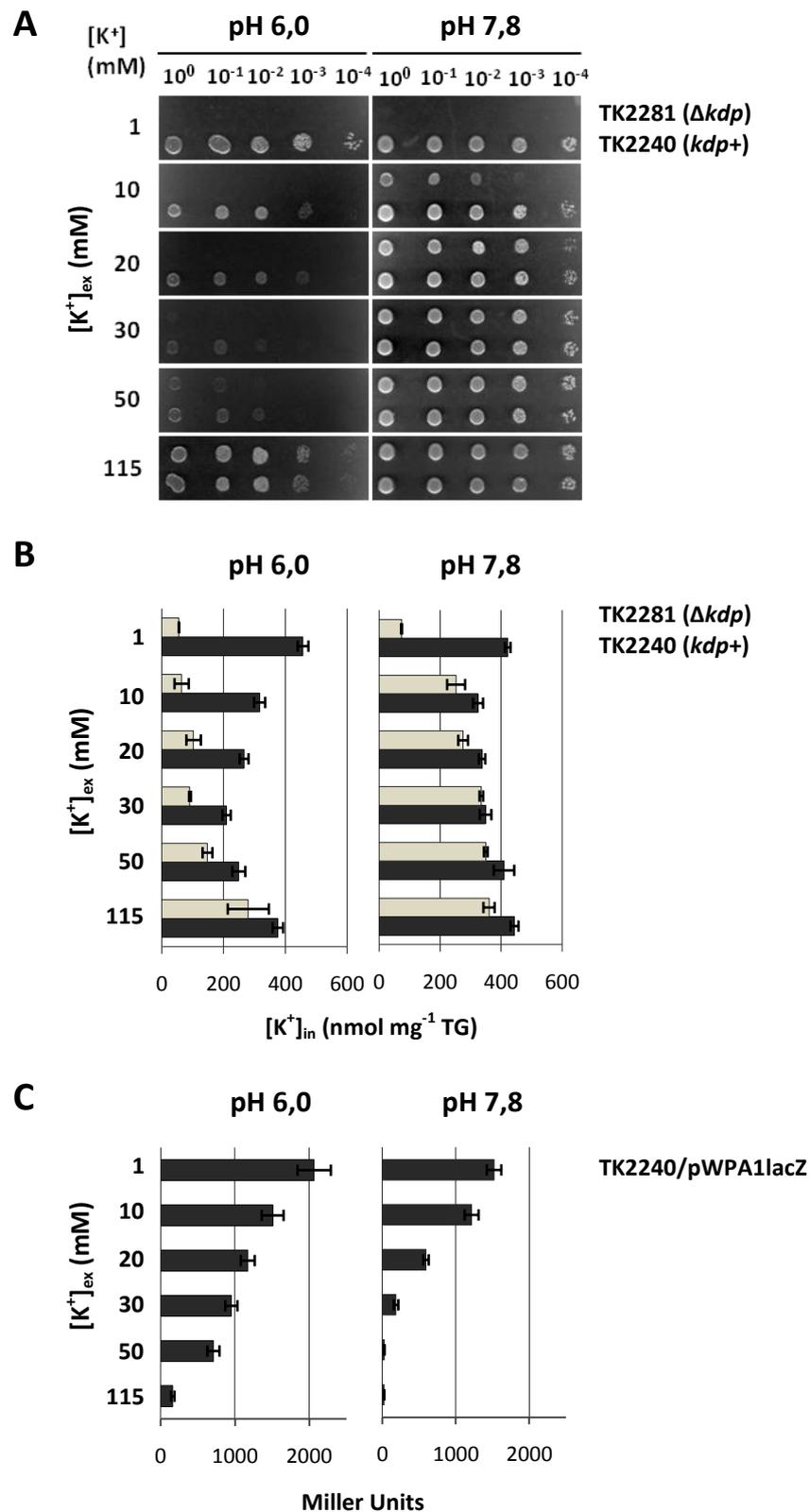


Abb. 3.2. Wachstum (A), cytoplasmatische K^+ -Konzentration (B) und β -Gal Aktivitäten (C) der Stämme TK2281 (Δkdp , Δtrk , Δkup) und TK2240 ($kdp+$, Δtrk , Δkup), in Abhängigkeit des externen pH-Werts und der externen K^+ -Konzentration.

A. Wachstum. Die Zellen wurden in K115 (pH 7,2) bis zur exponentiellen Phase kultiviert, in K0 (pH 6,0 bzw. 7,8) gewaschen und anschließend verdünnt (10^0 - 10^{-4}). Drei Mikroliter jeder Verdünnungsstufe wurden auf Minimalmedium-Agarplatten mit den angezeigten K^+ -Konzentrationen $[K^+]_{ex}$ und pH-Werten (pH 6,0 bzw. pH 7,8) getropft. Nach 24 stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Platten gescannt.

B. Cytoplasmatische K^+ -Konzentration. Die Zellen wurden wie unter A. beschrieben vorkultiviert, gewaschen und Subkulturen mit den angezeigten K^+ -Konzentrationen $[K^+]_{ex}$ und pH 6,0 bzw. pH 7,8 auf eine initiale optische Dichte (OD_{600}) von 0,1 angeimpft. Die cytoplasmatische K^+ -Konzentration $[K^+]_{in}$ wurde in der exponentiellen Phase bestimmt und in $nmol\ mg^{-1}$ Trockengewicht (TG) angegeben.

C. β -Gal Aktivitäten. TK2240, transformiert mit dem Reporter-Plasmid pWPA1lacZ, wurde wie unter A. beschrieben vorkultiviert, gewaschen und subkultiviert. Proben wurden in der exponentiellen Wachstumsphase genommen. Die β -Galaktosidase Aktivität der Proben wurde bestimmt und in Miller Units angegeben.

Die Werte in B. und C. repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Wie TK2281 wies der Stamm TK2240 bei einem externen pH-Wert von 7,8, unabhängig von der externen K^+ -Konzentration, einen hohen cytoplasmatischen pH-Wert auf (Tab. 3.1). Im Gegensatz zu TK2281 war jedoch das Wachstum von TK2240 bei K^+ -Konzentrationen ≤ 10 mM nicht beeinträchtigt (Abb. 3.2. A); bei diesen geringen externen K^+ -Konzentrationen zeigte TK2240/pWPA1lacZ eine hohe β -Gal Aktivität und folglich eine hohe Induktion der *kdpFABC*-Expression (Abb. 3.2. C). Die daraus resultierende, hohe Synthese des KdpFABC-Komplexes vermittelte einen ausreichend hohen K^+ -Transport, um eine hohe cytoplasmatische K^+ -Konzentration zu gewährleisten (Abb. 3.2. B). Mit steigenden K^+ -Konzentrationen sanken die β -Gal-Aktivitäten von TK2240/pWPA1lacZ (Abb. 3.2. C). Die sinkende *kdpFABC*-Expression wurde jedoch durch die relativ hohe, unspezifische K^+ -Aufnahme bei K^+ -Konzentrationen > 10 mM kompensiert und daher blieb bei einem externen pH-Wert von 7,8 der cytoplasmatische K^+ -Gehalt von TK2240 bei allen getesteten K^+ -Konzentrationen nahezu konstant hoch (Abb. 3.2. B).

Wie auch bei einem externen pH-Wert von 7,8, zeigte TK2240/pWPA1lacZ bei einem externen pH-Wert von 6,0 die höchste β -Gal-Aktivität bei einer K^+ -Konzentration von 1 mM (Abb. 3.2. C). Auch hier bewirkte die hohe *kdpFABC*-Expression eine hohe cytoplasmatische K^+ -Konzentration von etwa $450\ nmol\ mg^{-1}$ Trockengewicht (TG) (Abb. 3.2. B). Dementsprechend wies TK2240 ebenfalls einen hohen cytoplasmatischen pH-Wert und ein normales Wachstum unter dieser Bedingung auf (Tab. 3.1 und Abb. 3.2. A). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der KdpFABC-Komplex als einzig aktiver K^+ -Transporter generell in der Lage ist, die Zelle mit ausreichend K^+ zu versorgen. Die Höhe der β -Gal Aktivitäten von TK2240/pWPA1lacZ korrelierten negativ mit der externen K^+ -Konzentration; je höher die externe K^+ -Konzentration, desto niedriger die β -Gal Aktivität (Abb. 3.2. C). Demnach sank

die Induktion der *kdpFABC*-Expression und folglich die Synthese des KdpFABC-Komplex mit steigenden K^+ -Konzentrationen. Einhergehend mit den sinkenden β -Gal Aktivitäten von TK2240/pWPA1lacZ bei steigenden K^+ -Konzentrationen, konnte bei K^+ -Konzentration von 10-50 mM überraschenderweise eine signifikante Abnahme der cytoplasmatischen K^+ -Konzentration, des cytoplasmatischen pH-Werts und, daraus folgend, eine deutliche Wachstumshemmung von TK2240 beobachtet werden (Tab. 3.1 und Abb. 3.2. A+B). Obwohl das K^+ -Bedürfnis der Zelle (der postulierte interne Stimulus von KdpD) unter diesen Bedingungen hoch ist, ist die *kdpFABC*-Expression auf einem niedrigen Niveau. Unter diesen Bedingungen trifft demzufolge die Annahme, dass KdpD das zelluläre K^+ -Bedürfnis wahrnimmt und daraufhin eine hohe *kdpFABC*-Expression induziert, eindeutig nicht zu. Vielmehr scheint die Induktion der *kdpFABC*-Expression in Abhängigkeit der externen K^+ -Konzentration gehemmt zu werden. Diese Beobachtung ist der Ausgangspunkt der nachfolgenden Untersuchungen.

Es ist wichtig zu beachten, dass die Hemmung des Kdp-Systems bei höheren K^+ -Konzentrationen nicht von dem externen pH-Wert abhängig ist, sondern bei höheren pH-Werten lediglich von der relativ hohen, unspezifischen K^+ -Aufnahme überdeckt wird. Bei einer hohen K^+ -Konzentration ist auch bei einem pH-Wert von 6,0 die unspezifische K^+ -Aufnahme hoch genug, um die Hemmung des Kdp-Systems zu kompensieren; so war die cytoplasmatische K^+ -Konzentration in TK2240, ebenso wie in TK2281, bei einer K^+ -Konzentration von 115 mM ausreichend hoch, um eine pH-Homöostase und Wachstum zu erlauben (Tab. 3.1 und Abb. 3.2. A).

Die Ergebnisse implizieren, dass die unzureichende K^+ -Aufnahme von TK2240 bei 10-50 mM K^+ und einem pH-Wert von 6,0 aus der geringen *kdpFABC*-Expression und demnach aus einer geringen Synthese des KdpFABC-Komplexes resultiert. Allerdings kann anhand dieser Daten nicht ausgeschlossen werden, dass bei hohen externen K^+ -Konzentrationen, zusätzlich zu der Abnahme der *kdpFABC*-Expression, die K^+ -Transportaktivität des KdpFABC-Komplexes inhibiert wird und den beschriebenen Phänotyp verursacht.

3.2.2. Ursache der Inhibierung des Kdp-Systems bei hohen K^+ -Konzentrationen

Wie bereits beschrieben, sinkt die *kdpFABC*-Expression in TK2240 mit steigenden, externen K^+ -Konzentrationen, obwohl bei diesen K^+ -Konzentrationen und einem pH-Wert von 6,0 das K^+ -Bedürfnis der Zellen hoch ist. Diese Beobachtung impliziert, dass die KdpD-vermittelte Induktion der *kdpFABC*-Expression durch einen extrazellulären Stimulus, d.h. externes K^+ , reprimiert wird. Ist dies der Fall, muss KdpD einerseits in der Lage sein, die extrazelluläre

3. Untersuchungen zur Natur des Stimulus von KdpD

K^+ -Konzentration wahrzunehmen und andererseits muss die entsprechende Sensor-Domäne im Periplasma lokalisiert sein.

KdpD ist als Homodimer aktiv (Heermann *et al.*, 1998), wobei jedes Monomer zwei kurze periplasmatische Schleifen besitzt, bestehend aus 9 bzw. 13 Aminosäuren (Abb. 3.3). Es ist bekannt, dass die Carboxylgruppe der Seitenkette von Aspartat in vielen K^+ -Bindestellen als eine der Donor-Gruppen für die oktohedrale Koordination von K^+ dient (Harding, 2002). Da die periplasmatischen Schleifen von KdpD zwei Aspartatreste aufweisen, wurde an diesen beiden Resten eine ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt. Durch die eingefügten Aspartat-Substitutionen kann eine Beteiligung dieser beiden Aspartatreste an einer potentiellen, periplasmatischen Sensor-Domäne näher untersucht werden.

Die Mutagenese des *kdpD*-Gens erfolgte im Plasmid pBD5-9, woraus pBD5-9* Derivate hervorgingen, die für KdpD mit den entsprechenden Aspartat-Substitutionen (*) kodieren. Der Stamm TKV2208 trägt eine Deletion des *kdpD*-Gens, welche mit dem *kdpD*-WT Gen in pBD5-9 bzw. den *kdpD**-Derivaten in pBD5-9* komplementiert wurde. TKV2208/pBD5-9 wird im Folgenden als KdpD Wild-Typ (KdpD-WT) bezeichnet, die Derivate TKV2208/pBD5-9* entsprechend ihrer Aspartat-Substitution in KdpD.

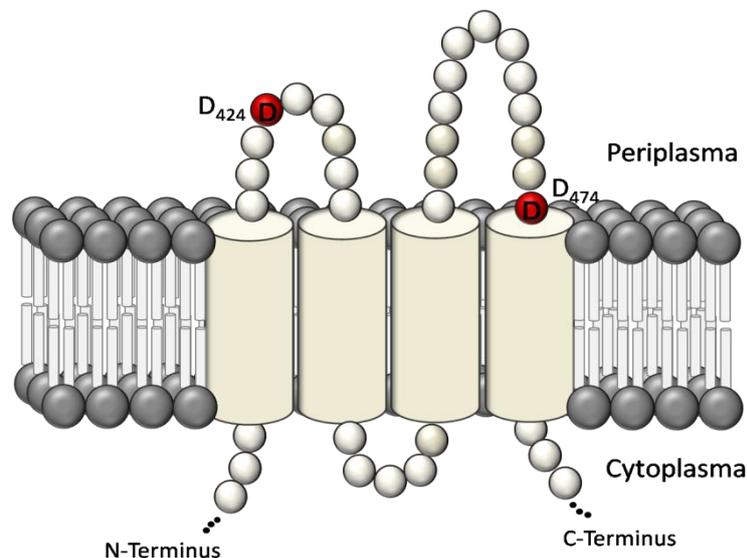


Abb. 3.3. Sekundärstruktur-Modell der Transmembran-Region von KdpD basierend auf der NMR Struktur von Maslennikov *et al.* (2010). Die Zylinder kennzeichnen die vier Transmembranhelices. Die Aspartat-Reste, welche einer Mutagenese ausgesetzt wurden, sind rot gekennzeichnet. Die Nummern der Aspartatreste beziehen sich auf die Position im KdpD-Protein.

Die erzeugten Mutanten konnten in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden, die jeweils einen veränderten Phänotyp gegenüber der Wachstumshemmung bei externen K^+ -

3. Untersuchungen zur Natur des Stimulus von KdpD

Konzentrationen von 10-50 mM und einem pH-Wert von 6,0 zeigten. Die erste Gruppe besaß im Vergleich zum KdpD-WT eine verminderte Sensitivität gegenüber dem inhibitorischen Effekt von extrazellulärem K^+ auf das Kdp-System. Interessanterweise wiesen die Mutanten der ersten Gruppe ausschließlich Aspartat-Austausche in der zweiten periplasmatischen Schleife auf (D474A, D474Y, D474C). Die zweite Gruppe umfasste nur eine einzige Mutante, welche im Vergleich zum KdpD-WT eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem inhibitorischen Effekt von extrazellulärem K^+ auf das Kdp-System zeigte. Diese Mutante besaß einen Austausch des Aspartatrests in der ersten periplasmatischen Schleife (D424Y). Eine weitere Gruppe von Mutanten zeigte im Vergleich zum KdpD-WT keine Veränderung hinsichtlich der Inhibierung des Kdp-Systems bei höheren K^+ -Konzentrationen (D424E, D424N, D424A, D424G, D474E, D474N) und wird im Folgenden nicht berücksichtigt.

Abbildung 3.4 zeigt das Wachstum des KdpD-WT, sowie jeweils eines repräsentativen KdpD-Derivats jeder Gruppe (KdpD-D424Y und KdpD-D474A) auf Minimalmedium-Platten mit definierten K^+ -Konzentrationen und einem pH-Wert von 6,0. Zusätzlich wurden der KdpD-WT und die KdpD-Derivate unter den gleichen Wachstumsbedingungen in flüssigem Minimalmedium kultiviert und die Verdopplungszeit, sowie die cytoplasmatische K^+ -Konzentration bestimmt (Abb. 3.5).

Bei der niedrigsten getesteten K^+ -Konzentration von 1 mM zeigten der KdpD-WT und die Derivate KdpD-D424Y und KdpD-D474A ein vergleichbar starkes Wachstum (Abb. 3.4) mit einer geringen Verdopplungszeit von 60-70 Minuten (Abb. 3.5. A). Die cytoplasmatischen K^+ -Konzentrationen des KdpD-WT und der Mutante KdpD-D424Y zeigten über den Bereich der getesteten externen K^+ -Konzentrationen eine negative Korrelation mit den entsprechenden Verdopplungszeiten; bei externen K^+ -Konzentrationen von 1 mM und 115 mM waren die Verdopplungszeiten gering, einhergehend mit hohen cytoplasmatischen K^+ -Konzentration von $\sim 400-500 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ TG}$ (Abb. 3.5. A+B). Im Vergleich dazu waren die cytoplasmatischen K^+ -Konzentrationen bei externen K^+ -Konzentrationen im Bereich von 10-50 mM deutlich vermindert, einhergehend mit deutlich erhöhten Verdopplungszeiten (Abb. 3.5. A+B). Es ist jedoch zu beachten, dass das Wachstum und die cytoplasmatische K^+ -Konzentration von KdpD-D424Y, im Gegensatz zum KdpD-WT, bereits bei einer relativ geringen externen K^+ -Konzentration von 5 mM eine signifikante Reduktion aufwies und im Bereich von 10-50 mM K^+ deutlich stärker beeinträchtigt war, als das Wachstum und die cytoplasmatische K^+ -Konzentration des KdpD-WT (Abb. 3.4 und Abb. 3.5. A+B).

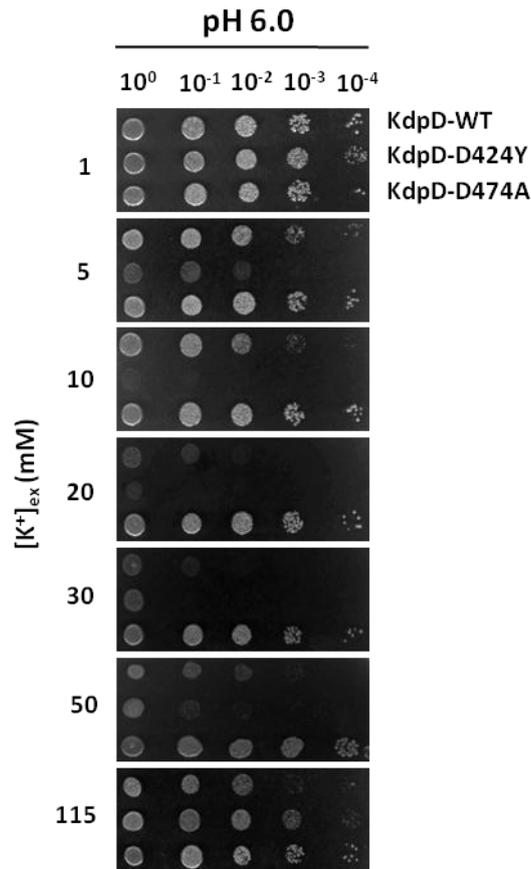


Abb. 3.4. Einfluss der Aspartat-Substitutionen in KdpD auf das Wachstum bei verschiedenen externen K^+ -Konzentration und pH 6,0. Der Stamm TKV2208 (*kdpFABCE+*, $\Delta kdpD$, Δtrk , Δkup) wurde mit dem Plasmid pBD5-9 bzw. den Derivaten pBD5-9* transformiert, welches für KdpD oder die KdpD-Derivate KdpD-D424Y bzw. D474A kodiert. Die Kultivierung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 3.2. A beschrieben. Aufgrund der erhöhten Sensitivität des Derivats KdpD-D424Y gegenüber K^+ , wurde eine K^+ -Konzentration von 5 mM in die Testreihe eingeschlossen.

Die Derivate KdpD-D474A, KdpD-D474C oder KdpD-D474Y zeigten über den gesamten Bereich der getesteten K^+ -Konzentrationen keine Wachstumshemmung (Abb. 3.4) und die Verdopplungszeiten, sowie die cytoplasmatischen K^+ -Konzentrationen waren annähernd konstant (Fig. 3.5. A+B). Da ein Stamm, der keine spezifischen K^+ -Transporter besitzt, nicht in der Lage ist bei pH 6,0 und einer externen K^+ -Konzentration ≤ 50 mM zu wachsen (TK2281, Abb. 3.2. A), ist unter diesen Bedingungen eine aktive K^+ -Aufnahme *via* KdpFABC die Voraussetzung für das Wachstum von KdpD-D474A, KdpD-D474C und KdpD-D474Y. Dieses Ergebnis demonstriert eindeutig, dass die Hemmung des Kdp-Systems bei höheren K^+ -Konzentrationen nicht auf Ebene des KdpFABC-Komplexes erfolgt, d. h. die Aktivität des KdpFABC-Komplexes nicht durch hohe externe K^+ -Konzentrationen inhibiert wird. Da die beschriebenen Phänotypen der Derivate KdpD-D424Y und KdpD-D474A auf die Aspartat-Substitutionen in den periplasmatischen Schleifen von KdpD zurückzuführen

3. Untersuchungen zur Natur des Stimulus von KdpD

sind, scheint somit die Hemmung des Kdp-Systems bei höheren K^+ -Konzentrationen tatsächlich durch die Sensorkinase KdpD vermittelt zu werden.

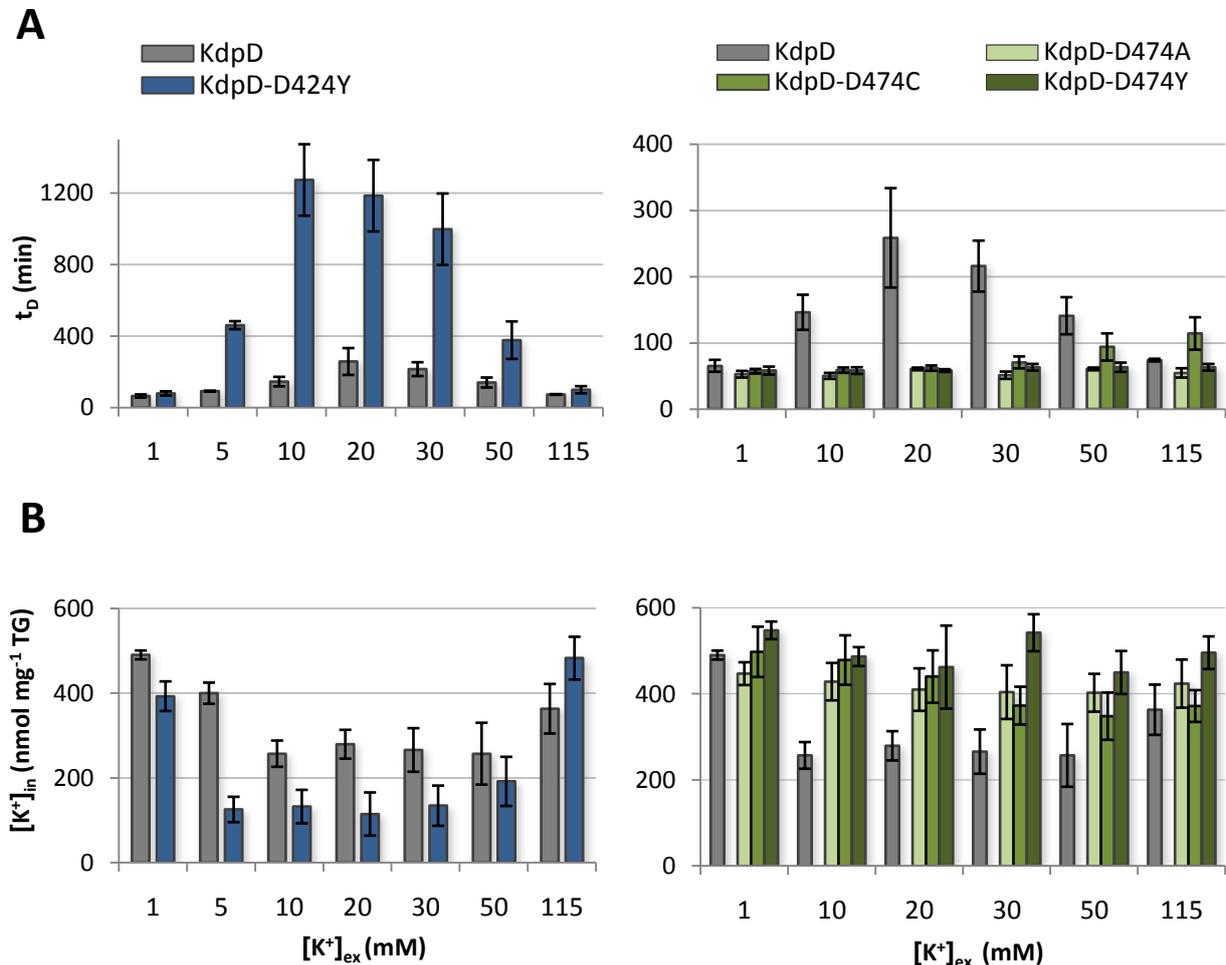


Abb. 3.5. Einfluss der Aspartat-Substitutionen in KdpD auf die Verdopplungszeit (A) und die cytoplasmatische K^+ -Konzentration (B) bei verschiedenen externen K^+ -Konzentrationen und pH 6,0. TKV2208/pBD5-9* ($\Delta kdpD$, Δtrk , $\Delta kup/kdpD^*$) wurde über Nacht in K115 (pH 7,2) kultiviert, in K0 (pH 6,0) gewaschen und anschließend Subkulturen mit den angezeigten K^+ -Konzentrationen $[K^+]_{ex}$ und pH 6,0 auf eine initiale OD von 0,1 angeimpft.

A. Die Verdopplungszeiten (t_D) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt und sind in Minuten angegeben.

B. Die cytoplasmatischen K^+ -Konzentrationen ($[K^+]_{in}$) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt und sind in $nmol\ mg^{-1}\ TG$ angegeben.

Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

3.2.3. Einfluss der Aspartat-Austausche in KdpD auf die Regulation der *kdpFABC*-Expression

Die folgenden Versuche wurden mit dem Stamm TKV2209 durchgeführt, der, neben einer Inaktivierung von *trk* und *kup*, eine Deletion des *kdpDE*-Operons aufweist. Die *kdpDE*-Deletion wurde mit dem Plasmid pPV-2 bzw. pPV-2* komplementiert, welches für KdpD

bzw. die KdpD*-Derivate und zusätzlich KdpE kodiert. Um den Einfluss der Aspartat-Austausche in den periplasmatischen Schleifen von KdpD auf die Regulation der *kdpFABC*-Expression zu untersuchen, wurde wiederum das Plasmid pWPA1lacZ als quantitativer Reporter für die *kdpFABC*-Expression eingesetzt. Der Stamm TKV2209 wurde mit den Plasmiden pWPA1lacZ und pPV-2 bzw. pPV-2* co-transformiert. Das bisher verwendete Testsystem TKV2208/pBD5-9 konnte für die folgenden Versuche nicht eingesetzt werden, da das Plasmid pBD5-9 nicht mit dem Reporter-Plasmid pWPA1lacZ kompatibel ist. Der Phänotyp der KdpD-Derivate im TKV2209/pPV-2-Hintergrund bezüglich des Wachstums bei definierten K^+ -Konzentrationen bei pH 6,0, entsprach jedoch dem Phänotyp der entsprechenden Derivate im TKV2208/pBD5-9-Hintergrund. Die Zellen wurden erneut in Minimalmedien mit definierten K^+ -Konzentrationen und einem pH-Wert von 6,0 kultiviert. Um den Einfluss der Aspartat-Substitutionen auf die Induktion der *kdpFABC*-Expression unter K^+ -limitierenden Wachstumsbedingungen zu untersuchen, wurde die minimale externe K^+ -Konzentration auf 0,1 mM herabgesetzt.

Das generelle Muster zeigte sowohl für den KdpD-WT, als auch für das Derivat KdpD-D424Y, sinkende β -Gal-Aktivitäten bei steigenden externen K^+ -Konzentrationen, mit einem Maximum der β -Gal-Aktivität bei der niedrigsten getesteten K^+ -Konzentration von 0,1 mM (Abb. 3.6). Die Höhe der β -Gal-Aktivitäten des KdpD-WT und KdpD-D424Y waren bei 0,1 mM K^+ vergleichbar, divergierten jedoch zunehmend bei externen K^+ -Konzentrationen ≥ 1 mM, wobei die β -Gal Aktivität von KdpD-D424Y bei einer gegebenen K^+ -Konzentration ≥ 1 mM signifikant niedriger war als die β -Gal Aktivität des KdpD-WT (Abb. 3.6). Dieses Ergebnis stimmt gut mit der Beobachtung überein, dass das Derivat KdpD-D424Y im Gegensatz zum KdpD-WT bereits bei einer K^+ Konzentration von 5 mM eine signifikante Hemmung der K^+ -Aufnahme und des Wachstums zeigte und im Bereich von 10-50 mM K^+ die Hemmung der K^+ -Aufnahme und des Wachstums der Mutante KdpD-D424Y deutlich stärker ausgeprägt war als bei dem KdpD-WT.

Bei einer externen K^+ -Konzentration von 0,1 mM war die Höhe der β -Gal Aktivitäten der Derivate KdpD-D474A, KdpD-D474C und KdpD-D474Y ebenfalls maximal und vergleichbar mit der β -Gal Aktivität des KdpD-WT (Abb. 3.6). Im Gegensatz zum KdpD-WT jedoch, blieben die β -Gal Aktivitäten der Derivate KdpD-D474A, KdpD-D474C und KdpD-D474Y bei externen K^+ -Konzentrationen bis zu 30 mM auf einem hohen Niveau (ca. 75% des Maximums) und halb-maximale β -Gal Aktivitäten stellten sich erst bei einer externen K^+ -Konzentration von 50 mM ein (Abb. 3.6). Während für den KdpD-WT, sowie KdpD-D474A und KdpD-D474C bei einer K^+ -Konzentration von 115 mM praktisch keine β -Gal Aktivität

3. Untersuchungen zur Natur des Stimulus von KdpD

mehr nachgewiesen werden konnte, blieb jedoch die β -Gal Aktivität der Mutante KdpD-D474Y (ca. 30% des Maximums) bei dieser K^+ -Konzentration verhältnismäßig hoch (Abb. 3.6)

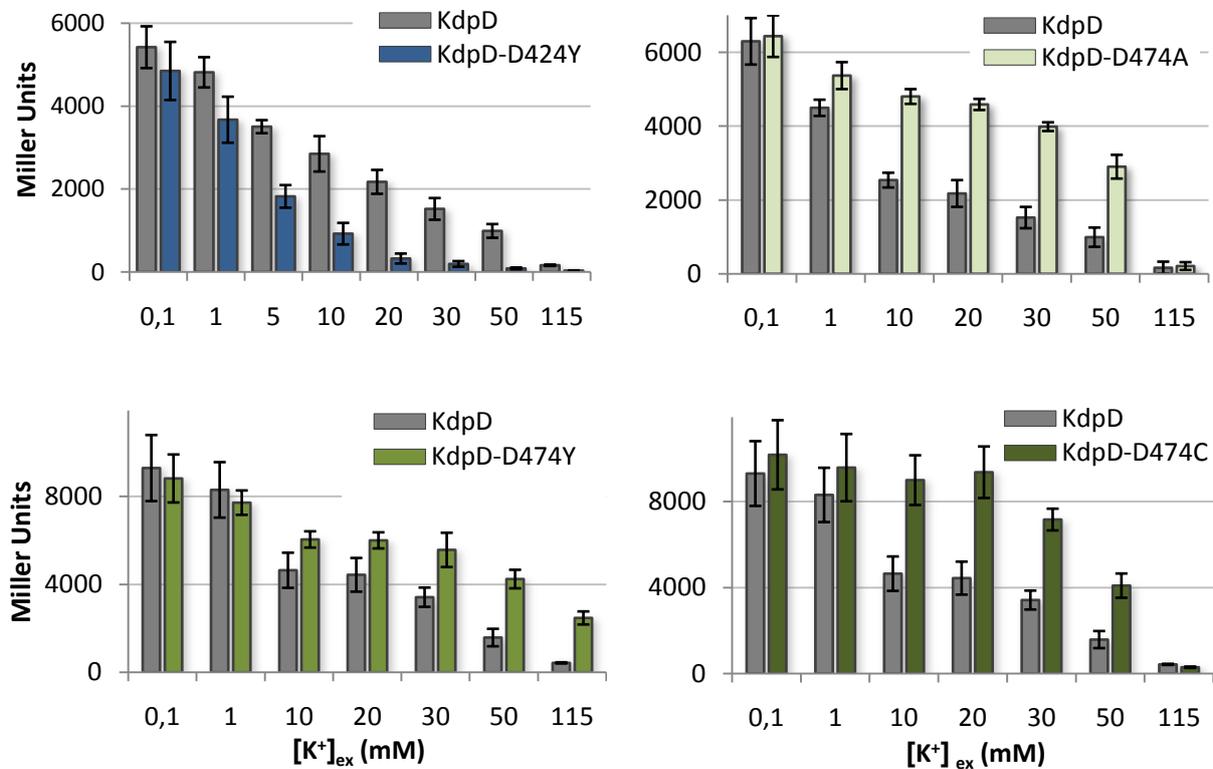


Abb. 3.6. Einfluss der Aspartat-Substitutionen in KdpD auf die Regulation der *kdpFABC*-Expression bei verschiedenen externen K^+ -Konzentrationen und pH 6,0. TKV2209 ($\Delta kdpDE$, Δtrk , Δkup), co-transformiert mit dem Reporter-Plasmid pWP_{allacZ} und dem Plasmid pPV-2 bzw. pPV-2*, wurde in K115 (pH 7,2) bis zur exponentiellen Phase kultiviert, mit K0 (pH 6,0) gewaschen und in Minimalmedien mit definierten K^+ -Konzentrationen (pH 6,0) subkultiviert. β -Gal Aktivitäten wurden bestimmt und sind in Miller Units angegeben. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Die Feststellung, dass die Derivate KdpD-D474A, KdpD-D474C und KdpD-D474Y bei K^+ -Konzentrationen von 10-50 mM im Vergleich zu dem KdpD-WT eine signifikant höhere β -Gal-Aktivität aufwiesen, stimmt wiederum gut mit der Beobachtung überein, dass diese Derivate im Gegensatz zum KdpD-WT unter diesen Bedingungen keine Hemmung der K^+ -Aufnahme und des Wachstums zeigten. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass bei den wachstumsinhibierenden K^+ -Konzentrationen (10-50 mM) eine ausreichend hohe *kdpFABC*-Expression einer Hemmung der K^+ -Aufnahme und des Wachstums entgegenwirkt.

Zusammengefasst bestätigen diese Ergebnisse, dass die Hemmung der K^+ -Aufnahme und des Wachstums des KdpD-WT bei K^+ -Konzentrationen von 10-50 mM auf einer unzureichenden

Induktion, oder anders ausgedrückt, einer Repression der *kdpFABC*-Expression durch KdpD basiert.

3.2.4. Expressionskinetik des *kdpFABC*-Operons nach einer Reduktion der externen K^+ -Konzentration

Bislang wurde die stationäre *kdpFABC*-Expression von Zellen bestimmt, die bei einer gegebenen K^+ -Konzentration kultiviert wurden. Im Folgenden wurde hingegen die zeitlich aufgelöste Expression (Expressionskinetik) des *kdpFABC*-Operons untersucht, nachdem die Zellen einer plötzlichen Reduktion der externen K^+ -Konzentration ausgesetzt wurden. Da β -Gal Aktivitäten nur als indirektes Maß für die *kdpFABC*-Expression dienen, wurde die *kdpA*-Expression, repräsentativ für die Expression des *kdpFABC*-Operons, mittels Q-RT-PCR direkt quantifiziert.

Für den Stamm TK2240 (*kdp+*, Δtrk , Δkup) wurden Expressionskinetiken des *kdpFABC*-Operons erstellt, nachdem exponentiell wachsende Zellen von einem Medium mit hoher K^+ -Konzentration (60 mM, pH 7,2) in Medien mit verschiedenen, niedrigeren K^+ -Konzentrationen (0,02 mM, 0,1 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM; pH 7,2) transferiert wurden. Ein schneller Transfer der Zellen wurde erreicht durch Filtration, Resuspension und Subkultivierung der Zellen in vorgewärmten Medium gleicher Zusammensetzung, jedoch mit entsprechend niedrigerer K^+ -Konzentration. In einem Kontrollversuch wurden Zellen zusätzlich in Minimalmedium mit gleicher K^+ -Konzentration transferiert, um einen eventuellen Einfluss der Filtrationsprozedur auf die *kdpFABC*-Expression zu untersuchen, welcher jedoch vernachlässigt werden konnte. Für die Erstellung der Expressionskinetiken wurden zu den angegebenen Zeiten Proben genommen (Abb. 3.7) und mittels Q-RT-PCR die gegen die Expression des *housekeeping*-Gens *gap* normalisierte *kdpA*-Expression quantifiziert. Zusätzlich wurden aus den fünf Subkulturen in einem 30 minütigen Intervall Proben zur Bestimmung der extrazelluläre K^+ -Konzentration genommen (Abb. 3.7).

Die Expressionskinetiken von TK2240-Zellen, die einer plötzlichen Reduktion der externen K^+ -Konzentration ausgesetzt wurden, zeigten eine unerwartete Dynamik. Die KdpD/KdpE Signaltransduktions-Kaskade wurde sehr schnell aktiviert, bereits 30 Sekunden nach der Reduktion der externen K^+ -Konzentration war das *kdpFABC*-Expressions-Niveau in den fünf Subkulturen hoch (Abb. 3.7). Nachdem die *kdpFABC*-Expression in jeder Subkultur innerhalb weniger Minuten ein Maximum erreichte, sank die Transkriptmenge und verblieb schließlich auf einem basalen Niveau, welches jedoch höher war als das Transkript-Niveau in der Vorkultur (Abb. 3.7). Der Zeitraum zwischen maximaler *kdpFABC*-Expression und dem Erreichen des basalen Niveaus, unterschied sich in den fünf Subkulturen, abhängig von der

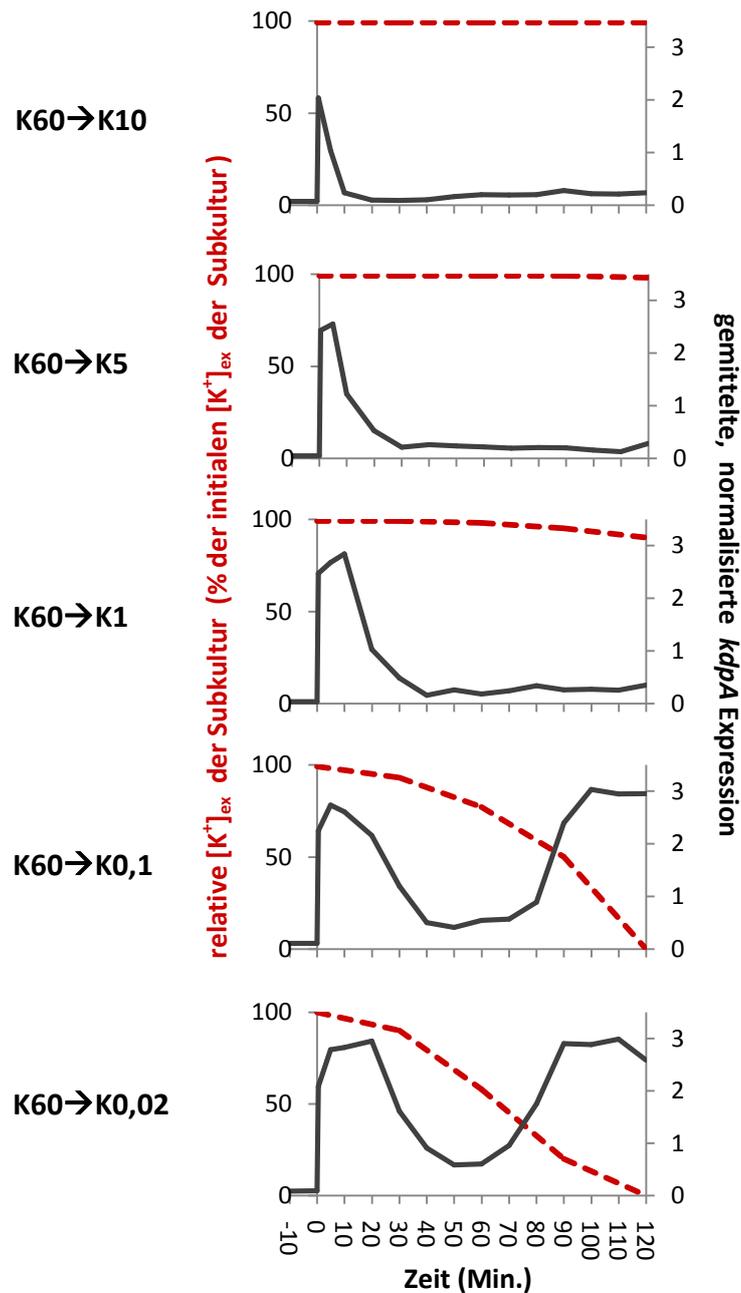


Abb. 3.7. *kdpA*-Expressionskinetik nach einer plötzlichen Abnahme der externen K^+ -Konzentration und relative K^+ -Abnahme der Subkultur. TK2240 (*kdp+*, Δtrk , Δkup) wurde in K60 (pH 7,2) bis zur exponentiellen Phase kultiviert, Vakuum-filtrierte, gewaschen und in Minimalmedien mit den angezeigten, niedrigeren K^+ -Konzentrationen subkultiviert. Der Moment, in dem die Zellen in das Medium niedrigerer K^+ -Konzentration transferiert wurden, wurde als Zeitpunkt 0 definiert. In jeder Subkultur wurde in einem 10-Minuten Intervall die normalisierte *kdpA* Transkript-Menge mittels Q-RT-PCR quantifiziert (zusätzlich 10 Minuten vor, sowie 30 Sekunden und 5 Minuten nach dem Transfer). Jeder Datenpunkt repräsentiert Durchschnittswerte von technischen Triplikaten, repräsentativ für mindestens zwei biologische Replikate. Zusätzlich wurden die externen K^+ -Konzentrationen der Subkulturen in einem 30-Minuten Intervall bestimmt. Gezeigt ist die K^+ -Konzentration relativ zur initialen K^+ -Konzentration jeder Subkultur in %.

Differenz der K^+ -Konzentration der Subkultur gegenüber der Vorkultur; umso niedriger die K^+ -Konzentration der Subkultur, desto länger der Zeitraum einer hohen *kdpFABC*-Expression (Abb. 3.7).

Zellen, die in Medium mit einer K^+ -Konzentration von 0,02 mM oder 0,1 mM subkultiviert wurden, zeigten einen zweiten Anstieg der *kdpFABC*-Expression nach 60 bzw. 80 Minuten, während die Transkriptmenge in den Subkulturen mit höheren K^+ -Konzentrationen auf dem basalen Niveau verblieb (Abb. 3.7). In Minimalmedium mit 0,02 mM K^+ oder 0,1 mM K^+ ist das Wachstum von TK2240 durch die limitierte K^+ -Verfügbarkeit beschränkt. Zellen, die unter K^+ -limitierenden Bedingungen kultiviert werden, reduzieren durch K^+ -Akkumulation kontinuierlich die K^+ -Konzentration des Mediums, bis aufgrund von K^+ -Mangel kein weiteres Wachstum mehr möglich ist. Entsprechend sank die externe K^+ -Konzentration der K^+ -limitierten Subkulturen kontinuierlich, bis der K^+ -Pool innerhalb von 120 Minuten erschöpft war. Im Gegensatz dazu konnte lediglich eine geringe Reduktion der K^+ -Konzentration in der Subkultur mit 1 mM K^+ , und keine signifikante Veränderung der K^+ -Konzentrationen in den Subkulturen mit 5 bzw. 10 mM K^+ beobachtet werden (Abb. 3.7).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass es eine sehr gute Korrelation zwischen einer Aktivierung der KdpD/KdpE Signaltransduktion und einer Reduktion der externen K^+ -Konzentration gibt. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass KdpD externes K^+ detektiert.

3.3. Diskussion

Der Stimulus, der von KdpD wahrgenommen wird und die KdpD/KdpE Signaltransduktions-Kaskade aktiviert, ist noch immer unbekannt. Es sind jedoch Faktoren bzw. Wachstumsbedingungen bekannt, die einen Einfluss auf die Induktion der *kdpFABC*-Expression und folglich auf die Stimulus-Wahrnehmung von KdpD ausüben. Hierzu gehört die K^+ -Konzentration, die Osmolarität und der pH-Wert des Mediums, sowie das Vorhandensein bzw. die Aktivität anderer K^+ -Aufnahmesysteme der Zelle (Laimins *et al.*, 1981, Asha und Gowrishankar, 1993). Der Stimulus, der von KdpD wahrgenommen wird, wurde häufig beschrieben als das zelluläre K^+ -Bedürfnis (Laimins *et al.*, 1981; Malli und Epstein, 1998), ein physiologischer Zustand der Zelle der gegeben ist, wenn ein erhöhter K^+ -Bedarf vorliegt, oder die K^+ -Aufnahme durch externen K^+ -Mangel oder Inaktivierung der konstitutiv exprimierten K^+ -Transporter limitiert ist.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war eine Untersuchung der Stimulus-Antwort von KdpD (*kdpFABC*-Expression) von *E. coli* Zellen, die verschiedenen, externen K^+ -Konzentrationen

und pH-Werten ausgesetzt wurden, sowie der physiologischen Parameter, welche durch die KdpD-Antwort beeinflusst werden (d.h. intrazelluläre K^+ -Konzentration, intrazellulärer pH-Wert und Wachstum). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Induktion der *kdpFABC*-Expression mit steigenden K^+ -Konzentrationen kontinuierlich sinkt, obwohl bei K^+ -Konzentrationen von 10-50 mM und pH 6,0 aus dem verminderten, KdpFABC-vermittelten K^+ -Transport eine signifikante Reduktion der cytoplasmatischen K^+ -Konzentration, des cytoplasmatischen pH-Werts und, daraus folgend, eine deutliche Wachstumshemmung resultierte; daher wird unter diesen Bedingungen die Induktion der *kdpFABC*-Expression reprimiert, obwohl das zelluläre K^+ -Bedürfnis hoch ist.

Der inhibierende Effekt von K^+ auf das Kdp-System ist nur bei azidischen pH-Werten sichtbar, da die unspezifische K^+ -Aufnahme bei höheren pH-Werten (pH 7,8) und K^+ -Konzentrationen (≥ 10 mM) den verminderten, KdpFABC-vermittelten K^+ -Transport kompensiert und somit überdeckt. Daher wurde diese wichtige Eigenschaft des Kdp-Systems in der Vergangenheit häufig übersehen. Nichtsdestotrotz wurde eine Inhibierung des Kdp-Systems von *E. coli* durch höhere K^+ -Konzentrationen bereits von Roe *et al.* (2000) beschrieben, wobei die Hemmung der K^+ -Aufnahme auf eine Hemmung der K^+ -Transportaktivität des KdpFABC-Komplexes zurückgeführt wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Hemmung der K^+ -Aufnahme bei höheren K^+ -Konzentrationen durch einzelne Aminosäure-Substitutionen in KdpD aufgehoben werden kann. Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass die gehemmte K^+ -Aufnahme des KdpD-WT bei höheren K^+ -Konzentrationen aus einer unzureichenden Induktion der *kdpFABC*-Expression durch KdpD, und nicht aus einer Hemmung der K^+ -Transportaktivität von KdpFABC resultiert.

Die Aspartat-Austausche in den periplasmatischen Schleifen von KdpD verändern die Antwort von KdpD auf höhere K^+ -Konzentrationen, die Induktion der *kdpFABC*-Expression des KdpD-WT und der beschriebenen KdpD-Derivate ist jedoch unter K^+ -Limitation identisch. Dieser Befund demonstriert, dass durch die beschriebenen Aspartat-Substitutionen keine generelle Beeinträchtigung der Stimulus-Wahrnehmung von KdpD oder der KdpD/KdpE Signaltransduktion verursacht wird. Weiterhin kann aufgrund dieser Ergebnisse die Hypothese aufgestellt werden, dass KdpD über die periplasmatischen Schleifen externes K^+ wahrnimmt und die *kdpFABC*-Expression in Abhängigkeit der externen K^+ -Konzentration reprimiert; je höher die externe K^+ -Konzentration, desto stärker die Repression der *kdpFABC*-Expression. Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich jedoch nicht schließen, ob die K^+ -vermittelte Repression der *kdpFABC*-Expression bei K^+ -Konzentrationen ≥ 10 mM aus einer

Inhibierung der Kinase-, oder aber einer Aktivierung der Phosphatase-Aktivität von KdpD resultiert.

Die Hypothese, dass KdpD externes K^+ wahrnimmt, ist eine Erweiterung, kein Ausschluss der Hypothese, dass KdpD einen intrazellulären Stimulus (K^+ -Bedürfnis der Zelle) detektiert. So sind die β -Gal Aktivitäten von TK2240/pWPA1lacZ bei einem pH-Wert von 6,0, bei dem generell ein erhöhter K^+ -Bedarf der Zelle vorliegt, höher als bei einem pH-Wert von 7,8 (Abb. 3.2. C), jedoch nicht hoch genug, um eine ausreichende K^+ -Aufnahme zu gewährleisten (Abb. 3.2. A+B). Daher kann ein Modell aufgestellt werden, in dem KdpD einen intrazellulären, aktivierenden (hohes K^+ -Bedürfnis) und einen externen, reprimierenden Stimulus ($[K^+]_{ex}$) wahrnimmt. Das Ausmaß der Aktivierung der KdpD/KdpE Signaltransduktions-Kaskade wäre demzufolge die Summe der Intensität zwei verschiedener Reize.

Bei den *E. coli* Stämmen, die in dieser Arbeit verwendet wurden (Δtrk , Δkup), reprimieren K^+ -Konzentrationen ≥ 10 mM die *kdpFABC*-Expression, während bei diesen K^+ -Konzentrationen und pH 6,0 der postulierte interne Stimulus (K^+ -Bedürfnis) die *kdpFABC*-Expression aufgrund des zellulären K^+ -Mangels aktiviert. Die Intensität der daraus resultierenden *kdpFABC*-Expression ist jedoch nicht ausreichend, um den zellulären K^+ -Mangel auszugleichen (Abb. 3.8. A).

In einem *E. coli* WT-Stamm hingegen ist bei höheren K^+ -Konzentrationen (≥ 10 mM), bei denen eine Repression der *kdpFABC*-Expression erfolgt, die K^+ -Affinität von Trk und Kup hoch genug, um die Zelle mit ausreichend K^+ zu versorgen. Daher ist unter diesen Umständen die K^+ -Aufnahme ausreichend und es findet keine Aktivierung der *kdpFABC*-Expression durch den intrazellulären Stimulus statt (Abb. 3.8. B).

Unter K^+ -limitierten Wachstumsbedingungen erfolgt sowohl in einem *E. coli* WT-Stamm, als auch in einem in *trk* und *kup* inaktivierten Stamm, keine K^+ -Aufnahme *via* Trk und Kup. Dies löst einen zellulären K^+ -Mangel (hohes K^+ -Bedürfnis) aus, der wiederum die KdpD-vermittelte *kdpFABC*-Expression aktiviert. Gleichzeitig findet aufgrund der geringen externen K^+ -Konzentration keine Repression der *kdpFABC*-Expression durch externes K^+ statt. Daher ist die *kdpFABC*-Expression unter K^+ -limitierten Wachstumsbedingungen maximal (Abb. 3.8. C).

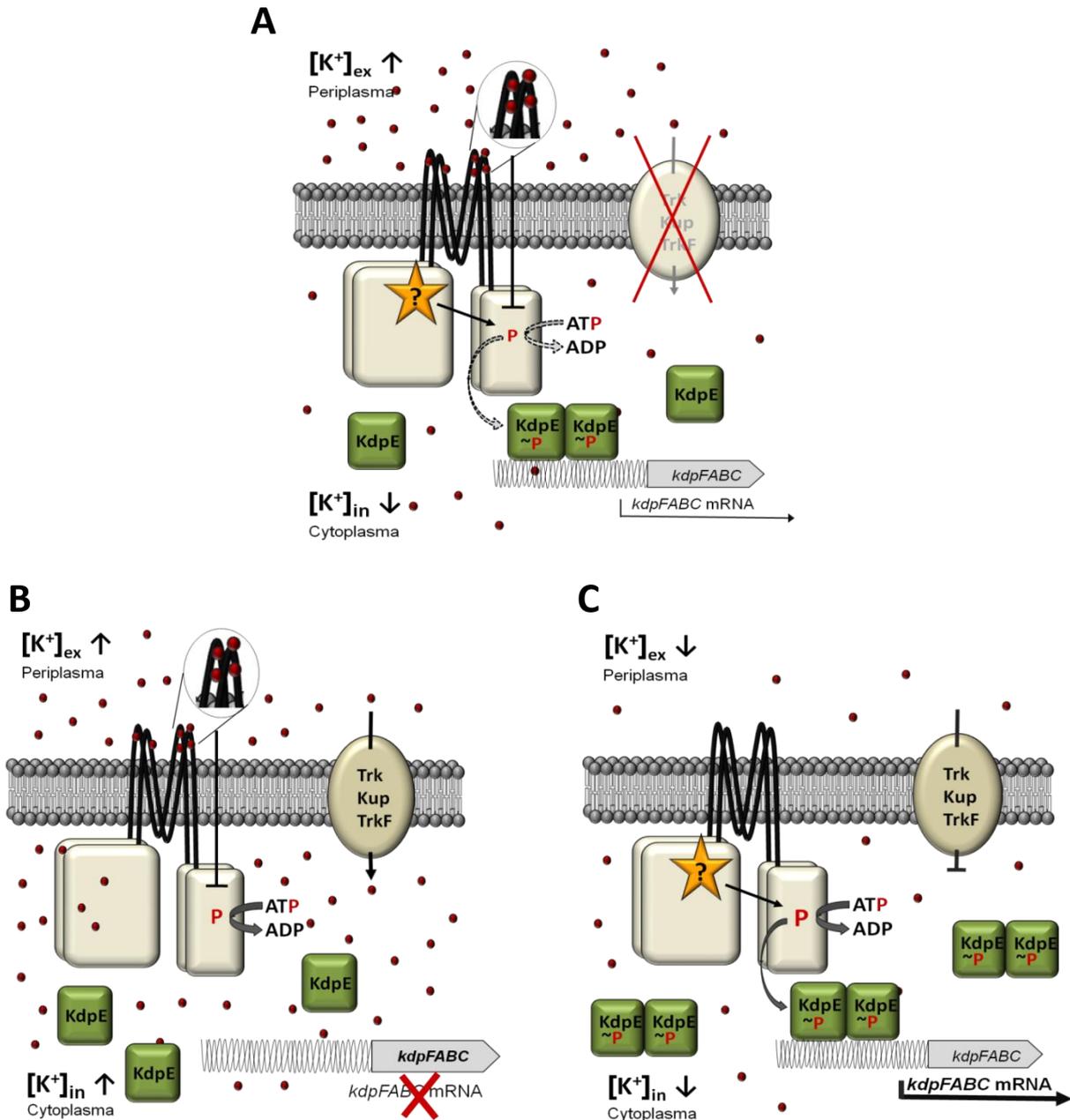


Abb. 3.8. Modell zur Reizwahrnehmung von KdpD.

A. Modell zur Reizwahrnehmung von KdpD in einem Stamm, der in Trk und Kup inaktiv ist und eine geringe TrkF-Aktivität aufweist (pH-Wert von 6,0). Bei hohen externen K^+ -Konzentrationen interagiert K^+ mit der periplasmatischen Sensor-Domäne von KdpD und hemmt die $kdpFABC$ -Expression. Aufgrund der fehlenden Aktivität von Trk, Kup und TrkF ist die K^+ -Aufnahme unter diesen Bedingungen unzureichend und führt zu einem zellulären K^+ -Mangel, der durch die intrazelluläre Sensor-Domäne registriert wird und die $kdpFABC$ -Expression aktiviert. Die aus den entgegengesetzt wirkenden Stimuli resultierende $kdpFABC$ -Expression ist jedoch nicht ausreichend, um den zellulären K^+ -Mangel auszugleichen.

B. Modell zur Reizwahrnehmung von KdpD in einem WT-Stamm. Bei hohen externen K^+ -Konzentrationen interagiert K^+ mit der periplasmatischen Sensor-Domäne und hemmt die $kdpFABC$ -Expression. Unter diesen Bedingungen findet ein hoher K^+ -Transport via Trk und Kup statt, der die K^+ -Aufnahme der Zelle sichert. Demnach findet unter diesen Bedingungen keine Aktivierung der $kdpFABC$ -Expression durch den intrazellulären Stimulus statt.

C. Modell zur Reizwahrnehmung von KdpD in einem WT-Stamm und in einem Stamm, der in Trk und Kup inaktiv ist. Bei geringen externen K^+ -Konzentrationen interagiert K^+ nicht mit der periplasmatischen K^+ -Sensor-Domäne und es findet keine Hemmung der *kdpFABC*-Expression statt. Aufgrund der relativ geringen K^+ -Affinität von Trk und Kup ist die K^+ -Aufnahme unter diesen Bedingungen unzureichend und führt zu einem zellulären K^+ -Mangel, der durch die intrazelluläre Sensor-Domäne registriert wird die *kdpFABC*-Expression aktiviert.

Welchen Vorteil hat die Zelle davon, neben dem intrazellulären Stimulus, zusätzlich die externe K^+ -Konzentration zu detektieren? Für *E. coli*, sowie die meisten anderen Bakterien, existiert kein generelles, cytoplasmatisches K^+ -Optimum. Die cytoplasmatische K^+ -Konzentration ist hingegen maßgeblich von den Umweltbedingungen, insbesondere der Osmolarität der Umgebung, abhängig (Epstein, 2003). Obwohl einige Studien zeigten, dass die Osmolarität die KdpD/KdpE-vermittelte *kdpFABC*-Expression stimuliert (Laimins *et al.*, 1981), sind hierzu jedoch folgende, umfangreiche Einschränkungen zu machen: (i) hohe Konzentrationen nicht-ionischer Osmolyte stimulieren die *kdpFABC*-Expression nicht (Sutherland *et al.*, 1986; Asha und Gowrishankar, 1993; Jung und Altendorf, 1998), (ii) hohe Konzentrationen ionischer Osmolyte stimulieren die *kdpFABC*-Expression in einem deutlich geringeren Ausmaß als K^+ -Limitation (Hamann *et al.*, 2008), (iii) hohe Konzentrationen von KCl, ebenfalls ein ionisches Osmolyt, stimulieren die *kdpFABC*-Expression nicht (Hamann *et al.*, 2008), (iv) das Ausmaß der *kdpFABC*-Expression in der Gegenwart hoher NaCl-Konzentrationen bleibt abhängig von der externen K^+ -Konzentration. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die externe Osmolarität *per se* einen direkten Einfluss auf die Reizwahrnehmung von KdpD hat.

Der K^+ -Transport *via* Trk und Kup ist, im Gegensatz zum K^+ -Transport *via* KdpFABC, nicht an ATP-Hydrolyse gekoppelt. Verändert sich das K^+ -Bedürfnis der Zelle während die externe K^+ -Konzentration hoch genug ist, um die K^+ -Aufnahme *via* Trk und Kup zu bewerkstelligen, ist eine Induktion der *kdpFABC*-Expression durch KdpD energetisch betrachtet unvorteilhaft. Ein dualer Mechanismus der Stimulus-Wahrnehmung von KdpD, bei dem sowohl die externe K^+ -Konzentration, als auch das K^+ -Bedürfnis der Zelle wahrgenommen wird, ermöglicht somit eine „ökonomische“ Kontrolle der *kdpFABC*-Expression. Unter K^+ -Limitation wird eine maximale *kdpFABC*-Expression induziert, während eine *kdpFABC*-Expression unter Wachstumsbedingungen verhindert wird, unter denen einem erhöhten K^+ -Bedürfnis der Zelle durch die K^+ -Aufnahme durch Trk und Kup begegnet werden kann und somit ein zellulärer K^+ -Mangel unwahrscheinlich ist. Weiterhin ist es möglich, dass die Wahrnehmung der externen K^+ -Konzentration nicht nur eine Inhibierung der *kdpFABC*-Expression bei hohen K^+ -Konzentration, sondern ebenfalls eine Aktivierung der *kdpFABC*-Expression bei niedrigen

K⁺-Konzentrationen auslöst. In diesem Fall würde die Wahrnehmung von externem K⁺ eine Aktivierung der *kdpFABC*-Expression als vorausschauende Antwort auf einen drohenden, zellulären K⁺-Mangel ermöglichen, bevor sich dieser intrazellulär etabliert.

Ausgehend von der Annahme, dass die Intensität der Aktivierung der KdpD/KdpE Signaltransduktions-Kaskade die Summe aus zwei entgegengesetzt wirkenden Reizen ist - Repression durch externes K⁺ und Aktivierung durch das hohe K⁺-Bedürfnis -, kann die veränderte Regulation der *kdpFABC*-Expression in den Derivate KdpD-D474A und KdpD-D474C folgendermaßen erklärt werden: die durch externes K⁺ vermittelte Repression der *kdpFABC*-Expression wird durch die Aspartat-Substitutionen aufgehoben und die verbleibende Regulation reflektiert den postulierten intrazellulären Stimulus, das K⁺-Bedürfnis der Zelle; bei K⁺-Konzentration bis 30 mM ist der unspezifische K⁺-Transport gering und daher das K⁺-Bedürfnis der Zelle hoch. Entsprechend sind die β -Gal Aktivitäten von TKV2209/ pPV-2-D474A und TKV2209/ pPV-2-D474C unter diesen Bedingungen hoch. Der Anstieg des unspezifischen K⁺-Transports bei 50 mM geht mit einer Reduktion des K⁺-Bedürfnisses und folglich einer Reduktion der β -Gal Aktivitäten einher und eine hohe unspezifische K⁺-Aufnahme bei 115 mM K⁺ reprimiert die β -Gal Aktivität vollständig. Die cytoplasmatische K⁺-Konzentration ist dabei unter allen getesteten Bedingungen in einem physiologischem Bereich von ungefähr 400 nmol mg⁻¹ Trockengewicht. Somit sichert die Regulation der *kdpFABC*-Expression in TKV2209/ pPV-2-D474A und TKV2209/ pPV-2-D474C eine optimale K⁺-Versorgung der Zelle.

Der Austausch des Aspartats 424 in KdpD führte nur in einem einzigen Fall zu einer signifikanten Veränderung der Sensitivität gegenüber externem K⁺. Interessanterweise bewirkte diese Substitution (D424Y) einen entgegengesetzten Phänotyp, nämlich eine erhöhte Sensitivität von KdpD-D424Y gegenüber externem K⁺. Möglicherweise führt diese Substitution zu einer Repositionierung der cytoplasmatischen Domänen und verhindert dadurch die Wahrnehmung des internen Stimulus, so dass die Induktion der *kdpFABC*-Expression dieses Derivats ausschließlich durch die Inhibierung durch externes K⁺ reguliert wird. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhte K⁺-Sensitivität dieses Derivats dadurch verursacht wird, dass die Aspartat-Substitution die K⁺-Affinität der postulierten K⁺-Sensordomäne erhöht und dadurch bereits bei niedrigeren K⁺-Konzentrationen eine Induktion der *kdpFABC*-Expression inhibiert wird.

Substitutionen von KdpD-D424 und KdpD-D474 verursachen nicht notwendigerweise eine Veränderung der Reizwahrnehmung von KdpD. Daher kann ausgeschlossen werden, dass die Carboxylgruppen dieser Aspartatreste an der Koordinierung von K⁺ in einer potentiellen

Bindestelle beteiligt sind. Es ist jedoch möglich, dass die Carbonylgruppe von D424 oder D474 direkt an der Bildung einer K^+ -Bindestelle beteiligt ist. In diesem Fall würde eine potentielle K^+ -Bindestelle nur dann durch eine Substitution beeinflusst werden, wenn die Substitution eine Konformations-Änderung hervorruft, die eine Koordinierung von K^+ durch die Carbonylgruppe verhindert. Weiterhin ist es möglich, dass D424 bzw. D474 nicht direkt an der Bildung einer K^+ -Bindestelle beteiligt sind, Substitutionen jedoch eine Konformations-Änderung bewirken, die die Funktionalität einer in der Nähe lokalisierten K^+ -Bindestelle beeinflussen. Aufgrund der limitierten strukturellen Daten ist es zurzeit nicht möglich, eine K^+ -Bindestelle in den periplasmatischen Schleifen von KdpD zu identifizieren. K^+ -Bindestellen zeigen eine starke Heterogenität in der Distanz von K^+ zum Koordinierungspartner, sowie in der Anzahl von Koordinierungspartnern, welche nicht auf Proteine beschränkt sein müssen, sondern ebenfalls durch Wassermoleküle gegeben sein können (Ch. Ziegler, persönliche Mitteilung). Daher ist die Mutagenese der Aspartatreste in den periplasmatischen Schleifen von KdpD hilfreich, um die Natur des Stimulus von KdpD zu charakterisieren, erlaubt jedoch nur bedingt Rückschlüsse auf den molekularen Mechanismus der Reizwahrnehmung.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde in einer älteren Studie postuliert, dass die Membran-Domäne inklusive der periplasmatischen Schleifen von KdpD nicht essentiell für die Stimulus-Wahrnehmung von KdpD sind, da entsprechend verkürzte KdpD-Derivate unter K^+ -Limitation ($[K^+]_{ex} < 1 \text{ mM}$) weiterhin eine hohe Induktion der *kdpFABC*-Expression aufwiesen (Heermann *et al.*, 2003b). In einer anderen Studie wurde außerdem gezeigt, dass ein KdpD-Derivat, welches ausschließlich die lösliche C-terminale Domäne (AS 499-894) umfasst, eine hohe *kdpFABC*-Expression unter K^+ -limitierenden Wachstumsbedingungen induziert (Rothenbücher *et al.*, 2006). Aus diesen Studien wurde gefolgert, dass cytoplasmatische Domänen von KdpD als K^+ -Sensor fungieren. Im Gegensatz zum KdpD-WT jedoch vermittelten diese verkürzten KdpD-Derivate alle eine hohe, konstitutive *kdpFABC*-Expression bei externen K^+ -Konzentrationen $> 1 \text{ mM}$. Bei genauer Betrachtung bestätigen demzufolge die Ergebnisse der zitierten Arbeiten die aus der vorliegenden Arbeit gezogene Schlussfolgerung, dass die periplasmatischen Schleifen ebenfalls als K^+ -Sensor dienen und die Sensitivität von KdpD gegenüber externem K^+ vermittelt.

Wie bereits erwähnt wurde gezeigt, dass KdpD im Zuge einer Erhöhung der externen Osmolarität des Mediums durch ionische Solute eine *kdpFABC*-Expression induziert. Es bleibt jedoch rätselhaft, warum KCl und nicht-ionische Osmolyte nicht effektiv sind. Neuere

3. Untersuchungen zur Natur des Stimulus von KdpD

Studien zeigten, dass UspC (*universal stress protein C*), welches unter zahlreichen Stress-Bedingungen einschließlich hyperosmotischen Bedingungen synthetisiert wird (Gustavsson *et al.*, 2002), unter Salzstress an die N-terminale Usp-Domäne von KdpD bindet, den KdpD/KdpE~P/DNA-Komplex stabilisiert und somit eine *kdpFABC*-Expression stimuliert (Heermann *et al.*, 2009a). Dieses Modell erklärt jedoch nicht, warum als Osmolyt ausschließlich Salze, mit Ausnahme von KCl, effektiv sind und nicht-ionisch Osmolyte wie Sucrose keine *kdpFABC*-Expression stimulieren. Möglicherweise interferieren hohe Na⁺-Konzentrationen mit der postulierten Reaktion zwischen K⁺ und der periplasmatischen K⁺-Sensor-Domäne und suggerieren somit eine Abnahme der externen K⁺-Konzentration. Diese Hypothese stimmt mit der Annahme von Asha und Gowrishankar (1993) überein, dass die Induktion der *kdpFABC*-Expression durch hohe Konzentrationen ionischer Solute nicht auf den osmotischen Eigenschaften dieser Solute basiert.

Die Annahme, dass externes K⁺ einen direkten Einfluss auf KdpD hat, wird durch die zeitlich aufgelösten Induktionsprofile der *kdpA*-Expression nach einer plötzlichen Reduktion der externen K⁺-Konzentration unterstützt. Die *kdpA*-Expression ist in allen fünf Subkulturen bereits 30 Sekunden nach dem Transfer der Zellen sehr hoch. Vergleichbare Ergebnisse wurden für den *E. coli* WT K12 erzielt (Hamann *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass in K12 eine schnelle und hohe *kdpA*-Expression nach einer Reduktion der externen K⁺-Konzentration von 20 mM auf 20 µM induziert wird, die weder mit einer Abnahme der intrazellulären Konzentration von K⁺, ATP, Glutamat, Prolin oder Trehalose, noch mit einer Abnahme des Turgors einhergeht (Hamann *et al.*, 2008). Die Induktionsprofile der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch, dass die Induktion der *kdpA*-Expression eindeutig mit der K⁺-Konzentration der Subkultur korreliert; da die K⁺-Konzentrationen in allen fünf Subkulturen niedriger ist als in der Vorkultur, findet in allen Subkulturen eine Induktion der *kdpA*-Expression statt, wobei Höhe und Dauer der *kdpA*-Expression mit der Differenz der K⁺-Konzentration in Vor- und Subkultur korreliert.

Die Beobachtung, dass die Transkript-Mengen nach der initialen Induktion fällt bis ein stabiles Expressions-Niveau erreicht ist, legt die Vermutung nahe, dass die *kdpFABC*-Expression und damit die Reizwahrnehmung durch KdpD einer negativen *feedback*-Kontrolle unterliegt. Möglicherweise wird der negative *feedback* indirekt durch den KdpFABC-Komplex vermittelt; der hohen *kdpFABC*-Expression folgt ein erhöhter K⁺-Transport, der wiederum die intrazelluläre K⁺-Konzentration erhöht. Ein solches Modell wurde von Kremling *et al.* (2004) im Zuge einer mathematischen Modellierung des KdpD/KdpE Systems von *E. coli* vorgeschlagen, wobei die experimentellen Beobachtungen mit den simulierten

Ergebnissen nur unter Berücksichtigung einer Rückkopplung von KdpFABC auf den Input des Systems in Einklang gebracht werden konnten. Aufgrund der geringen initialen K^+ -Konzentration der K^+ -limitierten Subkulturen (0,1 mM K^+ und 0,02 mM K^+) bewirkt die kontinuierliche K^+ -Akkumulation der Zellen eine stetige Abnahme der externen K^+ -Konzentration, bis der K^+ -Pool vollständig erschöpft ist. In diesen Subkulturen erfolgte ein zweiter Anstieg der *kdpA*-Expression nach 60 bzw. 80 Minuten. Da die K^+ -Konzentration in den K^+ -limitierten Subkulturen kontinuierlich sinkt, muss die *kdpFABC*-Expression nach Erreichen des basalen Expressions-Niveaus wieder steigen, um die K^+ -Versorgung der Zellen konstant zu halten. Somit kann der zweite Anstieg der *kdpA*-Expression sowohl auf eine weitere Reduktion der externen K^+ -Konzentration, als auch auf einen zellulären K^+ -Mangel zurückgeführt werden.

Heermann und Kollegen (2014) untersuchten jüngst die *kdpA*-Expressionskinetik eines WT-Stamms (MG1655, *kdp+*, *trk+*, *kup+*), nach einem Transfer dieser Zellen von nicht-induzierenden Bedingungen (10 mM K^+) in strenge K^+ -Limitation (0,04 mM K^+). Der Versuchsaufbau entsprach dabei dem Versuchsaufbau aus Abb. 3.7. Die beobachtete *kdpA*-Expressionskinetik von MG1655 stimmte mit der in dieser Arbeit beschriebenen, nicht-monotonen *kdpA*-Expressionskinetik von TK2240 überein. Zusätzlich zur *kdpA*-Expression untersuchten die Autoren die cytoplasmatische K^+ -Konzentration von MG1655 über die Zeit. Es konnte eine inverse Korrelation zwischen der Höhe der *kdpA*-Expression und der Höhe der cytoplasmatischen K^+ -Konzentration beobachtet werden. Diese Beobachtungen bestätigen somit die Hypothese, dass der K^+ -Transport *via* KdpFABC einen negativen *feedback* auf die *kdpFABC*-Expression ausübt. Diese Hypothese wurde durch eine entsprechende Analyse der *kdpA*-Expressionskinetik eines *E. coli* Stamms untermauert, der einen inaktiven KdpFABC-Komplex synthetisiert. Nach einem Transfer dieser Zellen in K^+ -limitierte Bedingungen, konnte bis zum Erreichen eines Maximums ein monotoner Anstieg der *kdpA*-Expression beobachtet werden. In diesem Stamm blieb somit der negative *feedback* auf die *kdpA*-Expression aus. Diese Studie ergab somit interessante Hinweise auf die Natur des intrazellulären Stimulus von KdpD. Die Autoren postulierten, dass die intrazelluläre K^+ -Konzentration als Stimulus unter K^+ -limitierten Wachstumsbedingungen dient, während die Aktivierung der KdpD/KdpE Signaltransduktion unter nicht K^+ -limitierten Wachstumsbedingungen durch die externe K^+ -Konzentration reprimiert wird.

3.4. Ausblick

Die Sensorkinase KdpD zeigt *in vitro* eine Autokinase-, Phosphotransferase- (Voelkner *et al.*, 1993; Puppe *et al.*, 1996) und KdpE-spezifische Phosphatase-Aktivität (Puppe *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1997). Es sollte im Weiteren untersucht werden, ob externes K^+ die Autokinase- oder Phosphatase-Aktivität von KdpD beeinflusst, bzw. ob in den KdpD-Derivaten, die eine veränderte Sensitivität gegenüber externem K^+ vermitteln, gegenüber dem KdpD-WT eine veränderte Autokinase- oder Phosphatase-Aktivität festzustellen ist. Hierzu müssten invertierte Membranvesikel von Zellen präpariert werden, die entweder den *kdpD*-WT, oder die in dieser Arbeit beschriebenen *kdpD*-Derivate exprimieren. Die Autokinase-Aktivität des Kdp-WT bzw. der KdpD-Derivate kann nach einer Inkubation der entsprechenden invertierten Membranvesikel mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, elektrophoretischer Auftrennung der Membranvesikel und anschließender Detektion der radioaktiv phosphorylierten Proteine quantifiziert werden. Die Phosphatase-Aktivität des Kdp-WT bzw. der KdpD-Derivate kann nach Inkubation der entsprechenden invertierten Membranvesikel mit $\text{KdpE}\sim\gamma\text{-}^{32}\text{P}$, elektrophoretischer Auftrennung der Membranvesikel und anschließender Detektion der radioaktiv phosphorylierten Proteine quantifiziert werden. Die Bestimmung der Autokinase- und Phosphatase-Aktivitäten des KdpD-WT und der KdpD-Derivate sollte bei verschiedenen externen (bzw. bei invertierte Membranvesikel entsprechend internen) K^+ -Konzentrationen durchgeführt werden.

Die potentielle K^+ -Bindestelle in den periplasmatischen Schleifen von KdpD könnte durch eine systematische Substitution der dort lokalisierten Aminosäuren genauer charakterisiert werden. Die erzeugten Mutanten könnten mittels β -Gal-Assay hinsichtlich der Induktion der *kdpFABC*-Expression bei verschiedenen externen K^+ -Konzentrationen untersucht werden.

Weiterhin sollte die Hypothese, dass die Induktion der *kdpFABC*-Expression bei hohen Na^+ -Konzentrationen (0,5M) aus einer Interferenz von Na^+ mit der postulierten K^+ -Sensor-Domäne resultiert, überprüft werden. Hierzu könnte mittels β -Gal-Assays untersucht werden, ob die in dieser Arbeit beschriebenen KdpD-Derivate unter hohen Na^+ -Konzentrationen (0,5M) eine gegenüber dem KdpD-WT veränderte Induktion der *kdpFABC*-Expression aufweisen.

4. Quantifizierung der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes und des KdpD/KdpE-Systems

4.1. Einleitung

Die Gene des Kdp-Systems, kodiert auf dem *kdpFABC*-Operon und dem *kdpDE*-Operon, weisen eine ungewöhnliche Architektur auf; das *kdpDE*-Operon liegt direkt stromabwärts des *kdpFABC*-Operons, wobei der Promotor, der Transkriptionsstart und das *kdpD*-Startkodon innerhalb des *kdpC*-Gens lokalisiert ist (Abb. 1.4). Unter induzierenden Bedingungen bindet ein phosphoryliertes KdpE-Dimer als Transkriptionsaktivator an eine 23 Bp umfassende Operator-Struktur stromaufwärts des *kdpFABC*-Promotors und induziert somit die Expression des *kdpFABC*-Operons (Sugiura *et al.*, 1992). Die Expression des *kdpFABC*-Operons wurde bislang weitestgehend auf transkriptioneller Ebene untersucht, wobei unter K^+ -Limitation mittels *kdpFABC*-Promotor::*lacZ*-Fusionen oder Q-RT-PCR eine über tausendfache Amplifikation der *kdpFABC*-Expression bestimmt wurde (Zimmann *et al.*, 2007; Hamann *et al.*, 2008). Demgegenüber war die anhand dieser Methoden ermittelte *kdpFABC*-Expression unter nicht-induzierenden Bedingungen jedoch so gering, dass sich nicht mit Sicherheit feststellen ließ, ob eine basale Transkription und daraus folgend eine basale Synthese des KdpFABC-Komplexes stattfindet. Der Promotor des *kdpDE*-Operons zeigt eine Ähnlichkeit zu der “-35“- und “-10“-Consensus-Sequenz von typischen, σ^{70} -abhängigen Promotoren in *E. coli* und bedingt eine konstitutive, basale Expression von *kdpD* und *kdpE* (Polarek *et al.*, 1992). Weiterhin wurde mittels einer chromosomalen, transkriptionellen *kdpD*::*lacZ*-Fusion gezeigt, dass die Expression des *kdpDE*-Operons unter induzierenden Bedingungen ebenfalls erhöht wird (Polarek *et al.*, 1992). Somit unterliegt das KdpD/KdpE Zweikomponenten-System möglicherweise einer Autoregulation.

Neben einer regulatorischen Interaktion von Zweikomponenten-Systemen und zugehörigen Zielproteinen auf genetischer Ebene, scheinen auch regulatorische Interaktionen von Zweikomponenten-Systemen und zugehörigen Zielproteinen auf Proteinebene zu existieren. Es gibt zunehmend Hinweise, dass Transporter als Co-Sensoren für Sensorkinasen fungieren (Tetsch und Jung, 2009a). Transporter binden spezifisch Substrate und transportieren diese aus dem Medium in das Cytoplasma. Daher sind Transporter gut geeignet, um Informationen über den eigenen Transport-Status und damit über den metabolischen Fluss eines Substrats an eine korrespondierende Sensorkinase zu übermitteln (Tetsch und Jung, 2009a). Die Sensorkinase wiederum integriert diese Information und reguliert als Antwort die Expression

von Genen, die an dem Transport bzw. an der Prozessierung des Substrats beteiligt sind. Hierbei kann das Gen, welches den Transporter kodiert, selbst ein Zielgen des korrespondierenden Zweikomponenten-Systems sein und somit die eigene Synthese kontrollieren (Tetsch und Jung, 2009b). Ein bekanntes Beispiel für dieses Modell ist das Sensorkinase/Antwortregulator-System DcuS/DcuR von *E. coli*. DcuS/DcuR wird durch C₄-Dicarbonsäuren aktiviert und reguliert unter aeroben Wachstumsbedingungen die Expression des Gens *dctA*, welches den Dicarbonsäure-Transporter DctA kodiert (Zientz *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass DctA mit der Sensorkinase DcuS interagiert und so eine Einheit in der Stimulus-Wahrnehmung bildet (Witan *et al.*, 2012). Hierbei wird davon ausgegangen, dass der DctA Transporter in Abwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren inaktiv ist und die DcuS-Aktivität über eine direkte Interaktion inhibiert, während DctA in Anwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren aktiv ist und dadurch die Interaktion von DcuS und DctA modifiziert und somit die Inhibierung der DcuS-Aktivität aufgehoben wird (Witan *et al.*, 2012). Ein ähnlicher Mechanismus der Stimulus-Wahrnehmung ist auch für die Sensorkinase KdpD vorstellbar. Basierend auf den Ergebnissen eines *bacterial two-hybrid* Assays gibt es erste Hinweise, dass die Sensorkinase KdpD und die K⁺-Transportuntereinheit KdpB tatsächlich interagieren (Kipschull, 2011). Für eine regulatorische Interaktion zwischen KdpD und KdpB ist jedoch eine basale Synthese des KdpFABC-Komplexes auch unter nicht-induzierenden Bedingungen eine Voraussetzung. Zurzeit gibt es jedoch auf Protein-Ebene keine präzisen Informationen über die absoluten Mengen des KdpFABC-Komplexes, sowie der Sensorkinase KdpD und des Antwortregulators KdpE unter induzierenden bzw. nicht-induzierenden Wachstumsbedingungen. Daher war das Ziel der folgenden Arbeit eine absolute Quantifizierung der vier Untereinheiten des hoch-affinen KdpFABC-Komplexes, sowie KdpD und KdpE aus dem *E. coli* WT-Stamm K12 unter nicht-induzierenden Bedingung (nicht K⁺-limitierten Wachstumsbedingungen; K115) und unter induzierenden Bedingung (K⁺-limitierte Wachstumsbedingungen; K0). Durch diese Untersuchungen sollte ebenfalls die Frage beantwortet werden, ob unter induzierenden Bedingungen eine erhöhte Synthese von KdpD und KdpE stattfindet.

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Absolute Quantifizierung von KdpFABC und KdpD/KdpE

Zur Quantifizierung der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes und des Zweikomponenten-Systems KdpD/KdpE unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen, wurde *E. coli* K12 unter K⁺-limitierten (K0,1), sowie unter nicht K⁺-limitierten

(K115) Wachstumsbedingungen bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert (OD_{600} von 0,5). In der K^+ -limitierten Zellkultur konnte zum Zeitpunkt der Zellernte kein K^+ mehr nachgewiesen werden. Daher wird im Folgenden davon ausgegangen, dass die anschließende Quantifizierung unter induzierenden Bedingungen aus einer nominal K^+ -freien Zellkultur (K0) vorgenommen wurde. Aus den Protein-Extrakten dieser Zellen wurden an der Universität Greifswald mittels hoch sensitiver und selektiver Massenspektrometrie (*multiple reaction monitoring*; MRM) die Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes, sowie des KdpD/KdpE Zweikomponenten-Systems quantifiziert. Die absolute Konzentration eines Proteins konnte mittels MRM durch die Zugabe eines internen Standards zu der zu analysierenden Probe ermittelt werden. Als interner Standard dienten definierte Konzentrationen schwerer (^{13}C - und ^{15}N -markiertes Arginin oder Lysin), proteotypischer Peptide für jedes zu quantifizierende Protein. Proteotypische Peptide sind einzigartige Peptide eines Proteins, die dieses eindeutig identifizieren und mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden können (Kuster *et al.*, 2005). Basierend auf dem Verhältnis der Signal-Intensität des schweren Standard-Peptids bekannter Konzentration zu der Signal-Intensität des natürlichen Peptids in der zu analysierenden Probe, konnten absolute Konzentrationen der Proteine ermittelt werden. Eine kurze Übersicht über die Methodik der Quantifizierung ist in Abbildung 4.1 gegeben.

Da KdpF nur 29 Aminosäuren umfasst und außerdem keine Trypsin-Schnittstelle beinhaltet, konnte diese Untereinheit des KdpFABC-Komplexes weder identifiziert, noch quantifiziert werden.

4. Quantifizierung der Untereinheiten des Kdp-Systems

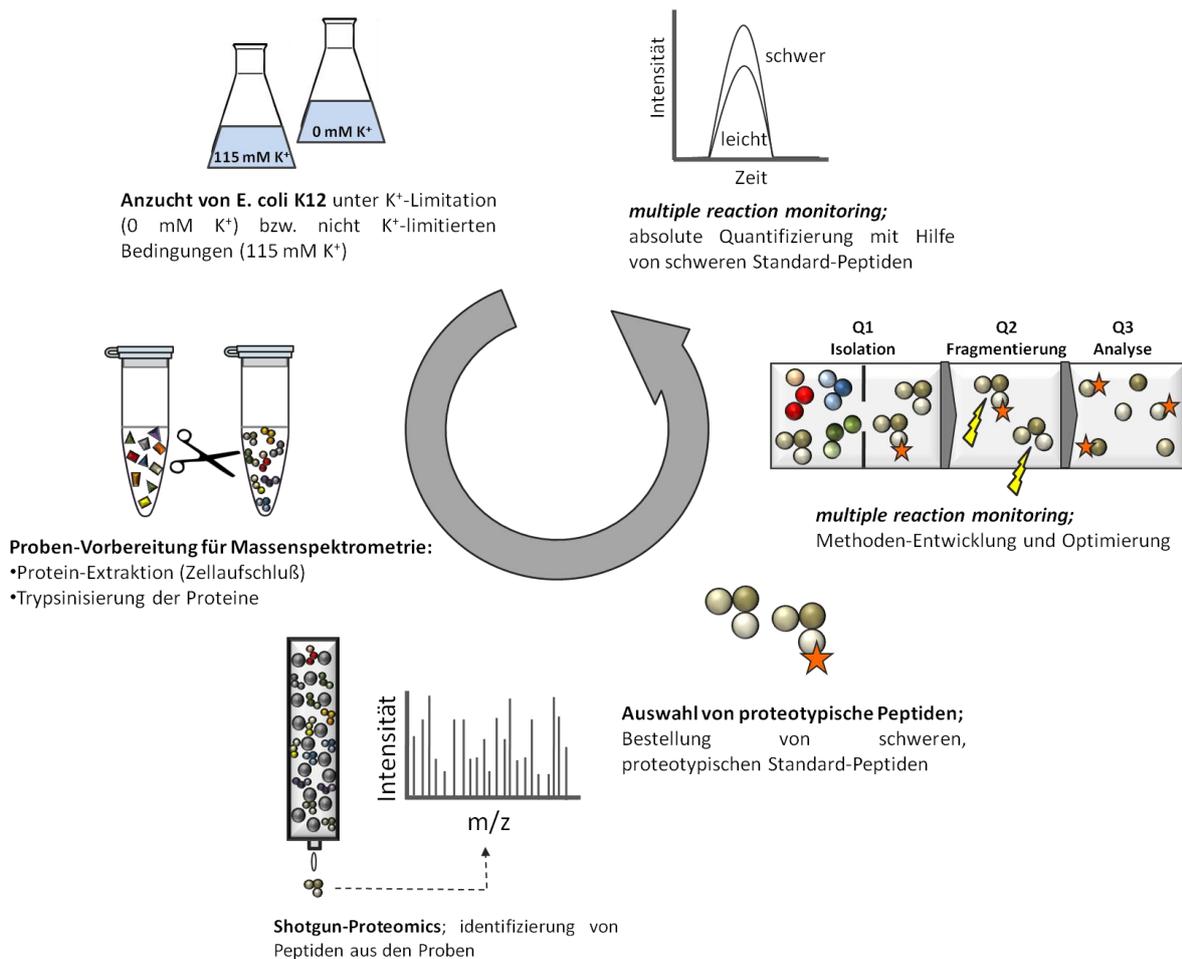


Abb. 4.1. Absolute Quantifizierung von Kdp(F)ABC und KdpDE aus *E. coli* K12 mittels MRM. Zellen wurden in K0 bzw. K115 kultiviert, durch Ultraschall aufgeschlossen und der Protein-Extrakt trypsinisiert. Mittels Shotgun-Massenspektrometrie wurden die Peptide der Proteine des Kdp-Systems identifiziert und anhand der Ergebnisse geeignete, proteotypische Peptide für jedes Protein ausgewählt. Die schweren (^{13}C - und ^{15}N -markiertes Arginin oder Lysin), proteotypischen Standard-Peptide wurden in definierten Konzentrationen zu den zu analysierenden Proben gegeben und erlaubten somit eine absolute Quantifizierung der entsprechenden natürlichen Peptide mittels MRM.

Zunächst wurden die Konzentrationen der Proteine des Kdp-Systems unter nicht K^+ -limitierten Wachstumsbedingungen (K115) bestimmt. Unter diesen Bedingungen findet, ausgehend von dem Promotor des *kdpDE*-Operons, eine geringe Expression des *kdpDE*-Operons statt (Polarek *et al.*, 1992). Die durchschnittliche Konzentration von KdpD entsprach $0,41 \text{ fmol } \mu\text{g}^{-1}$ Protein und von KdpE $0,85 \text{ fmol } \mu\text{g}^{-1}$ Protein (Tab. 4.1). Da KdpD als Dimer (KdpD_2) aktiv ist (Heermann *et al.*, 1998), betrug entsprechend die physiologisch relevante KdpD_2 -Konzentration etwa $0,2 \text{ fmol } \mu\text{g}^{-1}$ Protein. Die Konzentrationen der Untereinheiten KdpA und KdpB des KdpFABC-Komplexes entsprachen überraschenderweise ebenfalls etwa $0,2 \text{ fmol } \mu\text{g}^{-1}$ Protein, während $0,53 \text{ fmol } \mu\text{g}^{-1}$ Protein quantifiziert wurden (Tab. 4.1).

Tab. 4.1. Absolute Konzentrationen von KdpABCDE aus *E. coli* K12 unter K⁺-limitierten (K0) und nicht K⁺-limitierten (K115) Wachstumsbedingungen.

Protein	Peptidsequenz	115 mM K ⁺		0 mM K ⁺	
		durchschnittliche Konzentration [fmol μg ⁻¹ Protein]	Standard Abweichung [fmol μg ⁻¹ Protein]	durchschnittliche Konzentration [fmol μg ⁻¹ Protein]	Standard Abweichung [fmol μg ⁻¹ Protein]
KdpA	LINDIPLPGTTGVER	0,20	0,07	59,96	18,39
KdpB	GSLTTFSIANDVAK	0,21	0,09	45,22	7,00
KdpC	YSQQPLVK	0,53	0,21	48,82	15,98
KdpD	TYGLVVVEPGNLR	0,41	0,12	5,66	1,82
KdpE	QWSAVPVIVLSAR	0,85	0,16	8,98	1,75

Zellen wurden unter K⁺-limitierten (K0) und nicht K⁺-limitierten (K115) Wachstumsbedingungen kultiviert und absolute Konzentrationen von KdpA, KdpB, KdpC, KdpD und KdpE mittels MRM quantifiziert. Gegeben sind durchschnittliche Konzentrationen der Proteine aus fünf (K0) bzw. mindestens zwei (K115) unabhängigen Replikaten und die entsprechenden Standard-Abweichungen in fmol μg⁻¹Protein. Für jedes Protein ist die Sequenz des proteotypischen Peptids angegeben, auf dessen Basis (Intensität natürliches Peptid *versus* Intensität schweres Peptid) die Konzentration des entsprechenden Proteins quantifiziert wurde.

Diese Daten lassen darauf schließen, dass auch in der Abwesenheit eines entsprechenden Stimulus eine geringe KdpFABC-Synthese, in der Größenordnung der KdpD-Synthese, stattfindet.

Unter K⁺-Limitation (K0) bindet ein phosphoryliertes KdpE-Dimer mit hoher Affinität stromaufwärts des *kdpFABC*-Promotors (Sugiura *et al.*, 1992) und induziert dadurch eine hohe *kdpFABC*-Expression. Unter diesen Bedingungen entsprach die durchschnittliche Konzentration von KdpA 59,96 fmol μg⁻¹ Protein (Tab. 4.1) und somit einer etwa 300-fach höheren Konzentration als unter nicht K⁺-limitierten Bedingungen (Abb. 4.2). Die durchschnittliche KdpB- bzw. KdpC-Konzentration betrug 45,22 bzw. 48,83 fmol μg⁻¹ (Tab. 4.1), entsprechend einer 215-fachen bzw. 92-fachen Erhöhung gegenüber nicht K⁺-limitierten Bedingungen (Abb. 4.2). Unter K⁺-Limitation wurden weiterhin durchschnittlich 2,83 fmol KdpD₂ μg⁻¹ bzw. 8,98 fmol KdpE μg⁻¹ Protein quantifiziert (Tab. 4.1 und Abb. 4.2).

Interessanterweise konnte somit unter K⁺-Limitation, neben eines signifikanten Anstiegs der Konzentration der Kdp(F)ABC-Untereinheiten, ebenfalls ein etwa zehnfacher Anstieg in der KdpD- und KdpE-Konzentration beobachtet werden.

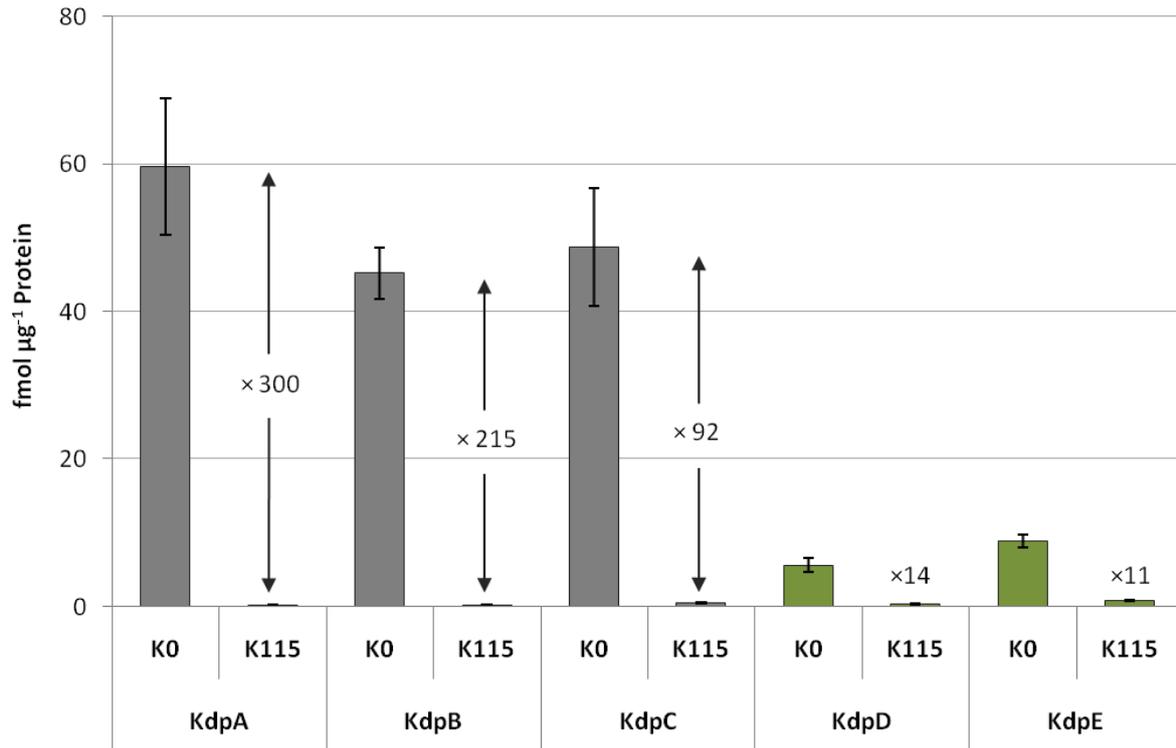


Abb. 4.2. Absolute Konzentrationen von KdpABCDE aus *E. coli* K12 unter K⁺-limitierten (K0) und nicht K⁺-limitierten (K115) Wachstumsbedingungen. Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 4.1. Auf der Basis dieser Daten wurde zusätzlich das Amplifikations-Verhältnis (× X) der einzelnen Proteine bestimmt (Konzentration KdpX K0 versus Konzentration KdpX K115).

Neben einer Bestimmung der absoluten Konzentrationen der Proteine des Kdp-Systems, war ebenfalls die Bestimmung der Molekülzahl pro Zelle von Interesse. Um die Konzentrationen der Proteine von fmol KdpX µg⁻¹ Protein (Tab. 4.1) in Moleküle KdpX pro Zelle umwandeln zu können, musste zunächst die Proteinkonzentration pro Zelle bestimmt werden. Hierzu wurde *E. coli* K12 entsprechend der Anzucht für die Quantifizierung kultiviert, die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase mit Hilfe einer Thomakammer gezählt und anschließend die Proteinkonzentration bekannter Zellmengen bestimmt. Anhand der ermittelten Korrelation (K115: $1,6 \times 10^{-7}$ µg Protein pro Zelle; K0: $1,67 \times 10^{-7}$ µg Protein pro Zelle) konnten die zellulären Mengen der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes sowie KdpD und KdpE in Annäherung berechnet werden (Abb. 4.3). Demnach enthält eine Zelle unter nicht K⁺-limitierten Bedingungen etwa 40 Moleküle KdpD (20 KdpD₂) und 85 Moleküle KdpE. Unter K⁺-Limitation steigt die zelluläre Konzentration von KdpD und KdpE signifikant auf etwa 550 KdpD Monomere (275 KdpD₂) und 860 KdpE Monomere pro Zelle. Damit entspricht das Verhältnis von KdpD₂:KdpE sowohl unter induzierenden, als auch unter nicht-induzierenden Bedingungen, ungefähr 1:4 (Abb. 4.3).

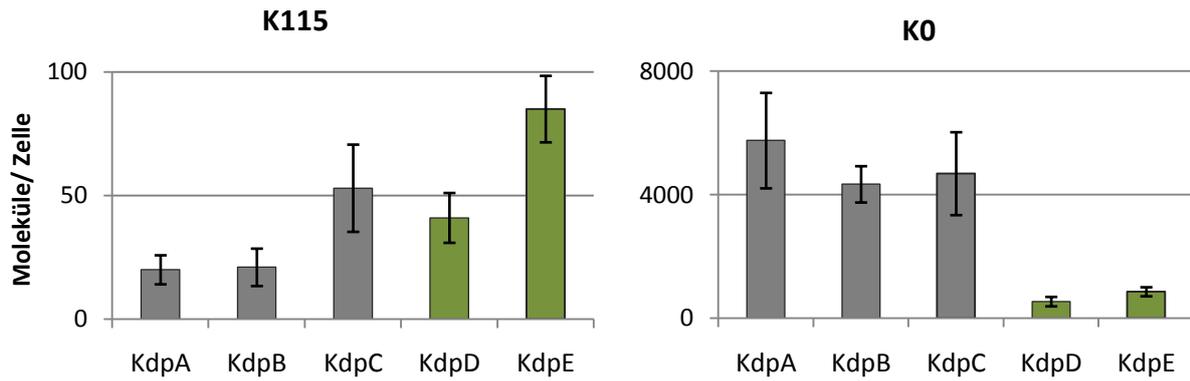


Abb. 4.3. Zelluläre Quantifizierung von KdpABCDE aus *E. coli* K12 unter nicht K^+ -limitierten und K^+ -limitierten Wachstumsbedingungen. Zelluläre Mengen von KdpA, KdpB, KdpC, KdpD und KdpE unter nicht K^+ -limitierten (K115) und K^+ -limitierten (K0) Wachstumsbedingungen wurden auf Grundlage der absoluten Konzentrationen aus Tab. 4.1, sowie der ermittelten Proteinmenge pro Zelle bestimmt.

4.2.2. Untersuchungen zur Autoregulation von KdpD/KdpE

Basierend auf der vorangegangenen absoluten Quantifizierung und der Erkenntnis, dass das KdpD/KdpE Zweikomponenten-System einer positiven Autoregulation unterliegt, sollte im Folgenden die physiologische Relevanz der Autoregulation untersucht werden.

Positive Autoregulation ist eine weit verbreitete Eigenschaft von Zweikomponenten-Systemen (Shinagawa *et al.*, 1983; Roy *et al.*, 1990; Ravio *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass eine positive Autoregulation von Zweikomponenten-Systemen die quantitativen Eigenschaften der Expressionskinetik der entsprechenden Zielgene (d.h. sowohl die zeitliche Regulierung, als auch das Expressions-Niveau) beeinflussen kann (Mitrophanov *et al.*, 2010). Interessanterweise zeigt die Expressionskinetik der Zielgene des PhoP/PhoQ-Zweikomponenten-Systems aus *Salmonella enterica* (*mgtA*, *pmrD*, *phoP*, *mig-14*), welches ebenfalls einer positiven Autoregulation unterliegt, ein sehr ähnliches Profil wie die Expressionskinetik des *kdpFABC*-Operons (Abb. 3.7). Nachdem die Expression der Zielgene ca. 30 Minuten nach einem Umsetzen der Zellen in induzierende Wachstumsbedingungen (niedrig $[Mg^{2+}]$) ein initiales Maximum erreicht, sinkt die Menge an Transkript und verbleibt schließlich auf einem stationären Niveau, welches 20-50% des Maximums entspricht (Shin *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass das initiale Maximum der Zielgen-Expression bei Aufhebung der Autoregulation ausbleibt und sich in diesem Fall die Zielgen-Expression dem stationären Niveau asymptotisch annähert (Shin *et al.*, 2006).

Es stellte sich nun die Frage, ob die Erhöhung der KdpD- und KdpE-Synthese unter induzierenden Bedingungen ebenfalls einen Einfluss auf die Kinetik der *kdpFABC*-Expression hat. Um diese Frage zu beantworten wurde untersucht, ob eine Aufhebung der Autoregulation

von KdpD/KdpE eine Veränderung der *kdpFABC*-Expressionskinetik verursacht. Hierbei wurde angenommen, dass eine Erhöhung der *kdpDE*-Expression unter induzierenden Bedingungen nicht durch eine Bindung von KdpE~P an den *kdpDE*-Promotor induziert wird, sondern im Zuge der *kdpFABC*-Transkription ein „Durchlesen“ der RNA-Polymerase in das *kdpDE*-Operon stattfindet und dadurch die *kdpDE*-Transkriptionsrate erhöht wird. Demzufolge müsste die Erhöhung der *kdpDE*-Expression unter K⁺-Limitation durch eine räumliche Trennung des *kdpFABC*- und *kdpDE*-Operons aufgehoben werden können. Zur Aufhebung der Autoregulation wurde der Stamm TKV2209 (*kdpFABC*⁺, Δ *kdpDE*, Δ *trk*, Δ *kup*), der eine chromosomale Deletion des *kdpDE*-Operons aufweist, mit einem F'₈-Plasmid (F'*kdpDE*) konjugiert, welches das *kdpDE*-Operon unter der Kontrolle des nativen Promotors trägt. F'-Plasmide liegen in ein bis zwei Kopien in der Zelle vor (Frame und Bishop, 1971), so dass eine Erhöhung der *kdpDE*-Expression durch eine erhöhte Kopienzahl des *kdpDE*-Operons in der Zelle vermieden wird. Die *kdpDE*-Expression sollte demzufolge in TKV2209/F'*kdpDE* zu jedem Zeitpunkt auf dem basalen Niveau verbleiben. Als *kdp*-WT Stamm diente TK2240 (*kdp*⁺, Δ *trk*, Δ *kup*).

Um zu untersuchen, ob in TKV2209/F'*kdpDE* gegenüber TK2240 eine veränderte Stimulus-Antwort stattfindet, wurden zeitlich aufgelöste Induktionsprofile der *kdpFABC*-Expression nach einer Veränderung der externen K⁺-Konzentration erstellt. Dies ermöglichte sowohl den zeitlichen Ablauf, als auch die Intensität der *kdpFABC*-Expression in TKV2209/F'*kdpDE* und TK2240 vergleichen zu können. Zellen von TK2240 und TKV2209/F'*kdpDE* wurden entweder unter nicht K⁺-limitierten Wachstumsbedingungen (K60) vorkultiviert und in K⁺-limitiertes Medium (K0,1) transferiert (Abb. 4.4) oder, *vice versa*, unter K⁺-Limitierung (K0,1) vorkultiviert und einer plötzlichen Erhöhung der externen K⁺-Konzentration (K60) ausgesetzt (Abb. 4.5). Zu den angegebenen Zeiten wurde die RNA isoliert und mittels Q-RT-PCR die gegen die *gap*-Expression normalisierte *kdpA*-Expression quantifiziert.

Abbildung 4.4. A zeigt die Expressions-Kinetik von *kdpA* (repräsentativ für das *kdpFABC*-Operon) in TKV2209/F'*kdpDE* und TK2240 nach einer Reduktion der externen K⁺-Konzentration von 60 mM K⁺ auf 0,1 mM K⁺. Das Profil der *kdpFABC*-Expression entspricht in beiden Stämmen den Induktionsprofilen aus Abbildung 3.7, d. h. eine hohe *kdpA*-Expression ist bereits wenige Minuten nach dem Transfer der Zellen in K⁺-limitiertes Medium zu beobachten, es folgt ein Rückgang der Transkriptmenge bis zum Erreichen eines stationären Niveaus und anschließend ein erneuter Anstieg der *kdpA*-Expression. Es konnte jedoch weder im zeitlichen Verlauf, noch in der Intensität der *kdpA*-Expression, ein

signifikanter Unterschied zwischen den Profilen von TKV2209/F'kdpDE und TK2240 identifiziert werden.

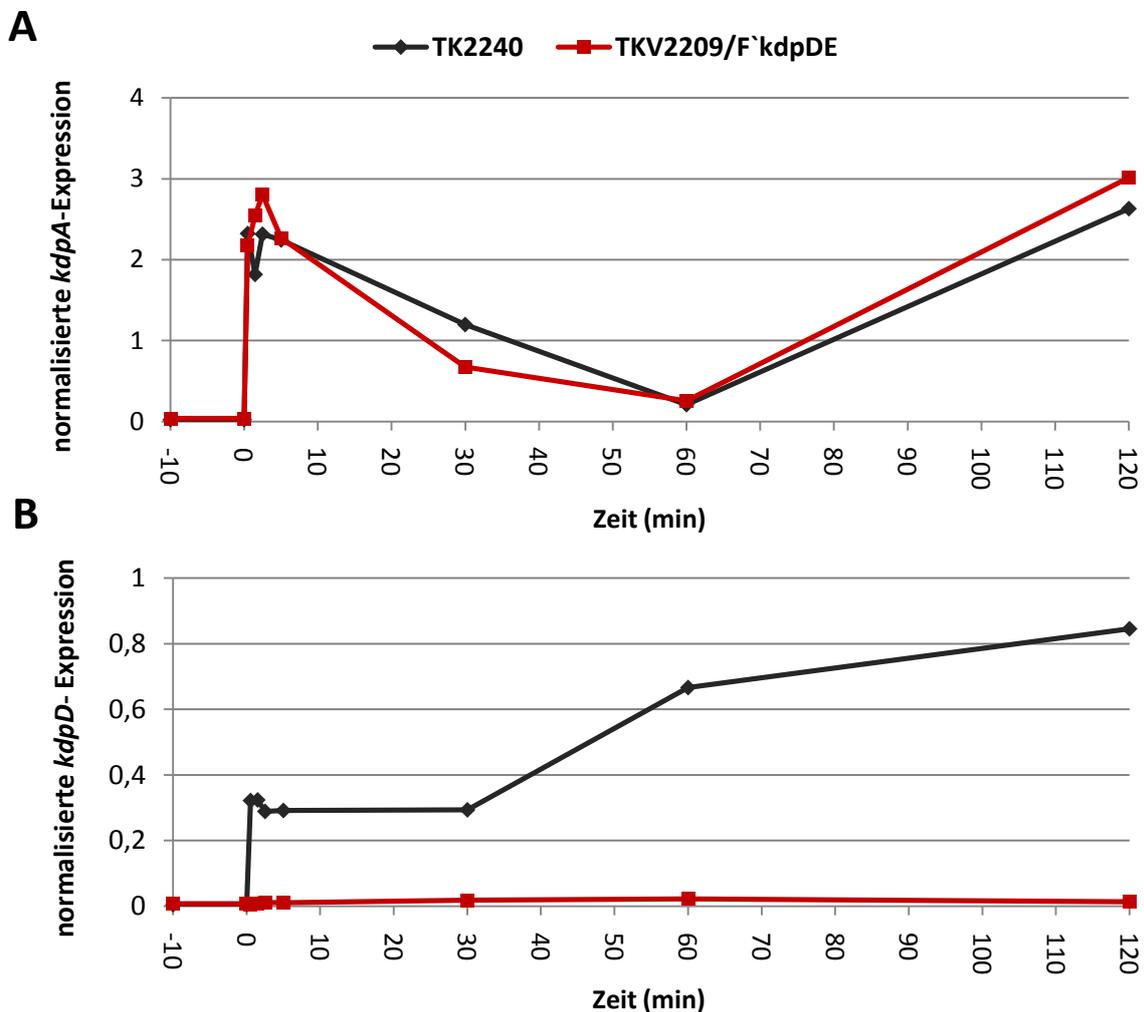


Abb. 4.4. Zeitlich aufgelöste *kdpA*-Expression (A) bzw. *kdpD*-Expression (B) in TKV2209/F'kdpDE und TK2240 nach einer abrupten Reduktion der externen K⁺-Konzentration. TKV2209/F'kdpDE ($\Delta kdpDE$, Δtrk , $\Delta kup/kdpDE$) und TK2240 (*kdp*⁺, Δtrk , Δkup) wurden bis zur exponentiellen Phase in K60 vorkultiviert, Vakuum-filtriert, gewaschen und in K0,1 subkultiviert. Der Moment, in dem die Zellen in das Medium niedrigerer K⁺-Konzentration umgesetzt wurden, wurde als Zeitpunkt 0 definiert. 10 Min. vor bzw. 0,5, 1,5, 2,5, 5, 30, 60 und 120 Min. nach der Reduktion der externen K⁺-Konzentration wurden Proben genommen und die RNA isoliert.

A. Die normalisierte *kdpA*-Transkriptmenge wurde mittels Q-RT-PCR quantifiziert.

B. Die normalisierte *kdpD*-Transkriptmenge wurde mittels Q-RT-PCR quantifiziert.

Jeder Datenpunkt repräsentiert Durchschnittswerte von drei technischen Replikaten, repräsentativ für die Ergebnisse biologischer Triplikate.

In einem Kontroll-Experiment wurde aus diesen Proben, zusätzlich zur *kdpA*-Expression, die gegen *gap* normalisierte Expression von *kdpD* (repräsentativ für das *kdpDE*-Operon) bestimmt (Abb. 4.4. B). Die *kdpD*-Expression von TK2240 und TKV2209/F'kdpDE ist in der

Vorkultur unter nicht K^+ -limitierenden Wachstumsbedingungen auf einem vergleichbaren, basalen Niveau. Bereits 30 Sekunden nach einer plötzlichen Reduktion der externen K^+ -Konzentration kam es in TK2240 zu einem sprunghaften Anstieg der *kdpD*-Transkriptmenge. Die Transkriptmenge verblieb für 30 Minuten auf diesem Niveau und stieg im weiteren Zeitverlauf leicht an (Abb. 4.4. B). Es ist jedoch zu beachten, dass die Transkriptmenge von *kdpD* in TK2240 deutlich geringer ist als die Transkriptmenge von *kdpA* (Abb. 4.4. A+B). Im Gegensatz hierzu verblieb die Menge an *kdpD*-Transkript in TKV2209/F'*kdpDE* auch nach einer Reduktion der K^+ -Konzentration auf dem basalen Niveau (Abb. 4.4. B).

Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Menge von KdpD und KdpE erforderlich ist, um bei einem Wechsel von induzierenden zu nicht-induzierenden Wachstumsbedingungen eine effiziente Dephosphorylierung von KdpE und folglich eine Termination der *kdpFABC*-Expression zu bewerkstelligen, wurde ebenfalls der umgekehrte Versuchsaufbau getestet; hierbei wurden exponentiell wachsende Zellen von TKV2209/F'*kdpDE* und TK2240 unter K^+ -Limitation (K0,1) vorkultiviert und das zeitlich aufgelöste Profil der *kdpA*-Expression nach einer abrupten Erhöhung der externen K^+ -Konzentration auf 60 mM aufgenommen (Abb. 4.5).

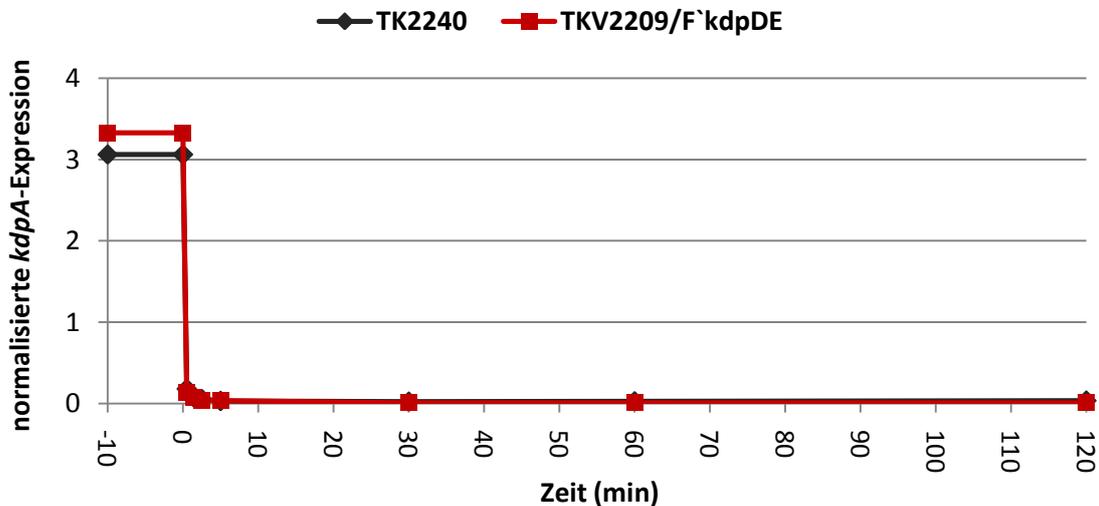


Abb. 4.5. Zeitlich aufgelöste *kdpA*-Expression in TKV2209/F'*kdpDE* und TK2240 nach einer Erhöhung der externen K^+ -Konzentration. TKV2209/F'*kdpDE* ($\Delta kdpDE$, Δtrk , $\Delta kup/kdpDE$) und TK2240 (*kdp+*, Δtrk , Δkup) wurden bis zur exponentiellen Phase in K0,1 vorkultiviert, Vakuumfiltriert, gewaschen und in K60 subkultiviert. Der Moment, in dem die Zellen in das Medium höherer K^+ -Konzentration umgesetzt wurden, wurde als Zeitpunkt 0 definiert. 10 Min. vor, bzw. 0,5, 1,5, 2,5, 5, 30, 60 und 120 Min. nach der Zunahme der externen K^+ -Konzentration wurde die RNA isoliert und die normalisierte *kdpA*-Transkriptmenge mittels Q-RT-PCR quantifiziert. Jeder Datenpunkt repräsentiert Durchschnittswerte von drei technischen Replikaten, repräsentativ für die Ergebnisse biologischer Triplikate.

Bereits 1,5 Minuten nach der Erhöhung der externen K^+ -Konzentration erreichte die *kdpA*-Transkriptmenge in beiden Zellkulturen ein minimales und vergleichbares Level und verblieb im weiteren Verlauf auf diesem (Abb. 4.5). Dementsprechend konnte auch bei diesem Versuchsaufbau kein signifikanter Unterschied in den Profilen der *kdpA*-Expression von TKV2209/F'*kdpDE* und TK2240 erkannt werden. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen zeigte TKV2209/F' *kdpDE* gegenüber TK2240 keine Beeinträchtigung des Wachstums unter den getesteten Bedingungen (Daten nicht gezeigt).

4.3. Diskussion

Erstmals erfolgte eine präzise Quantifizierung der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes, sowie des KdpD/KdpE Zweikomponenten-Systems unter K^+ -limitierenden und nicht K^+ -limitierenden Bedingungen mittels MRM. Auf Basis dieser Ergebnisse konnte die stöchiometrische Komposition der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes und des KdpD/KdpE Zweikomponenten-Systems, sowie das Amplifikations-Verhältnis jedes Proteins (Proteinkonzentration unter induzierenden Bedingungen *versus* Proteinkonzentration unter nicht-induzierenden Bedingungen) ermittelt werden. Weiterhin erlaubten diese Daten eine Bestimmung der absoluten, zellulären Proteinmengen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Quantifizierung nicht aus ganzen Zellen, sondern aus trypsinisierten Protein-Extrakten vorgenommen wurde. Somit hängt die Genauigkeit der Bestimmung zellulärer Proteinmengen maßgeblich von der Effizienz der Zell-Lyse, sowie der Effizienz der Protein-Trypsinisierung während der Probenvorbereitung ab. Daher sollte die Quantifizierung der Proteine auf Zellebene als eine Annäherung, und nicht als eine exakte Quantifizierung betrachtet werden.

Es gibt eindeutige Hinweise, dass die Sensor kinase KdpD sowohl externes K^+ (Laermann *et al.*, 2013), als auch das zelluläre K^+ -Bedürfnis wahrnimmt. Es ist jedoch unklar, durch welchen Parameter das zelluläre K^+ -Bedürfnis vermittelt wird. Es wurde bereits von Asha und Gowrishankar (1993) ein Modell aufgestellt, in dem KdpD die spezifische Rate des K^+ -Influx detektiert, wobei die *kdpFABC*-Expression induziert wird, wenn die Rate des K^+ -Influxes sinkt. Es blieb jedoch unbeantwortet, wie Informationen über den K^+ -Influx durch KdpD wahrgenommen werden können. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse eines *bacterial two-hybrid* Assays, durch welches eine Interaktion zwischen der Sensor kinase KdpD und der K^+ -Transportuntereinheit KdpB gezeigt werden konnte (Kipschull, 2011), ist es möglich, dass der KdpFABC-Komplex Informationen über den K^+ -Influx an KdpD übermittelt und dadurch die Aktivität von KdpD in Abhängigkeit der K^+ -Aufnahme moduliert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch unter nicht-induzierenden Bedingungen eine geringe

kdpFABC-Expression stattfindet und die Konzentrationen der Untereinheiten des Kdp(F)ABC-Komplexes und KdpD₂ unter diesen Bedingungen in der gleichen Größenordnung in der Zelle vorliegen. Dieser Befund würde ebenfalls unter der Annahme zutreffen, dass der KdpFABC-Komplex als Dimer aktiv ist. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für eine potentielle, regulatorische Interaktion von KdpD und KdpFABC in der Stimulus-Wahrnehmung.

Unter induzierenden Bedingungen wurden annähernd äquimolare KdpA-, KdpB und KdpC-Konzentrationen quantifiziert. Dieser Befund reflektiert die 1:1:1:1-Stöchiometrie der Untereinheiten im aktiven KdpFABC-Komplex (Murphy, 2001). Weiterhin wurde für KdpA, KdpB und KdpC unter induzierenden Bedingungen eine 100-300-fach höhere Proteinmenge nachgewiesen, als unter nicht-induzierenden Bedingungen. Dieses Verhältnis ist niedrig im Vergleich zu den Ergebnissen einer älteren Studien, in der, ebenfalls in *E. coli* K12, mittels Q-RT-PCR eine über zweitausendfach erhöhte Transkription des *kdpFABC*-Operons unter K⁺-Limitierung beobachtet wurde (Hamann *et al.*, 2008). Die Beobachtung, dass unter induzierenden Bedingungen gegenüber nicht-induzierenden Bedingungen die Transkriptionsrate deutlich stärker steigt als die Menge an Protein, ist ungewöhnlich und impliziert, dass unter induzierenden Bedingungen entweder die Translationseffizienz, oder aber die Proteinstabilität abnimmt. Allerdings könnte dieses ungewöhnliche Ergebnis auch darauf beruhen, dass sich die geringe Menge an *kdpFABC*-Transkript unter nicht-induzierenden Bedingungen mit herkömmlichen Methoden nicht ausreichend sensitiv bestimmen lässt. Entsprechend würde ein relativ geringer Fehler in der Quantifizierung des geringen *kdpFABC*-Expressions-Niveaus unter nicht-induzierenden Bedingungen leicht einen signifikanten Fehler in der Bestimmung des Amplifikationsverhältnisses verursachen.

Neben eines signifikanten Anstiegs der Proteinmenge der KdpFABC-Untereinheiten unter K⁺-Limitation, konnte unter diesen Bedingungen ebenfalls eine etwa zehnfach höhere Menge von KdpD und KdpE nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahmen, dass das KdpD/KdpE-System einer Autoregulation unterliegt und stimmt mit den Beobachtungen von Polarek *et al.* (1992) überein, der mittels einer transkriptionellen *kdpD::lacZ* Fusion ebenfalls eine etwa zehnfache Erhöhung der *kdpD*-Transkription unter K⁺-Limitation bestimmt hat. Es wurde postuliert, dass es unter K⁺-Limitation im Zuge der hohen *kdpFABC*-Transkription zu einem „Durchlesen“ der RNA-Polymerase durch das *kdpFABC*-Operon in das *kdpDE*-Operon kommt und dadurch unter diesen Bedingungen ebenfalls eine Erhöhung der *kdpDE*-Expression verursacht wird (Polarek *et al.*, 1992). Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch mittels Q-RT-PCR gezeigt werden, dass unter induzierenden Bedingungen eine

Erhöhung der *kdpD*-Expression stattfindet. In einen Stamm, in dem das *kdpFABC*-Operon und das *kdpDE*-Operon räumlichen getrennt voneinander vorliegen, konnte hingegen unter K^+ -limitierenden Wachstumsbedingungen keine Erhöhung der *kdpD*-Expression mehr beobachtet werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahmen, dass die Autoregulation des KdpD/KdpE-System durch den *kdpFABC*-Promotor vermittelt wird und nicht durch eine Bindung von KdpE~P an den *kdpDE*-Promotor. Die Erhöhung der Proteinmenge von KdpD und KdpE unter K^+ -Limitation entspricht nur etwa 10 % der Erhöhung der Proteinmenge der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass etwa 90% der von dem *kdpFABC*-Promotor induzierten Transkripte nach dem *kdpFABC*-Operon terminiert werden (Polarek *et al.*, 1992). In *kdpD* konnte jedoch bislang weder ein Rho-abhängiger Terminator, noch eine Rho-unabhängige Terminations-Struktur identifiziert werden.

Die zellulären Konzentrationen von Sensorkinasen und Antwortregulatoren wurden bisher nur für wenige Zweikomponenten-Systeme mittels quantitativer Westernblot-Analyse bestimmt, d.h. EnvZ/OmpR aus *E. coli* (Cai *et al.*, 2002), WalK/WalR aus *Streptococcus pneumonia* (Wayne *et al.*, 2010) und LiaS/LiaR aus *Bacillus subtilis* (Schrecke *et al.*, 2013). Das stöchiometrische SK (Sensorkinase):AR (Antwortregulator) Verhältnis bestimmt die Robustheit eines Zweikomponenten-Systems hinsichtlich Störungen in der zellulären Sensorkinase- oder Antwortregulator-Konzentration (Goulian, 2004; Batchelor und Goulian, 2003). Die Konzentration von EnvZ und OmpR entspricht 100 und 3500 Molekülen pro Zelle. Dementsprechend liegt OmpR in 35-fachen Überschuss gegenüber EnvZ und 75fachen Überschuss gegenüber EnvZ₂ vor. Es wurde gezeigt, dass der Output des EnvZ/OmpR Zweikomponenten-Systems (OmpR~P) unempfindlich (robust) gegenüber Veränderungen des SK:AR-Verhältnisses ist, solange OmpR die Konzentration von EnvZ signifikant übersteigt (Cai *et al.*, 2002). Weiterhin wurde für das Zweikomponenten-System WalK/WalR von *S. pneumonia* 920 Moleküle WalK und 6200 Moleküle WalR pro Zelle bestimmt, entsprechend eines WalK:WalR Verhältnisses von 1:7 bzw. eines WalK₂:WalR Verhältnisses von 1:14. Obwohl dieses Verhältnis im Vergleich zu dem EnvZ:OmpR Verhältnis niedriger ist, ist WalR im signifikantem Überschuss gegenüber WalK vorhanden, was zu der Annahme führte, dass das WalK/WalR Zweikomponenten-System ebenfalls robust ist (Wayne *et al.*, 2010).

Im Gegensatz dazu repräsentiert LiaSFR von *B. subtilis* ein nicht-robustes Zweikomponenten-System. Dies spiegelt sich in einem ungewöhnlichen SK:AR Verhältnis wider, wobei die Menge der Sensorkinase LiaS die Menge des entsprechenden Antwortregulators LiaR vier- bis acht-fach übersteigt (Schrecke *et al.*, 2013). Die Autoren spekulierten, dass aufgrund einer

ineffiziente Phosphatase-Aktivität von LiaS, zusammen mit einer hohen Affinität von LiaR zu Acetylphosphat, ein Überschuss der Sensor kinase LiaS gegenüber dem Antwortregulator LiaR benötigt wird, um den Phosphorylierungsstatus von LiaR zu kontrollieren.

Das KdpD₂:KdpE Verhältnis ist mit 1:4 relativ gering. Daher könnte KdpD/KdpE, im Vergleich zu EnvZ/OmpR bzw. WalS/WalR, anfälliger für Störungen in der Konzentration von KdpD oder KdpE sein. Ohne weitere Studien bezüglich des Einflusses variierender Konzentrationen von KdpD bzw. KdpE auf den Output des Systems (KdpE~P), ist es zurzeit jedoch nicht möglich, die Robustheit des KdpD/KdpE-Systems zu beurteilen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten die Annahme, dass das KdpD/KdpE Zweikomponenten-System einer Autoregulation unterliegt. Daher wurde weiterhin untersucht, ob die Autoregulation des KdpD/KdpE-Systems einen Einfluss auf die Kinetik der *kdpFABC*-Expression hat. Es existiert eine auffällige Ähnlichkeit zwischen der Expressionskinetik der Zielgene des PhoP/PhoQ-Zweikomponenten-Systems aus *Salmonelle enterica* (Shin *et al.*, 2006) und der Expressionskinetik des *kdpFABC*-Operons (Abb. 4.4. A; Abb. 3.7). Während die positive Autoregulation von PhoP/PhoQ jedoch eine Voraussetzung für das initiale Maximum der Zielgen-Expression ist (Shin *et al.*, 2006), scheint im Gegensatz dazu die Autoregulation von KdpD/KdpE unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf und/oder die Intensität der *kdpFABC*-Expression zu haben. Hierzu sollte beachtet werden, dass letztendlich der Phosphorylierungsstatus eines Zweikomponenten-Systems die Expression des Zielgens reguliert. Das Expressionsniveau des Zweikomponenten-Systems bietet eine zusätzliche, jedoch nicht obligatorische Ebene der Regulation.

Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass die Zelle unter Energie-Aufwand eine höhere Menge an KdpD/KdpE unter induzierenden Bedingungen synthetisiert, ohne dass dies eine physiologische Relevanz beinhaltet. Es kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden, dass die Autoregulation von KdpD/KdpE unter anderen, nicht getesteten Wachstumsbedingungen durchaus die Kinetik der *kdpFABC*-Expression beeinflusst. So wurde für das PhoQ/PhoP-System aus *E. coli* gezeigt, dass die positive Autoregulation von PhoQ/PhoP über einen großen Bereich verschiedener Stimulus-Stärken ($[Mg^{2+}]$ im Wachstumsmedium) stattfindet, jedoch keinen Einfluss auf den System-Output (d.h. das PhoP~P-Niveau und daraus folgend das Niveau der Zielgen-Expression) hat (Miyashiro und Goulian, 2008). Die PhoQ/PhoP-Autoregulation zeigte ausschließlich unter stark induzierenden Bedingungen (wachstumslimitierende Mg^{2+} -Konzentrationen) einen signifikanten Effekt auf die Menge an PhoP~P und die Zielgen-Expression (Miyashiro und

Goulian, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass unter stark induzierenden Bedingungen (wachstumslimitierende K^+ -Konzentrationen) die Autoregulation von KdpD/KdpE jedoch keinen Einfluss auf die *kdpFABC*-Expressionskinetik hat.

Weiterhin wäre es möglich, dass das KdpD/KdpE Zweikomponenten-System von *E. coli* neben dem *kdpFABC*-Operon weitere, bislang unbekannte Zielgene reguliert, deren Promotoren im Vergleich zum *kdpFABC*-Promotor eine niedrigere Affinität zu KdpE~P besitzen. In diesem Fall wäre eine Erhöhung der Menge von KdpE~P notwendig, um die Transkription dieser Zielgene zu ermöglichen. Über einen Vergleich der Sequenz der DNA-Bindestelle von KdpE~P stromaufwärts des *kdpFABC*-Promotors mit dem *E. coli* Genom, konnte jedoch bislang keine weitere Bindestelle identifiziert werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Sequenzen der potentiellen Bindestellen aufgrund der erwarteten geringeren KdpE~P Bindungsaffinität nicht identisch zu der bekannten Sequenz der DNA-Bindestelle sein können. Dies erschwert eine Identifikation potentieller Bindestelle mittels Sequenzvergleich.

Ein Regulon, in dem die Promotoren der zugehörigen Gene eine unterschiedliche Affinität zu dem Antwortregulator besitzen, erlaubt eine zeitliche Hierarchie in der Aktivierung der Transkription der verschiedenen Zielgene. Die Transkription einiger Gene würde bereits durch geringe Mengen an phosphoryliertem Antwortregulator aktiviert werden, während andere Gene des Regulons zur Transkriptionsaktivierung eine erhöhte Menge an phosphoryliertem Antwortregulator benötigen. Eine erhöhte Synthese des Antwortregulators und der korrespondierenden Sensorkinase kann dabei durch positive Autoregulation ermöglicht werden. Ein Beispiel für eine solche hierarchische Regulation von Zielgenen durch ein Zweikomponenten-System ist das BvgA/BvgS Zweikomponenten-Systems aus *Bordetella pertussis*, wobei BvgS die Sensorkinase und BvgA den Antwortregulator darstellt (Arico *et al.*, 1989, Cummings *et al.*, 2006). *B. pertussis* ist der Erreger des Keuchhustens, wobei das Zweikomponenten-System BvgA/BvgS die Expression zahlreicher Virulenz-assoziiertes Gene reguliert (Melvin *et al.*, 2014). Die Gene des *bvg*-Regulons können in (wenigstens) vier verschiedene Klassen eingeteilt werden, basierend auf der Affinität von BvgA~P zu dem entsprechenden Promotor (Williams und Cotter, 2007). Klasse 1 Gene kodieren unter anderem Toxine (*ptxA-E*; kodiert Pertussis-Toxin) und besitzen Promotoren mit niedriger Affinität zu BvgA~P (Boucher *et al.*, 1994, Zu *et al.*, 1996). Promotoren von Klasse 2 Gene, zu denen das *bvgAS*-Operon selbst gehört, besitzen eine hoch-affine BvgA~P Bindestelle (Boucher *et al.*, 2001). Es ist bisher nur ein Klasse 3 Gen charakterisiert, *bipA* (Stockbauer *et al.*, 2001). Der *bipA*-Promotor besitzt sowohl hoch-affine BvgA~P

Bindestellen stromaufwärts des Transkriptions-Start, als auch niedrig-affine BvgA~P Bindestellen stromabwärts des Transkriptions-Starts (Deora *et al.*, 2001). Die Transkription von *bipA* wird durch geringe BvgA~P Konzentrationen aktiviert und durch hohe Konzentrationen von BvgA~P gehemmt (Deora *et al.*, 2001). Klasse 4 Gene werden durch das BvgA/BvgS Zweikomponenten-System reprimiert (Akerley *et al.*, 1995). Unter induzierenden Bedingungen kommt es zu einer Aktivierung der Transkription von Klasse 2 Genen, einschließlich einer positiven Autoregulation von BvgA/BvgS. Bei andauernden induzierenden Wachstumsbedingung kommt es nachfolgend in einer festgelegten, zeitlichen Abfolge zu verschiedenen phänotypischen Phasen, in denen jeweils eine bestimmte Klasse von Genen exprimiert bzw. reprimiert wird (Williams und Cotter, 2007). Die unterschiedlichen Affinitäten der Promotoren der Gene des *bvg*-Regulons zu BvgA~P, zusammen mit der positiven Autoregulation von BvgA/BvgS, erlauben somit die Etablierung eines spezifischen genetischen Programms unter bestimmten Umweltbedingungen.

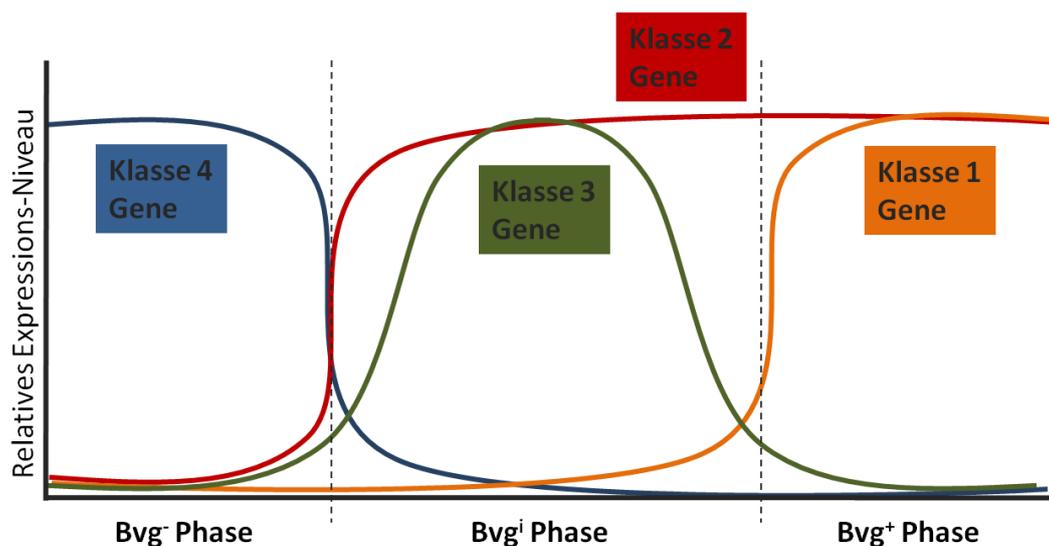


Abb. 4.6. Etablierung der drei phänotypischen Phasen von *B. pertussis* durch das BvgA/BvgS Regulon (verändert nach Melvin *et al.*, 2014). Das Zweikomponenten-System BvgA/BvgS reguliert vier Klassen von Genen und drei phänotypische Phasen (Bvg⁻, Bvgⁱ und Bvg⁺). Die Bvg⁻ Phase ist durch eine maximale Expression von Klasse 4 Genen, sowie einer minimalen Expression von Klasse 1, 2 und 3 Genen gekennzeichnet und erfolgt, wenn BvgA/BvgS inaktiv ist. Nach erfolgter Stimulus-Wahrnehmung bewirkt die Aktivierung von BvgA/BvgS den Übergang zur Bvgⁱ Phase, in welcher die Expression der Klasse 2 und 3 Gene maximal ist. Da *bvgA* und *bvgS* selbst Zielgene der Klasse 2 darstellen, bewirkt die erhöhte BvgA/BvgS-Synthese in der Bvgⁱ Phase letztendlich den Übergang zur Bvg⁺ Phase. Diese ist durch eine maximale Expression der Klasse 1 und 2 Gene gekennzeichnet. Die Bvg⁺ Phase ist notwendig und ausreichend, um *in vivo* eine Infektion zu verursachen.

4.4. Ausblick

Der Befund, dass eine geringe KdpFABC-Synthese auch unter nicht-induzierenden Wachstumsbedingungen stattfindet und dass die Untereinheiten des Kdp(F)ABC-Komplexes und KdpD₂ unter diesen Bedingungen in der gleichen Größenordnung in der Zelle vorliegen, ist eine wichtige Voraussetzung für eine potentielle, regulatorische Interaktion von KdpB und KdpD. Die Interaktion von KdpB und KdpD, die mittels eines *bacterial two-hybrid* Systems nachgewiesen werden konnte (Kipschull, 2011), sollte jedoch über ein zweites Nachweisverfahren, wie z.B. ein Affinitäts-Pulldown Assay, verifiziert werden. Hierzu könnte KdpD über einen His-Tag an Ni²⁺-NTA gebunden werden und nach einer Zugabe von KdpB eine Bindung zwischen KdpD und KdpB mittels spezifischer Antikörper untersucht werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob der KdpFABC-Komplex einen Einfluss auf die Reizwahrnehmung von KdpD hat. Hierzu sollte zunächst mittels β -Gal Assay oder RT-PCR die *kdpFABC*-Expression eines *kdp*-WT Stamms mit der *kdpFABC*-Expression eines Stamms verglichen werden, der eine *kdpB*-Deletion trägt. Um eine genauere Analyse der potentiellen KdpB-KdpD Interaktion vorzunehmen, könnten mittels zielgerichteter Mutagenese Aminosäuren von KdpB identifiziert werden, die eine Interaktion von KdpB mit KdpD, jedoch nicht die Transport-Eigenschaften des KdpFABC-Komplexes beeinflussen.

Um die physiologische Relevanz der Autoregulation des KdpD/KdpE-Systems zu charakterisieren, könnten weiterhin zwei verschiedene Ansätze verfolgt werden.

Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Menge von KdpE~P benötigt wird, um die Expression bislang unbekannter Zielgene zu regulieren, könnte unter induzierenden Bedingungen mittels DNA-Microarray eine Transkriptom-Analyse von TK2240 und TKV22009/F`*kdpDE* vorgenommen werden. Gene, deren Expression in TKV2209/F`*kdpDE* signifikant von der Expression in TK2240 abweichen, stellen potentielle Zielgene von KdpE~P dar. Die Promotoren dieser Gene sollten anschließend hinsichtlich einer KdpE~P Bindestelle untersucht werden.

Um einen Einfluss der Autoregulation des KdpD/KdpE-Systems auf die Expressionskinetik des *kdpFABC*-Operons generell auszuschließen oder doch noch bestätigen zu können, sollte die *kdpA*-Expressionskinetik von TK2240 und TKV22009/F`*kdpDE* bei geringeren Stimulus-Stärken verglichen werden.

5. Deletion von *kdpD* in *E. coli*

5.1. Einleitung

Das Wachstum von *E. coli* erfordert unter K^+ -limitierten Wachstumsbedingungen eine Synthese des hoch affinen K^+ -Aufnahmekomplexes KdpFABC und demzufolge eine Induktion der *kdpFABC*-Expression (Altendorf und Epstein, 1996). Die Expression des *kdpFABC*-Operons wird durch die Bindung eines KdpE~P-Dimers an eine Operator-Struktur stromaufwärts des *kdpFABC*-Promotors induziert (Sugiura *et al.*, 1992). Der Phosphorylierungsgrad von KdpE wird wiederum durch KdpD reguliert (Voelkner *et al.*, 1993). Daher ist es naheliegend anzunehmen, dass in einem *E. coli* Stamm, der eine Deletion des *kdpD*-Gens trägt, keine *kdpFABC*-Expression induziert werden kann. Folglich kann ebenfalls davon ausgegangen werden, dass dieser Stamm nicht in der Lage ist unter K^+ -Limitation zu wachsen.

Entgegen dieser Annahme konnte jedoch gezeigt werden, dass das stark verkürzte KdpD-Derivat KdpD/1-395, welches ausschließlich die N-terminale Domäne umfasst, eine hohe, konstitutive *kdpFABC*-Expression induziert, die bei K^+ -Konzentrationen < 2 mM noch gesteigert wird (Heermann *et al.*, 2003a). Da KdpD/1-395 die vier TMHs, sowie die C-terminale, katalytische Transmitter-Domäne fehlen, ist dieses Derivat nicht in der Lage KdpE zu phosphorylieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die KdpD/1-395 vermittelte *kdpFABC*-Expression das Vorhandensein von KdpE mit einer intakten Phosphorylierungsstelle voraussetzt. Ferner wurde postuliert, dass KdpE in Abwesenheit der katalytischen Transmitter-Domäne von KdpD durch niedermolekulare Phosphodonor phosphoryliert werden kann und die N-terminale Domäne KdpD/1-395 einen stabilisierenden Effekt auf die Bindung von KdpE~P an die korrespondierende DNA-Bindestelle ausübt (Abb. 1.9. B), wodurch die *kdpFABC*-Expression induziert wird (Heermann *et al.*, 2003a). Auch verschiedene andere bakterielle Antwortregulatoren wie CheY, NtrC, PhoB, OmpR und ArcA können ebenso wie KdpE *in vitro* durch den niedermolekularen Phosphodonor Acetylphosphat phosphoryliert werden (Lukat *et al.*, 1992; Wanner und Wimes-Riesenberg, 1992; Feng *et al.*, 1992; McCleary und Stock, 1994; Kenney *et al.*, 1995; Lucassen, 1998). Daher wäre es möglich, dass Acetylphosphat auch *in vivo* als Phosphodonor für KdpE dient.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich folgendes Problem: der *E. coli* Stamm, der umfangreich zur Charakterisierung Plasmid-kodierter KdpD-Derivate verwendet wurde (TKV2208, Puppe *et al.*, 1996), trägt lediglich eine unvollständige Deletion des *kdpD*-Gens und kodiert für einen Teil der N-terminalen Domäne von KdpD (AS 1-128). Es ist möglich,

dass das verbleibende, verkürzte Derivat KdpD/1-128 einen Einfluss auf die Regulation der *kdpFABC*-Expression in diesem Stamm hat und gegebenenfalls die Charakterisierung Plasmid-kodierter KdpD-Derivate beeinträchtigt. Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Arbeit, die Konstruktion einer vollständigen, chromosomalen *kdpD*-Deletion in *E. coli* vorzunehmen. Bei der Charakterisierung des daraus hervorgegangenen *E. coli* Stamms zeigte sich jedoch überraschenderweise, dass dieser Stamm nach einer zeitlichen Verzögerung fähig war unter K^+ -limitierten Bedingungen zu wachsen. Dieses unerwartete Phänomen wird im Folgenden analysiert.

5.2. Ergebnisse

5.2.1. Konstruktion einer chromosomalen *kdpD*-Deletion in *E. coli* LB2240

Ziel der folgenden Arbeit war die Konstruktion eines *E. coli* Stamms, der eine vollständige, chromosomale Deletion des *kdpD*-Gens trägt. Die Gene *kdpD* und *kdpE* sind in einem Operon organisiert, wobei *kdpE* stromabwärts des *kdpD*-Gens lokalisiert ist (Abb. 1.7). Es ist daher wichtig sicherzustellen, dass die Deletion des *kdpD*-Gens die Expression des *kdpE*-Gens nicht beeinflusst. Aus diesem Grund sollte der Verbleib eines Selektionsmarkers im Chromosom anstelle des *kdpD*-Gens vermieden werden.

Die Stammkonstruktion erfolgte mittels der *counter-selection* Methode (Heermann *et al.*, 2008). Diese Methode ermöglicht eine Identifikation von Klonen mit chromosomalen Modifikationen, die keine positive Selektion erlauben, ohne den Verbleib eines Selektionsmarkers im modifizierten Zielbereich des Chromosoms (Abb. 2.1 und Abb. 2.2). Die Deletion des *kdpD*-Gens erfolgte im *E. coli* Stamm LB2240 (*kdp+*, Δtrk , Δkup), woraus der Stamm LB2240 $\Delta kdpD$ hervorging. LB2240 weist eine Deletion der Gene *trk* und *kup* auf und besitzt somit keine konstitutiv synthetisierten K^+ -Transport-Systeme. Die ersten drei Triplets des *kdpD*-Gens, sowie die Ribosomen-Bindestelle (RBS) des entsprechenden mRNA-Moleküls, sind im *kdpC*-Gen lokalisiert und konnten demzufolge nicht deletiert werden (Abb. 5.1. A). Daher wurden in LB2240 $\Delta kdpD$ die RBS und das *kdpD*-Startkodon in *kdpC* durch Punktmutationen inaktiviert (Abb. 5.1. B), ohne die Aminosäuresequenz von KdpC zu beeinträchtigen. Die Deletion des *kdpD*-Gens in LB2240 $\Delta kdpD$ wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Die *kdpDE*-Promotorregion von LB2240 und LB2240 $\Delta kdpD$ ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

A LB2240

```

-10          -35
agcgttgaac agctcacgca actgatcgca aaatacagcc aacaaccgct ggtgaaatat atcggccagc
>.....kdpC.....>

          RBS          Start kdpD
cggttgtaa cattgttgaa ctcaatctgg cgctggataa acttgatgaa taacgaaccc ttacgtcccg
>.....kdpC.....>>
>>.....kdpD.....>

```

B LB2240 Δ *kdpD*

```

-10          -35
agcgttgaac agctcacgca actgatcgca aaatacagcc aacaaccgct ggtgaaatat atcggccagc
>.....kdpC.....>

          RBS          Start
cggttgtaa cattgttgaa ctcaatctgg cgctggacaaa acttgacgaa taatttcatgaggatatgtg
>.....kdpC.....>>          >>.

kdpE
acaaacgttc
>..kdpE..>

```

Abb. 5.1. DNA-Sequenz der *kdpDE*-Promoterregion in LB2240 (A) und LB2240 Δ *kdpD* (B).

Die -10 und -35 Region des *kdpDE*-Promoters ist grün unterlegt.

A. Die Ribosomen-Bindestelle (RBS, blau hinterlegt) und das Startkodon von *kdpD* (ATG, gelb hinterlegt) ist gekennzeichnet.

B. Die Ribosomen-Bindestelle (RBS, blau hinterlegt) und das Startkodon von *kdpE* (GTG, gelb hinterlegt) ist gekennzeichnet. Nukleotide, die gegenüber dem WT (LB2240) mutiert wurden, sind rot hinterlegt.

5.2.2. Charakterisierung von LB2240 Δ *kdpD*

Der Stamm LB2240 Δ *kdpD* und der Ausgangsstamm LB2240 wurden auf die Fähigkeit untersucht, unter K^+ -limitierten (K0,1) und nicht K^+ -limitierten Bedingungen (K115) wachsen zu können. Weiterhin wurde überprüft, ob die chromosomale Deletion des *kdpD*-Gens mittels Plasmid-kodiertem KdpD komplementiert werden kann. Hierfür wurde LB2240 Δ *kdpD* mit dem Plasmid pBD5-9 transformiert, welches das *kdpD*-Gen unter der Kontrolle des natürlichen Promoters trägt. Als zusätzliche Kontrolle wurde der Stamm TKV2209 (Δ *kdpDE*, Δ *trk*, Δ *kup*) eingesetzt, der sich gegenüber LB2240 Δ *kdpD* lediglich durch eine zusätzliche Deletion des *kdpE*-Gens unterscheidet. Das Wachstum von TKV2209, sowie

LB2240 Δ *kdpD*/pBD5-9 wurde ebenfalls unter K⁺-limitierten (K0,1) und nicht K⁺-limitierten Bedingungen (K115) getestet.

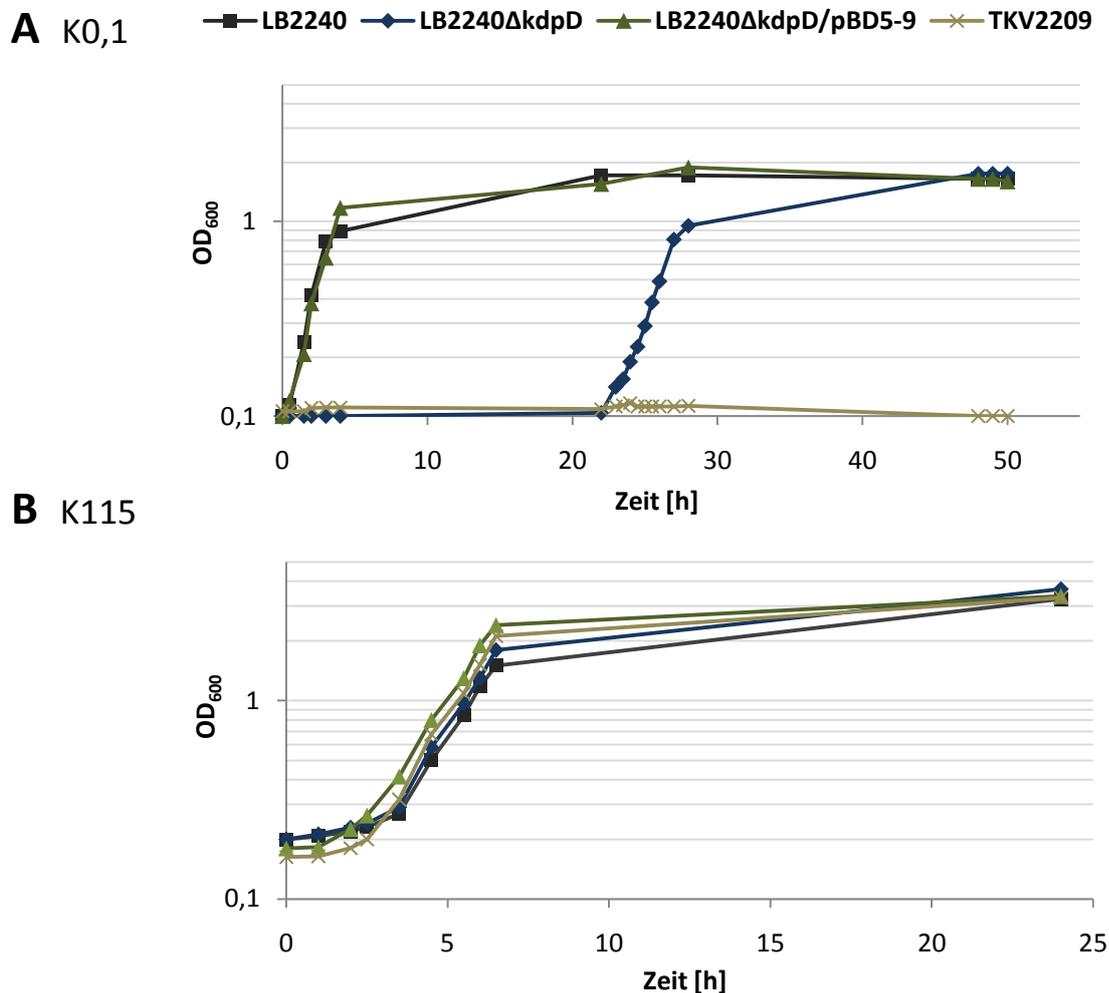


Abb. 5.2. Wachstumsverlauf von LB2240 (*kdp*⁺), LB2240 Δ *kdpD* (Δ *kdpD*), LB2240 Δ *kdpD*/pBD5-9 (Δ *kdpD*/*kdpD*⁺) und TKV2209 (Δ *kdpDE*) unter K⁺-limitierten (K0,1) und nicht K⁺-limitierten (K115) Bedingungen.

A. Wachstumsverlauf unter K⁺-Limitation (K0,1). Die Zellen wurden in K115 vorkultiviert, mit K0 gewaschen und in K0,1-Medium auf eine initiale optische Dichte (OD) von ~ 0,1 angeimpft. Das Wachstum wurde über 52 Stunden verfolgt.

B. Wachstumsverlauf unter nicht K⁺-limitierenden Bedingungen (K115). Die Zellen wurden in K115 vorkultiviert, eine K115-Kultur auf eine initiale optische Dichte (OD) von ~ 0,1 angeimpft und das Wachstum über 24 Stunden verfolgt.

Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei biologische Replikate.

Der Ausgangsstamm LB2240 zeigte unter K⁺-Limitation mit einer Verdopplungszeit von etwa 40 Minuten ein starkes Wachstum und erreichte innerhalb von vier Stunden die stationäre Phase (Abb. 5.2. A). Im Gegensatz dazu war LB2240 Δ *kdpD*, wie erwartet, innerhalb der ersten 22 Stunden nicht in der Lage unter K⁺-limitierten Bedingungen zu

wachsen. Überraschenderweise setzte jedoch nach circa 22 Stunden ein Wachstum von LB2240 Δ *kdpD* ein, wobei die Verdopplungszeit von etwa 70 Minuten niedriger ist als die Verdopplungszeit des Ausgangsstamms LB2240 (Abb. 5.2. A). Mittels Sequenzanalyse wurde überprüft und bestätigt, dass die Zellen nach Einsetzen des Wachstums noch immer die *kdpD*-Deletion trugen. Der Stamm TKV2209 zeigte hingegen über die gesamte getestete Zeitspanne kein Wachstum (Abb. 5.2. A). Da sich TKV2209 gegenüber LB2240 Δ *kdpD* ausschließlich durch eine zusätzliche Deletion des *kdpE*-Gens unterscheidet, zeigt diese Beobachtung, dass das verzögert einsetzende Wachstum von LB2240 Δ *kdpD* von KdpE abhängig ist. Weiterhin kann aus dieser Beobachtung gefolgert werden, dass die *kdpE*-Expression in LB2240 Δ *kdpD* durch die *kdpD*-Deletion nicht beeinträchtigt wird, da in diesem Fall der Wachstumsverlauf von LB2240 Δ *kdpD* und TKV2209 identisch sein müsste. Das Wachstum von LB2240 Δ *kdpD*/pBD5-9 war identisch zu dem Wachstum des Ausgangsstamms LB2240 (Abb. 5.2. A). Diese Beobachtung bestätigt, dass das *kdpD*-Gen in pBD5-9 die chromosomale *kdpD*-Deletion in LB2240 Δ *kdpD* komplementieren kann und stützt weiterhin die Annahme, dass die *kdpE*-Expression in LB2240 Δ *kdpD* nicht beeinträchtigt wurde.

Bei einer hohen K⁺-Konzentration von 115 mM ist die unspezifische K⁺-Aufnahme hoch genug, um die Zelle mit K⁺ zu versorgen. Daher sind unter dieser Wachstumsbedingung auch *E. coli* Stämme in der Lage zu wachsen, die keine spezifischen K⁺-Transporter besitzen (Laermann *et al.*, 2013). Unter nicht K⁺-limitierten Bedingungen ist das Wachstum von LB2240 Δ *kdpD* identisch zu dem Wachstum von LB2240 und LB2240 Δ *kdpD*/pBD5-9 (Abb. 5.2. B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die initiale Wachstumshemmung von LB2240 Δ *kdpD*, ausgelöst durch die *kdpD*-Deletion, durch einen K⁺-spezifischen Effekt verursacht wurde. Diese Beobachtung impliziert, dass die Wachstumshemmung von LB2240 Δ *kdpD* unter K⁺-Limitation aus einer fehlenden Induktion der *kdpFABC*-Expression resultiert. Hieraus ergibt sich die Frage, ob das nach etwa 22 Stunden eintretende Wachstum von LB2240 Δ *kdpD* mit einer Induktion der *kdpFABC*-Expression einhergeht.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde aus einer K⁺-limitierten Zellkultur von LB2240 Δ *kdpD*, nach dem verzögerten Einsetzen der exponentiellen Wachstumsphase, zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen (Abb. 5.3. A), RNA isoliert und die normalisierte *kdpA*-Transkriptmenge mittels Q-RT-PCR bestimmt (Abb. 5.3. B). Als Kontrolle wurde ebenfalls die *kdpA*-Transkriptmenge einer nicht K⁺-limitierten Zellkultur von LB2240 Δ *kdpD* quantifiziert.

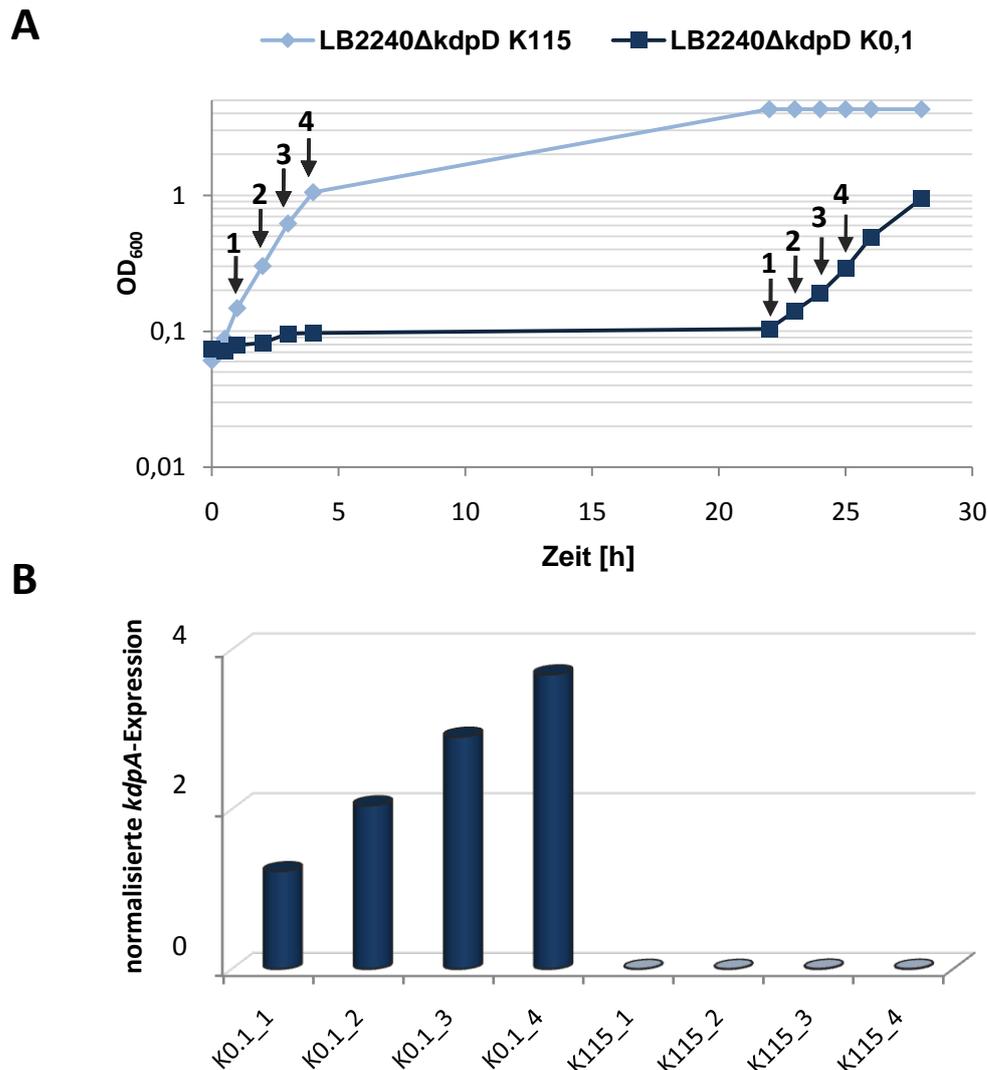


Abb. 5.3. *kdpFABC*-Expression in LB2240Δ*kdpD* unter K⁺-limitierten (K0,1) sowie nicht K⁺-limitierten (K115) Wachstumsbedingungen.

A. Die Kultivierung von LB2240Δ*kdpD* erfolgte in K0,1 bzw. K115 wie in der Legende zu Abb. 5.2 beschrieben. Nach Einsetzen der exponentiellen Wachstumsphase wurden nach 1, 2, 3 und 4 Stunden Proben genommen (durch Pfeile gekennzeichnet).

B. Aus den Proben wurde die RNA isoliert und die gegen die Expression des *gap*-Gens normalisierte *kdpA*-Transkriptmenge mittels Q-RT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse repräsentieren Durchschnittswerte von technischen Triplikaten, repräsentativ für biologische Duplikate.

In der K⁺-limitierten Zellkultur von LB2240Δ*kdpD* fand nach Einsetzen des Wachstums, im Gegensatz zu der nicht K⁺-limitierten Zellkultur, tatsächlich eine *kdpFABC*-Expression statt, wobei die *kdpFABC*-Expression im betrachteten Zeitraum kontinuierlich zunahm (Abb. 5.3. B).

Der Stamm TKV2209 (Δ*kdpD*, Δ*kdpE*) ist nicht in der Lage unter K⁺-Limitation zu wachsen. Daraus wurde gefolgert, dass das verzögert einsetzende Wachstum von LB2240Δ*kdpD* von KdpE abhängig ist. Da das verzögert einsetzende Wachstum von LB2240Δ*kdpD* mit einer *kdpFABC*-Expression einherging kann weiterhin geschlussfolgert werden, dass die Induktion

der *kdpFABC*-Expression in *LB2240ΔkdpD* von KdpE abhängig ist. Um zu untersuchen, ob das Wachstum von *LB2240ΔkdpD* unter K^+ -limitierten Bedingungen eine Phosphorylierung von KdpE voraussetzt, wurde ebenfalls mittels der *counter-selection* Methode eine Punktmutation in *kdpE* eingeführt (entsprechend einer Aminosäure-Substitution von Aspartat 52 gegen Asparagin), die die Phosphorylierungsstelle D52 in KdpE inaktiviert, woraus der Stamm *LB2240ΔkdpD.KdpE-D52N* hervorging. Im Gegensatz zu *LB2240ΔkdpD* zeigte der Stamm *LB2240ΔkdpD.KdpE-D52N* kein Wachstum unter K^+ -limitierenden Bedingungen (Abb. 5.4). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die intakte Phosphorylierungsstelle in KdpE eine Voraussetzung für das Wachstum von *LB2240ΔkdpD* unter K^+ -Limitation ist und impliziert, dass KdpE~P die *kdpFABC*-Expression in *LB2240ΔkdpD* induziert.

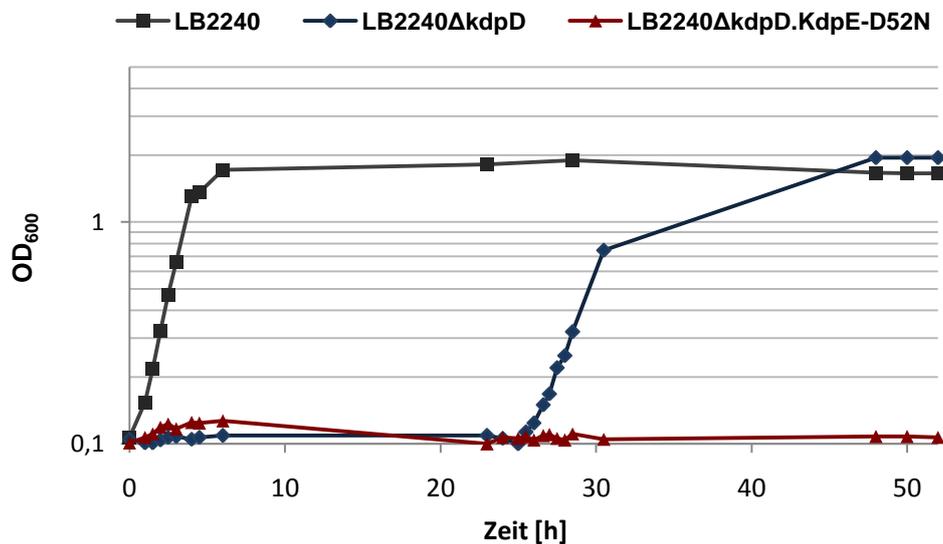


Abb. 5.4. Wachstumsverlauf von *LB2240*, *LB2240ΔkdpD* und *LB2240ΔkdpD.KdpE-D52N* ($\Delta kdpD$, *kdpE-D52N*) unter K^+ -Limitation (K0.1).

Die Kultivierung erfolgte wie in der Legende zu Abbildung 5.2. A beschrieben. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei biologische Replikate.

Wie kann in *LB2240ΔkdpD* in Abwesenheit von KdpD eine Phosphorylierung von KdpE erfolgen? Es konnte gezeigt werden, dass KdpE *in vitro* durch Acetylphosphat phosphoryliert werden kann (Lucassen, 1998). Daher muss Acetylphosphat auch *in vivo* als Phosphodonor für KdpE in Betracht gezogen werden. Acetylphosphat ist ein Intermediat des zentralen Stoffwechsels. In *E. coli* wird die Bildung von Acetylphosphat aus Acetyl-CoA und anorganischem Phosphat durch die Phosphotransacetylase (*pta*) bzw. aus ATP und Acetat durch die Acetat-Kinase (*ackA*) katalysiert. Um zu überprüfen, ob in *LB2240ΔkdpD* eine Phosphorylierung von KdpE durch Acetylphosphat vermittelt wird, wurden die Gene *pta* und

ackA in LB2240 Δ *kdpD* deletiert, woraus der Stamm LB2240 Δ *kdpD*. Δ *pta*. Δ *ackA* hervorging. In Abwesenheit der Acetat-Kinase und Phosphotransacetylase ist das Wachstum von *E. coli* auf Acetat als einzige C-Quelle nicht möglich (Brown *et al.*, 1977). Um die Deletion der Gene *pta* und *ackA* in LB2240 Δ *kdpD*. Δ *pta*. Δ *ackA* zu verifizieren, wurde daher, neben einer Sequenzanalyse, das Wachstum von LB2240 Δ *kdpD*. Δ *pta*. Δ *ackA* auf Acetat als einziger C-Quelle getestet. Unter diesen Bedingungen konnte kein Wachstum von LB2240 Δ *kdpD*. Δ *pta*. Δ *ackA* beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Sollte die Induktion der *kdpFABC*-Expression in LB2240 Δ *kdpD* aus einer Phosphorylierung von KdpE durch Acetylphosphat resultieren, sollte LB2240 Δ *kdpD*. Δ *pta*. Δ *ackA* nicht in der Lage sein unter K⁺-Limitation zu wachsen, da in diesem Stamm keine Acetylphosphat-Synthese stattfinden kann (McCleary und Stock, 1994). Unter K⁺-Limitation zeigte LB2240 Δ *kdpD*. Δ *pta*. Δ *ackA*, ebenso wie LB2240 Δ *kdpD*, eine lange lag-Phase von etwa 23 Stunden mit nachfolgend einsetzendem Wachstum (Abb. 5.5. A). Das Wachstum von LB2240 Δ *kdpD*. Δ *pta*. Δ *ackA* war jedoch deutlich langsamer als das Wachstum von LB2240 Δ *kdpD*. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass das Wachstum von LB2240 Δ *kdpD*. Δ *pta*. Δ *ackA* in K115-Minimalmedium (Abb. 5.5. B), sowie in KML-Komplexmedium (Daten nicht gezeigt), ebenfalls langsamer war als das Wachstum von LB2240 Δ *kdpD*. Demzufolge ist die Beeinträchtigung des Wachstums von LB2240 Δ *kdpD*. Δ *pta*. Δ *ackA* gegenüber LB2240 Δ *kdpD* nicht K⁺-spezifisch und Acetylphosphat scheint nicht essentiell für die Phosphorylierung von KdpE in LB2240 Δ *kdpD* zu sein.

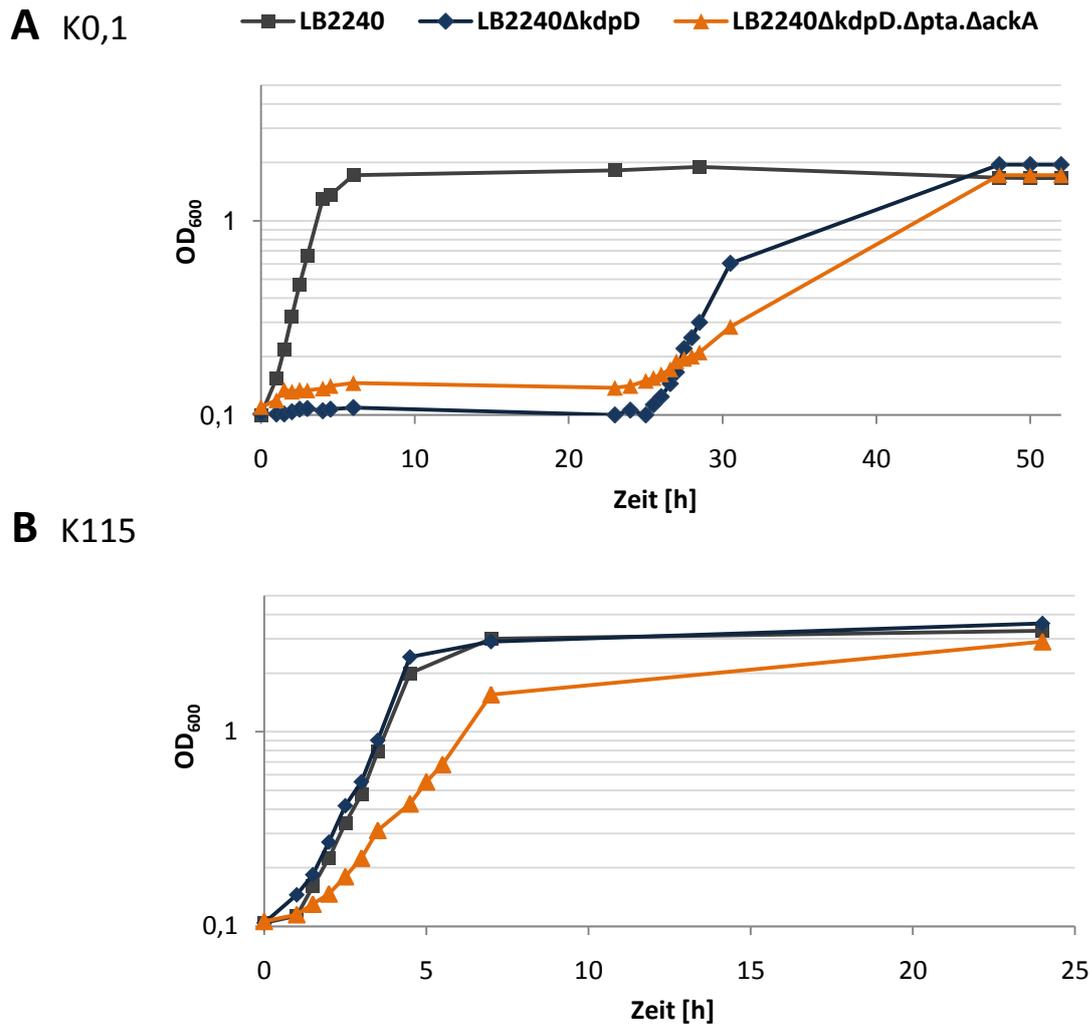


Abb. 5.5. Wachstumsverlauf von LB2240, LB2240Δ*kdpD* und LB2240Δ*kdpD*.Δ*pta*.Δ*ackA* (Δ*kdpD*, Δ*pta*, Δ*ackA*) unter K⁺-limitierten und nicht K⁺-limitierten Bedingungen.

A. Wachstumsverlauf unter K⁺-Limitation (K0,1). Die Kultivierung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 5.2. A beschrieben.

B. Wachstumsverlauf unter nicht K⁺-limitierenden Bedingungen (K115). Die Kultivierung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 5.2. B beschrieben.

Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei biologische Replikate.

5.2.3. Charakterisierung der Verzögerung des Wachstums von LB2240Δ*kdpD*

Es stellt sich die Frage, warum das Wachstum von LB2240Δ*kdpD* erst nach einer langen zeitlichen Verzögerung eintritt. Hierzu sind zwei verschiedene Antworten denkbar. Einerseits ist es möglich, dass in allen Zellen der K⁺-limitierten Zellkultur von LB2240Δ*kdpD* erst nach einem längeren Zeitraum eine Induktion der *kdpFABC*-Expression stattfindet. Andererseits wäre es möglich, dass nur in einigen Zellen der K⁺-limitierten Zellkultur von LB2240Δ*kdpD* eine *kdpFABC*-Expression induziert wird. Die beobachtete Verzögerung würde in diesem Fall die Zeit widerspiegeln, die der Zell-Zuwachs erfordert bis eine Zelldichte erreicht ist, die eine optische Verfolgung des Wachstums ermöglicht.

Um zu untersuchen, welche dieser Möglichkeiten zutrifft, wurde das Wachstum von LB2240 Δ *kdpD* auf K⁺-limitierten Festmedien untersucht. Hierzu wurden, analog zu den Wachstumsversuchen in Flüssigkultur, etwa 10⁸ Zellen auf K0,1-Agarplatten ausplattiert (Abb. 5.6). Sollte nach einer Verzögerung in allen Zellen eine *kdpFABC*-Expression stattfinden, so sollte nach ausreichender Inkubationszeit ein Zellrasen auf der Agarplatte erkennbar sein (Abb. 5.6. A). Findet hingegen nur in wenigen Zellen eine *kdpFABC*-Expression statt, sollten nur vereinzelt Kolonien entstehen (Abb. 5.6. B).

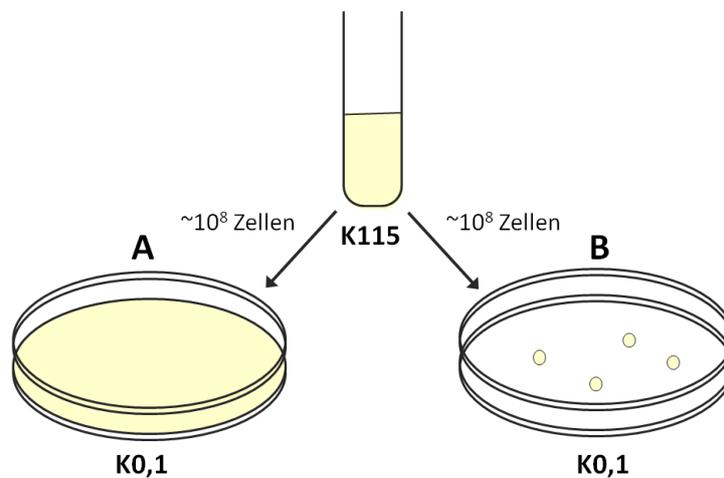


Abb. 5.6. Analyse des zeitlich verzögerten Wachstums von LB2240 Δ *kdpD* unter K⁺-Limitation.

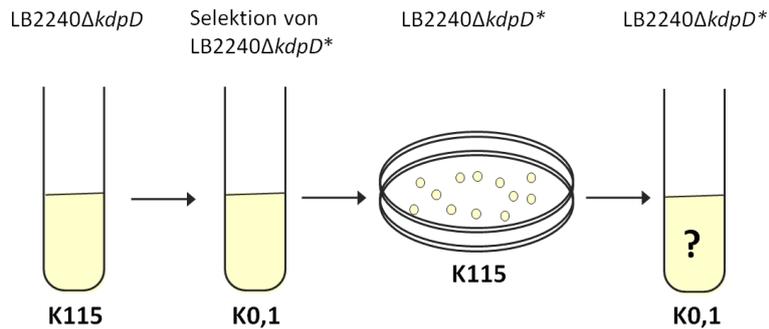
Zellen wurden in K115 bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert, in K0 gewaschen und anschließend circa 10⁸ Zellen auf K0,1-Minimalmedium-Agarplatten ausplattiert. Die Auswertung erfolgte nach 48 stündiger Inkubation.

A. Findet in allen Zellen eine *kdpFABC*-Expression statt, ist nach der Inkubation ein Zellrasen zu erkennen.

B. Findet nur in einigen Zellen eine *kdpFABC*-Expression statt, sind nach der Inkubation Einzelkolonien vorhanden.

Aus den 10⁸ ausplattierten Zellen gingen durchschnittlich 5 Einzelkolonien hervor. Dieser Befund bestätigt die Annahme, dass unter K⁺-Limitation nur in wenigen Zellen (im Folgenden als LB2240 Δ *kdpD** bezeichnet) eine *kdpFABC*-Expression stattfindet und dass LB2240 Δ *kdpD** in der K⁺-limitierten Zellkultur von LB2240 Δ *kdpD* einer positiven Selektion unterliegt. Dies würde bedeuten, dass eine Reinkultur von LB2240 Δ *kdpD** ohne zeitliche Verzögerung in der Lage sein müsste, unter K⁺-Limitation zu wachsen. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde LB2240 Δ *kdpD**, nach erfolgter Selektion in K⁺-limitierter Zellkultur, auf K115-Minimalmedium-Agarplatten vereinzelt und anschließend eine K⁺-limitierte Flüssigkultur mit einer Einzelkolonie inokuliert (Abb. 5.7. A).

A



B

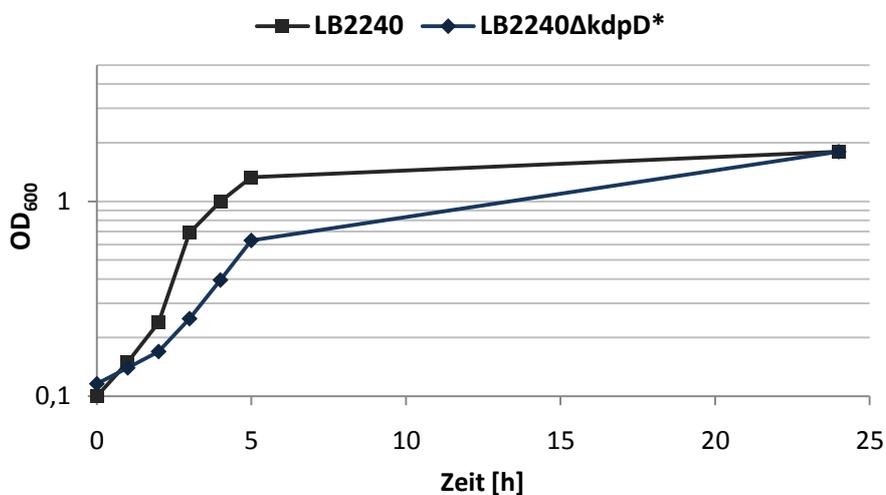


Abb. 5.7. Wachstumsverlauf von *LB2240ΔkdpD unter K^+ -Limitation.**

A. *LB2240ΔkdpD* wurde in K115 vorkultiviert und anschließend in K0,1 überimpft. In K0,1 wird selektiv *LB2240ΔkdpD** kultiviert und nach Erreichen der stationären Phase eine verdünnte *LB2240ΔkdpD**-Zellkultur auf K115-Agarplatten ausplattiert. Eine Einzelkolonie von *LB2240ΔkdpD** wurde in K0,1 subkultiviert und der Wachstumsverlauf dokumentiert.

B. Der Wachstumsverlauf von *LB2240ΔkdpD** in K0,1 wurde über 24 Stunden verfolgt. Als Kontrolle wurde ebenfalls der Wachstumsverlauf des Ausgangsstamms *LB2240* dokumentiert.

Der Stamm *LB2240ΔkdpD** zeigte unter K^+ -Limitation ein sofortiges Wachstum ohne eine lag-Phase von ca. 22 Stunden (Abb. 5.7. B).

5.3. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Stamm *LB2240ΔkdpD* konstruiert, der eine vollständige Deletion des *kdpD*-Gens aufweist. Basierend auf Komplementationstests wurde gefolgert, dass die Expression des stromabwärts lokalisierten *kdpE*-Gens durch die *kdpD*-Deletion nicht beeinträchtigt wurde. Daher eignet sich *LB2240ΔkdpD* für die Charakterisierung Plasmidkodierter KdpD-Derivate.

LB2240 Δ *kdpD* ist über einen Zeitraum von 22-25 Stunden nicht in der Lage, unter K⁺-Limitation zu wachsen. Interessanterweise setzte danach jedoch ein Wachstum von LB2240 Δ *kdpD* ein, wobei die Verdopplungszeit niedriger ist als die entsprechende Verdopplungszeit des Ausgangsstamms LB2240. Die Verzögerung des Wachstums der LB2240 Δ *kdpD*-Kultur resultiert aus der Tatsache, dass nur wenige Zellen (LB2240 Δ *kdpD**) in der Kultur fähig sind unter K⁺-limitierten Bedingungen zu wachsen und diese einer positiven Selektion unterliegen. Die Verzögerung reflektiert die Zeit, die das Wachstum von LB2240 Δ *kdpD** erfordert, bis eine optisch messbare Zelldichte erreicht ist. Eine reine LB2240 Δ *kdpD**-Kultur hingegen zeigte unter K⁺-Limitation ein Wachstum ohne zeitliche Verzögerung. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass das Wachstum von LB2240 Δ *kdpD** aus einer KdpD-unabhängigen Expression des *kdpFABC*-Operons resultiert.

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass LB2240 Δ *kdpD** eine Suppressormutation trägt, die eine KdpD-unabhängige Expression des *kdpFABC*-Operons ermöglicht. Um die postulierte Mutation in LB2240 Δ *kdpD** zu identifizieren, wurde an der Universität Göttingen eine vergleichende Genom-Sequenzierung von LB2240 Δ *kdpD* und LB2240 Δ *kdpD** durchgeführt. Aufgrund der unzureichenden Qualität der DNA-Sequenz konnte jedoch bisher keine Auswertung erfolgen. Es wurde jedoch mittels Sequenzanalyse ausgeschlossen, dass in LB2240 Δ *kdpD** eine Mutation im *kdp*-Regulon, oder in der *kdpFABC*-Promotorregion vorliegt.

Aus 10⁸ Zellen einer nicht K⁺-limitierten LB2240 Δ *kdpD*-Kultur, die auf K⁺-limitierte Agarplatten ausplattierten wurden, entstanden durchschnittlich 5 Einzelkolonien. Diese 5 Einzelkolonien gehen aus 5 Zellen hervor, die wahrscheinlich bereits in der Vorkultur eine Mutation trugen die eine KdpD-unabhängige *kdpFABC*-Expression verursacht. Ausgehend von 5 Zellen, wären etwa 24 Generationen erforderlich, um eine optisch messbare Zelldichte zu erreichen. Bei einer Verdopplungszeit von etwa 70 Minuten würde dies einer Zeitspanne von 27 Stunden entsprechen. Diese theoretische Überlegung stimmt gut mit den experimentellen Beobachtungen überein.

Das Wachstum von LB2240 Δ *kdpD** ist abhängig von der Anwesenheit von KdpE mit einer intakten Phosphorylierungsstelle. Dieses Ergebnis impliziert, dass die *kdpFABC*-Expression in LB2240 Δ *kdpD** durch KdpE~P induziert wird. Welche Art von Mutation kann eine, von der Sensorkinase unabhängige, Phosphorylierung des Antwortregulators ermöglichen? Dies soll am Beispiel des Antwortregulators Spo0A aus *Bacillus subtilis* erläutert werden.

Der Antwortregulator Spo0A reguliert in *B. subtilis* den Übergang von exponentiellem Wachstum zur Sporulation (Hoch *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu den meisten

Antwortregulatoren, wird Spo0A nicht direkt durch eine Sensor kinase phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Spo0A wird hingegen durch ein Phosphorelay kontrolliert (Burbulys *et al.*, 1991), bestehend aus mindestens fünf verschiedenen Sensor kinasen KinA, KinB, KinC, KinD und KinE (Jiang *et al.*, 2000), sowie Spo0F und Spo0B. Bei Spo0F handelt es sich um einen Antwortregulator, der keine Output-Domäne besitzt (Trach *et al.*, 1985). Spo0B wiederum besitzt eine DHP-Domäne und weist daher eine Phosphotransferase-Aktivität auf (Burbulys *et al.*, 1991). Der Phosphotransfer findet ausgehend von einer der Sensor kinasen KinA, KinB, KinC, oder KinD zunächst auf Spo0F statt. Spo0F~P bildet zusammen mit Spo0B und Spo0A einen Phosphotransfer-Komplex, in dem die Phosphorylgruppe von Spo0F über die Phosphotransferase Spo0B letztlich auf Spo0A übertragen wird. Spo0A~P initiiert daraufhin die Expression von Genen, die die Sporulation von *B. subtilis* auslösen (Burbulys *et al.*, 1991).

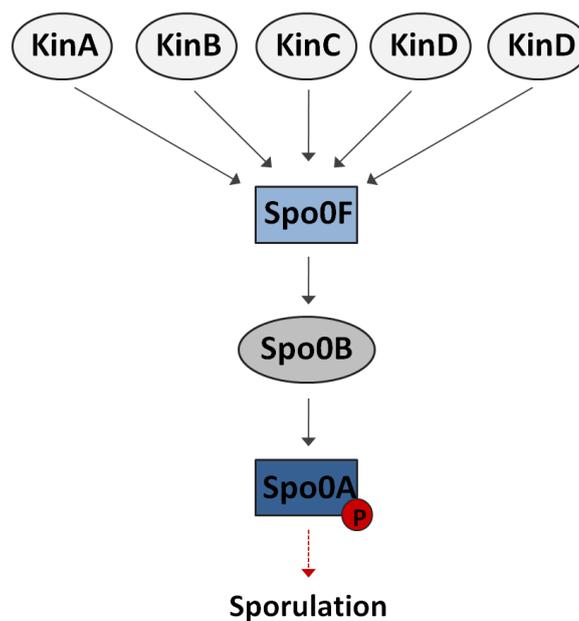


Abb. 5.8. Sporulations-Phosphorelay aus *Bacillus subtilis*. Proteine mit Phosphotransferase-Aktivität sind in grau, Proteine mit Empfänger-Domäne in blau dargestellt. Der Phosphotransfer ist durch graue Pfeile gekennzeichnet.

Eine Deletion der Gene *spo0B* und *spo0F*, die für Spo0F bzw. Spo0B kodieren, unterbindet die Fähigkeit einer Zelle zu sporulieren, da der Phosphorylierungsgrad des Antwortregulators Spo0A in diesem Fall nicht ausreichend ist um die Sporulation zu initiieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass einzelne Mutationen in *spo0A* die Fähigkeit zur Sporulation eines Stamms, der eine Deletion der Gene *spo0B* und *spo0F* trägt, wiederherstellen (Kawamura *et al.*, 1983; Sharrock *et al.*, 1984; Shoji *et al.*, 1988; Spiegelman *et al.*, 1990; Olmedo *et al.*,

1990; Ireton *et al.*, 1993). Die entsprechenden Spo0A-Derivate können dabei unter anderem direkt durch die Sensorkinase KinC phosphoryliert werden (Kobayashi *et al.*, 1995). Es wurde gefolgert, dass die Aminosäure-Substitutionen in den Spo0A-Derivaten eine Interaktion von Spo0A mit alternativen Phosphodonoren (Spiegelman *et al.*, 1990), wie der Sensorkinase KinC (Kobayashi *et al.*, 1995), erlauben. Folglich können Aminosäure-Substitutionen in Spo0A die Interaktions-Spezifität von Spo0A herabsetzen und ermöglichen eine Phosphorylierung durch einen alternativen Phosphodonor (Spiegelman *et al.*, 1990).

Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für LB2240 Δ *kdpD** denkbar, wobei eine Mutation in LB2240 Δ *kdpD** ein Protein dahingehend verändern könnte, dass eine KdpD-unabhängige Phosphorylierung von KdpE ermöglicht wird. Analog zu Spo0A aus *B. subtilis* wäre hierfür eine Mutation in *kdpE* denkbar. Es muss jedoch erwähnt werden, dass LB2240 Δ *kdpD** mittels Sequenzanalyse überprüft wurde und bestätigt werden konnte, dass *kdpE* keine Mutation aufweist. Wenn jedoch eine Aminosäure-Substitution die Spezifität eines Antwortregulators dahingegen verändern kann, dass eine alternative Interaktion zwischen diesem Antwortregulator und einer Sensorkinase stattfindet, so ist es im Umkehrschluss ebenfalls denkbar, dass eine Aminosäure-Substitution in einer Sensorkinase eine alternative Sensorkinase/Antwortregulator-Interaktion erlaubt.

In den meisten Bakterien existieren zahlreiche Zweikomponenten-Systeme (Ulrich und Zhulin, 2010). Jedes dieser Zweikomponenten-Systeme reguliert als Antwort auf einen spezifischen Stimulus die Expression einer bestimmten Gruppe von Zielgenen (Gao und Stock, 2009). Hierbei ist es für die Zelle von großer Bedeutung sicherzustellen, dass eine Sensorkinase ausschließlich den zugehörigen Antwortregulator phosphoryliert, um die geeignete Zellantwort zu vermitteln. Zurzeit sind hunderte Strukturen von Empfänger-Domänen verschiedener Antwortregulatoren bekannt (PDB), die ein hohes Maß an struktureller Ähnlichkeit aufweisen. Es stellt sich also die Frage, wie die hohe Phosphotransfer-Spezifität einer Sensorkinase/Antwortregulator Paarung vermittelt wird. Der Phosphotransfer von Sensorkinase zum Antwortregulator erfordert eine transiente Interaktion, in der die Phosphorylgruppe von einem konservierten Histidinrest der Sensorkinase auf einen konservierten Aspartatrest des zugehörigen Antwortregulators übertragen wird (Zapf *et al.*, 2000). Durch einen Vergleich von hinterlegten Strukturen der Sensorkinase/Antwortregulator-Komplexe HK853/RR468 und ThkA/TrrA aus *Thermatoga maritima* (Casino *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2009) und Spo0B/Spo0F aus *B. subtilis* (Zapf *et al.*, 2000) wurde deutlich, dass es zu einem Kontakt zwischen der α 1-Helix der DHp-Domäne der Sensorkinase und der α 1-Helix der Empfänger-Domäne des zugehörigen Antwortregulators kommt (Abb. 5.9).

Weiterhin wurde untersucht, welche Aminosäuren einer Sensorkinase und des zugehörigen Antwortregulators co-evolvierten (Skerker *et al.*, 2008). Hierbei wird davon ausgegangen, dass jede Aminosäure-Substitution in einem der beiden Partner, die die Spezifität der Paarung beeinträchtigt, entweder revertieren, oder durch eine zusätzliche Aminosäure-Substitution in dem korrespondierenden Partner kompensiert werden muss, um die Spezifität des Zweikomponenten-Systems aufrecht erhalten zu können (Skerker *et al.*, 2008). Mittels dieser Analyse konnten Aminosäuren in der DHp-Domäne von Sensorkinasen identifiziert werden, die mit hoher Frequenz mit bestimmten Aminosäuren des zugehörigen Antwortregulators covariierten und somit möglicherweise die Phosphotransfer-Spezifität einer Sensorkinase/Antwortregulator Paarung vermitteln (exemplarisch für Spo0B/SpoF aus *B. subtilis* in Abb. 5.9 dargestellt).

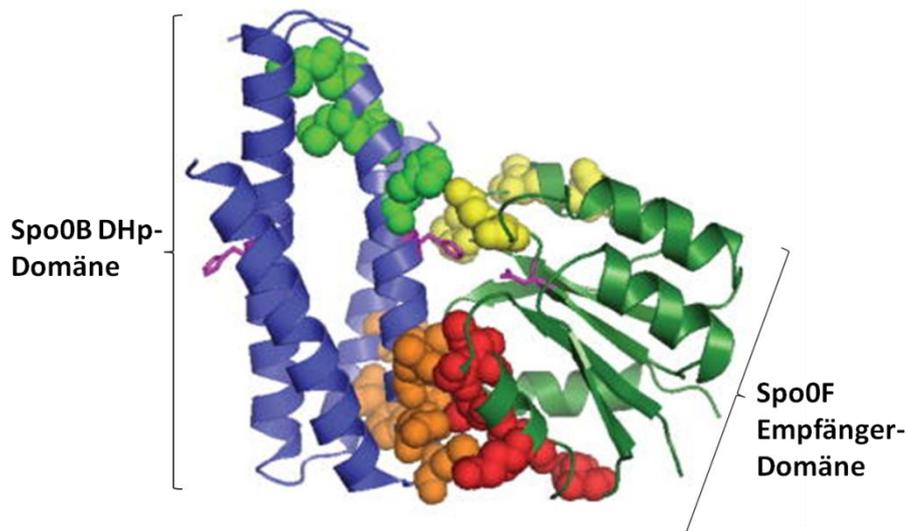


Abb. 5.9. Struktur der DHp-Domäne der Phosphotransferase Spo0B im Komplex mit der Empfänger-Domäne von Spo0F (verändert nach Skerker *et al.*, 2008). AS, die mittels Co-Variationsanalysen mutmaßlich die Spezifität der Spo0B/Spo0F-Paarung bestimmen, sind raumfüllend dargestellt (nur in einem DHp-Monomer dargestellt). Jedes Molekül umfasst zwei Regionen, die diese AS umfassen (grün und orange in Spo0B, rot und gelb in Spo0F). Die konservierten Histidinreste in Spo0B und der konservierte Aspartatrest in Spo0F sind in violett gezeigt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde durch zielgerichtete Mutagenese versucht, die Phosphotransfer-Spezifität der Sensorkinase EnvZ dahingehend zu verändern, dass das EnvZ-Derivat *in vitro* fähig ist, den nicht zugehörigen Antwortregulator RstA zu phosphorylieren. Hierfür wurden Aminosäuren in EnvZ, die mutmaßlich die Spezifität von EnvZ vermitteln, gegen die entsprechenden Aminosäuren der Sensorkinase RstB substituiert. Erstaunlicherweise waren einzelne Aminosäure-Substitutionen in EnvZ (L254Y; A255R)

gegen die entsprechende Aminosäure aus RstB ausreichend, um eine signifikante Phosphorylierung von RstA durch das EnvZ-Derivat zu ermöglichen (Skerker *et al.*, 2008).

Daher trägt LB2240 Δ *kdpD** möglicherweise eine Mutation, die die Phosphotransferase-Spezifität einer Sensorkinase verändert und diese befähigt, KdpE zu phosphorylieren. Es ist wahrscheinlich, dass dieses Sensorkinase-Derivat, im Vergleich zu KdpD, eine geringere Affinität zu KdpE aufweist. Übereinstimmend mit dieser Hypothese ist die Beobachtung, dass die Verdopplungszeit von LB2240 Δ *kdpD** unter K⁺-limitierten Wachstumsbedingungen höher ist als die Verdopplungszeit von LB2240.

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert wurde, unterliegt KdpD/KdpE einer Autoregulation, wobei die Erhöhung der Expression des *kdpDE*-Operons unter induzierenden Bedingungen vermutlich durch ein Durchlesen der RNA-Polymerase durch das *kdpFABC*-Operon in das *kdpDE*-Operon verursacht wird. Da die Amplifikation von KdpD und KdpE unter induzierenden Bedingungen nur etwa 10 % der Amplifikation der Untereinheiten des KdpFABC-Komplex entspricht, wurde postuliert, dass nur etwa 10 % der *kdpFABC*-Transkripte in *kdpDE* fortgesetzt werden, während 90 % terminiert werden. In diesem Fall müsste im *kdpD*-Gen ein Terminations-Signal lokalisiert sein, welches in LB2240 Δ *kdpD* und LB2240 Δ *kdpD** durch die Deletion des *kdpD*-Gens nicht mehr vorhanden wäre. Daher könnte nach Einsetzen einer *kdpFABC*-Expression die KdpE-Kopienzahl in LB2240 Δ *kdpD** höher sein, als die KdpE-Kopienzahl im Ausgangsstamm in LB2240. Dies wiederum würde eine potentielle Interaktion von KdpE mit einem alternativen Phosphodonor begünstigen, dessen Affinität zu KdpE geringer sein sollte als die Affinität von KdpD zu KdpE. Der Komplementationstest durch LB2240 Δ *kdpD*/pBD5-9 zeigte indirekt, dass die *kdpE*-Expression durch die *kdpD*-Deletion nicht beeinflusst wurde, eine vergleichende Quantifizierung von KdpE aus LB2240 und LB2240 Δ *kdpD* steht jedoch noch aus (Ausblick). Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass die *kdpFABC*-Expression in LB2240 Δ *kdpD** nicht ausschließlich durch einen KdpE-Dosis Effekt hervorgerufen werden kann, da in diesem Fall alle Zellen in der K⁺-limitierten LB2240 Δ *kdpD*-Kultur ein verzögert einsetzendes Wachstum zeigen müssten.

Welche Relevanz haben die in diesem Kapitel gewonnenen Erkenntnisse für das Verständnis über das KdpD/KdpE-System aus *E. coli*? Diese Frage kann, solange die postulierte Suppressormutation im Chromosom von LB2240 Δ *kdpD** nicht identifiziert ist, nur hypothetisch beantwortet werden.

Bestätigt sich die Vermutung, dass die Mutation in LB2240 Δ *kdpD** eine andere Sensorkinase (Sensorkinase*) befähigt KdpE zu phosphorylieren, würde eine Charakterisierung dieser

Interaktion zum generellen Verständnis der Spezifität von Zweikomponenten-Systemen beitragen.

Wahrscheinlich vermittelt nur eine (oder wenige) Mutation(en) in LB2240 Δ *kdpD** die KdpD-unabhängige *kdpFABC*-Expression. Betrifft diese Mutation ein Gen, das für eine Sensorkinase* kodiert, so ist es wahrscheinlich, dass die Aminosäuren, welche die Spezifität dieser Sensorkinase* vermitteln, bereits im WT-Protein eine relativ hohe Homologie zu den entsprechenden Aminosäuren in KdpD aufweist. Wäre dies nicht der Fall, ist es schwer vorstellbar, dass nur eine Punktmutation (bzw. wenige Punktmutationen) eine Veränderung der Spezifität bewirken könnte. Dies wird durch die Tatsache belegt, dass die Sensorkinase EnvZ, deren Spezifität durch einzelne Aminosäure-Substitutionen mit RstB verändert werden konnte, bereits vor der Mutagenese in den die Spezifität vermittelnden Aminosäuren eine relativ hohe Identität zu RstB aufwies. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die gesuchte Sensorkinase* KdpE auch in Abwesenheit der postulierten Mutation phosphorylieren kann und die Spezifität durch die Mutation lediglich erhöht wird. Wie bereits einleitend erläutert wurde, vermittelt das KdpD-Derivat KdpD/1-395 eine weitestgehend konstitutive *kdpFABC*-Expression, welche von KdpE~P abhängig ist. Eine Deletion der zur Synthese von Acetylphosphat essentiellen Gene *pta* und *ackA* reduzierte die KdpD/1-395-vermittelte *kdpFABC*-Expression um 30-50% (Heermann *et al.*, 2003a). Es fand jedoch auch in Abwesenheit von Acetylphosphat noch immer eine hohe *kdpFABC*-Expression, und somit eine signifikante Phosphorylierung von KdpE, statt. Aus diesem Ergebnis folgerten die Autoren, dass Acetylphosphat nur zum Teil für die Phosphorylierung von KdpE in der Abwesenheit KdpD verantwortlich ist. Welcher Phosphodonor KdpE in Abwesenheit von KdpD und Acetylphosphat phosphorylieren kann, blieb jedoch offen. Es wäre denkbar, dass das WT-Protein der gesuchten Sensorkinase* dieser gesuchte Phosphodonor ist. Übereinstimmend mit dieser Überlegung konnte auch bei *B. subtilis* gezeigt werden, dass nicht nur die Spo0A-Derivate direkt durch KinC phosphoryliert werden können. Auch das Spo0A WT-Protein kann auf einem geringen Niveau durch KinC phosphoryliert werden (LeDeaux und Grossman, 1995).

5.4. Ausblick

Um die potentielle Suppressormutation in LB2240 Δ *kdpD** identifizieren zu können, sind zwei verschiedene Vorgehensweisen möglich.

Zum einen könnte die Genom-Sequenzierung von LB2240 Δ *kdpD* und LB2240 Δ *kdpD** wiederholt werden. Über einen Vergleich der beiden Sequenzen, sollte eine Identifikation der LB2240 Δ *kdpD** zugrunde liegenden Mutation möglich sein.

Alternativ könnte die Mutation in LB2240 Δ *kdpD** durch ein genetisches Verfahren isoliert und anschließend identifiziert werden. Hierzu wird zunächst die DNA von LB2240 Δ *kdpD** extrahiert. Im nächsten Schritt wird durch eine Restriktion der LB2240 Δ *kdpD**-DNA und anschließender Subklonierung der DNA-Fragmente in ein geeignetes Vektor-System, eine *shotgun-library* der LB2240 Δ *kdpD** DNA generiert. Der Ausgangsstamm LB2240 Δ *kdpD* wird anschließend mit der *shotgun-library* transformiert und auf Minimalmedium-Agarplatten mit einer geringen K⁺-Konzentration ausplattiert. Ausschließlich Zellen, die Plasmid-vermittelt das Gen mit der Mutation tragen, sollten hierdurch auf der Agarplatte mit geringer K⁺-Konzentration wachsen können. Anschließend kann das Gen mit der Mutation leicht identifiziert werden, indem die Plasmid-DNA der gewachsenen Klone sequenziert wird.

Es ist möglich, dass verschiedenen Einzelkolonien von LB2240 Δ *kdpD** Träger unterschiedlicher Mutationen sind, die den gleichen Phänotyp verursachen. Um ein umfassendes Bild der gesuchten Suppressormutation(en) zu erhalten, sollten die oben beschriebenen Untersuchungen mit möglichst vielen Einzelkolonien aus verschiedenen LB2240 Δ *kdpD**-Kulturen durchgeführt werden.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob aufgrund der *kdpD*-Deletion in LB2240 Δ *kdpD** unter K⁺-Limitation eine, im Vergleich zum Ausgangsstamm LB2240, erhöhte KdpE-Synthese stattfindet. Hierzu könnte mittels Q-RT-PCR vergleichend die *kdpE*-Transkription in LB2240 Δ *kdpD** und LB2240 quantifiziert werden. Auf Proteinebene könnte die KdpE-Menge in LB2240 Δ *kdpD** und LB2240 mittels MRM oder Immunoblot quantifiziert werden.

6. A. Zusammenfassung

Unter K^+ -limitierenden Wachstumsbedingungen oder, in wesentlich geringerem Ausmaß, unter Salzstress synthetisiert *E. coli* den KdpFABC-Komplex, ein hoch-affines K^+ -Transportsystem ($K_m \sim 2\mu M$). Die Regulation der Expression des *kdpFABC*-Operons erfolgt durch das Sensorkinase/Antwortregulator-System KdpD/KdpE.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die Identifizierung des Stimulus, der von der Sensorkinase KdpD wahrgenommen wird. Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Beobachtung, dass die K^+ -Aufnahme über das Kdp-System bei K^+ -Konzentrationen >5 mM inhibiert wird. Diese wichtige Eigenschaft des Kdp-Systems wurde in der Vergangenheit häufig übersehen, da die Inhibierung des Kdp-Systems bei höheren pH-Werten (pH 7,8) durch eine hohe Rate unspezifischen K^+ -Transports kompensiert und somit überdeckt wird.

Es konnte gezeigt werden, dass einzelne Aspartat-Substitutionen in den periplasmatischen Schleifen der Sensor-Domäne von KdpD ausreichen, um die Inhibierung des Kdp-Systems bei höheren K^+ -Konzentrationen aufzuheben. Diese KdpD-Derivate zeigten eine, im Vergleich zum KdpD-WT, veränderte Regulation der *kdpFABC*-Expression bei K^+ -Konzentrationen >5 mM, die eine adäquate K^+ -Aufnahme *via* KdpFABC ermöglichte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibierung der K^+ -Aufnahme über das Kdp-System bei K^+ -Konzentrationen >5 mM auf einer Inhibierung der *kdpFABC*-Expression durch KdpD basiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme der extrazellulären K^+ -Konzentration eine effiziente und sofortige Stimulierung der KdpD/KdpE-Signaltransduktion bewirkt. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die extrazelluläre K^+ -Konzentration als Reiz für die Sensorkinase KdpD dient.

Im zweiten Teil dieser Arbeit erfolgte erstmals eine absolute Quantifizierung von KdpD und KdpE, sowie der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen mittels hoch-sensitiver und selektiver Massenspektrometrie. Unter nicht-induzierenden Bedingungen liegt die KdpFABC-Synthese in der gleichen Größenordnung wie die KdpD- und KdpE-Synthese vor. Dieser Befund ist eine wichtige Voraussetzung für die postulierte, regulatorische Interaktion zwischen der Sensorkinase KdpD und der K^+ -Transportuntereinheit KdpB (Kipschull, 2011). Unter induzierenden Bedingungen stieg die KdpFABC-Synthese 100-300-fach, während eine etwa 10-fache Erhöhung der KdpD- und KdpE-Synthese nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung bestätigt, dass das Zweikomponenten-System KdpD/KdpE unter induzierenden Bedingungen

einer Autoregulation unterliegt. Die Autoregulation konnte durch eine räumliche Trennung des *kdpFABC*- und *kdpDE*-Operons aufgehoben werden. Die Aufhebung der Autoregulation von KdpD/KdpE hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expressionskinetik des *kdpFABC*-Operons unter induzierenden Bedingungen.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschreibt die Konstruktion eines *E. coli*-Stamms, der eine vollständige Deletion des *kdpD*-Gens trägt. Nach einer zeitlichen Verzögerung konnte in dem daraus resultierenden *E. coli*-Stamm (LB2240 Δ *kdpD*) unter K⁺-Limitation eine KdpD-unabhängige Expression des *kdpFABC*-Operons nachgewiesen werden. Die *kdpFABC*-Expression befähigte diesen Stamm, in Abwesenheit von KdpD unter K⁺-Limitation zu wachsen. Es konnte gezeigt werden, dass das K⁺-limitierte Wachstum von LB2240 Δ *kdpD* eine Phosphorylierung von KdpE voraussetzt, wobei Acetylphosphat nicht als alternativer Phosphodonor diente. Da nur wenige Zellen einer LB2240 Δ *kdpD*-Kultur den beschriebenen Phänotyp zeigten, liegt die Vermutung nahe, dass diese Zellen Träger einer Suppressormutation sind, die eine KdpD-unabhängige Phosphorylierung von KdpE und daraus folgend eine *kdpFABC*-Expression verursacht.

6. B. Summary

E. coli synthesizes the high affinity KdpFABC K⁺-transport complex ($K_m \sim 2\mu\text{M}$) under K⁺-limiting growth conditions or, to a lesser extent, under salt-stress. The expression of the *kdpFABC* operon is regulated by the sensor kinase/response regulator system KdpD/KdpE.

The aim of the first part of this study was the identification of the stimulus sensed by the sensor kinase KdpD. The starting point of the investigation was the observation, that external K⁺ concentrations >5 mM inhibited K⁺ uptake *via* the Kdp-system. The inhibition of the Kdp-system is masked by a high rate of unspecific K⁺ transport at higher pH values (pH 7,8). Therefore, this important feature of the Kdp-system was often overlooked in the past. Single aspartate substitutions in the periplasmic loops of the KdpD sensor-domain were sufficient to abolish the inhibition of the Kdp system at higher K⁺ concentrations. Compared with KdpD-WT, these KdpD derivatives exhibited an altered regulation of *kdpFABC* expression at external K⁺ concentrations >5 mM, allowing adequate K⁺ uptake *via* the KdpFABC complex. These results demonstrate, that the inhibition of K⁺ uptake *via* KdpFABC at K⁺ concentrations >5 mM is based on inhibition of KdpD-mediated *kdpFABC* expression. Furthermore, time-course analyses of *kdpFABC* expression revealed, that a decline in the extracellular K⁺ concentration efficiently stimulated KdpD/KdpE-mediated signal transduction. Based on these results it was concluded, that the extracellular K⁺ concentration serves as one of the stimuli sensed by KdpD.

In the second part of the present study, absolute amounts of the subunits of the KdpFABC complex and KdpD/KdpE were quantified under inducing and non-inducing conditions using high sensitive mass spectrometric methods. Synthesis of KdpFABC and KdpD/KdpE was found to be in the same range under non-inducing conditions. This observation is an important prerequisite for the postulated regulatory interaction between the sensor kinase KdpD and the K⁺ transport subunit KdpB (Kipschull, 2011). Under inducing conditions, synthesis of KdpFABC was increased 100-300-fold, whereas only a 10-fold increase in the synthesis of KdpD/KdpE was observed. These results confirmed that KdpD/KdpE is subjected to autoregulation under inducing conditions. The KdpD/KdpE autoregulation could be abolished by spatial separation of the *kdpFABC*- and *kdpDE*-operon. However, abolishment of KdpD/KdpE autoregulation did not influence the expressionkinetic of the *kdpFABC* operon under inducing conditions.

The third part of this study describes the construction of an *E. coli* strain, carrying a complete deletion of the *kdpD* gene. Surprisingly, after a time lag, a KdpD-independent *kdpFABC*

expression could be observed in this *E. coli* strain (LB2240 Δ *kdpD*), grown under K⁺-limiting conditions. Additionally, the *kdpFABC* expression enabled this strain to grow under K⁺-limiting conditions. The K⁺-limited growth of LB2240 Δ *kdpD* required phosphorylation of KdpE, whereupon acetylphosphate did not serve as alternative phosphodonor for KdpE.

Since only a few cells in the culture of LB2240 Δ *kdpD* exhibited the described phenotype, it is obvious that these cells carry a suppressor mutation, giving rise to a KdpD-independent KdpE phosphorylation and subsequent *kdpFABC* expression.

7. Literaturverzeichnis

Ahnert, F., Schmid, R., Altendorf, K. und Greie, J.C. (2006) ATP binding properties of the soluble part of the KdpC subunit from the *Escherichia coli* K⁺-transporting KdpFABC P-type ATPase. *Biochemistry* **45** (36): 11038-46.

Akerley, B.J., Cotter, P.A. und Miller, J.F. (1995) Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell* **80**: 611-620.

Albanesi, D., Martin, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M.C., Haouz, A., Alzari, P.M., de Mendoza, D. und Buschiazio, A. (2009) Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 16185-16190.

Altendorf, K. und 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. und Drosse, S. (1998) Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* **643**: 137-146.

Aravind, L. und Ponting, C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 458-459.

Arico, B., Miller, J.F., Roy, C., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R. und Rappuoli, R. (1989) Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 6671-6675.

Asha, H. und 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.

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*, Boca Raton, Florida 205-224.

Bakker, E.P., Borchard, A., Michels, M., Altendorf, K. und 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.

Bakker, E.P. und Harold, F.M. (1980) Energy coupling to potassium transport in *Streptococcus faecalis*. Interplay of ATP and the protonmotive force. *J. Biol. Chem.* **255** (2): 433-40.

Bakker, E.P. und Mangerich, W.E. (1981) Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J. Bacteriol.* **147**: 820-826.

Batchelor, E. und Goulian, M. (2003) Robustness and the cycle of phosphorylation and dephosphorylation in a two-component regulatory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**: 691-696.

Becker, D., Fendler, K., Altendorf, K. und 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* **46** (48): 13920-13928.

- Bilwes, A.M., Quezada, C.M., Croal, L.R., Crane, B.R. und Simon, M.I. (2001)** Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nat. Struct. Biol.* **8** (4): 353-60.
- Booth, I.R. (1985)** Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**: 359-378.
- Booth, I.R., Jones, M.A., McLaggan, D., Nikolaev, Y., Ness, L.S., Wood, C.M., Miller, S., Töttemeyer, S. und Ferguson, G.P. (1996)** Bacterial ion channels, *Handbook of Biological Physics* Vol. 2 (Koning, W. N.; Kaback, H. R.; Lolkema, J. S.; eds.), Elsevier Science, Amsterdam, 693-729.
- Bossemeyer, D., Schlösser, A. und Bakker, E.P. (1989)** Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K⁺-uptake system. *J. Bacteriol.* **171**: 2219-2221.
- Boucher, P.E., Menozzi, F.D. und Loch, C. (1994)** The modular architecture of bacterial response regulators. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. *J. Mol. Biol.* **24**: 363-377.
- Boucher, P.E., Yang, M.S., Schmidt, D.M. und Stibitz, S. (2001)** Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* **183**: 536-544.
- Bramkamp M. und Altendorf K. (2005)** Single amino acid substitution in the putative transmembrane helix V in KdpB of the KdpFABC complex of *Escherichia coli* uncouples ATPase activity and ion transport. *Biochemistry* **44**: 8260-8266.
- Bramkamp, M., Altendorf, K. und 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.* **24** (5-6): 375-386.
- Brown, T.D.K., Jones-Mortimer, M.C. und Kornberg, H.L. (1977)** The enzymatic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 327-336.
- Burbulys, D., Trach, K.A. und Hoch, J.A. (1991)** Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.
- Buurman, E.T., Kim, K.T. und Epstein, W. (1995)** Genetic evidence of two sequentially occupied K⁺ binding sites in the Kdp transport ATPase. *J. Biol. Chem.* **270**: 6678-6685.
- Buurmann, E.T., McLaggen, D., Naprstek, J. und Epstein, W. (2004)** Multiple paths for nonphysiological transport of K⁺ in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**: 4238-4245.
- Cai, S.J. und Inouye, M. (2002)** EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**: 24155-24161.
- Cann, M. J. (2007)** Sodium regulation of GAF domain function. *Biochem. Soc. Trans.* **35**: 1032-1034.
- Casino, P., Rubio, V. und Marina, A. (2009)** Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **139**: 325-336.
- Cheung, J. und Hendrickson, W.A. (2010)** Sensor-domains of two-component regulatory systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 116-123.
- Csonka, L.N. (1989)** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbio. Rev.* **53**: 121-147.
- Csonka L.N. und Hanson A.D. (1991)** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.

- Cummings, C.A., Bootsma, H.J., Relman, D.A. und Miller, J.F. (2006)** Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J. Bacteriol.* **188**: 1775-1785.
- Deora, R., Bootsma, H.J., Miller, J.F. und Cotter, P.A. (2001)** Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol. Microbiol.* **40**: 669-683.
- Dosch, D.C., Helmer, G.L., Sutton, S.H., Salvacion, F.F. und 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.
- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. und MacKinnon, R. (1998)** The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**: 69-77.
- Durell, S.R., Bakker, E.P. und 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.
- Epstein, W. (1986)** Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 73-78.
- Epstein, W. (2003)** The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **75**: 293-320.
- Epstein, W. und Kim, B.S. (1971)** Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **101**: 836-843.
- Epstein, W. und Schultz, S.G. (1965)** Cation transport in *Escherichia coli*. V. Regulation of cation content. *J. Gen. Physiol.* **49**: 221-234.
- Epstein, W., Whitelaw, V. und Hesse, J. (1978)** A K⁺ transport ATPase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **253**: 6666-6668.
- Farwick, M., Siewe, R.M. und Krämer, R. (1995)** Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 4690-4695.
- Feng, J., Atkinson, M.R., McCleary, W., Stock, J.B., Wanner, B.L. und Ninfa, A.J. (1992)** Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 6061-6070.
- Frame, R. und Bishop, J.O. (1971)** The number of sex-factors per chromosome in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **121** (1): 93-103.
- Gao, R. und Stock, A.M. (2009)** Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 133-54.
- Gao, R. und Stock, A.M. (2010)** Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 160-167.
- Gaßel, M. und 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. und 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.

- Goulian, M. (2004)** Robust control in bacterial regulatory circuits. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 198-202.
- Gowrishankar, J. (1985)** Identification of osmoreponsive genes in *Escherichia coli*: evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation. *J. Bacteriol.* **164** (1): 434-445.
- Greie, J.C. und 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.
- Gustavsson, N., Diez, A. und Nystrom, 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.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. und Beckwith, J. (1995)** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J. Bacteriol.* **177**: 4121-4130.
- Hamann, K., Zimmann, P. und Altendorf, K. (2008)** Reduction of turgor is not the stimulus for the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**: 2360-2367.
- Hamann, K. (2008)** Systematic Analysis of Stimulus Perception of the Sensor Kinase KdpD of *Escherichia coli*. *Dissertation*, Universität Osnabrück.
- Harding, M.M. (2002)** Metal-ligand geometry relevant to proteins and in proteins: sodium and potassium. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **58**: 872-874.
- Harold, F., Altendorf, K. und Hirata, H. (1974)** Probing membrane transport mechanisms with ionophores, *Ann. NY Acad. Sci.* **235**: 149-160.
- Heitkamp, T., Böttcher, B. und Greie, J.C. (2009)** Solution structure of the KdpFABC P-type ATPase from *Escherichia coli* by electron microscopic single particle analysis. *J. Struct. Biol.* **166** (3): 295-302.
- Heitkamp, T., Kalinowski, R., Böttcher, B., Börsch, M., Altendorf, K. und Greie, J.C. (2008)** K⁺-translocating KdpFABC P-type ATPase from *Escherichia coli* acts as a functional and structural dimer. *Biochemistry* **47** (11): 3564-75.
- Heermann, R., Altendorf, K. und Jung, K. (1998)** The turgor sensor KdpD of *Escherichia coli* is a homodimer. *Biochim. Biophys. Acta* **1415**: 114-124.
- Heermann, R., Altendorf, K. und 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. und 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. und Jung, K. (2010)** The complexity of the 'simple' two-component system KdpD/KdpE in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **304**: 97-106.
- Heermann, R., Fohrmann, A., Altendorf, K. und 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., Lippert, M.L. und Jung, K. (2009b)** Domain swapping reveals that the N-terminal domain of the sensor kinase KdpD in *Escherichia coli* is important for signaling. *BMC Microbiol.* **9**: 133-145.
- Heermann, R., Weber, A., Mayer, B., Ott, M., Hauser, E., Gabriel, G., Pirch, T. und Jung, K. (2009a)** The universal stress protein UspC scaffolds the KdpD/KdpE signaling cascade of *Escherichia coli* under salt stress. *J. Mol. Biol.* **386** (1): 134-148.
- Heermann, R., Zeppenfeld, T. und Jung, K. (2008)** Simple generation of site-directed point mutations in the *Escherichia coli* chromosome using Red/ET recombination. *Microb. Cell Fact.* **7**: 14.
- Heermann, R., Zigann, K., Gayer, S., Rodriguez-Fernandez, M., Banga, J.R., Kremling, A. und Jung, K. (2014)** Dynamics of an interactive network composed of a bacterial two-component system, a transporter and K⁺ as mediator. *PLoS One* **9** (2): e89671. doi: 10.1371.
- Hoch, J.A. (1993)** Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 441-465.
- Hoch, J.A. und Silhavy, T.J. (1995)** Two-Component Signal Transduction. Washington, DC:ASM Press.
- Huynh, T.N. und Stewart, V. (2011)** Negative control in two-component signal transduction by transmitter phosphatase activity. *Mol. Microbiol.* **82**: 275-286.
- Ireton, K., Rudner, D.Z., Siranosian, K.J. und Grossman, A.D. (1993)** Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the Spo0A transcription factor. *Genes Dev.* **7**: 283-294.
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M. und Hoch, J.A. (2000)** Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **38**: 535-542.
- Jung, K. und Altendorf, K. (1998a)** 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. und Altendorf, K. (1998b)** 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., Tjaden, B. und 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. und 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.
- Kawamura, F. und Saito, H. (1983)** Isolation and mapping of a new suppressor mutation of an early sporulation gene *spo0F* mutation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 330-334.
- Kipschull, K. (2011)** Die Sensorkinase KdpD aus *Escherichia coli*: Funktionelle Reinigung, Nukleotidbindestudien und *in vivo* Protein-Protein Interaktionen. *Dissertation*, Universität Osnabrück.
- Kenney L. (2010)** How important is the phosphatase activity of sensor kinases? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 168-176.

- Kenney, L.J., Bauer, M.D. und Silhavy, T.J. (1995)** Phosphorylation dependent conformational changes in OmpR, an osmoregulatory DNA-binding protein in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8866-8870.
- Kitko, R.D., Cleeton, R.L., Armentrout, E.I., Lee, G.E., Noguchi, K., Berkmen, B.D., Jones, B.D. und Slonczewski, J.L. (2009)** Cytoplasmic acidification and the benzoate transcriptome in *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE* **4**: e8255.
- Kitko, R.D., Wilks, J.C., Garduque, G.M. und Slonczewski, J.L. (2010)** Osmolytes contribute to pH homeostasis of *Escherichia coli*. *PLoS ONE* **5**: e10078.
- Kobayashi, K., Shoji, K., Shimizu, T., Nakano, K., Sato, T. und Kobayashi, Y. (1995)** Analysis of a suppressor mutation *ssb* (*kinC*) of *surOB20* (*spo0A*) mutation in *Bacillus subtilis* reveals that *kinC* encodes a histidine protein kinase. *J. Bacteriol.* **177**: 176-182.
- Kremling, A., Heermann, R., Centler, F., Jung, K. und Gilles, E.D. (2004)** Analysis of two-component signal transduction by mathematical modeling using the KdpD/KdpE system of *Escherichia coli*. *Biosystems.* **78** (1-3): 23-37.
- Kroll, R.G. und I.R. Booth. (1981)** The role of potassium transport in the generation of a pH gradient in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **198**: 691-698.
- Kroll, R.G. und I.R. Booth. (1983).** The relationship between intracellular pH, the pH gradient and potassium transport in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **216**: 709-716.
- Kuster, B., Schirle, M., Mallick, P. und Aebershold, R. (2005)** Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6** (7): 577-583.
- Laermann, V., Cudic, E., Kipschull, K., Zimmann, P. und Altendorf, K. (2013)** The sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* senses external K⁺. *Mol. Microbiol.* **88**: 1194-1204.
- Laimins, L.A., Rhoads, D.B. und Epstein, W. (1981)** Osmotic control of *kdp* operon expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** (1): 464-468.
- LeDeaux, J.R. und Grossman, A.D. (1995)** Isolation and characterization of *kinC*, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:166-175.
- Lee, S.J. und Gralla, J.D. (2004)** Osmo-regulation of bacterial transcription via poised RNA polymerase. *Mol. Cell.* **14**: 153-162.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall, R.J. (1951)** Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1): 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.
- Lukat, G.S., McCleary, W.R., Stock, A.M. und Stock, J.B. (1992)** Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 718-722.
- Mahmood, N.A.B.N., Biemans-Oldehinkel, E., Patzlaff, J.S., Schuurman-Wolters, G.K. und Poolman, B. (2006)** Ion Specificity and Ionic Strength Dependence of the Osmoregulatory ABC Transporter OpuA. *J. Biol. Chem.* **281**: 29830-29839.

- Malli, R. und Epstein, W. (1998)** Expression of the Kdp ATPase is consistent with regulation by turgor pressure. *J. Bacteriol.* **180** (19): 5102-5108.
- Martinez-Argudo, I., Little, R. und Dixon, R. (2004)** Role of the amino-terminal GAF domain of the NifA activator in controlling the response to the antiactivator protein Nifl. *Mol. Microbiol.* **52**: 1731-1744
- Maslennikov, I., Klammt, C., Hwang, E., Kefala, G., Okamura, M., Esquivies, L., Mors, K., Glaubitz, C., Kwiatkowski, W., Jeon, Y.H. und Choe, S. (2010)** Membrane domain structures of three classes of histidine kinase receptors by cell-free expression and rapid NMR analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 10902-10907.
- Melvin, J.A., Scheller, E.V., Miller, J.F. und Cotter, P.A. (2014)** *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* **12** (4): 274-88.
- McCleary, W.R. und Stock, J.B. (1994)** Acetyl phosphate and the activation of two-component response-regulators. *J. Biol. Chem.* **269**: 31567-31572.
- Miller, J. H. (1972)** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mitchell, P. (1968)** in: Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction, Glynn Research Ltd, Bodmin, Cornwall, UK.
- Mitrophanov, A.Y., Hadley, T.J. und Groisman, E.A. (2010)** Positive autoregulation shapes response timing and intensity in two-component signal transduction systems. *J. Mol. Biol.* **401**: 671-680.
- Miyashiro, T. und Goulian, M. (2008)** High stimulus unmasks positive feedback in an autoregulated bacterial signaling circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 17457-17462.
- Møller, J.V., Juul, B. und Le Maire, M. (1996)** Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1286**: 1-51.
- Nachin, L., Brive, L., Persson, K.C., Svensson, P. und Nystrom, T. (2008)** Heterodimer formation within universal stress protein classes revealed by an in silico and experimental approach. *J. Mol. Biol.* **380**: 340-350.
- Murphy, K.P. (2001)** Computing Science and Statistics 33.
- Narayanan, A., Shivesh, K., Evrard, A.N., Paul, L.N. und Yernool, D.A. (2014)** An asymmetric heterodomain interface stabilizes a response regulator-DNA complex. *Nat. Commun.* **5**: 3282 doi: 10.1038/ncomms4282.
- Nakashima, K., Sugiura, A., Kanamaru, K. und 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.
- Olmedo, G., Ninfa, E.G., Stock, J. und Youngman, P. (1990)** Novel mutations that alter the regulation of sporulation in *Bacillus subtilis*: evidence that phosphorylation of regulatory protein Spo0A controls the initiation of sporulation. *J. Mol. Biol.* **215**: 359-372.
- Oren, A. (1999)** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 334-348.

- Padan, E., Zilberstein, D., und Rottenberg, H. (1976)** The proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells. *Eur. J. Biochem.* **63**: 533-541.
- Parkinson, J.S. und Kofoid, E.C. (1992)** Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71-112.
- Peterson, G.L. (1977)** A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83** (2): 346-356.
- Polarek, J.W., Walderhaug, M.O., und Epstein, W., (1988)** Genetics of Kdp, the K⁺-transport ATPase of *E. coli*. *Methods. Enzymol.* **157**: 655-667.
- Polarek, J.W., Williams, G. und Epstein, W. (1992)** The products of the *kdpDE* operon are required for expression of the Kdp ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 2145-2151.
- Poolman, B., Blount, P., Folgering, J.H.A., Friesen, R.H.E., Moe, P.C. und 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. und 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.
- Ravio, T., Popkin, L. und Silhavy, T.J. (1999)** The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *J. Bacteriol.* **181**: 5263-5272.
- Rhoads, D.B., Waters, F.B. und Epstein, W. (1976)** Cation transport in *Escherichia coli*. VIII. Potassium transport mutants. *J. Gen. Physiol.* **67**: 325-341.
- Rhoads, D.B. und Epstein, W. (1977).** Energy coupling to net K⁺-transport in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**: 1394-1401.
- Rothenbücher, M.C., Facey, S.J., Kiefer, D., Kossmann, M. und Kuhn, A. (2006)** The cytoplasmic C-terminal domain of the *Escherichia coli* KdpD protein functions as a K⁺ sensor. *J. Bacteriol.* **188**: 1950-1958.
- Roe, A.J., McLaggan, D., O'Byrne, C.P. und Booth, I.R. (2000)** Rapid inactivation of the *Escherichia coli* Kdp K⁺ uptake system by high potassium concentrations. *Mol. Microbiol.* **35**: 1235-1243.
- Roy, C.R., Miller, J.F. und Falkow, S. (1990)** Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* *bvgABC* operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3763-3767.
- Salmond, C.V., Kroll, R.G. und Booth, I. (1984)** The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2845-2850.
- Schlösser, A., Hamann, A., Schleyer, M. und 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.
- Schlösser, A., Hamann, A., Bossemeyer, D., Schneider, E. und Bakker, E.P. (1993)** NAD⁺ binding to the *Escherichia coli* K⁺-uptake protein TrkA and sequence similarities between TrkA and domains of a family of dehydrogenases suggest a role for NAD⁺ in bacterial transport. *Mol. Microbiol.* **9**: 533-543.

- Schlösser, A., Meldorf, M., Stumpe, S., Bakker, E.P. und Epstein, W. (1995)** TrkH and its homolog, TrkG, determine the specificity and kinetics of cation transport by the Trk system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 1908-1910.
- Schniederberend, M. (2004)** Die Sensorkinase KdpD aus *Escherichia coli*: Charakterisierung von Mutanten mit veränderter Reizwahrnehmung. *Diplomarbeit*, Universität Osnabrück.
- Schrecke, K., Jordan, S. und Mascher, T. (2013)** Stoichiometry and perturbation studies of the LiaFSR system of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **87**: 769-788.
- Searcy, D.H. (1976)** Thermoplasma acidophilum: Intracellular pH and potassium concentration. *Biochim. Biophys. Acta.* **451**: 278-286.
- Sharrock, R.A., Rubenstein, S., Chan, M. und Leighton, T. (1984)** Intergenic suppression of *spo0* phenotypes by the *Bacillus subtilis* mutation *rvtA*. *Mol. Gen. Genet.* **194**: 260-264.
- Shin, D., Lee, E.J., Huang, H. und Groisman, E.A. (2006)** A positive feedback loop promotes transcription surge that jump-starts Salmonella virulence circuit. *Science* **314**: 1607-1609.
- Shinagawa, H., Makino, K. und Nakata, A. (1983)** Regulation of the pho regulon in *Escherichia coli* K-12. Genetic and physiological regulation of the positive regulatory gene *phoB*. *J. Mol. Biol.* **168**: 477-488.
- Shoji, K., Hiratsuka, S., Kawamura, F. und Kobayashi, Y. (1988)** New suppressor mutation *sur0B* of *spo0B* and *spo0F* mutations in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 3249-3257.
- Siebers, A. und 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. und Altendorf, K. (1993)** K⁺-translocating Kdp-ATPases and other bacterial P-type ATPases. In: *Alkali cation transport systems in prokaryotes* (Bakker, E.P., ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 225-252
- Skerker, J.M., Perchuk, B.S., Siryaporn, A., Lubin, E.A., Ashenberg, O., Goulian, M. und Laub, M.T. (2008)** Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* **133**: 1043-1054.
- Song, Y., Peisach, D., Pioszak, A.A., Xu, Z. und Ninfa, A.J. (2004)** Crystal structure of the C-terminal domain of the two-component systems transmitter protein NRII (NtrB), regulator of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**: 6670-6678.
- Sørensen, T.L., Clausen, J.D., Jensen, A.M., Vilsen, B., Møller, J.V., Andersen, J.P. und Nissen, P. (2004)** Localization of a K⁺-binding site involved in dephosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **279**: 46355-46358.
- Spiegelman, G., Van Hoy, B., Perego, M., Day, J., Trach, K. und Hoch, J.A. (1990)** Structural alterations in the *Bacillus subtilis* Spo0A regulatory protein which suppress mutations at several *spo0* loci. *J. Bacteriol.* **172**: 5011-5019.
- Stewart, R.C. (2010)** Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 133-141.
- Stewart, L.M.D., Bakker, E.P. und Booth, I.R. (1985)** Energy coupling to K⁺-uptake via the Trk system in *Escherichia coli*: the role of ATP. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 77-85.
- Stockbauer, K.E., Fuchslocher, B., Miller, J.F. und Cotter, P.A. (2001)** Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol. Microbiol.* **39**: 65-78.

- Stumpe, S., Schlösser, A., Schleyer, M. und 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.). Elsevier Science, Amsterdam, 473-499.
- Sugiura, A., Hirokawa, K., Nakashima, K. und Mizuno, T. (1994)** Signal-sensing mechanisms of the putative osmosensor KdpD in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **14** (5): 929-938.
- Sugiura, A., Nakashima, K., Tanaka, K. und Mizuno, T. (1992)** Clarification of the structural and functional features of the osmoregulated kdp operon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**: 1769-1776.
- Sukharev, S.I., Blount, P., Martinac, B. und Kung, C. (1997)** Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Annu. Rev. Physiol.* **59**: 633-657.
- Sutherland, L., Cairney, J., Elmore, M.J., Booth, I.R. und 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. und Ikura, M. (1998)** NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature* **396**: 88-92.
- Tetsch, L. und Jung, K. (2009a)** The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transporter protein in bacteria. *Mol. Microbiol.* **73**: 982-992.
- Tetsch, L. und Jung, K. (2009b)** How are signals transduced across the cytoplasmic membrane? transport proteins as transmitter of information. *Amino Acids* **37**: 467-477.
- 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. und Ikura, M. (1999)** Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 953-962.
- Trach, K., Chapman, J.W., Piggot, P.J. und Hoch, J.A. (1985)** Deduced product of the stage 0 sporulation gene *spoOF* shares homology with the Spo0A, OmpR and SfrA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7260-7264.
- Trchounian, A. und Kobayashi, H. (1999)** Kup is the major K⁺ uptake system in *Escherichia coli* upon hyper-osmotic stress at low pH. *FEBS Lett.* **447**: 144-148.
- Ulrich, L.E. und Zuhlin, I.B. (2010)** The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic. Acids. Res.* **38**: D401-D407.
- Van Bogelen, R.A., Hutton, M.E. und Neidhardt, F.C. (1990)** Gene-protein database of *Escherichia coli* K-12, edition 3, *Electrophoresis* **11**, 1131-1166.
- Voelkner, P., Puppe, W. und 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., Dosch, D.C. und Epstein, W. (1987)** Potassium transport in bacteria. In: Ion transport in prokaryotes. (Rosen, B.P., ed), Academic Press, New York pp. 84-130.
- Walderhaug, M.O., Polarek, J.W., Voelkner, P., Daniel, J.M., Hesse, J.E., Altendorf, K. und 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. und Wilmes-Riesenberg, M.R. (1992)** Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in the control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 2124-2130.
- Wayne, K.J., Sham, L.T., Tsui, H.C., Gutu, A.D., Barendt, S.M., Keen, S.K. und Winkler, M.E. (2010)** Localization and cellular amounts of the WalRKJ (VicRKX) two-component regulatory system proteins in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **192**: 4388-4394.
- White, S., Tuttle, F.E., Blankenhorn, D., Dosch, D.C. und Slonczewski, J.L. (1992)** pH dependence and gene structure of *inaA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 1537-1543.
- Williams, C.L. und Cotter, P.A. (2007)** Autoregulation is essential for precise temporal and steady-state regulation by the *Bordetella* BvgAS phosphorelay. *J. Bacteriol.* **189**: 1974-1982.
- Witan, J., Bauer, J., Wittig, I., Steinmetz, P.A., Erker, W. und Unden, G. (2012)** Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Mol. Microbiol.* **85** (5): 846-861.
- Wood, J.M., Culham, D.E., Hillar A., Vernikovska Y.I., Liu, F., Boggs, J.M. und Keates, R.A. (2005)** A structural model for the osmosensor, transporter, and osmoregulator ProP of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**: 5634-5646.
- Yamada, S., Sugimota, H., Kobayashi, M., Ohno, A., Nakamura, H. und Shiro, Y. (2009)** Structure of PAS-linked histidine kinase and the response regulator complex. *Structure* **17**: 1333-1344.
- Zapf, J., Sen, U., Madhusudan, Hoch, J.A. und Varughese, K.I. (2000)** A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure* **8**: 851-862.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A. und MacKinnon, R. (2001)** Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel–Fab complex at 2.0 °Å resolution. *Nature* **414**: 43-48.
- Zientz, E., Bongaerts, J. und Unden, G. (1998)** Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR* genes) two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **180**: 5421-5425.
- Zimmann, P., Puppe, W. und Altendorf, K. (1995)** Membrane topology analysis of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270** (47): 28282-28288.
- Zimmann, P., Steinbrügge, A., Schniederberend, M., Jung, K. und Altendorf, K. (2007)** The extension of the fourth transmembrane helix of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* is involved in sensing. *J. Bacteriol.* **189** (20): 7326-34.
- Zu, T., Manetti, R., Rappuoli, R. und Scarlato, V. (1996)** Differential binding of BvgA to two classes of virulence genes of *Bordetella pertussis* directs promoter selectivity by RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* **21**: 557–565.

Anhang 1. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Vera Laermann
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdaten:	14.04. 1982 in Braunschweig

Schulische Ausbildung

01.08.1988-30.06.1992	Barbara-Grundschule Pulheim
31.08.1992-12.06.2001	Geschwister-Scholl Gymnasium Pulheim
12.06.2001	Abitur

Studium

01.10.2003-31.03.2009	Studium der Biologie an der Universität Osnabrück
01.07.2008-31.03.2009	Diplomarbeit in der Abteilung Mikrobiologie, Universität Osnabrück: Charakterisierung chromosomaler Mutationen im <i>kdpD</i> -Gen von <i>Escherichia coli</i> .
seit 01.06.2009	Promotion in der Abteilung Mikrobiologie, Universität Osnabrück: Untersuchungen zur Stimulus-Wahrnehmung und Regulation des Zweikomponenten-Systems KdpD/KdpE aus <i>Escherichia coli</i> .

Anhang 2. 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.

- Die *kdpA*-Expressionskinetiken nach einer Veränderung der externen K^+ -Konzentration wurden von mir geplant und ausgewertet. Die Versuche wurden unter meiner Anleitung von Emina Ćudić, im Rahmen eines Großpraktikums und einer Masterarbeit, durchgeführt.
- Die Quantifizierung der Untereinheiten des KdpFABC-Komplexes, sowie KdpD und KdpE, erfolgte durch Kristin Surmann und Dr. Elke Hammer im Rahmen einer Kooperation mit der Abteilung Functional Genomics der Universität Greifswald.
- Die Konstruktion der Plasmide pBD5-9-D424A, pBD5-9-D424E, pBD5-9-D424Y, pBD5-9-D424, pBD5-9-D474A, pBD5-9-D474E, pBD5-9-D474C und pBD5-9-D474Y, sowie die Überprüfung der zellulären Lokalisation der entsprechenden KdpD-Derivate, erfolgte durch Kerstin Kipschull.

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,

(Ort, Datum)

(Unterschrift)