
**Zur Funktion des
Sensor-Histidinkinase/Antwortregulator Systems
YehU/YehT in *Escherichia coli***

Tobias Kraxenberger

**Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades**

**vorgelegt von
Tobias Kraxenberger**

am 12. April 2011

- 1. Gutachterin:** **Professor Dr. Kirsten Jung, LMU München**
Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie, LMU München
- 2. Gutachter:** **Professor Dr. Thorsten Mascher, LMU München**
Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie, LMU München

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2011

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Bakterielle Signaltransduktion: Zweikomponenten-Systeme..... | 1 |
| 1.2 Aufbau und Funktion von Sensor-Histidinkinasen | 2 |
| 1.3 Aufbau und Funktion von Antwortregulatoren..... | 4 |
| 1.4 Das SHK/AR System YehU/YehT in <i>Escherichia coli</i> | 6 |
| Aufgabenstellung | 13 |
| 2. Material und Methoden | 14 |
| 2.1 Materialien..... | 14 |
| 2.2 Stämme, Plasmide, Oligonukleotide | 16 |
| 2.2.1 Stämme..... | 16 |
| 2.2.2 Plasmide | 17 |
| 2.2.3 Oligonukleotide | 23 |
| 2.3 Mikrobiologische Methoden | 29 |
| 2.3.1 Kultivierung | 29 |
| 2.3.2 Dauerkulturen | 30 |
| 2.4 Molekularbiologische und genetische Methoden | 31 |
| 2.4.1 Plasmidisolierung..... | 31 |
| 2.4.2 Isolierung genomischer DNA..... | 31 |
| 2.4.3 Modifikation von DNA | 31 |
| 2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA..... | 32 |
| 2.4.5 Markierung von DNA für Gel-Retardations- und DNase I Schutzexperimente | 32 |
| 2.4.6 Extraktion von DNA aus Reinigungsgelen..... | 32 |
| 2.4.7 Präparation kompetenter Zellen und Transformation..... | 33 |
| 2.4.8 Plasmidkonstruktion..... | 33 |
| 2.4.9 Stammkonstruktion | 35 |
| 2.4.9.1 Gendeletion mit Quick & Easy <i>E. coli</i> Gene Deletion Kit..... | 35 |
| 2.4.9.2 Chromosomale Genmodifikationen: BAC Modification Kit..... | 35 |
| 2.4.10 DNA-Sequenzanalyse | 36 |
| 2.4.11 Transkriptomanalyse mit Affymetrix <i>E. coli</i> Genom 2.0 Chip..... | 36 |
| 2.4.11.1 Isolierung von RNA..... | 36 |
| 2.4.11.2 Entfernung von chromosomaler DNA und Reinigung | 36 |
| 2.4.11.3 Transkriptomanalyse mit Affymetrix <i>E. coli</i> Genom 2.0 Chip | 37 |
| 2.4.12 Kartierung von Transkriptionsstartpunkten | 37 |
| 2.5 Biochemische und Analytische Methoden | 38 |
| 2.5.1 Fraktionierung von Zellfraktionen | 38 |
| 2.5.2 Reinigung löslicher Proteine über Ni ⁺² -NTA-Affinitätschromatographie und Dialyse | 39 |
| 2.5.3 Reinigung von YehU-His ₆ und Derivaten | 39 |
| 2.5.4 Rekonstitution von gereinigtem YehU-His ₆ | 40 |
| 2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 41 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.5.6 | Immunologischer Nachweis von Proteinen | 41 |
| 2.5.7 | Proteinbestimmung..... | 42 |
| 2.5.8 | Analytische Gelfiltration | 42 |
| 2.5.9 | In vitro Phosphorylierungen | 43 |
| 2.5.9.1 | Synthese von ³² P-Acetylphosphat | 43 |
| 2.5.9.2 | Phosphorylierung von YehT mit ³² P-Acetylphosphat..... | 43 |
| 2.5.9.3 | Bestimmung der Kinase-Aktivität von YehU-His ₆ in vitro..... | 43 |
| 2.5.10 | DNA-Protein-Interaktionsstudien..... | 44 |
| 2.5.10.1 | Formaldehyd Fixierung, SDPA und SELEX | 44 |
| 2.5.10.2 | Gel-Retardationsexperimente..... | 45 |
| 2.5.10.3 | DNase I Schutzexperiment..... | 46 |
| 2.6 | Datenbanken und bioinformatische Methoden | 47 |
| 2.6.1 | Datenbanken..... | 47 |
| 2.6.2 | Vorhersagen und Motivsuche..... | 47 |
| 2.6.3 | DNA-Fragmentlängenanalyse | 48 |
| 2.6.4 | Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen und Berechnung der apparenten Dissoziationskonstante | 48 |
| 3. | Ergebnisse..... | 50 |
| 3.1 | Einfluss von YehU/YehT auf die Regulation der Expression benachbarter Gene des <i>yehU/yehT</i> Locus | 50 |
| 3.1.1 | Expressionsprofil der benachbarten Gene von <i>yehU/yehT</i> | 50 |
| 3.1.2 | Promotor:YehT Interaktion..... | 52 |
| 3.2 | Validierung der Ergebnisse der Expressionsanalyse von Oshima <i>et al.</i> (2002)..... | 53 |
| 3.3 | Die LytTR-bindende Konsensus DNA-Sequenz und YehU/YehT homologe ZKS | 55 |
| 3.3.1 | Extrapolation der LytTR-artigen Konsensus DNA-Bindesequenz..... | 55 |
| 3.3.2 | Das homologe SHK/AR-System LytS/LytR aus <i>S. aureus</i> | 56 |
| 3.4 | Anreicherung His ₆ -YehT bindender DNA Fragmente in vitro..... | 56 |
| 3.5 | Expressionsprofil aller <i>E. coli</i> Gene nach Überproduktion von His ₆ -YehT | 58 |
| 3.6 | Evaluation der Transkriptomanalyse..... | 62 |
| 3.6.1 | In silico Analyse der 5'-UTR YehT-abhängig exprimierter Gene | 63 |
| 3.6.2 | Kartierung der Transkriptionsstartpunkte (5'RACE)..... | 64 |
| 3.6.3 | His ₆ -YehT:Promotor Interaktion..... | 65 |
| 3.7 | Der <i>yjiY</i> Promotor P _{<i>yjiY</i>} | 67 |
| 3.7.1 | Eingrenzung der YehT Bindestelle: DNase I Schutzexperiment | 67 |
| 3.7.2 | Definition der His ₆ -YehT Bindestelle in P _{<i>yjiY</i>} | 69 |
| 3.8 | Extrapolation: Identifizierung putativer YehT-Bindestellen in silico | 72 |
| 3.9 | Der Aktivierungsmechanismus des YehU/YehT-Systems..... | 76 |
| 3.9.1 | Reinigung von His ₆ -YehT | 76 |
| 3.9.2 | Oligomerisierung von His ₆ -YehT und Derivaten..... | 78 |
| 3.9.3 | Aktivität des gereinigten Antwortregulators YehT..... | 79 |
| 3.9.4 | Klassische Komponenten eines ZKS: SHK (YehU) und AR (YehT) | 80 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.9.5 | Alternativer Phosphatdonor GTP und niedermolekulare Stimuli | 84 |
| 3.9.6 | Akzessorische Proteine: YehS, Rsd und Ndk | 85 |
| 4. | Diskussion | 89 |
| 4.1 | Identifizierung YehU/YehT regulierter Gene | 89 |
| 4.2 | Der YehT-abhängige Promotor von <i>yjiY</i> | 95 |
| 4.3 | Biochemische Charakterisierung von YehU und YehT | 98 |
| | Ausblick | 103 |
| 5. | Zusammenfassung | 104 |
| 6. | Literatur | 106 |
| A1 | - Daten aller gelisteten Gene/intergenen Regionen der angegebenen <i>E. coli</i> -Stämme | 121 |
| A2 | - Genomische Nachbarschaft von <i>yehU/yehT</i> | 121 |
| A3 | - Abgleich mit Oshima <i>et al.</i> (2002) | 121 |
| A4 | - Gene mit LytTR-artiger 5'-UTR | 121 |
| A5 | - Homologe Zielgene <i>yohJK</i> | 121 |
| A6 | - Co-Reinigung YehT bindender DNA-Fragmente..... | 121 |
| A7 | - 37 Gene mit den größten Expressionsunterschieden | 121 |
| A8 | - Extrapolation YehT Bindestelle..... | 121 |
| | Danksagung | 122 |
| | Lebenslauf | 123 |
| | Ehrenwörtliche Versicherung | 125 |
| | Erklärung | 126 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| 5'-RACE | <i>rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction</i> ; Methode zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts eines Gens |
| 5'-UTR | <i>5'-untranslated region</i> , 5'- eines Gens gelegene, transkribierte, aber nicht-translatierte DNA-Sequenz |
| Abb. | Abbildung |
| Amp ^R | Ampicillin-Resistenz |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| AR | Antwortregulator |
| AS | Aminosäure |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CA-Domäne | <i>catalytic and ATP-binding</i> , katalytische und ATP-bindende Domäne |
| CTAB | Cetyltrimethylammoniumbromid |
| Da | Dalton (analog kDa) |
| ddH ₂ O | zweifach destilliertes Wasser |
| DDM | <i>N</i> -Dodecyl-β-D-maltosid |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DHp-Domäne | Dimerisierungs- und Histidin- Phosphotransfer Domäne |
| DM | <i>N</i> -Decyl-β-D-maltosid |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| DNase I | Desoxyribonuklease I |
| dNTPs | Desoxyribonukleotidtriphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EMSA | Electrophoretic Mobility Shift Assays, Gelretardations Experiment |
| FUS | <i>far upstream sequence</i> , weit vom Transkriptionsstartpunkt entfernte DNA-Sequenz |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| His ₆ -Tag | Hexahistidin am N- oder C-Terminus eines Proteins zur Reinigung via Affinitätschromatographie |
| HPT | Histidin Phosphotransferprotein |
| IgG | Immunglobuline der Klasse G |
| Kan ^R | Kanamycin-Resistenz |
| K _d | apparente Dissoziationskonstante |
| LDAO | Lauryldimethylaminoxid |
| MW | Molekulargewicht |
| Nt | Nukleotid(e) |
| NTA | Triazetonitril |
| ODx | Optische Dichte der Wellenlänge x nm |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |

| | |
|--------|--|
| PP | Periplasma |
| rF | Relative Fluoreszenz, dimensionslos |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SELEX | Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung |
| SHK | Sensor-Histidinkinase |
| spda | <i>solid phase DNA-binding assay</i> ; Methode zur Anreicherung von DNA Fragmenten durch immobilisiertes Protein |
| Tab. | Tabelle |
| TG | Tris/Glycin |
| U | Unit(s) |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| ÜK | Über-Nacht-Kultur |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| WT | Wildtyp |
| x g | Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung g in m/s^2 |
| YehT~P | Phospho-YehT, analog auch andere Proteine |
| ZKS | Zweikomponentensystem |
| ZM | Zytoplasmamembran |
| ZP | Zytoplasma |

Nomenklatur

Substitutionen im *yehU*- und *yehT*-Gen und der Genprodukte werden wie folgt bezeichnet: Der Einbuchstaben-Code der nativen Aminosäure wird von der Position im Protein gefolgt. Aminosäuresubstitutionen an dieser Position sind im Einbuchstaben-Code angefügt. Eine Deletion wird mit Δ angegeben, dies gilt auch für die Deletion der codierenden Sequenz einer Domäne innerhalb eines Gens.

Genprodukte werden so beziffert, dass das erste Methionin im Wildtyp-Protein in der Aminosäuresequenz mit „1“ bezeichnet wird, unabhängig ob N-terminal ein His₆-Tag vorausgeht. Die codierende DNA Sequenz für einen His₆-Tag wird, positionsabhängig, als *his₆*-Gen oder Gen-*his₆* dargestellt.

Wenn nicht anders dargestellt, beziehen sich Angaben zu Größe und/oder Positionen von DNA-Fragmenten auf die WT Sequenzen und beinhalten nicht eventuell vorhandene Adaptoren. Alle Positionsangaben von Sequenzen oder Nt beziehen sich auf den Translationsstartpunkt (A von ATG ist Position +1).

1. Einleitung

Stetig wechselnde Umweltbedingungen in den natürlichen Habitaten von Bakterien machen deren schnelle und effektive Adaptation unerlässlich. So können sich in kürzester Zeit physikalische und chemische Parameter ändern, wie beispielsweise die Temperatur, der Sauerstoffgehalt, die Osmolarität, der pH Wert, das Nährstoffangebot oder die Anwesenheit von schädlichen Stoffen. Es ist z.B. notwendig, innerhalb kürzester Zeit auf Salz- und Säurestress zu reagieren (Heermann und Jung, 2010, Tetsch *et al.*, 2008), eine Hitzeschockantwort zu generieren (Yura *et al.*, 1993), oder verfügbare C-Quellen sofort zu assimilieren (Island und Kadner, 1993, Island *et al.*, 1992). Andererseits ist es ebenso notwendig, auf die Anwesenheit anderer Organismen zu reagieren, seien es artgleiche Bakterien oder andere pro- oder eukaryotische Spezies. Dies ermöglicht erst synchronisierte Abläufe wie Biofilmbildung (Senadheera und Cvitkovitch, 2008), Biolumineszenz (Anetzberger *et al.*, 2009) oder Expression von Virulenzfaktoren (Rumbaugh *et al.*, 2009).

Die bakterielle Signaltransduktion erfolgt allgemein in drei Schritten: Zu Beginn des Prozesses steht der extra- oder intrazelluläre Reiz. Dieser wird von einem Protein wahrgenommen, verarbeitet und weitergeleitet. Dadurch wird eine zelluläre Reaktion generiert. Das Spektrum reicht von der Modulation der Expression eines einzelnen Gens und der damit verbundenen Protein-Produktion über eine globale zelluläre Reaktion wie der Motilität bis hin zu einer multizellulären Reaktion wie der Biofilmbildung. Signale können zudem amplifiziert werden und, wenn sie durch verschiedene Systeme erkannt werden, in eine gemeinsame Reaktion integriert werden (Gao und Stock, 2009, Krell *et al.*, 2010).

1.1 Bakterielle Signaltransduktion: Zweikomponenten-Systeme

Die vorherrschenden Systeme zur Sensierung von Reizen werden oft als Zweikomponenten-Systeme bezeichnet. Die ersten Systeme wurden 1986 beschrieben (Ninfa und Magasanik, 1986, Nixon *et al.*, 1986). Sie bestehen, wie der Name impliziert, aus zwei Komponenten. Ein oftmals in der Zytoplasmamembran integriertes Sensorprotein erkennt einen intra- oder extrazellulären Reiz und leitet diesen an einen zytoplasmatischen Antwortregulator weiter, welcher die Reaktion auf den Reiz auslöst. Dies ist häufig die Modulation der Genexpression. Solche Systeme sind in allen Organismen anzutreffen. Am häufigsten kommen sie jedoch in Prokaryoten und Archäen vor (Alex und Simon, 1994, Saito, 2001, Stock *et al.*, 2000).

Im prototypischen Zweikomponenten-System sind Sensorprotein und Antwortregulator modular aufgebaut (Abb. 1.1). Der Sensor besitzt die (membranintegrierte) Sensordomäne

und die im Zytoplasma lokalisierte Transmitterdomäne mit Histidinkinase-Aktivität. Daher werden diese Proteine als Sensor-Histidinkinasen (SHK) bezeichnet. Der Antwortregulator (AR) besitzt eine Empfängerdomäne und eine Effektor-domäne. Letztere ist oft eine DNA-bindende Domäne (Gao und Stock, 2009, Mascher *et al.*, 2006).

Der Mechanismus der Signalintegration durch SHK/AR Systeme ist seit über 20 Jahren bekannt. Als direkte Folge der Reizerkennung erfolgt die Autophosphorylierung der SHK durch die γ -Phosphorylgruppe von ATP an einem hochkonservierten Histidinrest in der Transmitterdomäne des Proteins. Im nächsten Schritt wird die Phosphorylgruppe auf einen hochkonservierten Aspartatrest in der Empfängerdomäne des AR transferiert (Abb. 1.1), wodurch dieser aktiviert wird (siehe Abschnitt 1.3).

Neben diesem einfachen Phosphotransfer-System, existieren weitere, komplexere Systeme. Im so genannten Phosphorelais-System existieren mehrere phosphorylierbare Komponenten: Ein Regulatorprotein, welches einen konservierten Aspartatrest aufweist und ein Histidinphosphotransfer-Protein (HPT), welches an einem konservierten Histidin phosphoryliert wird (Hoch, 2000). Dieses hat selbst weder Kinase- noch Phosphataseaktivität (Tsuzuki *et al.*, 1995). Das Phosphorelais ermöglicht eine genauere Feinabstimmung bzw. Vernetzung mit anderen Signaltransduktionswegen. Ein Beispiel ist das Sporulationsphosphorelais aus *Bacillus subtilis* (Hoch und Varughese, 2001). Sind die in der Signalkaskade stromabwärts gelegenen Domänen mit der Kinasedomäne der SHK in einer Polypeptidkette vereinigt, spricht man von Hybridsensorkinasen. Mehrere als Phosphodonor bzw. Phosphoakzeptor agierende Reste in einer SHK ergeben ebenfalls ein mehrstufiges Phosphorelais. Die Sensierung von Autoinduktoren durch das Lux-System in *Vibrio* Spezies wird durch Phosphorelais Systeme vermittelt (Ng und Bassler, 2009, Timmen *et al.*, 2006).

Mittlerweile sind aus Genomsequenzen ca. 50.000 Zweikomponenten-System-Proteine abgeleitet. Die Struktur von mehr als 200 Proteinen wurde gelöst und die Funktion etlicher ZKS wurde charakterisiert. Aufgrund von Sequenz-, Struktur- und Funktionsdaten wurden verschiedene Klassen von SHK und AR definiert (Gao und Stock, 2009, Mascher *et al.*, 2006).

1.2 Aufbau und Funktion von Sensor-Histidinkinasen

SHK weisen in der Regel eine modulare Architektur auf. N-terminal ist die membranintegrierte Sensordomäne gelegen, welche den spezifischen Reiz wahrnimmt und daher familienübergreifend nicht konserviert ist. Es folgt die DHP-Domäne (Dimerisierungs- und Histidin Phosphotransfer Domäne; PFAM Nomenklatur: His Kinase A) und die CA-Domäne (catalytic and ATP binding; PFAM Nomenklatur: HATPase_c). Diese beiden Domänen sind

stark konserviert (Abb. 1.1). Zudem können SHK um weitere Module erweitert sein, die zur Signalerkennung und Signaltransduktion beitragen, wie z.B. HAMP-, GAF- oder PAS-Domänen (Mascher *et al.*, 2006, Stewart, 2010).

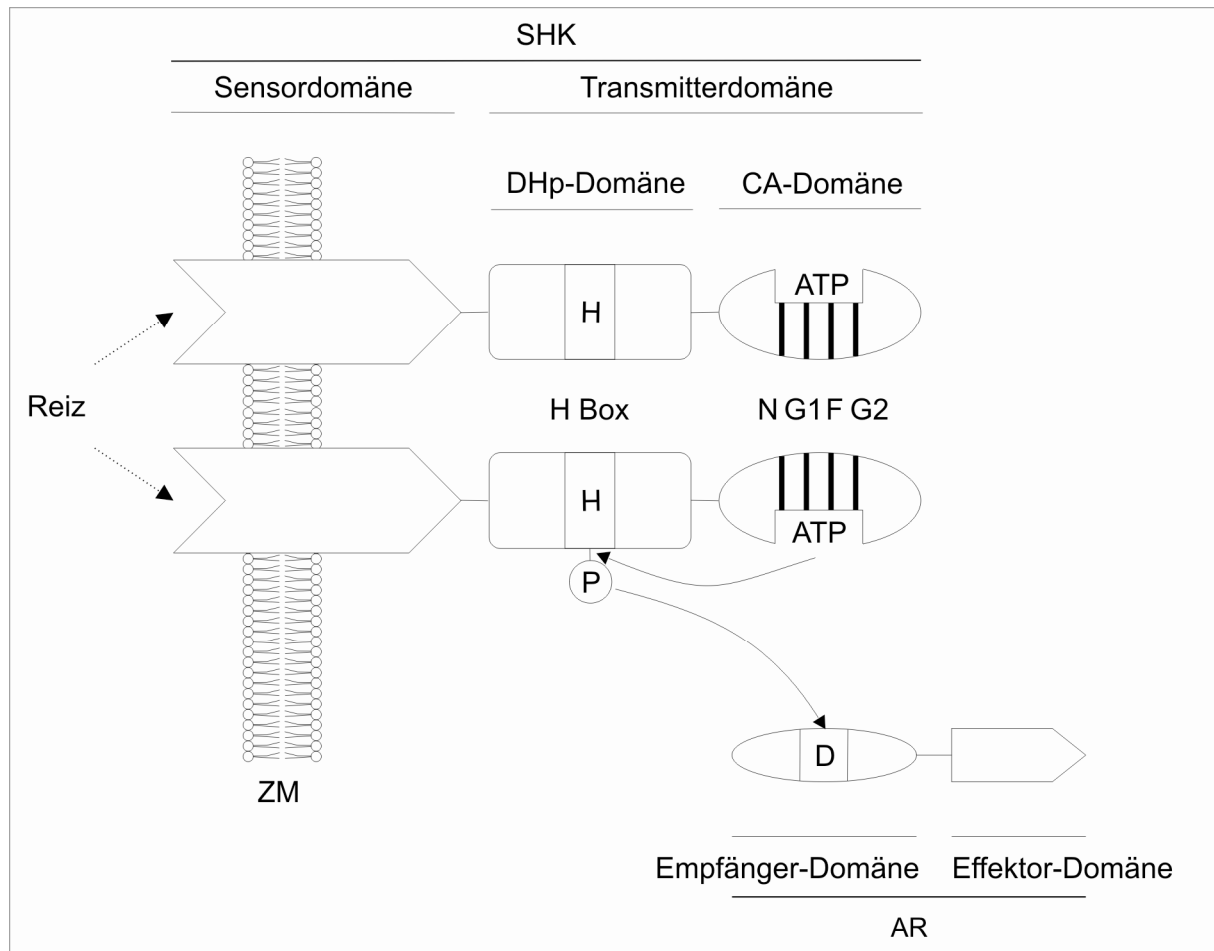


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer prototypischen Sensor-Histidinkinase (SHK) und eines Antwortregulators (AR) bei der Signaltransduktion. SHK agieren meist als Homodimer. Die Sensierung des spezifischen Reizes führt zur Autophosphorylierung an einem konservierten Histidinrest (H) in cis oder trans. Die Phosphorylgruppe wird auf den konservierten Aspartatrest (D) des spezifischen Antwortregulators übertragen, wodurch dieser aktiviert wird. SHK besitzen in der Regel zwei funktionelle Domänen: Die (membranintegrierte) Sensordomäne und die Transmitterdomäne. Diese besteht wiederum aus der Dimerisierungs- und Histidin-Phosphotransfer (DHp)-Domäne und der *catalytic and ATP-binding* (CA)-Domäne, welche unterschiedliche Aktivitäten besitzen. Innerhalb der DHp-Domäne liegt die H (Homologie)-Box, welche den phosphorylierbaren Histidinrest enthält. In der CA-Domäne befindet sich eine weitere Box (fünf bis zehn AS), welche die ATP Bindung vermittelt. Die N-, G1- und G2-Box, welche nach konservierten AS benannt sind, sind in allen SHK konserviert. Die F-Box ist nur in manchen Vertretern anwesend. AR dimerisieren in der Regel nach der Aktivierung durch Phosphorylierung (hier nicht dargestellt). Die Abbildung wurde von Stewart (2010) übernommen und angepasst, weitere Details siehe Abschnitt 1.2 und 1.3.

Membranintegrierte Sensordomänen können anhand des Ortes der Reizwahrnehmung klassifiziert werden. Stimuli werden im Periplasma (Prototyp: EnvZ/PhoA/VirA-artige SHK), Membran-assoziiert (z.B. LiaS/BceS, LuxN, 5TM Lyt-artige) oder zytoplasmatisch (z.B.

KdpD) wahrgenommen werden (Mascher *et al.*, 2006). An der Signaltransduktion können weitere Domänen beteiligt sein (Galperin *et al.*, 2001), wie z.B. die HAMP-Domäne, welche als Verbindungsdomäne zwischen Signaleingangsdomäne und Histidinkinasedomäne fungiert (Parkinson, 2010). Zusätzliche (zytoplasmatische) Module zur Reizerkennung oder Modulation der Signaltransduktion sind z.B. die PAS-Domäne (Taylor und Zhulin, 1999), die GAF-Domäne (Ho *et al.*, 2000) oder die USP-Domäne (Heermann *et al.*, 2009). Die DHP-Domäne enthält den phosphorylierbaren Histidinrest in der H-Box und vermittelt die Dimerisierung von SHK. Es wird davon ausgegangen, dass SHK in den meisten Fällen funktionelle Homodimere bilden. Die CA-Domäne ist durch die N-, G1-, F- und G2-Box charakterisiert (Abb. 1.1). Diese sind Bestandteile der ATP-Bindestelle (Stewart, 2010). In Hybridsensorkinasen sind weitere Domänen, wie z.B. Histidin-enthaltende Empfängerdomänen und HPt-Domänen in einer Polypeptidkette vorhanden (Gao und Stock, 2009). SHK besitzen in der Regel drei enzymatische Aktivitäten: Die (Auto-)Kinaseaktivität, die Phosphotransferaseaktivität und die Phosphataseaktivität. Wird der spezifische Reiz durch die Signaleingangsdomäne der SHK sensiert, verändert sich deren Konformation. Dies ermöglicht die Interaktion von zwei SHK über die DHP-Domäne und die Hydrolyse des an die CA-Domäne gebundenen ATPs (Levit *et al.*, 1996, Surette *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung des konservierten Histidinrestes durch die γ -Phosphorylgruppe des ATP findet in cis (Casino *et al.*, 2009) oder in trans (Ninfa *et al.*, 1993) statt. Dabei entsteht eine energiereiche Phosphoramidatbindung. Die Phosphorylgruppe wird schließlich auf einen konservierten Aspartatrest des AR (Acylphosphat) übertragen, wodurch der AR aktiviert wird (Stock *et al.*, 2000). Um das System wieder in den Ausgangszustand zurückzusetzen, ist eine Hydrolyse des Acylphosphats nötig. Viele SHK besitzen eine intrinsische Phosphataseaktivität, was die Halbwertszeit des phosphorylierten AR stark verringern kann (Kenney, 2010).

1.3 Aufbau und Funktion von Antwortregulatoren

Auch AR weisen in der Regel eine modulare Architektur auf. N-terminal liegt die Empfängerdomäne und C-terminal die Effektoromäne. 16% aller bekannten AR bestehen nur aus einer Empfängerdomäne. 30.000 AS Sequenzen von AR sind bekannt, ca. 200 AR sind strukturell und funktionell charakterisiert (Bourret, 2010). Die Klassifikation der AR erfolgt anhand der Struktur und Funktion der beiden Domänen (Galperin, 2010, Gao und Stock, 2009).

Die meisten AR weisen eine Signaleingangsdomäne vom CheY-Typ auf (Bourret, 2010). Das aktive Zentrum der Signaleingangsdomäne (PFAM Nomenklatur: Response_rec) weist

typischerweise eine $(\alpha/\beta)_5$ Topologie auf. Fünf β -Stränge falten sich in ein zentrales β -Faltblatt, welches auf der einen Seite von zwei, auf der anderen Seite von drei α -Helices umgeben wird. Diese Struktur enthält mehrere hochkonservierte AS. Drei Aspartatreste binden ein divalentes Metallion, welches für die Phospho-Biochemie unerlässlich ist. Einer dieser Aspartatreste wird phosphoryliert (Lukat *et al.*, 1990, Volz, 1993). Das divalente Kation ist auch unerlässlich für die Dephosphorylierungsreaktion. Die Phosphorylierung wird in der Regel durch eine für den AR spezifische SHK durchgeführt. Allerdings ist eine Phosphorylierung auch durch niedermolekulare Phosphatdonoren wie Acetylphosphat möglich (Lukat *et al.*, 1992). Die Relevanz des intrazellulären Acetylphosphatpools als Signal für verschiedenste Regulationskaskaden in vivo wird seit längerem diskutiert (McCleary *et al.*, 1993). Die Phosphorylierung führt zu einer räumlichen Änderung des Arrangements der $(\alpha/\beta)_5$ Topologie und somit zur Aktivierung des AR. Dies führt meist zur Dimerisierung des AR, wodurch z.B. die DNA-Bindung ermöglicht wird. Die Dephosphorylierung des AR wird durch die SHK vermittelt, durch eine intrinsische Phosphataseaktivität des AR oder über die Halbwertszeit des Acylphosphats (Bourret, 2010, Hess *et al.*, 1988, Stock *et al.*, 2000). Grundsätzlich kann die zelluläre Konzentration an phosphoryliertem AR aber auch über die de novo Proteinbiosynthese reguliert werden. Viele ZKS steuern die Menge an synthetisiertem AR und SHK selbst über Autoregulation der Genexpression (Groisman, 2001, Stock *et al.*, 2000).

Die meist C-terminal gelegene Effektor-domäne vermittelt letztendlich den durch die SHK wahrgenommenen Stimulus. Dies geschieht meistens durch die Regulation von Genexpression, aber auch durch Enzymaktivität und Protein:Protein Interaktion (Galperin, 2010). Es sind mehr als 60 Effektor-domänen-Familien bekannt. 51% der AR besitzen keine Effektor-domäne, sind nicht charakterisiert oder besitzen eine enzymatische Funktion. DNA-bindende Domänen werden anhand ihrer Proteinstruktur weiter unterteilt. 30% aller bekannten AR besitzen *winged helix* Domänen der OmpR/PhoB-Familie (PFAM Nomenklatur: Trans_reg_C), 16% *helix-turn-helix* Domänen der NarL/FixJ-Familie (PFAM Nomenklatur: LuxR_C_like oder GerE) und ca. 3% LytTR-artige Domänen der LytT/AgrA-Familie (Finn *et al.*, 2010, Galperin, 2010, Gao und Stock, 2009). Die ungewöhnliche Struktur der DNA-bindenden Domäne von AgrA aus *Staphylococcus aureus*, einem Mitglied der LytTR-Familie, wurde erst kürzlich gelöst. Diese besteht vornehmlich aus β -Strängen (Sidote *et al.*, 2008).

Manche Effektor-domänen besitzen auch eine enzymatische Aktivität, wie z.B. Methyl-esterasen/-transferasen (CheB/CheR) zur Modulation der Chemotaxis (Bren und Eisenbach, 2000). Wieder andere verarbeiten den transduzierten Reiz als Protein:Protein Interaktion, wie z.B. der *Partner-switching* Mechanismus, bei dem der AR PhyR den anti- σ Faktor NepR bindet und somit inaktiviert (Francez-Charlot *et al.*, 2009).

1.4 Das SHK/AR System YehU/YehT in *Escherichia coli*

In *Escherichia coli* sind 30 SHK bekannt und 32 AR, davon sind 29 DNA-bindend (Mizuno, 1997). Viele dieser Systeme werden seit Jahren intensiv erforscht, wie z.B. das Osmostress- und Kalium-abhängige KdpD/KdpE System (Heermann und Jung, 2010), das Magnesium-sensierende PhoP/PhoQ System (Minagawa *et al.*, 2003), oder das Quorum Sensing System QseC/QseB (Hughes und Sperandio, 2008). Abb. 1.2 zeigt die bekannten SHK und AR aus *E. coli* und, falls bekannt, deren detektierte Reize und die vermittelte Reaktion.

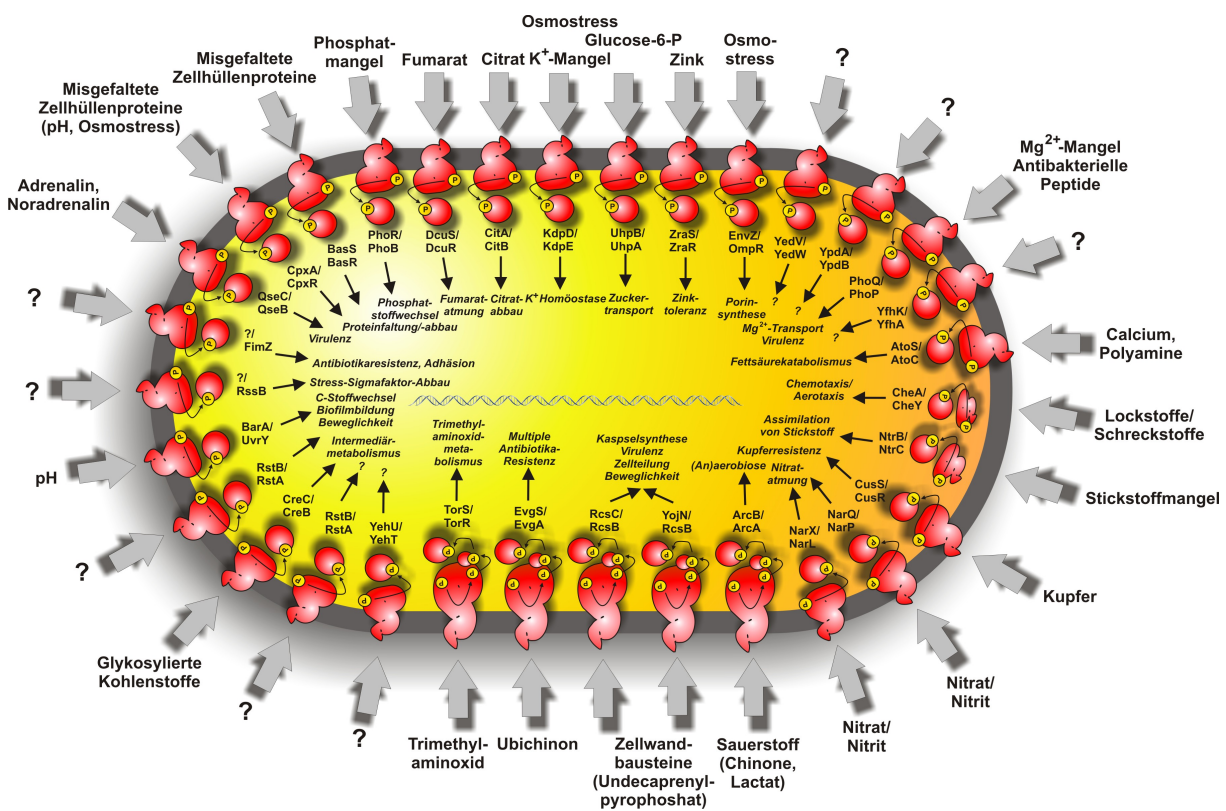


Abbildung 1.2: SHK und AR in *Escherichia coli*. Neben den membranintegrierten Sensoren und den zytoplasmatischen Regulatoren sind, sofern bekannt, der spezifische sensierte Reiz und die generierte Antwort dargestellt. Der aktivierende Reiz, die spezifischen SHK von FimZ und RssB und die vermittelte Reaktion einiger SHK oder AR sind nicht bekannt (?). Weitere Erläuterungen siehe Text. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Ralf Heermann (2010) zur Verfügung gestellt.

In vielen dieser Systemen ist der sensierte Reiz, der Mechanismus der Signaltransduktion und die regulierten Gene gut charakterisiert, dagegen gibt es für das YehU/YehT-System keine detaillierten Informationen.

Die offenen Leserahmen, welche für das Histidinkinase/Antwortregulator-System YehU/YehT codieren, wurden anhand von DNA-Sequenzdaten annotiert. Die Gene *yehU* und *yehT*

liegen bei 47.638 Centrisomen des *E. coli* K-12 MG1655 Chromosoms. Sie überlappen um vier Basenpaare, sind in einem Operon organisiert, und werden von den Genen *yehS* und *mlrA* flankiert (Keseler *et al.*, 2009). Das *yehU/yehT* Operon und die Organisation der benachbarten Gene sind in Abb. 1.3 dargestellt. Die Funktion der Genprodukte wurde basierend auf Sequenzvergleichen und Homologien vorhergesagt. YehU ist die SHK und YehT der AR. Das YehU/YehT System entspricht dem prototypischen Zweikomponenten-System aus Abb. 1.1, wobei die SHK YehU um ein Modul erweitert ist (Abb. 1.4).

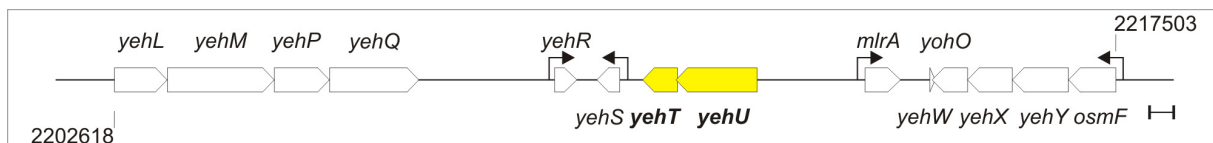


Abbildung 1.3: Organisation des *yehU/yehT* Locus und angrenzende Gene in *Escherichia coli*. Dargestellt ist ein maßstabgetreuer Ausschnitt des *E. coli* MG1655 Chromosoms im Bereich von 47,48 bis 47,77 Centrisomen (bp 2202618 – bp 2217503). Das Operon *yehU/yehT* ist gelb hinterlegt. *yehL* codiert ein AAA-Protein (Snider *et al.*, 2006). Für die Genprodukte von *yehM*, *yehP* und *yehQ* sind keine Funktionsvorhersagen verfügbar. Dies gilt auch für *yehS* und *yehR*. Das Genprodukt von *mlrA* reguliert unter anderem die Curli-Produktion in pathogenen *E. coli* (Brown *et al.*, 2001). *yohO* codiert vermutlich für ein kleines Membranprotein (Hemm *et al.*, 2008). Das Operon *osmF-yehYXW* codiert für einen putativen ABC-Transporter (Checroun und Gutierrez, 2004). Die Namen, Positionen, Größen und Funktionen der Gene wurden von EcoCyc (Keseler *et al.*, 2009) entnommen. Pfeile deuten an, dass entweder der Regulationsmechanismus der Genexpression (*mlrA*, σ^{38} -abhängig, Brown *et al.* 2001; *yehR* σ^S -abhängig, Wade *et al.*, 2006; *osmF* σ^{32} - und σ^S -abhängig, Checroun und Gutierrez, 2004), oder dass Expression nachgewiesen wurde (*yehS*, Zaslaver *et al.*, 2006). Maßstab --- 500 bp.

YehU besteht aus 561 AS (62,1 kDa) (Jain *et al.*, 2009, Keseler *et al.*, 2009). Es wurden mit den Programmen TMHMM, MEMSAT3 und OCTOPUS fünf, sechs oder sieben Transmembrandomänen vorhergesagt, die Daten dazu sind nicht gezeigt (Jones, 2007, Käll *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2006, Krogh *et al.*, 2001). Dieser N-terminal gelegene Sensorbereich weist Homologie zur 5-Transmembranrezeptoren-Domäne des LytS-YhcK-Typs auf (Anantharaman und Aravind, 2003) und wird in der Pfam Datenbank als 5TMR-LYT-Domäne bezeichnet (Finn *et al.*, 2010). Diese ist der Sensordomäne der SHK LytS strukturell ähnlich, welche Stress der Zellhülle in Gram-positiven Bakterien sensiert. Die 5-TMR-Lyt Domäne (z.T. auch 5-TM-Lyt genannt, Abb. 1.4) wird charakterisiert durch ein Aminosäure-Motiv (NXR) in der Schleife zwischen Helix 1 und 2, mehreren Resten wie Glycin und Prolin in der Mitte von Helix 2 und einem kurzketigen Rest, meist Glycin, in der Mitte von Helix 5. Diese Reste könnten die Gesamtstruktur beeinflussen und damit Ligandenbindung oder Signalweitergabe ermöglichen (Anantharaman und Aravind, 2003).

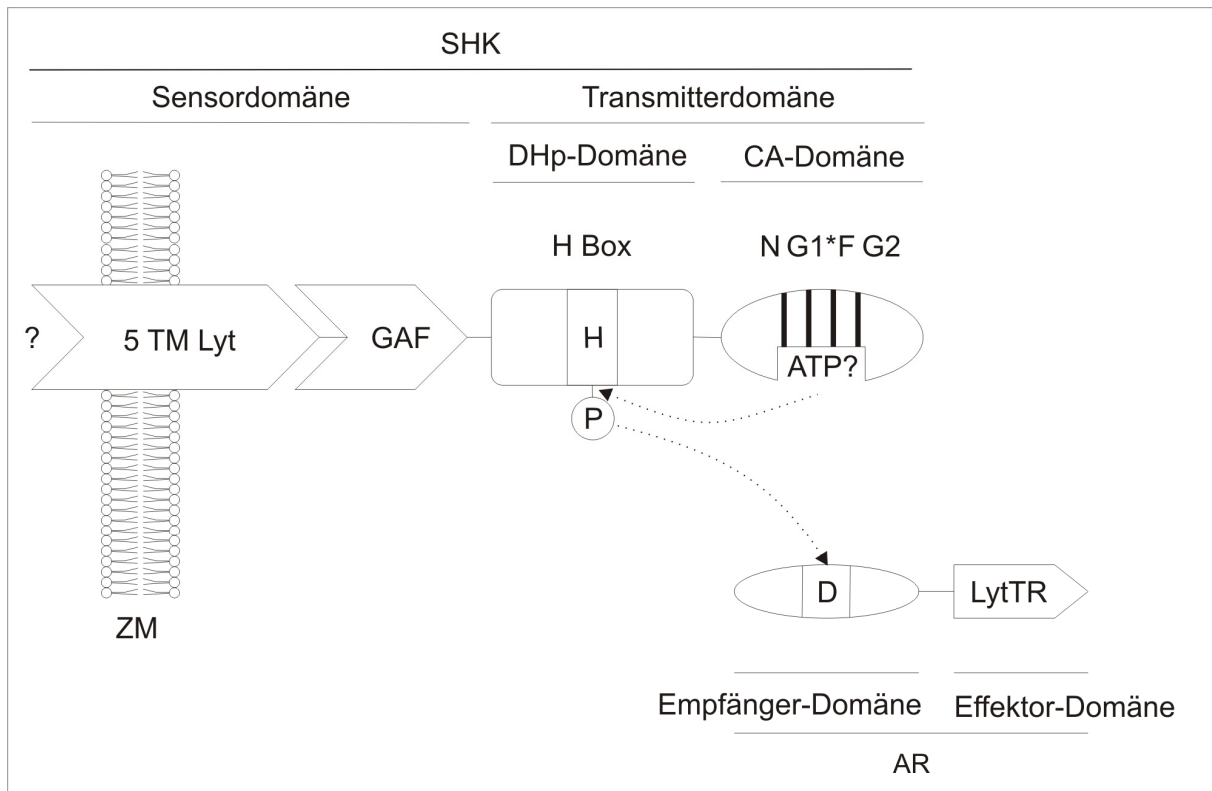


Abbildung 1.4: Architektur des SHK/AR Systems YehU/YehT in *E. coli*. Das SHK/AR System YehU/YehT entspricht weitgehend dem prototypischen System aus Abb. 1.1, hier wurde auf die Darstellung des SHK Homodimers verzichtet. YehU weist im Transmembranbereich Homologie zu der 5-Transmembranrezeptorendomäne des LytS-YhcK Typs (5 TM Lyt) auf. Im Zytoplasma wird die Sensordomäne durch die GAF Domäne fortgesetzt. Es folgen eine DHp- und CA-Domäne. Die G1 Box in YehU ist unvollständig (G1*), weswegen angenommen wurde, dass ATP nicht gebunden werden kann (ATP?; Whitchurch *et al.*, 1996). Der AR YehT besitzt eine zu CheY homologe Empfängerdomäne, die Effektoromäne gehört zum Typ der LytTR-artigen DNA-bindenden Domänen (Finn *et al.*, 2010). Details siehe Text. H: konservierter, phosphorylierbarer Histidinrest AS Position 382, D: konservierter, phosphorylierbarer Aspartatrest an AS Position 54. N, G1, F und G2 sind in SHK konservierte Boxen zur ATP Bindung. Die Abbildung wurde abgeändert von Stewart (2010) übernommen.

Eine Analyse mit ProDom (Servant *et al.*, 2002), in welchem die Subdomänen von Proteinen aufgrund von Sequenzähnlichkeiten identifiziert werden, ergab, dass die Signaleingangsdomäne in zwei Subdomänen unterteilt werden kann: AS 16-101 hat die ProDom Identifikationsnummer PD810677, AS 102-193 hat die Identifikationsnummer PD633472. Die erste Subdomäne besteht aus 72 AS, und ist in Pathogenen wie *Salmonella* und *Vibrio sp.* konserviert (Abb. 1.5 und Tab. 1.1). Die zweite Subdomäne enthält diejenigen AS und Motive, welche die Einteilung in die 5TMR-LYT Familie bedingen (Daten nicht gezeigt).

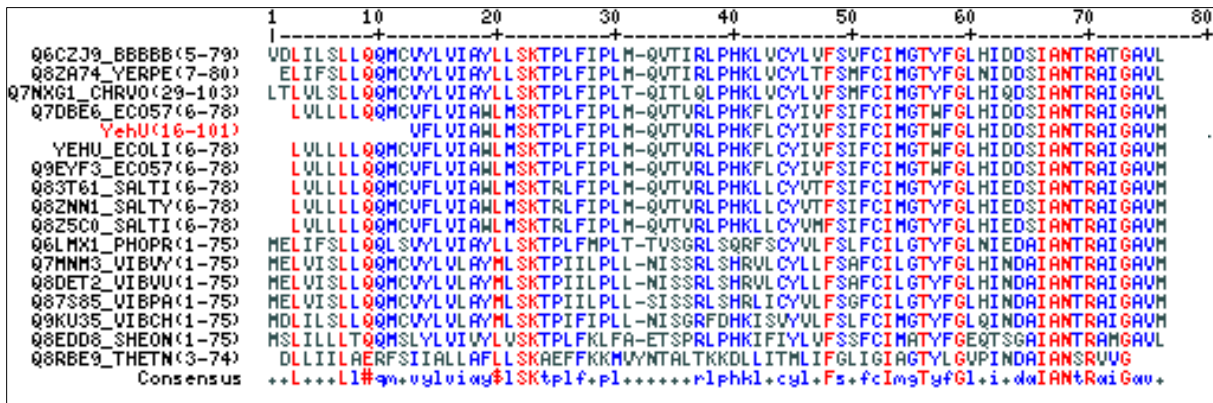


Abbildung 1.5: Subdomänenanalyse der Sensordomäne von YehU. ProDom gruppiert und vergleicht automatisch konservierte Domänen und identifiziert Subdomänen (Servant *et al.*, 2002). Davon ausgehend wurde ein multiples Alignment mit MultAlin (Corpet, 1988) durchgeführt, welches die Subdomänen getrennt verarbeitet. Gezeigt ist das Alignment der ersten Subdomäne PD810677. Links sind die Proteinidentifikationsschlüssel der UniProt Datenbank, die Stammabkürzungen und die Länge der verglichenen Subdomänen aufgelistet. Nähere Angaben zu den Proteinen und Stämmen sind Tabelle 1.1 zu entnehmen. Hochkonservierte AS sind in rot dargestellt ($\geq 90\%$), schwach konservierte AS in blau ($\geq 50\%$) und nicht konservierte AS in schwarz. In der Konsensussequenz stellt ein Punkt (.) eine nicht konservierte AS dar, Großbuchstaben (rote) eine stark und Kleinbuchstaben (blau) eine weniger konservierte AS dar. # steht für die AS D, E, N oder Q, \$ steht für L oder M.

Alle benutzten Datenbanken sagen anhand von Alignments voraus, dass Histidin 382 phosphoryliert wird. Einschlägige Datenbanken wie z.B. die Pfam Datenbank geben im zytoplasmatischen Teil der Sensordomäne von YehU eine GAF-Domäne an (Finn *et al.*, 2010). Die exakte Lage wird von verschiedenen Datenbanken je nach Definition der Domäne unterschiedlich angegeben, der Kernbereich ist ca. von AS 218 – AS 365 lokalisiert. Die GAF Domäne kommt in cGMP spezifischen Phosphodiesterasen, Adenylcyclasen und im FhIA Protein (GAF) vor (Aravind und Ponting, 1997). Es wird angenommen, dass die Domäne die Aktivität der benachbarten Domänen reguliert. Wie in Abb. 1.4 dargestellt, folgen auf die GAF-Domäne die klassische DHp- und CA-Domäne (Finn *et al.*, 2010).

Tabelle 1.1: Legende und weiterführende Informationen zum multiplen Alignment der Subdomäne PD810677 aus Abb. 1.4: Das multiple Alignment mit MultAlin (Corpet, 1988) wurde automatisch ausgehend von der YehU Subdomäne PD810677 (Servant et al., 2002) erstellt (Siehe Abbildung 1.3). Die dabei angeführten Proteine sind als UniProt Identifikationsnummer (UniProt ID) auch hier gelistet. Dazu wird der Name (falls definiert) bzw. der Genlocus angegeben. AS bezeichnet die Zahl der AS, welche jeweils in das Alignment eingegangen sind, GL ist die Anzahl der Aminosäuren des korrespondierenden Gesamtlängenproteins. Zudem ist der jeweilige Organismus angegeben. Alle Informationen und die wörtliche Beschreibung der Funktion wurden von der UniProt Datenbank übernommen (Jain et al., 2009). Zu Q8ZA74 konnten keine Informationen dargestellt werden, da der Eintrag aus der Datenbank entfernt wurde. *yehU** wird nicht im Phagen VT1-Saki codiert. Der Phage inseriert in *yehU*. Bei der Sequenzanalyse wurden die Sequenzen der umliegenden Gene aufgelistet (Yokoyama et al., 2000). ** Eingabe der Suche.

| UniProt ID | Genname, Genlocus | AS | GL | Organismus | Funktion (wie in UniProt angegeben) |
|------------|-----------------------|--------|---|--|--|
| Q6CZJ9 | ECA4152 | 5-79 | 572 | <i>Erwinia carotovora subsp. atroseptica (Pectobacterium atrosepticum)</i> | Putative SHK in ZKS |
| Q8ZA74 | | 7-80 | Der Eintrag wurde aus UniProt entfernt. | | |
| Q7NXG1 | CV_1665 | 29-103 | 590 | <i>Chromobacterium violaceum</i> | Putative SHK in ZKS |
| Q7DBE6 | <i>yehU*</i> | 6-78 | 561 | <i>Enterobacteria phage VT1-Sakai</i> | Putative SHK YehU in ZKS |
| YehU** | <i>yehU</i> , b2126 | 16-101 | 561 | <i>E. coli</i> | SHK in ZKS |
| YEHU_ECOLI | <i>yehU</i> , b2126 | 6-78 | 561 | <i>E. coli</i> | YehU |
| Q9EYF3 | <i>yehU*</i> | 6-78 | 561 | <i>Enterobacteria phage VT1-Sakai</i> | Putative SHK YehU in ZKS |
| Q83T61 | <i>yehU</i> ; t0696 | 6-78 | 561 | <i>Salmonella typhi</i> | Putative SHK in ZKS |
| Q8ZNN1 | <i>yehU</i> ; STM2159 | 6-78 | 561 | <i>Salmonella typhimurium</i> | Putative SHK in ZKS |
| Q8Z5C0 | <i>yehU</i> ; STY2389 | 6-78 | 561 | <i>Salmonella typhi</i> | Putative SHK in ZKS |
| Q6LMX1 | Z3303; PBPR3027 | 1-75 | 572 | <i>Photobacterium profundum (Photobacterium sp. (strain SS9))</i> | Hypothetisches LytS, Regulator Autolyse |
| Q7MNM3 | VV0692 | 1-75 | 560 | <i>Vibrio vulnificus (strain YJ016)</i> | Putativer Regulator der Autolyse |
| Q8DET2 | VV1_0502 | 1-75 | 560 | <i>Vibrio vulnificus</i> | Putativer Regulator der Autolyse |
| Q87S85 | VP0539 | 1-75 | 556 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Putatives nicht charakterisiertes Protein VP0539 |
| Q9KJU35 | VC_0694 | 1-75 | 558 | <i>Vibrio cholerae</i> | Putatives nicht charakterisiertes Protein |
| Q8EDD8 | SO_2822 | 1-75 | 560 | <i>Shewanella oneidensis</i> | SHK |
| Q8RBE9 | TTE0871 | 3-74 | 579 | <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> | Regulator Autolyse |

Der Antwortregulator YehT besteht aus 239 AS (27,4 kDa; Jain *et al.*, 2009, Keseler *et al.*, 2009). YehT umfasst zwei Domänen (Abb. 1.4), die CheY-homologen Empfängerdomäne und die DNA-bindenden Effektor-domäne, die zum LytTR-Typ gehört (Finn *et al.*, 2010, Nikolskaya und Galperin, 2002). Die LytTR-Familie weist Homologie zu LytT aus *Bacillus subtilis* und LytR aus *Staphylococcus aureus* auf (Nikolskaya und Galperin, 2002). Die CheA-artige Empfängerdomäne ist klassisch aufgebaut. Mehrere Datenbanken sagen aufgrund von Alignments voraus, dass Aspartat 54 der phosphorylierbare Aminosäurerest ist. Dies wurde mittlerweile durch komparative Phosphorylierung von YehT und YehT-D54E mit ^{32}P -Acetylphosphat nachgewiesen (Luitpold Fried, 2010, persönliche Kommunikation). Die Struktur der homologen LytTR-artigen DNA-bindenden Domäne des Proteins AgrA aus *Staphylococcus aureus* wurde kürzlich gelöst (Sidote *et al.*, 2008). Wie von Galperin und Nikolskaya (2002) vorhergesagt, repräsentiert diese eine neuartige Klasse der DNA-bindenden Domänen. Sidote und Kollegen (2008) konnten die genaue Interaktion der Domäne mit der Ziel-DNA durch Co-Kristallisation darstellen. Die Struktur dieser Domäne weist zehn β -Stränge auf. Diese sind, unterbrochen von zwei kurzen nicht an der Bindung beteiligten α -helikalen Bereichen, in drei verlängerte antiparallele β -Faltblattstrukturen (Faltblatt 1: $\beta 1$ - $\beta 2$; Faltblatt 2: $\beta 3$ -5- $\alpha 1$ - $\beta 6$ -7; Faltblatt 3: $\beta 8$ - $\beta 10$) angeordnet (Sidote *et al.*, 2008). Im Modell bindet ein parallel angeordnetes AgrA Dimer die DNA. Das Konsensus-Bindemotiv besteht aus einer neun bp langen Sequenz, die im Abstand von 12 bp in gleicher Orientierung wiederholt wird (Koenig *et al.*, 2004). Eine DNA-Konsensussequenz ([TA][AC][CA]GTTN[AG][TG]), welche von vielen LytTR-artigen AR erkannt wird, sowie der Bindungsmodus als *direct repeat* im Abstand von 12-13 Nukleotiden wurde für LytTR-artige AR bereits vorgeschlagen (Nikolskaya und Galperin, 2002). Anhand der AgrA-Struktur wurde eine mögliche Struktur der DNA-bindenden Domäne von YehT modelliert (Abb. 1.5).

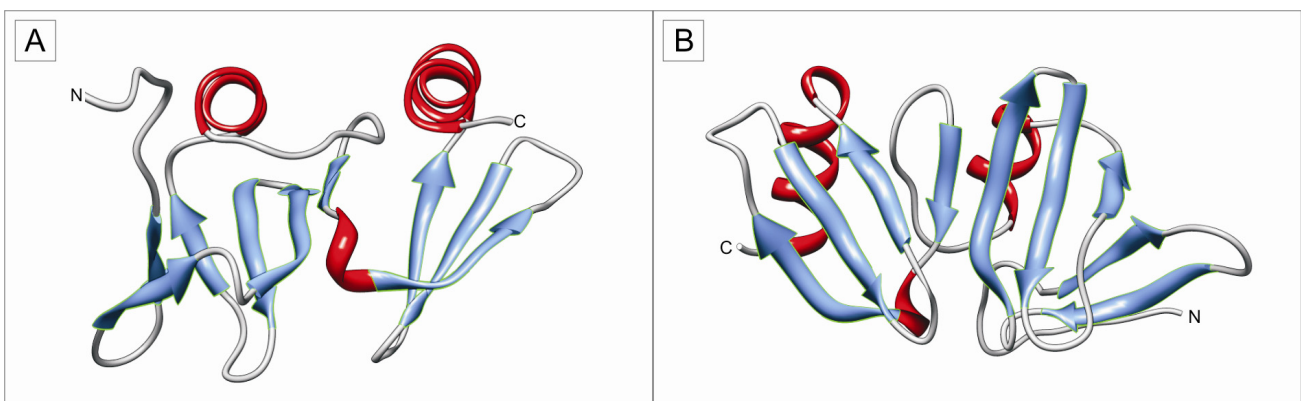


Abbildung 1.6: Strukturvorhersage der LytTR-artigen DNA-bindenden Domäne von YehT. Ein Strukturmodell mit HHPred (Söding *et al.*, 2005), das auf dem Sekundärstruktur-Alignment der C-terminalen Domäne von AgrA (PDB ID 3bs1) beruhte (vgl. 2.6.2), unterstützte den Aufbau der DNA-bindenden Domäne von YehT AS 121-239 aus β -Faltblättern (blau gefärbt), wobei sich die Zahl der Falblätter unterscheidet (10 Falblätter bei AgrA). Helices sind rot gefärbt. Hier sind zwei unterschiedliche Ansichten des Modells gezeigt: A zeigt die frontale Ansicht des Modells, B die Ansicht von unten. Die Darstellung der Modelle wurden mit Chimera produziert (Pettersen *et al.*, 2004). N: N-Terminus, C: C-Terminus.

AR mit LytTR-Domäne vermitteln oft die transkriptionelle Regulation von Quorum-Sensing kontrollierten Mechanismen z.B. der Expression von Virulenzfaktoren. So kommt es in *Pseudomonas aeruginosa* unter der Kontrolle des LytTR-artigen AR AlgR zur Produktion des Exopolysaccharids Alginate, einem Virulenzfaktor bei chronischen Atemwegserkrankungen (Lizewski *et al.*, 2004, Mohr *et al.*, 1991).

In *S. aureus* existiert das zu YehU/YehT sequenzhomologe ZKS mit der SHK LytS und dem AR LytR. Die Deletion dieses Systems führt zur Autolyse der Zellen (Brunskill und Bayles, 1996a). LytS/LytR reguliert die Expression von *IrgA* und *IrgB*. Zu *IrgA* und *IrgB* homologe Gene wurden auch in *E. coli* identifiziert. Deren putative Genprodukte YohJ und YohK sind in der inneren Membran inseriert. YohK ist ein putativer Serotonintransporter. Sowohl die Sequenzähnlichkeit, als auch die konservierte genomische Organisation lassen eine ähnliche Funktion im Zellwandmetabolismus vermuten. Die exakte Funktion ist in *E. coli* allerdings unbekannt. Bisher wurde YehU/YehT nur im Rahmen global angelegter Studien untersucht. Stets wurden Deletionsmutanten aller Zweikomponentensysteme in *E. coli* untersucht und selten Nachfolgestudien unternommen:

Die Überproduktion des AR YehT vermittelte leicht gesteigerte Resistenz gegen einige Agenzien, wie z.B. Deoxycholat, Kristallviolett, Fosfomycin und Imipenem (Hirakawa *et al.*, 2003). Die Transkriptionsanalyse einer *yehU/yehT* *E. coli* Deletionsmutante zeigte geringe Veränderungen im Genexpressionsprofil im Vergleich zum Wildtyp in der exponentiellen Wachstumsphase bei Kultivierung in LB Medium bei 37°C. 22 Gene (vgl. 3.2) wurden signifikant differentiell exprimiert (Oshima *et al.*, 2002). Auch mit Hilfe der „Phenotype Microarray“ Analysen konnten der *yehU/yehT*-Deletionsmutante kein signifikanter Phänotyp zugewiesen werden (Bochner *et al.*, 2001, Zhou *et al.*, 2003). Dabei wird anhand des Zellwachstums ermittelt, welche Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphat und Schwefelquellen genutzt werden können (Bochner *et al.*, 2001). Alle ZKS Proteine von *E. coli* wurden im Zuge einer weiteren Arbeit gereinigt und in vitro bezüglich der Phosphobiochemie charakterisiert. YehU/YehT wies dabei eine sehr niedrige Phosphorylierungsrate auf. Auch wurde keinerlei *crosstalk* mit anderen Zweikomponenten-Systemen nachgewiesen (Yamamoto *et al.*, 2005). Zahlreiche phänotypische Phänomene, wie Motilität, Biofilmbildung oder Veränderung der Ladung von Oberflächen und das Wachstum unter nicht-Standardbedingungen (30°C und kälter, mikroaerobe Verhältnisse, C-Quellen und Eisenmangel) wurden im Zuge dieses Projekts an der *yehU/yehT* Deletionsmutante untersucht (Behr, 2009, Fried, 2008, Guggenberger, 2007). Es wurde keine phänotypische Veränderung festgestellt. Auch bei Stress (Salz/Osmo-, Temperatur-, Schwermetallstress) wies die Doppeldeletionsmutante keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp bezüglich der Überlebensraten auf (Behr, 2009). Lediglich konnte mikroskopisch festgestellt werden, dass die Doppeldeletionsmutante eine Tendenz zur Aggregation aufweist (Guggenberger, 2007). Zudem konnte eine Deformation des Periplasmas visualisiert werden (Kraxenberger und Wanner 2007, Kraxenberger 2008; unveröffentlichte Daten).

Aufgabenstellung

Obwohl *Escherichia coli* zu den am besten charakterisierten Lebewesen gehört, gibt es keine detaillierten Informationen zu dem Sensor-Histidinkinase/Antwortregulatorsystem YehU/YehT. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Grundlagen geschaffen werden, um das YehU/YehT-System langfristig analysieren zu können.

Neben der Herstellung von *Escherichia coli* MG1655 *yehU/yehT* Mutanten werden die Gene *yehU* und *yehT* in geeignete Vektorsysteme kloniert und dabei mit Affinitäts-Tags für eine Reinigung der Genprodukte versehen. Zusätzlich werden Derivate konstruiert, in welchen die konservierten Aminosäurereste zur Phosphorylierung substituiert werden und die GAF-Domäne von YehU deletiert ist. Die Überproduktion der korrespondierenden Proteine His₆-YehT und YehU-His₆ und deren Derivate, sowie die Reinigung mittels Affinitätschromatographie und die Rekonstitution der membranintegrierten SHK sollen etabliert und deren Funktionalität in vitro nachgewiesen werden. Dazu soll die Phosphorylierungskaskade in vitro rekonstruiert werden.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Identifizierung der (YehU/YehT) regulierten Gene. Zunächst sollen alle verfügbaren Informationen zu möglichen Zielgenen von YehU/YehT validiert werden. Da SHK/AR-Systeme oft mit den Zielgenen assoziiert sind, sollen ausgewählte benachbarte Gene des *yehU/yehT* Operons bezüglich Expression und Promoter:AR Interaktion beschrieben werden. Mit diesen Methoden werden auch in der Literatur angegebene potentielle Zielgene überprüft. Die vorhergesagte LytTR-artige DNA-Bindesequenz wird auf das *E. coli* Genom abgebildet, um mögliche Zielgene zu identifizieren. Informationen zu sequenzhomologen Systemen werden in diese Analysen eingebunden. Parallel wird mit einer alternativen Methode nach YehT regulierten Genen gesucht. YehT wird in einem *yehT*-defizienten *E. coli*-Stamm überproduziert und das Transkriptom mittels Affymetrix *E. coli* Genom 2.0 Chip aufgenommen. Eine geeignete Auswahl potentieller YehT-regulierter Gene wird näher charakterisiert. Es soll die spezifische Interaktion von gereinigtem YehT mit korrespondierenden Promotorfragmenten demonstriert werden. Potentielle Promotor werden dann mit bioinformatischen und molekularbiologischen Methoden exakt kartiert. Wenn möglich wird ein DNA Motiv definiert, welches von YehT erkannt wird. Das Motiv wird durch gerichtete Mutagenese und YehT:DNA Interaktionsstudien validiert. Schließlich sollen weitere potentielle YehU/YehT regulierte Gene anhand der DNA-Bindesequenz ermittelt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Für diese Arbeit fanden folgende Materialien Verwendung:

Tabelle 2. 1: Verwendete Materialien und Hersteller

| Materialien | Hersteller |
|---|---|
| [γ - ³² P] ATP | Perkin Elmer (Rodgau) |
| [γ - ³² P] GTP | Perkin Elmer (Rodgau) |
| 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) | Roth (Karlsruhe) |
| ³² P-Orthophosphat | Hartmann Analytik (Braunschweig) |
| 5'-RNA Polyphosphatase | Epicentre Biotechnologies (Madison) |
| 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylophosphat (BCIP) | AppliChem (Darmstadt) |
| Acetylphosphat | Sigma (Deisenhofen) |
| Acrylamid | National Diagnostics (Atlanta) |
| Agarose | Serva (Heidelberg) |
| Äkta Purifier | GE Healthcare (Braunschweig) |
| Alkalische Phosphatase konjugiertes Anti-Maus IgG | GE Healthcare (Braunschweig) |
| Ammoniumpersulfat (APS) | National Diagnostics (Atlanta) |
| Ampicillin (Natriumsalz) | Roth (Karlsruhe) |
| Big Dye Terminator Ready-Reaction Mix | Applied Biosystems (Weiterstadt) |
| Bio-Beads | Biorad (München) |
| Calf-Intestinal-Phosphatase (CIP) | NEB (Frankfurt) |
| Carbenicillin (Dinatriumsalz) | Roth (Karlsruhe) |
| Chloramphenicol | Sigma (Deisenhofen) |
| Counter Selection BAC Modification Kit | Gene Bridges (Heidelberg) |
| DEPC | Roth (Karlsruhe) |
| DNase I (RNase frei) | New England Biolabs (Frankfurt) |
| DNA Oligonukleotide | Sigma (Deisenhofen) Invitrogen (Karlsruhe) Eurofins MWG Operon (Ebersberg) vormals Operon |
| DNase I | Sigma (Deisenhofen) |
| DNA-Standard (2-Log DNA-Ladder) | New England Biolabs (Frankfurt) |
| DNeasy Tissue Kit | Qiagen (Hilden) |
| dNTPs (Desoxy-Nukleotidtriphosphate) | Invitrogen (Karlsruhe) |
| Decylmaltosid | Calbiochem (La Jolla, Kalifornien) |
| DreamTaq | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Gel Filtration Calibration Kit LMW | GE Healthcare (Braunschweig) |
| GeneScan LIZ 500 DNA Fragment Größenstandard | Applied Biosystems (Weiterstadt) |

Tabelle 2.1: Verwendete Materialien und Hersteller (Fortsetzung)

| Materialien | Hersteller |
|---|--------------------------------------|
| Hi Yield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit | Süd-Laborbedarf (Gauting) |
| Hi Yield Plasmid Mini Kit | Süd-Laborbedarf (Gauting) |
| HiDi Formamid | Applied Biosystems (Weiterstadt) |
| HMW-Proteinstandard | Sigma (Deisenhofen) |
| Hybond P Protein Transfer Membran | GE Healthcare (Braunschweig) |
| L-(+) – Arabinose | Roth (Karlsruhe) |
| Lauryldimethylaminoxid (LDAO) | Calbiochem (La Jolla, Kalifornien) |
| Lipide (<i>E. coli</i>) | Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) |
| <i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid | Calbiochem (La Jolla, Kalifornien) |
| Ni ²⁺ -NTA-Agarose | Qiagen (Hilden) |
| Ni-NTA Magnetic Agarose Beads | Qiagen (Hilden) |
| Nitrozellulose-Membran | Schleicher&Schuell (Dassel) |
| Octylglycosid | Roth (Karlsruhe) |
| Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Penta-His-Anti-Mouse-IgG | Qiagen (Hilden) |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) | Roth (Karlsruhe) |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma (Deisenhofen) |
| Phire-DNA-Polymerase | Finnzyme Oy. (Espoo, Finnland) |
| Phusion-DNA-Polymerase | Finnzyme Oy. (Espoo, Finnland) |
| Pyridin | Roth (Karlsruhe) |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen (Hilden) |
| QIAquick-Gelextraction | Qiagen (Hilden) |
| Quick & Easy <i>E. coli</i> Gene Deletion Kit | Gene Bridges (Heidelberg) |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs (Frankfurt) |
| Rinderserumalbumin (BSA) | AppliChem (Darmstadt) |
| RNA Oligonukleotide | Sigma (Deisenhofen) |
| RNA Pure Kit | Süd-Laborbedarf (Gauting) |
| Superdex 75 10/300 GL Säule | GE Healthcare (Braunschweig) |
| T4 DNA-Ligase | New England Biolabs (Frankfurt) |
| T4 Polynukleotidkinase | New England Biolabs (Frankfurt) |
| T4 RNA Ligase | New England Biolabs (Frankfurt) |
| Taq-DNA-Polymerase | PeqLab (Erlangen) |
| Thermoscript Reverse Transcriptase | Invitrogen (Karlsruhe) |
| Triton X-100 | Calbiochem (La Jolla, Kalifornien) |

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

2.2 Stämme, Plasmide, Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 2.2, die verwendeten Plasmide in Tabelle 2.3 und die verwendeten Oligonukleotide in Tabelle 2.4 aufgeführt.

2.2.1 Stämme

Tabelle 2.2 Verwendete Stämme von *Escherichia coli*.

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|-------------------------|---|---------------------------------|
| BL21(DE3) | <i>E. coli</i> B <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> | (Studier <i>et al.</i> , 1990) |
| DH5α | <i>fhuA2</i> Δ(<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ80 Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> | (Taylor <i>et al.</i> , 1993) |
| HS996 | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG fhuA::IS2</i> | ResGen; Invitrogen (Karlsruhe) |
| MG1655 | F ⁻ lambda ⁻ <i>ilvG rfb50 rph1</i> <i>Escherichia coli</i> K12 Referenzstamm | (Blattner <i>et al.</i> , 1997) |
| MG1655- <i>rpsL</i> 150 | F ⁻ lambda ⁻ <i>ilvG rfb50 rph1 rpsL150</i> (Str ^R) | (Heermann <i>et al.</i> , 2008) |
| MG2 | F ⁻ lambda ⁻ <i>ilvG rfb50 rph1</i> Δ <i>yehUT</i> | (Behr, 2009) |
| MG3 | MG1655- <i>rpsL</i> 150 <i>yehT::rpsL-neo</i> | diese Arbeit |
| MG4 | MG1655- <i>rpsL</i> 150 <i>yehU-ΔGAF</i> | diese Arbeit |
| MG5 | MG1655- <i>rpsL</i> 150 <i>yehT-D54N</i> | diese Arbeit |
| MG6 | MG1655- <i>rpsL</i> 150 <i>yehU::rpsL-neo</i> | diese Arbeit |
| MG7 | MG1655- <i>rpsL</i> 150 <i>yehU-H382Q</i> | diese Arbeit |
| MG9 | MG1655- <i>rpsL</i> 150 <i>yehU-H383Q-ΔGAF</i> | diese Arbeit |
| TKR2000 | Δ <i>kdpFABC thi rha lacZ nagA trkA405 trkD1 atp706</i> | (Kollmann und Altendorf, 1993) |

2.2.2 Plasmide

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide.

| Plasmid | Resistenz | Genotyp | Referenz |
|---|------------------|---|---------------------------------------|
| A) Leervektoren | | | |
| pBAD24 | Amp ^R | Expressionsvektor | (Guzman <i>et al.</i> , 1995) |
| pBR322 | Amp ^R | Klonierungsvektor | (Bolivar <i>et al.</i> , 1977) |
| pUC19 | Amp ^R | Klonierungsvektor | (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985) |
| B) Plasmidcodierte Rekombinasen zur Erstellung von Deletionsmutanten | | | |
| pRED/ET | Amp ^R | λ-RED Rekombinase in pBAD24 | Gene Bridges |
| pCP20 | Amp ^R | FLP+ λcl 857+ λpR Rep ^{ts} | (Cherepanov und Wackernagel, 1995) |
| C) Expressionsplasmide zur Proteinproduktion | | | |
| pBAD24- <i>his rsd</i> | Amp ^R | <i>his₆-rsd</i> in pBAD24 | diese Arbeit |
| pBAD24- <i>his yehS</i> | Amp ^R | <i>his₆-yehS</i> in pBAD24 | diese Arbeit |
| pBAD24- <i>kdpE</i> | Amp ^R | <i>his₆-kdpE</i> in pBAD24 | diese Arbeit |
| pBAD24- <i>ndk</i> | Amp ^R | <i>his₆-ndk</i> in pBAD24 | diese Arbeit |
| pBAD24- <i>rsd his</i> | Amp ^R | <i>rsd-his₆</i> in pBAD24 | diese Arbeit |
| pBAD24- <i>yehS his</i> | Amp ^R | <i>yehS-his₆</i> in pBAD24 | diese Arbeit |
| pBAD24- <i>yehT</i> | Amp ^R | <i>his₆-yehT</i> in pBAD24 | (Guggenberger, 2007) |
| pBAD24- <i>yehT</i> D54E | Amp ^R | <i>his₆-yehT</i> D54E in pBAD24 | Fried, 2009; persönliche Gabe |
| pBAD24- <i>yehT</i> D54N | Amp ^R | <i>his₆-yehT</i> D54N in pBAD24 | (Behr, 2007) |
| pBAD24- <i>yehU</i> | Amp ^R | <i>yehU-his₆</i> in pBAD24 | (Guggenberger, 2007) |
| pBAD24- <i>yehU</i> ΔGAF | Amp ^R | <i>yehU-his₆</i> Δ bp 652-1095 in pBAD24 | (Behr, 2007) |
| pBAD24- <i>yehU</i> ΔGAF H382Q | Amp ^R | <i>yehU-his₆</i> Δ bp 652-1095 H382Q in pBAD24 | (Behr, 2007) |
| pBAD24- <i>yehU</i> H382Q | Amp ^R | <i>yehU-his₆</i> H382Q in pBAD24 | (Behr, 2007) |
| D) Klonierte 5'-UTR der angegebenen Gene für Protein:DNA Interaktionsstudien | | | |
| 1. Genomisch assoziierte Gene von <i>yehU/yehT</i> | | | |
| pUC19- <i>mlrA</i> | Amp ^R | <i>mlrA</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19- <i>osmF</i> | Amp ^R | <i>osmF</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19- <i>yehLMPQ</i> | Amp ^R | <i>yehLMPQ</i> Operon 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| 2. Validierung der Transkriptomanalyse Δ <i>yehUT</i> Oshima <i>et. al</i> (2002) | | | |
| pUC19- <i>cspB1</i> | Amp ^R | <i>cspB</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19- <i>cspB2</i> | Amp ^R | <i>cspB</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide (Fortsetzung).

| Plasmid | Resistenz | Genotyp | Referenz |
|---|------------------|--|--------------|
| 2. Validierung der Transkriptomanalyse <i>ΔyehUT</i> Oshima <i>et. al</i> (2002; Fortsetzung) | | | |
| pUC19-mlc | Amp ^R | <i>mlc</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-rfaS | Amp ^R | <i>rfaS</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-rfc1 | Amp ^R | <i>osmF</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-rfc2 | Amp ^R | <i>rfc</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-rfc2 | Amp ^R | <i>rfc</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yafT | Amp ^R | <i>yafT</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yjfO | Amp ^R | <i>yjfO</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yjhA1 | Amp ^R | <i>yjhA</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yjhA2 | Amp ^R | <i>yjhA</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yjhBC1 | Amp ^R | <i>yjhBC</i> Operon 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yjhBC2 | Amp ^R | <i>yjhBC</i> Operon 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yjhC1 | Amp ^R | <i>yjhC</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yjhC2 | Amp ^R | <i>yjhC</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| 3. Homologien (Zielgen eines homologen Systems und LytTR-artige DNA-Bindesequenz) | | | |
| pUC19-yohJ | Amp ^R | <i>yohJ</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-mtfA long | Amp ^R | <i>mtfA</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| 4. Evaluierung der Microarray Daten | | | |
| pUC19-FUS yjiY | Amp ^R | <i>yjiY</i> 5'-FUS UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-FUS yjiY mut | Amp ^R | mutagenisierte <i>yjiY</i> 5'-FUS in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-FUA yhjX mut | Amp ^R | <i>yhjX</i> 5'-FUS UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-FUS yhjX mut | Amp ^R | mutagenisierte <i>yhjX</i> 5'-FUS in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-yjiY 1 | Amp ^R | <i>yjiY</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-yjiY 2 | Amp ^R | <i>yjiY</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-yjiY 3 | Amp ^R | <i>yjiY</i> 5'-UTR Teil 3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-yjiY 1-3 | Amp ^R | <i>yjiY</i> 5'-UTR Teil 1-3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-yhjX 1 | Amp ^R | <i>yhjX</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-yhjX 2 | Amp ^R | <i>yhjX</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-yhjX 3 | Amp ^R | <i>yhjX</i> 5'-UTR Teil 3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-yhjX 1-3 | Amp ^R | <i>yhjX</i> 5'-UTR Teil 1-3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-ypjB 1 | Amp ^R | <i>ypjB</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-ypjB 2 | Amp ^R | <i>ypjB</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-ypjB 3 | Amp ^R | <i>ypjB</i> 5'-UTR Teil 3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-ypjB 1-3 | Amp ^R | <i>ypjB</i> 5'-UTR Teil 1-3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-b3007 1 | Amp ^R | b3007 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-b3007 2 | Amp ^R | b3007 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS-b3007 3 | Amp ^R | b3007 5'-UTR Teil 3 in pUC19 | diese Arbeit |

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide (Fortsetzung).

| Plasmid | Resistenz | Genotyp | Referenz |
|---|------------------|---|--------------|
| 4. Evaluierung der Microarray Daten (Fortsetzung) | | | |
| pUC19-NUS-b3007 1-3 | Amp ^R | b3007 5'-UTR Teil 1-3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>evgA</i> 1 | Amp ^R | <i>evgA</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>evgA</i> 2 | Amp ^R | <i>evgA</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>evgA</i> 3 | Amp ^R | <i>evgA</i> 5'-UTR Teil 3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>evgA</i> 1-3 | Amp ^R | <i>evgA</i> 5'-UTR Teil 1-3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>nlpA</i> 1 | Amp ^R | <i>nlpA</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>nlpA</i> 2 | Amp ^R | <i>nlpA</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>nlpA</i> 3 | Amp ^R | <i>nlpA</i> 5'-UTR Teil 3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>nlpA</i> 1-3 | Amp ^R | <i>nlpA</i> 5'-UTR Teil 1-3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>yebK</i> 1 | Amp ^R | <i>yebK</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>yebK</i> 2 | Amp ^R | <i>yebK</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>yebK</i> 3 | Amp ^R | <i>yebK</i> 5'-UTR Teil 3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>yebK</i> 1-3 | Amp ^R | <i>yebK</i> 5'-UTR Teil 1-3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>cspl</i> 1 | Amp ^R | <i>cspl</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>cspl</i> 2 | Amp ^R | <i>cspl</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>cspl</i> 3 | Amp ^R | <i>cspl</i> 5'-UTR Teil 3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>cspl</i> 4 | Amp ^R | <i>cspl</i> 5'-UTR Teil 4 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>cspl</i> 1-4 | Amp ^R | <i>cspl</i> 5'-UTR Teil 1-4 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>ivbL</i> 1 | Amp ^R | <i>ivbL</i> 5'-UTR Teil 1 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>ivbL</i> 2 | Amp ^R | <i>ivbL</i> 5'-UTR Teil 2 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>ivbL</i> 3 | Amp ^R | <i>ivbL</i> 5'-UTR Teil 3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-NUS- <i>ivbL</i> 1-3 | Amp ^R | <i>ivbL</i> 5'-UTR Teil 1-3 in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yehT-BS | Amp ^R | YehT geschützte <i>yjiY</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yehT-BS mut 1 | Amp ^R | Motiv3 mutagenisierte, durch YehT geschützte, <i>yjiY</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yehT-BS mut 2 | Amp ^R | Motiv23 mutagenisierte, durch YehT geschützte, <i>yjiY</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yehT-BS mut 3 | Amp ^R | Motiv123 mutagenisierte, durch YehT geschützte, <i>yjiY</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yehT-BS agrA out | Amp ^R | LytTR mutagenisierte, durch YehT geschützte, <i>yjiY</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-yehT-BS linker | Amp ^R | linker mutagenisierte, durch YehT geschützte, <i>yjiY</i> 5'-UTR in pUC19 | diese Arbeit |
| E) Angereicherte und klonierte DNA-Fragmente zur Sequenzierung | | | |
| 1. spda | | | |
| E1 (-) 2 | Amp ^R | <i>ydiH</i> Promotorfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 3 | Amp ^R | <i>rutEF/yfaWV</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 5 | Amp ^R | <i>yjgB</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 6 | Amp ^R | <i>gltD</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 7 | Amp ^R | <i>mhpC</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 8 | Amp ^R | <i>nudK</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide (Fortsetzung).

| Plasmid | Resistenz | Genotyp | Referenz |
|---|------------------|--|--------------|
| 1. spda (Fortsetzung) | | | |
| E1 (-) 9 | Amp ^R | <i>gltA</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 10 | Amp ^R | <i>ydeT</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 11 | Amp ^R | <i>tolR</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 12 | Amp ^R | <i>nanC</i> Promotorfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 14 | Amp ^R | <i>ptsP</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 15 | Amp ^R | <i>glcA</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 16 | Amp ^R | <i>tfaQ</i> Promotorfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 17 | Amp ^R | <i>metB</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 18 | Amp ^R | <i>ycgF</i> Promotorfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 19 | Amp ^R | <i>accB</i> Promotorfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 20 | Amp ^R | <i>alaS</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 22 | Amp ^R | <i>ydiH</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 23 | Amp ^R | <i>rhsA</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 25 | Amp ^R | <i>yrbK-lptA</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 26 | Amp ^R | <i>rhsA</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 27 | Amp ^R | <i>plsB</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 28 | Amp ^R | <i>rbbA</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 30 | Amp ^R | <i>intC</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 31 | Amp ^R | <i>hyaD</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 32 | Amp ^R | <i>rbbA</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 33 | Amp ^R | <i>glcB</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 34 | Amp ^R | <i>yjiE</i> Promotorfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 35 | Amp ^R | <i>rpsA</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 36 | Amp ^R | <i>potC</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (-) 37 | Amp ^R | <i>glnD</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (+) 2 | Amp ^R | <i>dsbG</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E1 (+) 8 | Amp ^R | <i>gspL</i> Genfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| E2 (+) 3 | Amp ^R | <i>rluD</i> Promotorfragment in pUC19 | diese Arbeit |
| 2. Anreicherung nach Formaldehyd Fixierung His ₆ -YehT:DNA | | | |
| pB 1.3 | Amp ^R | <i>hycB/hycC</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 1.7 | Amp ^R | <i>ygfK</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 1.8 | Amp ^R | <i>yagS</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 1.9 | Amp ^R | <i>yagI</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 1.14 | Amp ^R | <i>yejH</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 1.20 | Amp ^R | <i>insF</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 1.22 | Amp ^R | <i>yjfZ</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2 | Amp ^R | <i>yabl</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide (Fortsetzung).

| Plasmid | Resistenz | Genotyp | Referenz |
|---|------------------|--|--------------|
| 2. Anreicherung nach Formaldehyd Fixierung His ₆ -YehT:DNA (Fortsetzung) | | | |
| pB 2.1 | Amp ^R | <i>rtn</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.9 | Amp ^R | <i>mukB</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.10 | Amp ^R | <i>garK</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.11 | Amp ^R | <i>nuoC</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.12 | Amp ^R | <i>cls</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.16 | Amp ^R | <i>acs</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.17 | Amp ^R | <i>glnG</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.19 | Amp ^R | <i>copA</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.20 | Amp ^R | <i>kefB</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.21 | Amp ^R | <i>hscA</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.23 | Amp ^R | <i>yeiJ</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.4 | Amp ^R | <i>yrbF</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.5 | Amp ^R | <i>yliE</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 2.6 | Amp ^R | <i>fecCD</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 4 | Amp ^R | <i>yidQ</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB 5 | Amp ^R | <i>malT</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| 3. Anreicherung durch SELEX | | | |
| pB S 6 | Amp ^R | <i>glgX</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 7 | Amp ^R | <i>rhcC</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 8 | Amp ^R | <i>intS</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 9 | Amp ^R | <i>yfjT</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 11 | Amp ^R | <i>dapE</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 12 | Amp ^R | <i>dinK</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 14 | Amp ^R | <i>hrpA</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 26 | Amp ^R | <i>recN/ynfC</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 50 | Amp ^R | <i>yicI</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 52 | Amp ^R | <i>pdxJ/lacZ</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 71 | Amp ^R | <i>lflhA</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 74 | Amp ^R | <i>ygcCD</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 78 | Amp ^R | <i>yehH/rdoA</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 84 | Amp ^R | <i>lpp</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 94 | Amp ^R | <i>mltD</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 98 | Amp ^R | <i>potG</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 128 | Amp ^R | <i>thrC</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 139 | Amp ^R | <i>yafD</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |
| pB S 142 | Amp ^R | <i>modF</i> Genfragment in pBR322 | diese Arbeit |

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide (Fortsetzung).

| Plasmid | Resistenz | Genotyp | Referenz |
|---|------------------|--------------------------|--------------|
| 3. 5'-RACE: Klonierte DNA-Fragmente zur Kartierung des Transkriptionsstartpunktes | | | |
| pUC19-5PR-b3007 1.16 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-b3007 2.8 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-b3007 21/8 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-b3007 II 2.2 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-cspl 10.1.3 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-cspl 10.2.5 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-evgA1/16 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-evgA1/17 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-evgA2/24 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-evgA3 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-evgA3/16 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-ivbL 2.2.3 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-ivbL 2.2.4 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-nlpA10 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-nlpA3 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-nlpA7 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yahN 8.3 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yahN 9.26 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yebK 8.1/2 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yebK-8.2/3 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yhjX 1/6 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yhjX 3.1 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yhjX 500/1 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yhjX III | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yhjX III | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yhjX III 1 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yhjX III 2 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yhjX III 3 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yhjX III 5 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yjiY III 5 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-yjiY III 6 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-ypjB 5 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |
| pUC19-5PR-ypjB II 1 | Amp ^R | 5'RACE Fragment in pUC19 | diese Arbeit |

2.2.3 Oligonukleotide

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide. Das mit * gekennzeichnete Oligonukleotid ist RNA, alle übrigen DNA.

| Oligonukleotid | Sequenz (5' - 3') |
|--|---|
| A) Sequenzierprimer/Markierungsprimer | |
| 6-FAM uni24 | [6-FAM]ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG |
| 6-FAM pBR322 | [6FAM]GTCATCCTCGGCACCGTCACCCTG |
| pBAD24 anti | CAAATTCTGTTTTATCAGACCGCTTCTGCG |
| pBAD24 sense | TCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATA |
| pBR322 seq anti | CTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAA |
| rev24 | TTCACACAGGAAACAGCTATGACC |
| uni24 | ACGACGTTGTAAAACGACG |
| B) Klonierung von Genen | |
| kdpE NdeI sense | TTTCGCCATATGACAAACGTTCTGATTGT |
| kdpE XbaI antisense | CTCTCTAGATCAAAGCATAAACCGATAGC |
| ndk NdeI sense | ATGCGCCATATGGCTATTGAACGACTTTT |
| ndk XbaI anti | CTCTCTAGATTAACGGGTGCGCGGGCACA |
| rsd EcoRI sense | CTCGAATTCATGCTTAACCAGCTCGATAA |
| B) Klonierung von Genen | |
| rsd NdeI anti | TTTCGCCATATGAGCAGGATGTTTGACGCGG |
| rsd NdeI sense | TTTCGCCATATGCTTAACCAGCTCGATAA |
| rsd XbaI anti | CTCTCTAGATCAAGCAGGATGTTTGACGC |
| yehS EcoRI sense | CTCGAATTCATGCTAAGTAACGATATTCTGC |
| yehS NdeI anti | TTTCGCCATATGGCCTTTTTTTCACATGCTGGC |
| yehS NdeI sense | ATGCGCCATATGCTAAGTAACGATATTCTGC |
| yehS XbaI anti | CTCTCTAGATTAGCCTTTTTTTCACATGCT |
| C) Stammkonstruktion und Testprimer | |
| low YehT | GCATGAGGCCTTCAGGTGTTGATGAGGCAAAAAGCCATTTTAGCAGTCTTTAAT ACGACTCACTATAGGGCTC |
| RED-Kan anti | CGAGACTAGTGAGACGTGCTAC |
| RED-Kan sense | TATCAGGACATAGCGTTGGCTACC |
| yehT - 50 | CGTTACTTAGCATGAGGCCTT |
| yehT + 50 | TGTGAGCCTGATAGTTACACC |
| yehT anti | TTACAGGCCAATCGCCTCTTT |
| yehT sense | ATGATTAAGTCTTAATTGTC |

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung). Das mit * gekennzeichnete Oligonukleotid ist RNA, alle übrigen DNA.

| Oligonukleotid | Sequenz (5´ - 3´) |
|---|---|
| C) Stammkonstruktion und Testprimer (Fortsetzung) | |
| yehT-rpsL-neo-DOWN | CAAGCATCCCCACCATTTCCAGACCACTGATGCGCGGCATCTGGATATTCAGAA GAACTCGTCAAGAAGG |
| yehT-rpsL-neo-up | GAAGGGATCGGCGCGGTGCATAAACTGCGCCCGGATGTGCTGTTTCTCGGCCT GGTGATGATGGCGGGAT |
| YehTU test anti | GAATAAACAGATGTGTGGTGAGTGT |
| YehTU test sense | AAACCCTCTTCGTCTTCTTTACGT |
| yehU – 50 | GCTCCTGCAAAAATACACGCA |
| yehU + 50 | CTGCAAGAGTTCAAAGAAAGT |
| yehU sense | ATGTACGATTTTAATCTGGTG |
| yehU anti | TCATGCCTCGTCCCTCCATGG |
| yehU GAF del DOWN | GGGATTCACCTGGGCGTGAAGCAGTTTGATCTCTGACTGGGTGAGCATTTCAGAA GAACTCGTCAAGAAGG |
| yehU GAF del UP | TAAAATACACTTCGGCTTTTTCTGCCACTGCGCTGAAAGTGGCAGCCGGCCTG GTGATGATGGCGGGAT |
| D) Klonierte 5´-UTR der angegebenen Gene für Protein:DNA Interaktionsstudien | |
| 1. genomisch assoziierte Gene von <i>yehU/yehT</i> | |
| mlrA BI anti | TTTGGATCCCGTCTCACCCCTTGCTCGCGA |
| mlrA sense | CAGCCCAACCAGCCACCGA |
| osmF BI anti | CGCGGATCCGATGCTTTTCTCATTCTTTT |
| osmF EI sense | CGCGAATTCCTGCCAGCGTGACAGGTGACG |
| yehLMPQ BI anti | CGCGGATCCTAGTTGTTTGAGCGAAAAAT |
| yehLMPQ EI sense | CGCGAATTCATCCGTTTTCTTCAGACTT |
| yehS BI anti | CGCGGATCCGAGGCCTTCAGGTGTTGATG |
| yehS EI sense | CGCGAATTCAGCCTTTGAAGAACATGCCT |
| cspB1 anti | TCTACATTCCTTAACCTTGAGC |
| 2. Validierung der Transkriptomanalyse $\Delta yehUT$ Oshima <i>et. al</i> (2002) | |
| cspB1 sense | CACGTTTCTGAAGAAAGCTAT |
| cspB2 BamHI anti | CGCGGATCCATAGCTTTCTTCAGGAACGTG |
| cspB2 EcoRI sense | CGCGAATTCTCATGAAAGGTAAACATTGGC |
| mlc BamHI anti | CGCGGATCCCGCATACTCCCTATATTTTC |
| mlc EcoRI sense | CGCGAATTCCTCCCTGGCAAATAACCCGAA |
| rfaS BamHI anti | CGCGGATCCCTTTATGACCAGGATTTTTCG |
| rfaS EcoRI sense | CGCGAATTCAGTAAATAGCTGACTTATGGA |
| rfc1 BamHI anti | CGCGGATCCAAAATCCTCAGCAAACAGTA |

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung). Das mit * gekennzeichnete Oligonukleotid ist RNA, alle übrigen DNA.

| Oligonukleotid | Sequenz (5' - 3') |
|---|---------------------------------------|
| 2. Validierung der Transkriptomanalyse <i>ΔyehUT</i> Oshima <i>et. al</i> (2002; Fortsetzung) | |
| rfc1 EcoRI sense | CGCGAATTCATCGCCTCTGCCTTTTCTTAT |
| rfc2 BamHI anti | CGCGGATCCATAAGAAAAGGCAGAGGCGAT |
| rfc2 EcoRI sense | CGCGAATTCATATCTGGACCAACGTCCGTA |
| yafT anti | AATTGGACACTCCCTCGCCTG |
| yafT sense | CTATTCACACTCATGAAAATGAG |
| yehR anti | GTAAAACTCCATTTTATTTAA |
| yehR sense | TTGCTGGCGAATGACCTCACC |
| yhcB anti | GAACATCTCCCGTTGTCTTT |
| yhcB sense | TAAATAATTTCCAGGCGGCT |
| yjfO anti | AGTGTAGTGCCTTATTAATT |
| yjfO sense | CTGGATGAAGTAAAGCCGTG |
| yjhA1 anti | AAATTTCACTCATTTGTAGGA |
| yjhA1 sense | TTTCTCATCGGGTGATGAAAA |
| yjhA2 anti | GAAGTGAAGTGATGTTTGCCA |
| yjhA2 sense | GGAAACATATTTTCATGATGAG |
| yjhBC2 BamHI anti | CGCGGATCCTTCGTCAAATGAGGAAAGACT |
| yjhBC2 EcoRI sense | CGCGAATTCATCCGGAAACAAGTGAGCGT |
| yjhC1 anti | ATTTGTTTCCTGTGTTATTCT |
| yjhC1 sense | GGGAGTTTTATTCAACCTGAA |
| 3. Homologien (Zielgen eines homologen Systems und LytTR-artige DNA-Bindesequenz) | |
| mtfA BI anti | CGCGGATCCCGTTTTGCTCGCAAACCTCGT |
| up-mtfAE1 sense | CGCGAATTCGGCTTTAATCTGACGGCCGCG |
| up yohJ antisense | CGCGGATCCAATCAACACCCAGATGAGA |
| up yohJ EcoRI sense | CGCGAATTCCTAACTCCACCGCACGGGCG |
| 4. Evaluierung der Microarray Daten | |
| 4.1 5'-RACE | |
| 5PR RNA Adapter* | AUAUGCGCGAAUUCUGUAGAACGAACACUAGAAGAAA |
| 5'R Adapter Primer III | TGTAGAACGAACACTAGAAGAA |
| 5PR Primer II | GCGCGAATTCCTGTAGA |
| b3007-c-anti | AAACGACGTCGAATTGATAGTC |
| b3007-c-anti II | TGTGTATCTCCAGGACGCAA |
| cspl-c-anti | CCGTTCTCAATACCAAATTCAACT |

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung). Das mit * gekennzeichnete Oligonukleotid ist RNA, alle übrigen DNA.

| Oligonukleotid | Sequenz (5' - 3') |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| 4.1 5'-RACE (Fortsetzung) | |
| cspI-cII-anti | CACATCTTTGCTGCCATCTT |
| cspI-c-III | CCTTTTTTCAGGGTTAAACCATT |
| evgA-c- anti II | TCTAACACCTGGATACCGTAACT |
| evgA-c-anti | CAGTCAACTCTGCTAAGATTTC AAT |
| ivbL-c-anti | CTACGGCGCATTGCCGAC |
| ivbL-c-inner | GACCACTGCGGCGGATGG |
| nlpA-c-anti | TGTTTTGCATCGCTGCTACT |
| nlpA-c-anti II | CAACATCGAGGCCATATTTCT |
| yahN-c-anti | AATAAAATGCATCGCCCAGC |
| yahN-cII-anti | AAAGAGATTGGCTCCCGGAT |
| yahN-c-III | GGATCCATAGTGATTTTCATCCATAA |
| yebK-c-anti | CTGTGCCAGATGAAGTTTAAAATC |
| yebK-cII-anti | TCGAATGGATCGCGTTATCG |
| yebK-c-III | CAGCTGAGACTGGATTTT |
| yhjX-c-anti | AAACAGGCTCCAGGTATAAACCC |
| yhjX-c-anti II | CGCAACAGAAGACGAAATTG |
| yjiY c anti II | GTTTCAGACCGTCGTTGTTAATAA |
| yjiY-c-anti | CCGACGTAATGCAACTACCG |
| yjiY-cII-anti | GTTTCAGACCGTCGTTGTTAATAA |
| ypjB-c-anti | TCTATGGGGTGTTCCCTT |
| ypjB-c-anti II | GCTCTTGGTAAAAACTTATAGCAAC |
| 4.2 Klonierung 5'-UTR in pUC19 | |
| b3007 2 sense | TTTTTTGAATTCAGTGTATTTTTTGCTGCGTCCTG |
| b3007 1 anti | TTTTTTGGATCCTTTCCCTTGCGTTTACGCA |
| b3007 1 sense | TTTTTTGAATTCGCATGAATATTCGCGGGC |
| b3007 2 anti | TTTTTTGGATCCTAGTTTAGACATCCAGAC |
| b3007 3 anti | TTTTTTGGATCCCTCGGCGCGGTAAATAGC |
| b3007 3 sense | TTTTTTGAATTCACTCTCCATTGGCGCGATTAC |
| cspI 1 anti | TTTTTTGGATCCTGAGAAATGGACAAACAC |
| cspI 1 sense | TTTTTTGAATTCTAACAAAATGACTGGTTT |
| cspI 2 anti | TTTTTTGGATCCGACATAATTATTACCTTT |
| cspI 2 sense | TTTTTTGAATTCTTGACCTCTTGAGATTTT |

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung). Das mit * gekennzeichnete Oligonukleotid ist RNA, alle übrigen DNA.

| Oligonukleotid | Sequenz (5' - 3') |
|--|---------------------------------------|
| 4.2 Klonierung 5'-UTR in pUC19 (Fortsetzung) | |
| cspl 3 anti | TTTTTTGGATCCATAATAAAATTATAACAA |
| cspl 3 sense | TTTTTTGAATTCTTACAAAAGTAATCCTTGCTATGGG |
| cspl 4 anti | TTTTTTGGATCCAGAAAAACACAGCAATGA |
| cspl 4 sense | TTTTTTGAATTCGCCAAAATTCCTGAAATC |
| evgA 1 anti | TTTTTTGGATCCAATCAGGGATTGTACCGA |
| evgA 1 sense | TTTTTTGAATTCAAACCGTGGCTTTTGCAATACA |
| evgA 2 anti | TTTTTTGGATCCCTCATTTTCTCAATAAAA |
| evgA 2 sense | TTTTTTGAATTCTTATTGTTGACATTTTCAT |
| evgA 3 anti | TTTTTTGGATCCGCAAGAGGATGGTCATCA |
| evgA 3 sense | TTTTTTGAATTCATGACGCCTTATGTCTGT |
| ivbL 1 anti | TTTTTTGGATCCGGAATCGTGTGTTGTTCC |
| ivbL 1 sense | TTTTTTGAATTCCAAACACTACTACCAACTGCGCCA |
| ivbL 3 sense | TTTTTTGAATTCGTTACCAGCCGCAGGCGA |
| ivbL2 anti | TTTTTTGGATCCC GTT GAGCATGGAAGTAG |
| ivbL2 sense | TTTTTTGAATTCTGAAAAATTTCCATTGTCTCCCC |
| ivbL3 anti | TTTTTTGGATCCGCAAGGGAAAATTGAGGG |
| nlpA 1 anti | TTTTTTGGATCCTGCGCCATTTATAACGCC |
| nlpA 1 sense | TTTTTTGAATTCGACAGGGGCCGCATTATTG |
| nlpA 2 anti | TTTTTTGGATCCCGTAGATGATGTGTTGTC |
| nlpA 2 sense | TTTTTTGAATTCGATAGCGTTTCGTTTTTTAAACCG |
| nlpA 3 anti | TTTTTTGGATCCGATAAGAATAAAAAGGAA |
| nlpA 3 sense | TTTTTTGAATTCTTGCTTTCATCGCTCTCATCATG |
| yahN 1 sense | TTTTTTGAATTCCTCGCACCCGATTATTTT |
| yahN 1anti | TTTTTTGGATCCTACGGTCAGGTAAACGGC |
| yahN 2 anti | TTTTTTGGATCCAGAGATCACAAAGTGTCT |
| yahN 2 sense | TTTTTTGAATTCTTATCACACTATCACCCA |
| yahN 3 anti | TTTTTTGGATCCACAACCTCTGGAGCCGTAA |
| yahN 3 sense | TTTTTTGAATTCTTTGGTCATCAATTCAGCGGC |
| yebK 1 anti | TTTTTTGGATCCCGGGCGAAGCCAGAATGA |
| yebK 1 sense | TTTTTTGAATTCTCTCTTTACATCATGAATATGCTGG |
| yebK 2 anti | TTTTTTGGATCCCTCACGGTAATGACGAT |
| yebK 2 sense | TTTTTTGAATTCTTTTTATCTGCTTTTGT |

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung). Das mit * gekennzeichnete Oligonukleotid ist RNA, alle übrigen DNA.

| Oligonukleotid | Sequenz (5´- 3´) |
|--|---|
| 4.2 Klonierung 5´-UTR in pUC19 (Fortsetzung) | |
| yebK 3 anti | TTTTTTGGATCCGTTGTTATTTTTTTCAT |
| yebK 3 sense | TTTTTTGAATCCGGGAAAAGCGCGCAAAGT |
| yhjX 5PR 1 anti | TTTTTTGGATCCTAACAGGCTCCAGGTATAA |
| yhjX 5PR 1 sense | TTTTTTGAATTCATGACACCTTCAAATTATCAGC |
| yhjX 5PR 2 anti | TTTTTTGGATCCGGCAGTATTCTGCAGTAAT |
| yhjX 5PR 2 sense | TTTTTTGAATTCTTCTGATGGCATTTCATGCC |
| yhjX 5PR 3 anti | TTTTTTGGATCCCGGAATGAAATGCCTTAGTT |
| yhjX 5PR 3 sense | TTTTTTGAATTCTAACAATAGTTGTGGCGATAGTG |
| yhjX-anti (BHI) | AAAAAAGGATCCCTGAAACTGACAGTAAAAACTGTTTCGAAATGAATTCAAAAA |
| yhjX-mut-anti (BHI) | AAAAAAGGATCCCTGAGGGTGACAGTAAAAGGGTGTTCGAAATGAATTCAAAAA |
| yhjX-mut-sense (ERI) | TTTTTTGAATTCATTCGAACACCCTTTTACTGTCACCCTCAGGGATCCTTTTTT |
| yhjX-sense (ERI) | TTTTTTGAATTCATTCGAACAGTTTTTACTGTCAGTTTCAGGGATCCTTTTTT |
| yjiY YehT bs | TTTTTTGAATTCCTTTGCCGCTCAACCGCAAACTGACCGCTTACATCCCTAAA ATAACCACTCAGTTAGGATCCTTTTTT |
| yjiY YehT bs AgrA out | TTTTTTGAATTCCTTTGCCGCTCAACCTACCCAGTCACCGCTTACATCCCTAAC CGCCAACATCAGTTAGGATCCTTTTTT |
| yjiY YehT bs AgrA out anti | AAAAAAGGATCCTAACTGATGTTGGCGGTTAGGGATGTAAGCGGTGACTGGGTA GGTTGAGCGGCAAAGGGAATTCAAAAA |
| yjiY YehT bs anti | AAAAAAGGATCCTAACTGAGTGGTTATTTTAGGGATGTAAGCGGTGACTTTTGC GGTTGAGCGGCAAAGGGAATTCAAAAA |
| yjiY YehT bs mut 1 | TTTTTTGAATTCCTTTGAATAGACACCGCAAACTGACCGCTTACATCCCTAAA ATAACCACTCAGTTAGGATCCTTTTTT |
| yjiY YehT bs mut 1 anti | AAAAAAGGATCCTAACTGAGTGGTTATTTTAGGGATGTAAGCGGTGACTTTTGC GGTGTCTATTCAAAGGGAATTCAAAAA |
| yjiY YehT bs mut 2 | TTTTTTGAATTCCTTTGAATAGACACCGCAAACTGAAATAGGCCATCCCTAAA ATAACCACTCAGTTAGGATCCTTTTTT |
| yjiY YehT bs mut 2 anti | AAAAAAGGATCCTAACTGAGTGGTTATTTTAGGGATGGCCTATTTAGTTTGGC GTGTCTATTCAAAGGGAATTCAAAAA |
| yjiY YehT bs mut 3 | TTTTTTGAATTCCTTTGAATAGACACCGCAAACTGAAATAGGCCATCCCTAAA ATAAAAGAGACGTTAGGATCCTTTTTT |
| yjiY YehT bs mut 3 anti | AAAAAAGGATCCTAACGTCTCTTTTATTTTAGGGATGGCCTATTTAGTTTGGC GTGTCTATTCAAAGGGAATTCAAAAA |
| yjiY YehT bs spacer mut | TTTTTTGAATTCCTTTGCCGCTCACAATACCCAGTCCCGCTTAACGAAAGCCC CGCCCCACTCAGTTAGGATCCTTTTTT |
| yjiY YehT bs spacer mut anti | AAAAAAGGATCCTAACTGAGTGGGGCGGGCTTTCGTTAAGCGGGACTGGGGT ATTGTGAGCGGCAAAGGGAATTCAAAAA |
| yjiY-5P-1 anti | TTTTTTGGATCCAGTAAAACCTGGCATGTA |
| yjiY-5P-1 sense | TTTTTTGAATTCCAACATCACTACAGGATAG |
| yjiY-5P-2 anti | TTTTTTGGATCCCCAGAGTTACGCGCGCGT |

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung). Das mit * gekennzeichnete Oligonukleotid ist RNA, alle übrigen DNA.

| Oligonukleotid | Sequenz (5' - 3') |
|--|---|
| 4.2 Klonierung 5'-UTR in pUC19 (Fortsetzung) | |
| yjiY-5P-2 sense | TTTTTTGAATTCCTTAAACGACGCCTTTGCCGC |
| yjiY-5P-3 anti | TTTTTTGGATCCTGACGATAAATATGTGAT |
| yjiY-5P-3 sense | TTTTTTGAATTCGCGCCGAGTGAATTTTATTCA |
| yjiY-anti (BHI) | AAAAAAGGATCCCTGAAACAGGCGGAAAAAACTGGGCGGATTGAATTCAAAAAA |
| yjiY-mut-anti (BHI) | AAAAAAGGATCCCTGAGGGAGGCGGAAAAAGGGTGGGCGGATTGAATTCAAAAAA |
| yjiY-mut-sense (ERI) | TTTTTTGAATTC AATCCGCCACCCCTTTTTCCGCCTCCCTCAGGGATCCTTTTTT |
| yjiY-sense (ERI) | TTTTTTGAATTC AATCCGCCCAGTTTTTTTTCCGCCTGTTTCAGGGATCCTTTTTT |
| ypjB 5PR 1 anti | TTTTTTGGATCCGAACTAACTA ACTCGTGATTA |
| ypjB 5PR 1 sense | TTTTTTGAATTCGAGCTGGAGAACAATTA AAAAC |
| ypjB 5PR 2 anti | TTTTTTGGATCCCCATAATGACAAAGGCGTTG |
| ypjB 5PR 2 sense | TTTTTTGAATTC AAGGAAGCTGCATCAGAGACG |
| ypjB 5PR 3 anti | TTTTTTGGATCCACAAATTAATTTTAAAAT |
| ypjB 5PR 3 sense | TTTTTTGAATTCATTTAACGCTAGCGCAGTTTT |

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, aerob bei 37°C in Vollmedien. *E. coli* MG1655, HS996, DH5α und BL21 (DE3) wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium [1 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt] kultiviert. *E. coli* TKR2000 wurde in KML-Medium [1 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) KCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt] kultiviert. Als Minimalmedien wurde phosphatgepuffertes Medium nach Epstein und Kim (KE) (Epstein und Kim, 1971) verwendet, welches 0,4% (w/v) Glukose als C-Quelle enthielt und mit 100 mM Kalium-Phosphatpuffer auf pH 7,5 eingestellt war. Die optische Dichte (OD₆₀₀) der Zellsuspensionen als Maß der Zellzahl wurde bei 600 nm bestimmt. Festmedien der entsprechenden Kulturmedien wurden durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar hergestellt. Zur Selektion auf bestimmte Resistenzmarker wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugegeben: Ampicillin und Carbenicillin 100 µg/mL, Chloramphenicol 34 µg/mL, Kanamycin 50 µg/mL. Gene, welche in pBAD24 kloniert wurden, wurden mit 0,2% (w/v) Arabinose überexprimiert. Für die Microarray Analyse (2.4.11) wurden jeweils drei Kulturen

MG3/pBAD24-yehT und MG3/pBAD24-kdpE aus einer aeroben ÜK angeimpft ($OD_{600} = 0,05$) und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37°C aerob inkubiert. Dann wurde die plasmidbasierte Genexpression durch Zugabe von final 0,2% (w/v) Arabinose induziert. Nach 45 Minuten wurden die Zellen in 13 mL Aliquots geerntet (12000 x g, SS34 Rotor, 4°C), in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Für die YehT:DNA Formaldehyd Fixierung wurde MG1655 Δ yehUT, transformiert mit pBAD24-yehT, aus einer aeroben ÜK angeimpft ($OD_{600} = 0,05$) und bis zu einer OD_{600} von 0,5 aerob bei 37°C inkubiert. Dann wurde die plasmidbasierte Genexpression durch Zugabe von final 0,2% (w/v) Arabinose induziert. Nach 45 Minuten wurden die Zellen abzentrifugiert und im gleichen Volumen Phosphat-gepufferter Saline (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,0 Na₂HPO₄ mM, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4) resuspendiert. Die Fixierung und Reinigung sind unter 2.5.10.1 dargestellt.

Die Überproduktion von His₆-YehT und den Derivaten His₆-YehT-D54E und His₆-YehT-D54N, His₆-YehS, His₆-Ndk und His₆-Rsd fand stets in BL21(DE3) statt. Alle korrespondierenden Gene wurden in pBAD24 kloniert (siehe Plasmidkonstruktion). BL21(DE3) wurde mit den jeweiligen Plasmiden transformiert. Die Zellen wurden 1:100 aus einer aeroben ÜK angeimpft, bis zu einer OD_{600} von ca. 0,5-0,8 in LB mit Ampicillin kultiviert und die Genexpression mit 0,2% (w/v) Arabinose induziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, einmal gewaschen (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 5% (v/v) Glycerol), in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Die Überproduktion von YehU-His₆ und den Derivaten YehU-H382QHis₆, YehU- Δ GAF-His₆ und YehU- Δ GAF-H382Q-His₆ fand stets in *E. coli* TKR2000 statt. Alle korrespondierenden Gene wurden in pBAD24 kloniert (siehe Plasmidkonstruktion). TKR2000 wurde mit den jeweiligen Plasmiden transformiert. Die Zellen wurden 1:30 aus einer aeroben ÜK angeimpft und die Genexpression mit 0,2% (w/v) Arabinose induziert. Nach sechs bis acht Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, einmal gewaschen (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 5% (v/v) Glycerol) in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2 Dauerkulturen

Die Lagerung von Bakterienstämmen erfolgte in Glycerolkulturen. Hierfür wurden frisch kultivierte, stationäre Kulturen mit 17% (v/v) Glycerol versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Dauerkulturen wurden bei -20°C gelagert.

2.4 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.4.1 Plasmidisolierung

Plasmid-DNA wurde aus 2 mL aerober Übernachtskultur (37°C) mittels „Hi Yield Plasmid Mini Kit“ oder aus 5 ml Übernachtskultur mittels des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert, in 50 µL sterilem H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.4.2 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion in Abwandlung des Protokolls von Sambrook und Russel (2001) isoliert. Dazu wurden 1,5 mL Übernachtskultur 2 min bei 15900 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 567 µL TE-Puffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µL SDS (10% (w/v)), 5 µL RNase A (10 mg/mL) und 3 µL Proteinase K (20 mg/mL) wurden die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µL 5 M NaCl sowie 80 µL CTAB/NaCl-Lösung (0,7 M NaCl; 10% (w/v) CTAB) zugesetzt und die gesamte Suspension 10 min bei 65°C inkubiert. Um die DNA von den Proteinen zu trennen, wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugemischt und 5 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gemischt und erneut 5 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde die aus der wässrigen Phase DNA mit 0,7-1 Probenvolumen Isopropanol 30 min bei Raumtemperatur präzipitiert, zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet, bevor das DNA-Pellet in 100 µL H₂O aufgenommen wurde. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.4.3 Modifikation von DNA

Die Standard-DNA-Techniken wurden, falls nicht anders beschrieben, nach „Molecular Cloning, a Laboratory Handbook“ (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. Die in vitro-Veränderungen von DNA-Molekülen wie Restriktionen und Ligationen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zur Verhinderung einer Religation mit Alkalischer Phosphatase behandelt.

2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polyacrylamid- oder Agarose-Gelelektrophorese. Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde ausschließlich für die Reinigung 6-FAM-markierter DNA benutzt.

Vor dem Lauf wurden zu den Proben 10 x DNA-Probenpuffer [50 % (v/v) Glycerol; 0,1 M EDTA; 1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau] gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen diente der 2-log-ladder DNA Standard. Polyacrylamid (10% (w/v)- und Agarose-Gele (1% - 2% (w/v) Agarose) und Laufpuffer enthielten TAE [40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA]. Agarose-Gele wurden mit 0,2 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Polyacrylamidgele wurden nach dem Lauf in TAE-Puffer mit 0,2 µg/mL Ethidiumbromid für 10 min gefärbt. Der Gellauf wurde in einer „Mini Sub DNA Cell“-Agarosegel-Laufkammer (Biorad, München) bei konstant 100 V für 30-60 min bzw. einer Gelanlage Modell 45-1010-I (Peqlab) bei konstant 200 V für 60 min durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 304 nm und die Dokumentation der Gele mit der „Cybertech“-Fotodokumentationsanlage (Peqlab, Erlangen).

2.4.5 Markierung von DNA für Gel-Retardations- und DNase I Schutzexperimente

Für in vitro Protein:DNA Wechselwirkungsexperimente mit gereinigtem Protein und Promotorbereichen wurde die DNA mit 6-FAM (6-Carboxyfluorescein) markiert. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden jeweils in den Vektor pUC19 kloniert und wurden mit den Oligonukleotiden rev24 und 6-FAM-uni24 amplifiziert. Dazu wurde PHIRE-Polymerase verwendet. Das Oligonukleotid 6-FAM-uni24 war am 5'-Ende mit dem Farbstoff 6-FAM konjugiert. Dieser Farbstoff weist eine Absorptionswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 517 nm auf. Analog wurden Sonden von in pBR322 klonierten Fragmenten (2.5.10.1) mit den Oligonukleotiden 6-FAM pBR322 und pBR322 seq anti hergestellt.

2.4.6 Extraktion von DNA aus Reinigungsgelen

DNA-Fragmente wurden mittels des „Hi Yield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit“ oder „QIAquick-Gel-Extraction“-Kit nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen extrahiert.

6-FAM markierte PCR-Produkte wurden mittels Diffusion aus TAE-Polyacrylamid Gelen extrahiert. Die TAE Gelstücke wurden zerkleinert und für mindestens 6 h in „Gel-Diffusion Buffer“ [0,1% (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 10 mM Magnesiumacetat, 500 mM Ammoniumacetat, pH 8,0] inkubiert (Sigma, 2003). Die Gelstücke wurden abzentrifugiert, und die DNA im Überstand mit 0,7-1 Volumen Isopropanol gefällt. Die DNA wurde 30 min auf Eis präzipitiert, pelletiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 4°C, maximale Geschwindigkeit, 20 min), zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µL sterilem H₂O aufgenommen.

2.4.7 Präparation kompetenter Zellen und Transformation

Für die Aufnahme eines Plasmids wurden die Zellen mit CaCl₂ und RbCl behandelt (Promega, 1994). Frisches LB-Medium wurde mit Zellen einer Übernachtskultur 1:100 beimpft. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ 0,3 - 0,5) wurden die Zellen bei 4°C für 5 min abzentrifugiert (4.000 x g, Eppendorf Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 5 mL Lösung A [10 mM MOPS, pH 7,0, 10 mM RbCl] auf Eis resuspendiert und abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 5 mL Lösung B [100 mM MOPS, pH 6,5; 50 mM CaCl₂; 10 mM RbCl] resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und das Pellet in 1 mL Lösung B resuspendiert und weiterverwendet. 200 µL kompetente Zellen wurden mit 1 µL Plasmid-DNA bzw. mit dem gesamten Ligationansatz vermischt, 1 h auf Eis inkubiert und dann einem Hitzeschock (90 s bei 42°C) ausgesetzt. Die Zellsuspension wurde mit 1 mL LB-Medium versetzt und zur Regeneration für 1 h bei 37°C geschüttelt. 200 µL dieser Suspension (bei Ligationstransformation der gesamte Ansatz) wurden auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4.8 Plasmidkonstruktion

Die Plasmide pBAD24-*yehU* und pBAD24-*yehT* basieren auf dem Plasmid pBAD24 (Guzman *et al.*, 1995) und wurden von Christoph Guggenberger (2006) konstruiert, dessen Arbeit ich betreute. Die Codons für einen N-terminalen oder C-terminalen His₆-tag, eine Faktor Xa-Proteaseschnittstelle und eine weitere Klonierungsschnittstelle wurden über die entsprechenden Primer inseriert. Die zusätzliche Restriktionsschnittstelle ermöglichte schnelles Klonieren von Genen, deren Produkte dann einen N- oder C-terminalen Histidin Tag enthielten. Die Genmutationen, welche zu den Genprodukten His₆-YehT-D54N, YehU-H382Q-His₆, YehUΔGAF-His₆ und YehU-H382QΔGAF-His₆ wurden nach meiner Planung in

einem Forschungspraktikum (Behr, 2007) über Zweistufen-PCR hergestellt und analog kloniert.

kdpE wurde mit den Oligonukleotiden *kdpE* NdeI sense und *kdpE* XbaI antisense amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und XbaI verdaut und in den mit denselben Enzymen verdauten Vektor pBAD24-*yehT* kloniert. Dabei wurde *yehT* entfernt, im Vektorrückgrad blieb die codierende Sequenz für den His-Tag und die Faktor Xa Schnittstelle erhalten. Auf die gleiche Weise wurden die Gene *yehS* (Oligonukleotide: *yehS*-NdeI-sense und *yehS*-XbaI-antisense), *ndk* (Oligonukleotide: *ndk*-NdeI-sense und *ndk*-XbaI-antisense) und *rsd* (Oligonukleotide: *rsd*-NdeI-sense und *rsd*-XbaI-antisense) in den Vektor ligiert. Sollte das Genprodukt einen C-terminalen His₆-Tag aufweisen, wurden die Gene *rsd* (Oligonukleotide: *rsd*-EcoRI-sense und *rsd*-NdeI-antisense), *yehS* (Oligonukleotide: *yehS*-EcoRI-sense und *yehS*-NdeI-antisense) amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und NdeI verdaut und in den mit den selben Enzymen verdauten Vektor pBAD24-*yehU* kloniert. Dabei wurde *yehU* entfernt, im Vektorrückgrad blieb die codierende Sequenz für den His-Tag und die Faktor Xa Schnittstelle erhalten.

Die meisten pUC19 Derivate, welche potentielle Promotorregionen enthielten um diese für EMSA Experimente mit 6-FAM markierten Primern zu amplifizieren, wurden nach dem folgenden Schema kloniert: pUC19 wurde mit EcoRI und BamHI verdaut und gereinigt. Alle Fragmente enthielten eine 5'-BamHI und 3'-EcoRI Schnittstelle, mit denen sie in pUC19 kloniert wurden. Ausnahmen waren: *mlrA*, diese 5'UTR wurde 5' *blunt-end* und 3'BamHI kloniert. Die 5'-UTR der folgenden Gene wurden ausschließlich *blunt-end* in den mit SmaI linearisierten Vektor pUC19 kloniert: *cspB1*, *slp*, *yafT*, *yehR*, *yhcB*, *yjfO*, *yjhA1*, *yjhC*.

Alle bisher genannten Fragmente wurden via PCR von genomischer DNA amplifiziert (Oligonukleotide siehe Tab. 2.4). Die Fragmente mit den mutierten *yjiY* Promotorsequenzen ($P_{yjiY P}$ in Plasmid pBAD24-*yjiY* BS, $P_{yjiY MM123}$ in Plasmid pBAD24-*yjiY* BS mut3, $P_{yjiY MM23}$ in Plasmid pBAD24-*yjiY* BS mut2, $P_{yjiY MM3}$ in Plasmid pBAD24-*yjiY* BS mut1, $P_{yjiY MS}$ in Plasmid pBAD24-*yjiY* BS linker und $P_{yjiY ML}$ in Plasmid pBAD24-*yjiY* AgrA out) wurden durch Hybridisierung der in Tabelle 2.4 angegebenen Oligonukleotide hergestellt, verdaut und kloniert.

Für die SELEX Experimente wurde eine *E. coli* Genombibliothek hergestellt. Chromosomale DNA wurde mit Ultraschall in ca. 300 bp große Stücke geschert, und diese *blunt-end* in pUC19 kloniert, welcher mit SmaI zuvor linearisiert wurde. Die Fragmente der SELEX Anreicherung, der Anreicherung nach Formaldehydfixierung und der 5'RACE Analyse, welche sequenziert werden sollten, wurden zunächst aus den Agarosegelen eluiert, mit T4 Polynukleotidkinase (NEB) in T4-Ligasepuffer nach Angaben des Herstellers phosphoryliert und anschließend *blunt-end* in pUC19 (5'-RACE) und pBR322 (SELEX) kloniert, welche mit SmaI (pUC19) oder EcoRV (pBR322) zuvor linearisiert wurden.

2.4.9 Stammkonstruktion

2.4.9.1 Gendeletion mit Quick & Easy E. coli Gene Deletion Kit

Die Konstruktion der *yehUT*-Deletionsmutante erfolgte mit Hilfe des „Quick and Easy Gene Deletion Kits“ und wurde von Christoph Guggenberger und Stefan Behr nach meiner Planung in deren Diplomarbeiten durchgeführt (Behr, 2009, Guggenberger, 2007). Mittels homologer Rekombination kann spezifisch ein gewünschtes Gen gegen eine Resistenzkassette (FRT-PGK-gb2-neo-FRT) ausgetauscht werden. Die Entfernung der funktionellen Resistenzkassette erfolgte durch FLP-Rekombination nach Herstellerangaben. Abweichend dazu wurde statt des 706-FLP-Plasmids das Plasmid pCP20 verwendet, welches ebenfalls für das Gen der FLP Rekombinase kodiert. Die erfolgreiche Entfernung der Resistenzkassette wurde durch PCR mit entsprechenden Primern überprüft.

2.4.9.2 Chromosomale Genmodifikationen: BAC Modification Kit

Die Stämme MG3 und MG6 dienten als Vorstufe zur Herstellung chromosomaler Mutationen bzw. Deletionen. In MG3 wurde *yehT* und in MG6 *yehU* durch die Insertion einer Resistenzkassette inaktiviert. Dies wurde mittels des „Counter Selection BAC Modification Kits“ nach dem Protokoll von Heermann *et al.* (2008) in MG1655-*rpsL150* durchgeführt. Zuerst wurde in *yehT* (direkt stromabwärts des Codons für Aspartat 54) und in *yehU* (anstelle der GAF-Domäne) mit Hilfe der plasmidcodierten RedET Rekombinase eine *rpsL*-neo-Kassette inseriert. Die Kassette wurde mit der im Lieferumfang des Kits enthaltenen Matrize und den Primern *yehT*-*rpsL*-neo-DOWN und *yehT*-*rpsL*-neo-up bzw. *yehU*-GAF-del-DOWN und *yehU*-GAF-del-UP hergestellt. Klone mit korrekt inserierter Kassette wurden anhand von Kanamycin-Resistenz und Kontroll-PCR (Primerpaare *rpsL* neo anti – *yehT*+50 und *rpsL* neo sense – *yehT*-50 bzw. Primerpaare *rpsL* neo anti – *yehU*+50 und *rpsL* neo sense – *yehU*-50) und Streptomycin Sensitivität identifiziert. Alle Kontrollen zeigten eine korrekte Insertion (Daten nicht gezeigt).

Parallel wurde *yehT* D54E, *yehT* D54N, *yehU* H382Q, *yehU*ΔGAF und *yehU* H382QΔGAF mittels Zweistufen-PCR hergestellt und in pBAD24 kloniert (Behr, 2007). Die mutierten Gene wurden mittels PCR und den Primern *yehT*-sense und *yehT*-antisense bzw. *yehU*-sense und *yehU*-antisense amplifiziert. Durch erneute RedET vermittelte Rekombination wurde dann die *rpsL*-neo-Kassette durch jeweils ein mutiertes Gen ersetzt. Die (Gegen-) Selektion erfolgte mittels Resistenz gegenüber Streptomycin und Sensitivität gegenüber Kanamycin. Zum Nachweis der korrekten Insertion wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt

(Größenunterschied durch Entfernung der Kassette) und die PCR Produkte sequenziert (Daten nicht gezeigt). Mit diesen Stämmen wurde hier nicht gearbeitet. Sie finden gegenwärtig Verwendung bei der Herstellung von Reporterstämmen mit Promotor-*lacZ* Fusionen (Luitpold Fried und Stefan Behr, 2010, persönliche Kommunikation).

2.4.10 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierreaktion erfolgte nach dem Protokoll des Sequenzierungsservices der LMU München, Department Biologie I mit BigDye 3.1 Terminator Mix. Dieses basiert auf dem von Sanger entwickelten Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

2.4.11 Transkriptomanalyse mit Affymetrix *E. coli* Genom 2.0 Chip

2.4.11.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte mittels saurer Phenol Extraktion (Aiba *et al.*, 1981). Dazu wurden 13 mL Aliquots der Zellen (vgl. 2.3.1) 5 min bei 10000 x g pelletiert und das Pellet in 200 µL 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) resuspendiert. Die Zellen wurden mit 3 mL Lysepuffer (20 mM Na-Acetat (pH 5,5), 0,5% (w/v) SDS, 1 mM EDTA (pH 8,0)) aufgeschlossen. Die RNA wurde mit 3 mL saurem Phenol bei 65°C extrahiert und die Lösung 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die RNA wurde erneut bei 65°C mit 3 mL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und anschließend mit 9 mL Ethanol (100%) bei -20°C über Nacht präzipitiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 10000 x g wurde das Pellet mit 1 mL 70% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in 50-100 µl DEPC H₂O resuspendiert. Der RNA Gehalt und die Reinheit wurden photometrisch bestimmt und zusätzlich visuell über ein Agarose-Gel überprüft. Alle Reinigungsschritte wurden auf Eis durchgeführt sowie alle verwendeten Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

2.4.11.2 Entfernung von chromosomaler DNA und Reinigung

Die gereinigte RNA wurde zweimal mit RNase-freier DNase I (NEB) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des mitgelieferten Puffers behandelt. Anschließend wurde die RNA mit RNA-Säulchen (RNA Pure Kit) nach Angaben des Herstellers gereinigt und in

DEPC H₂O aufgenommen. Die RNA wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Der Versand zum Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB, Regensburg) erfolgte auf Trockeneis.

2.4.11.3 Transkriptomanalyse mit Affymetrix *E. coli* Genom 2.0 Chip

Alle weiteren Schritte, Synthese der biotinylierten cDNA, Markierung, Hybridisierung der cDNA mit dem Affymetrix *E. coli* Genom 2.0 Chips wurden im KFB (Regensburg) vorgenommen. Zuvor wurde eine weitere Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA durchgeführt. Auch die vergleichende Datenanalyse mit MAS5 wurde von dem KFB mit MAS5 durchgeführt. Es wurden Materialien und Protokolle von Affymetrix benutzt.

2.4.12 Kartierung von Transkriptionsstartpunkten

5'-rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction (5'-RACE) ermöglicht die Nukleotid-genaue Kartierung des Transkriptionsstartpunktes eines Gens. Diese Methode wurde mit wenigen Ausnahmen adaptiert von Argaman *et al.* (2001). Dieselbe RNA, welche auch zur Transkriptomanalyse (2.4.11.1) verwendet wurde, wurde zunächst in 2 Proben (Versuchs- und Kontrollansatz) geteilt. Im Versuchsansatz wurden die 5'-Enden von 5 µg Gesamt-RNA durch Zugabe von 5'-RNA Polyphosphatase nach Anleitung des Herstellers im mitgelieferten Puffer dephosphoryliert. Im Kontrollansatz wurde kein Enzym zugegeben. Anschließend wurde die RNA beider Ansätze mit RNA-Säulchen (RNA Pure Kit) nach Angaben des Herstellers gereinigt und in 15 µL DEPC H₂O aufgenommen. Über Nacht wurden jeweils 500 pmol RNA-Adapter (5'-AUAUGCGCGAAUCCUGUAGAACGAACAC UAGAAGAAA-3') pro Kontroll- und Versuchsansatz an die Gesamt-RNA bei 17°C mit T4-RNA Ligase in dem mitgelieferten Puffer nach Angaben des Herstellers ligiert und die RNA im Anschluss wieder mit RNA-Säulchen (RNA Pure Kit) gereinigt und in 15 µL DEPC H₂O aufgenommen. Ein Teil dieser RNA wurde anschließend mittels des ThermoScript Reverse Transcriptase Kits nach Angaben des Herstellers mit genspezifischen Oligonukleotiden (siehe Tabelle 2.6) in cDNA umgeschrieben und mit der mitgelieferten RNase H die verbleibende RNA verdaut. cDNA wurde bei -20°C gelagert. Die cDNA wurde als Matrize für die erste PCR Reaktionen mit jeweils einem genspezifischen und einem Adaptor-spezifischem Oligonukleotid verwendet. Alle Primer aus Tab. 2.4, die mit „II“ gekennzeichnet sind, wurden für die erste Reaktion benutzt.

0,5 μ L - 1 μ L der PCR-Produkte wurden für eine weitere, verschachtelte PCR Reaktion benutzt. Für die zweite verschachtelte PCR wurden wieder ein genspezifischer Primer (der weiter am 5'-Ende des Gens lag) und ein anderer Adapter-spezifische Primer, welcher näher am 3'-Ende des Adapters lag) eingesetzt. Alle Ansätze wurden parallel auf einem 2% (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt. Diejenigen Fragmente, welche nur im Versuchansatz (Dephosphorylierung der RNA) und nicht in der Kontrolle (keine Dephosphorylierung) vorhanden waren, wurden ausgeschnitten und gereinigt, mit T4 Polynukleotidkinase in T4-Ligasepuffer nach Angaben des Herstellers phosphoryliert und in pUC19 kloniert, welcher zuvor mit SmaI linearisiert wurde. Die klonierten Plasmide wurden mit DH5 α vermehrt, gereinigt und sequenziert. Die Sequenzen wurden mit VectorNTI (Invitrogen) auf das *E. coli* Genom abgebildet.

2.5 Biochemische und Analytische Methoden

2.5.1 Fraktionierung von Zellfraktionen

Für die Präparation der Proteine bzw. der Membranen wurden die Zellpellets in Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 30 mM Imidazol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 30 μ g/mL DNase I) aufgenommen (0,2 g Feuchtgewicht/mL) und nach Homogenisierung mit Hilfe eines Hochdruck-Zellaufschlussgerätes (Constant Systems Ltd.) bei 1,35 kbar, 4°C aufgeschlossen. His₆-Ndk enthaltende Zellen wurden auf Eis mit Ultraschall (Amplitude 20%, gepulst 0,5 s) aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Einschlusskörper wurden durch einen niedertourigen Zentrifugationsschritt für 20 min bei 12.000 x g (Sorvall-Zentrifuge, SS34 Rotor) entfernt. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und für 1 h bei 144.000 x g und 4°C zentrifugiert (Beckmann L-90K Ultrazentrifuge, 52Ti), wodurch Zytosol und Membranen getrennt wurden. Membranen, welche YehU und dessen Derivate enthielt, wurden zweimal in niederionischem Waschpuffer (1 mM Tris/HCl, pH 7,5; 3 mM EDTA; 0,5 mM PMSF) gewaschen und anschließend in TG-Puffer [50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10% (v/v) Glycerol] aufgenommen. Die Lagerung der Vesikel erfolgte bei -80°C, nachdem diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde.

2.5.2 Reinigung löslicher Proteine über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie und Dialyse

Die Proteine His₆-YehT, His₆-YehT-D54E, His₆-YehT-D54N, His₆-YehS, His₆-Ndk und His₆-Rsd wurden mittels Ni²⁺-NTA (Triazetonitril)-Agarose über eine Säule (Sigma-Aldrich) aus der zytosolischen Fraktion gereinigt. Um die Effizienz der einzelnen Schritte überprüfen zu können, wurden nach den verschiedenen Schritten Proben für eine SDS-PAGE (12,5% w/v PAA) entnommen. Ni²⁺-NTA wurde nach Angaben des Herstellers bezüglich der Bindekapazität von His₆-fusionierten Proteinen benutzt. Es wurde angenommen, dass das Zielprotein nach Überproduktion ca. 5% des zytosolischen Gesamtproteins ausmacht. In der Regel wurden 0,5 bis 1 mL reine Ni²⁺-NTA-Agarose in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt, zweimal mit dem 10 fachen Volumen an ddH₂O gewaschen und anschließend für 30 min bei 4°C mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 30 mM Imidazol, 2 mM β-Mercaptoethanol) äquibriert.

Zur Bindung der His₆-Proteine wurde die zytosolische Fraktion zu der äquibrierten Agarose gegeben und 30-60 min bei 4°C geschwenkt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten ebenfalls bei 4°C. Anschließend wurde das Agarose-Protein-Gemisch auf die Säule gegeben. Nach Absetzen der Ni²⁺-NTA-Agarose wurden nichtgebundene Proteine durch Waschen mit dem 100-fachen Säulenvolumen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend erfolgten fünf Elutionsschritte mit einem Säulenvolumen Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 300 mM Imidazol, 2 mM β-Mercaptoethanol). Die Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen wurde bestimmt (Lowry *et al.*, 1951) und mehrere Fraktionen gegebenenfalls vereinigt.

Um für nachfolgende Experimente das Imidazol aus der Proteinlösung zu entfernen und die NaCl-Konzentration zu senken, wurden die Eluate gegen das mindestens 500-fache Volumen Dialysepuffer bei 4°C dialysiert. Dabei wurde im ersten Schritt gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 2 mM β-Mercaptoethanol dialysiert. In den folgenden Schritten wurde die NaCl Konzentration auf 300 mM, 150 mM, 100 mM, 75 mM und 50 mM erniedrigt. Die übrigen Bestandteile blieben konstant. Gereinigtes Protein wurde bei 4°C auf Eis gelagert.

2.5.3 Reinigung von YehU-His₆ und Derivaten

Die Solubilisierung und Reinigung von YehU-His₆ und Derivaten erfolgte mittels Detergenz und Ni²⁺-NTA (Triazetonitril)-Agarose (Jung *et al.*, 1997). Die Proteine wurden aus Membranvesikeln von *E. coli* TKR2000 (Gesamtprotein Endkonzentration: 5 mg/ml) in

Gegenwart von Detergenz solubilisiert. Im Vorversuch wurde Decylmaltosid (Endkonzentration 1 (w/v), Dodecylmaltosid (Endkonzentration 1% (w/v)), Oktylglycosid (Endkonzentration 2% (w/v)) und LDAO (Endkonzentration 2% (w/v)) getestet. Der Solubilisierungspuffer enthielt 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10% (v/v) Glycerol, 2 mM DTT, in einen weiteren Ansatz wurde zusätzlich zu LDAO noch 0,6 M NaCl (Endkonzentration) zugegeben.

Dazu wurde die jeweilige Detergenzlösung innerhalb von 5 min schrittweise zum Solubilisierungsansatz gegeben. Insgesamt wurde 30 min unter Rühren auf Eis solubilisiert. Anschließend wurde 45 min bei 264000 x g in einer Beckman TL100-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand enthielt die solubilisierten Proteine. Überstand und Pellet wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die folgende Reinigung von YehU-His₆ und Derivaten fand nur mit LDAO (Endkonzentration 2% (w/v) mit 0,6 M NaCl) statt. Der Überstand wurde dann in 1/8 Volumen (abgesetztes Säulenmaterial) mit Reinigungspuffer [50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10% (v/v) Glycerol; 0,6 M KCl; 0,2% (w/v) LDAO; 1 mM β -Mercaptoethanol; 10 mM Imidazol] äquilibrierter Ni²⁺-NTA-Agarose für 30 min bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Die Suspension wurde anschließend auf eine Säule gegeben und nichtgebundene Proteine durch Waschen der Säule mit Säulenpuffer der 10-fachen Menge des Ausgangsvolumens entfernt. Die Eluierung von YehU-His₆ und Derivaten erfolgte dann durch Puffer mit einer Imidazolkonzentration von 200 mM in 10 Fraktionen von je 1/4 des Ausgangsvolumens.

2.5.4 Rekonstitution von gereinigtem YehU-His₆

Gereinigtes His₆-YehU und Derivate wurde gemäß der von Jung *et al.* (1997) abgewandelten Methode (Rigaud *et al.*, 1995) in Liposomen aus *E. coli*-Phospholipiden rekonstituiert. Bei dieser detergenzvermittelten Rekonstitution wurden die Liposomen durch Zugabe des Detergenz Triton X-100 [0,47% (v/v)] partiell solubilisiert. Anschließend wurde gereinigtes Protein in 0,2% (w/v) LDAO in einem Lipid:Protein-Verhältnis von 25:1 zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von BioBeads, um die Detergenzien zu entfernen. Die BioBeads wurden in einem BioBeads:Detergenz-Verhältnis von 5:1 zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde noch einmal die gleiche Menge BioBeads zugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden erneut BioBeads in einem BioBeads:Detergenz-Verhältnis von 10:1 zugegeben und über Nacht bei 4°C gerührt. Der Überstand wurde abgenommen und 1,5 h bei 372.000 x g in einer Beckmann TL- 100 Ultrazentrifuge zentrifugiert, das Pellet in 1 mL TG-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10% (v/v)

Glycerol) resuspendiert, die Proteinmenge bestimmt und das rekonstituierte Protein in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dazu wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 10 x 10 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 4,9% (w/v), im Trenngel 12,5% (w/v). Die Gele wurden mit Hilfe von Protogel2 Fertiglösung (30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid) (Biozym Diagnostik GmbH) hergestellt. Die Proben wurden vor dem Lauf mit SDS-Probenpuffer versetzt, so dass eine Endkonzentration von 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol und 0,005% (w/v) Bromphenolblau erzielt wurde. Als Proteinstandard wurde „PageRuler prestained Protein Ladder Plus“, bzw. „HMW Proteinstandard“ verwendet. Der Gellauf wurde in einer Gellaufanlage (Modell 45-1010-I, Peqlab) bei konstant 200 V durchgeführt.

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Serva Blau G-250 (Coomassie-Blau) detektiert (Weber und Osborn, 1969), wobei die Färbelösung zur Fixierung der Proteine zusätzlich 10% (w/v) TCA enthielt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in Entfärberlösung mit 5% (v/v) Methanol und 7,5% (v/v) Essigsäure. Zur Konservierung wurden die Gele anschließend bei 80°C in einem „Slab Gel Dryer SE1160“ (Hoefer) getrocknet.

2.5.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zum Nachweis von Proteinen mit His₆-Tag wurde nach der Auftrennung durch SDS-PAGE ein Western-Immunoblot durchgeführt. Das SDS-Polyacrylamidgel, die Nitrozellulosemembran (0,45 μ m Porengröße), sowie das Filterpapier wurden vorher in Blotpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol p.a.) äquilibriert. Mit Hilfe einer Nass-Blot Anlage (Biorad) wurden die aufgetrennten Proteine bei 300 mA innerhalb von 2 h oder bei 100 mA über Nacht auf die Nitrozellulosemembran oder Hybond P Protein Transfer Membran übertragen. Letztere wurde nach Herstellerangaben mit Methanol aktiviert.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h mit 3% (w/v) BSA in TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl) zur Absättigung unspezifischer Bindungen inkubiert. Anschließend erfolgte der immunologische Nachweis mit Hilfe von monoklonalen

Antikörpern. Der primäre Penta-His-Antikörper wurde in einer Endkonzentration von 1:2000 zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur in TBS + 3% (w/v) BSA inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Maus-IgG Antikörper in einer Endkonzentration von 1:5000 und 1 h bei Raumtemperatur in TBS + 3% (w/v) BSA inkubiert. Für den mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper wurde der Immunoblot durch Zugabe einer Färbe-Substratlösung (50 mM Na₂CO₃-Puffer (pH 9,5); 0,01% (w/v) Nitro-Blue-Tetrazolium; 0,045% (w/v) 5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat) entwickelt. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Waschen mit ddH₂O wurde die Membran zwischen Filterpapier getrocknet.

2.5.7 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration löslicher Proteine wurde wie von Lowry beschrieben durchgeführt (Lowry *et al.*, 1951), die Konzentration membranintegrierter Proteine wurden in Abwandlung des Protokolls durchgeführt (Peterson, 1977). Die Methode nach (Bradford, 1976) wurde für eine erste Abschätzung der Proteinmenge zusätzlich angewendet. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (AppliChem) verwendet.

2.5.8 Analytische Gelfiltration

Gelfiltrationen zur Bestimmung des Molekulargewichtes von His₆-YehT, His₆-YehT-D54E und His₆-YehT-D54N wurden in einer "Superdex 75 10/300 GL"-Gelfiltrationssäule in einer Äkta Purifier Anlage durchgeführt. Pro Lauf wurde die Säule mit 100 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 100 µL beladen. Der Säulenlauf erfolgte mit Säulenpuffer [50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10% (v/v) Glycerol; 50 M NaCl] bei einer Flußrate von 0,5 mL/min. Die Absorption des Eluats, aufgefangen in 1 mL-Fraktionen, wurde bei 280 nm in einer integrierten Optischen Einheit gemessen und das Profil digital aufgezeichnet. Zusätzlich wurden die gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Zur Eichung der Säule wurde das Gel Filtration Calibration Kit LMW benutzt. Die enthaltenen Proteine Aprotinin (6,5 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa), Carbonic Anhydrase (29 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Conalbumin (75 kDa) wurden in oben genanntem Puffer nach Angaben des Herstellers gelöst und unter gleichen Bedingungen aufgetrennt.

2.5.9 *In vitro* Phosphorylierungen

2.5.9.1 *Synthese von ³²P-Acetylphosphat*

Die Synthese von ³²P-Acetylphosphat erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Methode von Stadtman (1957). 190 µl Pyridin, 300 µl 0,33 M K₂HPO₄ und 100 µl [³²P] Orthophosphat wurden auf Eis unter Rühren inkubiert. 24 µl 98% (v/v) Essigsäureanhydrid wurden langsam zugegeben und insgesamt 6 min auf Eis inkubiert. Mit 4 N LiOH wurde der pH-Wert neutralisiert und das gebildete ³²P-Acetylphosphat mit 4,5 mL eiskaltem 96% (v/v) Ethanol zur Präzipitation für 1 h auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde pelletiert, zweimal mit je 5 mL Ethanol gewaschen und im Exsikkator über Nacht getrocknet. Nach Aufnahme des getrockneten [³²P]-Acetylphosphat in 180 µL TEGD-Puffer [50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 5 % (v/v) Glycerol, 0,1 mM EDTA und 1 mM DTT] wurde die Konzentration in einer angepassten Version der Methode nach Lipmann und Tuttle (1945) bestimmt.

2.5.9.2 *Phosphorylierung von YehT mit ³²P-Acetylphosphat*

Die Phosphorylierung von His₆-YehT erfolgte direkt nach der Reinigung von His₆-YehT im Elutionspuffer und nach unterschiedlichen Dialyseschritten durch Zugabe von 20 mM MgCl₂ und 20 mM ³²P-Acetylphosphat. Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert (Guggenberger, 2007). Die Phosphorylierung wurde mit 5xSDS-Probenpuffer zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgestoppt. Die Proben wurden mittels SDS PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden entweder mittels einer „Trans-Blot SD semi-dry-Anlage“ (Biorad, München) auf Nitrozellulosemembranen übertragen (20 V, 20 min) oder bei 80°C in einem Geltdrockner GD-4534 (Scie-Plas, UK) getrocknet und in beiden Fällen anschließend für ein bis drei Tage auf einem „Storage Phospho Screen“ (Molecular Dynamics) exponiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mittels „PhosphorImager Storm 820“ (Molecular Dynamics) detektiert.

2.5.9.3 *Bestimmung der Kinase-Aktivität von YehU-His₆ in vitro*

Phosphorylierungsreaktionen wurden in unterschiedlichen Phosphorylierungspuffern durchgeführt, da YehU-His₆ in KCl eine höhere Autokinaseaktivität besitzt (Guggenberger, 2007), aber His₆-YehT nur in NaCl stabil war (diese Arbeit). Alle Puffer enthielten 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 % (v/v) Glycerol und 2 mM DTT. Da His₆-YehT auch in der Anwesenheit von Mg²⁺ instabil ist, wurde die Konzentration auf 0,1 mM MgCl₂ verringert.

Je nach Zusammenstellung des Versuchsaufbaus wurden zudem 250 mM NaCl bzw. KCl und zugegeben. Gereinigtes His₆-YehT, His₆-YehS His₆-Ndk, His₆-Rsd, Membranvesikel mit YehU-His₆, YehU-H382Q-His₆, YehU-ΔGAF-His₆, YehU-ΔGAF-H382Q-His₆ oder die gereinigten und rekonstituierten Proteine kamen zum Einsatz.

Die Reaktion wurde (wenn nicht anders angegeben) durch Zugabe von γ -³²P-ATP gestartet. Dieses wurde entweder mit kaltem ATP gemischt (Endkonzentration: 20 μ M) oder unverdünnt (Endkonzentration: 0,016 μ M) eingesetzt. Die spezifische Radioaktivität betrug 2,4 bzw. 3000 Ci/mmol. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden dem Ansatz Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Proteinproben wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Analog wurde mit γ -³²P-GTP verfahren.

Für die *in vitro*-Phosphorylierung von YehU-His₆ und den Phosphotransfer auf den Antwortregulator His₆-YehT wurden YehU-His₆-haltige Membranvesikel des *E. coli*-Stamms TKR2000 in einer Konzentration von etwa 2 mg/ml und gereinigtes His₆-YehT in einer Konzentration von etwa 0,1 mg/ml im Reaktionsansatz verwendet (sofern nicht anders angegeben). Das molare Verhältnis von Sensor kinase zu Antwortregulator betrug zur Zeit des Phosphotransfers 1:2, Ndk, Rsd und YehS wurden äquimolar zu YehT eingesetzt.

Die Gele wurden entweder mittels einer „Trans-Blot SD semi-dry-Anlage“ (Biorad, München) auf Nitrozellulosemembranen übertragen (20 V, 20 min) oder bei 80°C in einem Gelrockner GD-4534 (Scie-Plas, UK) getrocknet und in beiden Fällen anschließend für ein bis drei Tage auf einem „Storage Phospho Screen“ (Molecular Dynamics) exponiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mittels „Phosphorimager Storm 820“ (Molecular Dynamics) detektiert.

2.5.10 DNA-Protein-Interaktionsstudien

2.5.10.1 Formaldehyd Fixierung, SDPA und SELEX

Das Protokoll wurde adaptiert von Liu *et al.* (2004). 1 mL MG1655Δ*yehUT*/pBAD24-*yehT* Zellen (OD₆₀₀ = 1,2 entsprechend ca. 1,2*10⁹ Zellen), aufgenommen in phosphatgepufferter Saline (137 mM NaCl, 2,7 nM KCl, 10,0 Na₂HPO₄ mM, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4), wurde global mit final 1% (v/v) Formaldehyd fixiert. Nach 10 Minuten wurde das verbleibende Formaldehyd mit einem Überschuss von final 125 mM Glycin neutralisiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Reinigung der DNA:YehT Komplexe erfolgte analog zur His₆-YehT, außer dass die Zellen mit Ultraschall (Amplitude 20%, gepulst 0,5 Sekunden, 4 Zyklen a 30 Sekunden) aufgeschlossen wurden, um die genomische DNA zu fragmentieren. Die

Quervernetzung durch Formaldehyd in den gereinigten Komplexen wurde durch Erhitzen auf 65°C (über Nacht) aufgelöst und die DNA mittels QIAGEN DNA Reinigungskit gereinigt, in pBR322 kloniert und sequenziert.

Das Protokoll für die SELEX Methode (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) und die verkürzte Abwandlung des spda (*solid phase DNA binding assays*) wurden von Shimada *et al.* (2005) adaptiert.

Als Proben-DNA wurde Ultraschall-fragmentierte genomische DNA (spda) oder PCR Produkte einer pUC19-*E.coli*-Genombibliothek (SELEX) benutzt. 3 µg (ca. 100 pmol) gereinigtes YehT wurde an 10 µL magnetische Ni²⁺-NTA Agarose *beads* Suspension immobilisiert. Die magnetischen Ni²⁺-NTA Agarose *beads* wurden stets nach Angaben des Herstellers gehandhabt und mit Magneten separiert. Die *beads* wurden beladen und einmal mit 500 µL Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol) gewaschen. Anschließend wurde 900 ng (ca. 5 pmol) Proben-DNA in 100 µL Puffer (50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol) zugegeben, und 15 min bei RT inkubiert. Die *beads* wurden dann fünfmal mit 500 µL Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurde die DNA mittels des „PCR cleanup Kits“ gereinigt. Die angereicherte DNA wurde dann entweder *blunt-end* in pUC19 kloniert (linearisiert mit SmaI) (spda) oder diente als PCR Matrize (SELEX). Die PCR Produkte wurden dann erneut wie oben beschrieben mit His₆-YehT inkubiert. Angereicherte SELEX Fragmente wurden *blunt end* in pBR322 kloniert, welcher zuvor mit EcoRV linearisiert wurde.

2.5.10.2 Gel-Retardationsexperimente

DNA:Protein Interaktionen wurden mittels Gel-Retardationsexperimenten visualisiert. Dies geschah initial mit zwei unterschiedlichen Gelsystemen. Langfristig setzte sich die unten dargestellte 0,5xTAE-gepufferte Variante durch. Alternativ wurde die Bindung der 5'-UTR der von Oshima *et al.* (2002) vorgeschlagenen YehU/YehT abhängigen Gele in Gel-Retardationsexperimente mit Tris/Glycin gepufferten Lämmli (1951) Gelen ohne SDS durchgeführt. Die Bindungsmuster waren identisch, allerdings waren die gemessenen Affinitäten im Vergleich zum 0,5xTAE im gepufferten System ca. 2-3mal so hoch. Die Versuchsanordnungen orientierten sich an Hellman und Fried (2007). YehT und Derivate bzw. YehS wurde seriell verdünnt (1:2), mit 30 fmol 6-FAM-markierter DNA inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. DNA-Protein-Komplexe wandern bei gelelektrophoretischer Auftrennung langsamer als freie DNA. Die Markierung des PCR-Fragments ist unter 2.4.5 dargestellt. Gereinigtes YehT wurde zunächst in Verdünnungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol) seriell

verdünnt und dann mit 150 ng Lachssperma DNA (unspezifischer Kompetitor) und dem zu testenden DNA Fragment (30 fmol) inkubiert. Das Probenvolumen betrug 27,5 μL . Die Endkonzentrationen im Reaktionsansatz waren 50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 6% (v/v) Glycerol, 5,45 ng/ μL Lachssperma DNA, 1,1 nM 6-FAM-markierte DNA, 0,136 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA und variable Konzentrationen an His₆-YehT. Die Reaktionsansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 7,5%-iges (w/v) natives 0,5-fach gepuffertes TAE-Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Laufpuffer diente ebenso 0,5xTAE. Der Gellauf wurde 3 h bei 70 V durchgeführt. Das Gel wurde anschließend mit Hilfe eines Typhoon Scanners („Typhoon Trio Variable Mode Imager 1 Scanner“, Amersham Bioscience) unter einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsfilter der Wellenlänge 526 nm aufgenommen (Zianni *et al.*, 2006).

2.5.10.3 DNase I Schutzexperiment

Das Protokoll für das DNase I Schutzexperiment wurde adaptiert von Zianni *et al.* (2006). Das Verhältnis von DNA zu Protein war identisch mit dem der Gel-Retardationsexperimente. 550 fmol 6-FAM-markierte P_{yjY-300/+1} DNA wurde mit 12,5 pmol, 25 pmol, 50 pmol und 100 pmol YehT in einem Endvolumen von 27,5 μL inkubiert. Die Endkonzentration aller Komponenten betragen im Reaktionsansatz 50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 6% (v/v) Glycerol, 20 nM 6-FAM-markierte DNA, 0,136 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA und variable Konzentrationen an His₆-YehT (227 nM, 454 nM, 909 nM und 1818 nM). Wurde verdünnte DNase I zugegeben (10^{-2} U, 10^{-3} U und 10^{-4} U), enthielten die Ansätze zusätzlich 0,05 mM CaCl₂ und 0,25 mM MgCl₂. Die Ansätze wurden 15 min bei 25°C inkubiert. Dann wurde die angegebenen Units DNase I zugegeben und bei 25°C inkubiert: 2 U (4 min, 5 min, 6 min), 10^{-2} U, 10^{-3} U und 10^{-4} U (1 min, 2 min, 3 min, 4 min). Die Reaktion wurde mit dem fünffachen Volumen Puffer DF (Hi Yield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit) abgestoppt, die DNA nach Angaben des Herstellers gereinigt und in 20 μL sterilem Wasser aufgenommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Zur Analyse der Fragmentlänge wurden 10 ng fragmentierte DNA (maximal 5 μL) mit 10 μL „HiDi“-Formamid und 0,05 μL „GeneScan LIZ 500“-Längenstandard gemischt, aufgeköcht und mittels einem ABI3730 Sequencer (Sequencing Service Department Biologie, Großhaderner Str. 2-4, 82152 Planegg-Martinsried) aufgetrennt und die Fluoreszenz aufgenommen. Die Daten wurden mit der Software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems) analysiert.

2.6 Datenbanken und bioinformatische Methoden

2.6.1 Datenbanken

Grundlegende Informationen wie Gensequenzen, intergene Sequenzen und Informationen zu Proteinen, wie z.B. die Anwesenheit und Positionen von Proteindomänen wurden aus einschlägigen Datenbanken wie NCBI, Biocyc (Keseler *et al.*, 2009), Genolist (Lechat *et al.*, 2008), RegulonDB (Gama-Castro *et al.*, 2008), PFAM (Finn *et al.*, 2010) und Uniprot (Jain *et al.*, 2009) übernommen. Strukturdaten von Proteinen wurden von RCSB Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000) übernommen. Entnommene Sequenzdaten wurden mit VectorNTI (Invitrogen) verwaltet, bearbeitet und für Alignments, Sequenzauswertungen und Kartierungen benutzt.

Analysen bezüglich bekannter oder nahe liegender Protein:Protein Interaktionen z.B. aufgrund von bekannten Interaktionsstudien, gemeinsamen Vorkommen der korrespondierenden Gene in einem oder mehreren Genomen und die Nachbarschaftsanalyse von Genen wurden mit STRING 8.3 (Jensen *et al.*, 2009) durchgeführt.

2.6.2 Vorhersagen und Motivsuche

σ^{70} abhängige -35/-10 Box wurden mit BProm der Firma Softberry vorhergesagt (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>).

Die Genauigkeit und Spezifität ist mit 80% angegeben. Es wurden stets die Standardeinstellungen benutzt.

Motive innerhalb einer DNA-Sequenz oder gemeinsame Motive von zwei oder mehr Sequenzen wurden mit MEME (Bailey und Elkan, 1994) und GLAM2 (Frith *et al.*, 2008) vorhergesagt. Der MEME Server durchsucht eine oder mehrere Sequenzen nach Ähnlichkeiten und stellt diese als Motiv dar. Es wurde jede mögliche Anzahl (inklusive Null) an Motiven pro Sequenz(en) erlaubt. Ansonsten wurden die voreingestellten Einstellungen beibehalten (minimale Länge des Motivs 6 Nukleotide, maximale Anzahl 50, Anzeige von 3 Motiven). GLAM2 durchsucht zwei oder mehrere Sequenzen nach unterbrochenen Motiven. Hier wurden die voreingestellten Einstellungen beibehalten (u.a. minimale und maximale Zahl der Sequenzen im Alignment und die Straf-Faktoren für Insertionen, Deletionen etc. in den Motiven).

Zur Suche nach DNA Motiven im *Escherichia coli* Genom wurde die Pattern Search Funktion von Genolist (Lechat *et al.*, 2008) genutzt. Die Motive, deren Abstand und die Anzahl der zugelassenen Fehler sind bei der jeweiligen Suche unter 3. Ergebnisse angegeben.

Meistens wurde als Filteroption gewählt, dass nur Sequenzen angezeigt werden, welche stromaufwärts eines Gens liegen und nicht weiter als 600 Nukleotide entfernt sind.

Subdomänen von Proteinen wurden mit ProDom (Servant *et al.*, 2002) identifiziert, nachfolgende Alignments wurden mit der integrierten Such-/Alignmentfunktion MultAlin (Corpet, 1988) angefertigt. Hier wurden die Grundeinstellungen nicht geändert.

Die Proteinstruktur der DNA-bindenden Domäne von YehT wurde mit HHPred (Söding *et al.*, 2005) vorhergesagt. Dieses Programm detektiert Homologien und sagt die Struktur von Proteinen oder Proteindomänen voraus. Dem liegt ein paarweiser Vergleich mit *hidden Markov models* (HMM-HMM) Vergleich zugrunde. HHPred durchsucht dabei Alignment Datenbanken. Zunächst wurde ein Alignment von YehT mit HHPred angefertigt (Standardeinstellungen). Dann wurde die automatisierte Version gewählt, bei der die Struktur des besten Alignments auf YehT angewendet wurde. Das Modell wurde mit Chimera ebenfalls unter Anwendung der Standardeinstellungen visualisiert (Pettersen *et al.*, 2004).

2.6.3 DNA-Fragmentlängenanalyse

Die Fragmentlängenanalyse nach dem DNase I Schutzexperiment wurde mit dem Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die originalen Dateien wurden in das Programm geladen und mit den Einstellungen „Size Standard: GS500LIZ_3730“, „Analysis Method: NPP (No Primer Peaks)“ analysiert. Dabei wird das Fragmentprofil anhand des definierten Längenstandard ausgerichtet und basengenau kartiert. Zur Identifizierungen der Bindestelle von His₆-YehT im P_{yjy +1/-300} Fragment wurden mehrere Fragmentanalysen (Unterschiedliche His₆-YehT Konzentrationen) mit der Peak Scanner Software (Applied Biosystems) übereinander gelegt und visuell ausgewertet.

2.6.4 Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen und Berechnung der apparenten Dissoziationskonstante

Die Auswertung der EMSA-Gele erfolgte mit der Analyse-Software ImageQuant 5.0. Zu quantifizierende Signale wurden mit identischer Fläche bestimmt. Der Hintergrund wurde subtrahiert (Background Correction). Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d wurde diejenige Proteinkonzentration bestimmt, welche nötig ist, um 50% der vorhandenen DNA zu binden. Dazu wurde der Prozentsatz freier DNA gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Als 100% wurde jeweils die freie DNA ohne Proteinzugabe festgelegt und

daraus der Anteil der verbliebenen freien DNA bei verschiedenen Proteinkonzentrationen errechnet.

3. Ergebnisse

Das Sensor-Histidinkinase/Antwortregulator System YehU/YehT in *Escherichia coli* war bis zum Beginn dieses Projekts nie Gegenstand detaillierter Forschung. Abgesehen von globalen Arbeiten zum Expressionsprofil (Oshima *et al.*, 2002), Phospho-Biochemie (Yamamoto *et al.*, 2005) und Phänotyp (Zhou *et al.*, 2003) aller Sensor-Histidinkinase/Antwortregulator Systeme in *E. coli* gab es bisher keine Veröffentlichung, welche sich ausschließlich mit dem ZKS YehU/YehT auseinandersetzte. Diese Arbeit fasst die initialen Ergebnisse zur Funktion der YehU/YehT vermittelten Genregulation zusammen.

3.1 Einfluss von YehU/YehT auf die Regulation der Expression benachbarter Gene des *yehU/yehT* Locus

Oftmals sind die Gene von SHK/AR-Systemen mit denjenigen Genen räumlich assoziiert, welche sie regulieren. Beispielsweise reguliert das SHK/AR-System KdpD/KdpE die Expression der Gene *kdpFABC*, welche stromaufwärts von *kdpD/kdpE* gemeinsam in einem Operon organisiert sind (Polarek *et al.*, 1992). In direkter Nachbarschaft zu *yehU/yehT* befindet sich stromabwärts das Gen *yehS* und stromaufwärts das Gen *mlrA*. Die Auswahl der Gene für die im Folgenden dargestellten Analysen wurden um die Operone *yehLMPQ* und *osmF-yehWXY*, und das Gen *yehR* erweitert (Abb. 1.3). *yehO* wurde in dieser Studie nicht berücksichtigt.

3.1.1 Expressionsprofil der benachbarten Gene von *yehU/yehT*

Die Expression der benachbarten Gene des *yehU/yehT* Operons wurde mit zwei alternativen Methoden überprüft. Zunächst wurde deren Transkription in *E. coli* MG1655 (WT), MG3 und der *yehU/yehT* Doppeldeletionsmutante mittels Northern Blot Hybridisierung verglichen (Fried, 2008, persönliche Kommunikation und Tab. 3.1). Die Zellen wurden in LB Medium mikroaerob bei 30°C kultiviert und zum einen in der exponentiellen, als auch in der stationären Phase geerntet. Die RNA wurde wie beschrieben extrahiert, aufgetrennt und nachgewiesen (Fried, 2008). Die Expression von *osmF* im WT unterschied sich nicht von der Doppeldeletionsmutante. *yehS* und *yehR* wurden in der *yehU/yehT* Deletionsmutante nicht exprimiert, allerdings in MG3. Für *yehL*, *yehM*, *yehP*, *yehQ*, *mlrA*, *yehW* und *yehY* konnte weder im WT noch in der Doppeldeletionsmutante ein Transkript nachgewiesen werden. Da hierbei kein externer Stimulus zugegen war, wurde parallel die YehU/YehT vermittelte

Genexpression artifiziell durch Überproduktion des AR His₆-YehT in MG3 induziert (3.5). Das mRNA Expressionsprofil wurde gegen eine Kontrolle (His₆-KdpE Überproduktion) mittels Affymetrix *E. coli* 2.0 Microarray ermittelt. Relative Fluoreszenzeinheiten (rF) ≤ 100 wurden als „Gen nicht signifikant exprimiert“ definiert. *yehLMPQ* und *yehR* wurden weder durch His₆-YehT- noch durch His₆-KdpE-Überproduktion signifikant exprimiert. Die Expression von *yehS* war bei His₆-YehT-Überproduktion ca. doppelt so hoch wie bei His₆-KdpE-Überproduktion. Die Expression von *mlrA* verringerte sich um 50%. Das *osmF-yehWXY* Operon wurde bei His₆-YehT-Überproduktion zwei- bis dreifach geringer exprimiert als bei His₆-KdpE-Überproduktion. Allerdings war die Streuung zwischen den biologischen Experimenten bzw. den Fluoreszenzen der Chips (ausgenommen von *yehS* und *osmF*) so stark, dass diese Ergebnisse keine signifikante Aussagekraft besitzen. Somit konnten diese Expressionsanalysen an dieser Stelle nicht abschließend beurteilt werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.1 zusammengefasst. Die originalen Daten sind im Anhang CD A2 einzusehen.

Tabelle 3.1: Expressionsprofil der benachbarten Gene des *yehU/yehT* Locus. Die Expression der benachbarten Gene des *yehU/yehT* Locus (Abb. 1.3) wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden analysiert. Aufgeführt sind die konventionellen Gennamen und deren Identifikationsnummer (b-Nummer). Es sind zunächst die Ergebnisse einer Expressionsanalyse via Northern Blot (NB) in WT, MG3 und $\Delta yehU/yehT$ Mutante dargestellt. Es wurde kein Signal, kein Unterschied in der Expression der Gene zwischen den unterschiedlichen Stämmen, oder nur Transkript im Wildtyp visualisiert. Die Daten wurden von Luitpold Fried (2008) zur Verfügung gestellt. Zudem ist die Expressionsanalyse nach Überproduktion der AR His₆-YehT und His₆-KdpE gezeigt. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind als rF, dem arithmetisches Mittel der relativen Fluoreszenz [dimensionslos] der Affymetrix *E. coli* 2.0 Genom Chip Auswertung dreier biologischer Experimente bei His₆-YehT- bzw. His₆-KdpE-Überproduktion angegeben. Diese sind ein indirektes Maß für die Expression des entsprechenden Gens. log₂ ratio: Logarithmus zur Basis 2 des Verhältnisses rF(YehT)/rF(KdpE), p: Signifikanz (t-Test).

| Gen | b-Nummer | NB | rF (YehT) | rF (KdpE) | log ₂ ratio | p |
|-------------|----------|---------------------------|-----------|-----------|------------------------|-------|
| <i>yehL</i> | b2119 | Kein Signal | 37,4 | 67,1 | -0,83 | 0,052 |
| <i>yehM</i> | b2120 | Kein Signal | 46,4 | 73,7 | -0,66 | 0,019 |
| <i>yehP</i> | b2121 | Kein Signal | 9,4 | 27,6 | -1,53 | 0,017 |
| <i>yehQ</i> | b2122 | Kein Signal | 81,2 | 105,0 | -0,37 | 0,015 |
| <i>yehR</i> | b2123 | Transkript nur im Wildtyp | 54,1 | 42,6 | 0,40 | 0,256 |
| <i>yehS</i> | b2124 | Transkript nur im Wildtyp | 2934,2 | 1658,1 | 0,83 | 0,001 |
| <i>mlrA</i> | b2127 | Kein Signal | 309,9 | 899,8 | -1,57 | 0,018 |
| <i>osmF</i> | b2131 | Kein Unterschied | 458,7 | 1492,5 | -1,70 | 0,001 |
| <i>yehW</i> | b2128 | Kein Signal | 221,1 | 477,2 | -1,07 | 0,033 |
| <i>yehX</i> | b2129 | Kein Signal | 189,6 | 495,2 | -1,35 | 0,014 |
| <i>yehY</i> | b2130 | Kein Signal | 244,2 | 567,2 | -1,20 | 0,012 |

3.1.2 Promotor:YehT Interaktion

Die Expressionsprofile einiger benachbarten Gene konnten aufgrund geringer Transkriptmengen (*yehLMPQ*, *yehR*) bzw. der hohen Streuung der relativen Fluoreszenz der Microarray Transkriptomanalyse (*mlrA*, *yehWXY*) nicht abschließend bewertet werden. Daher wurde die Interaktion der korrespondierenden putativen Promotorregionen mit His₆-YehT getestet. Die Promotoren von *yehS* und *osmF* wurden als interne Kontrolle mitgeführt. Dazu wurde zunächst die Überproduktion und Reinigung des Antwortregulators etabliert und dessen Aktivität nachgewiesen (3.8).

Die in vitro Wechselwirkung von His₆-YehT und der Promotor-DNA der benachbarten Gene des *yehU/yehT* Locus wurden als weiterer Parameter bestimmt, um eine YehT-Abhängigkeit zu definieren. Gereinigtes His₆-YehT (3.9) wurde mit 6-FAM markierter 5'-UTR-DNA der benachbarten Gene inkubiert. Die DNA Fragmente enthielten eine (putative) -35/-10 Box. Die -35/-10 Boxen der benachbarten Gene wurden mit dem Programm BPROM (2.6.2) vorhergesagt (Tab. 3.2). Exemplarisch ist ein Gel Retardations-Experiment von His₆-YehT und dem putativen *yehLMPQ*-Operon Promotor dargestellt (Abb. 3.1). Die apparente Dissoziationskonstante K_d wurde bestimmt, indem die Intensität der 6-FAM Markierung der freien DNA-Sonden quantifiziert und gegen die His₆-YehT Konzentration aufgetragen wurde.

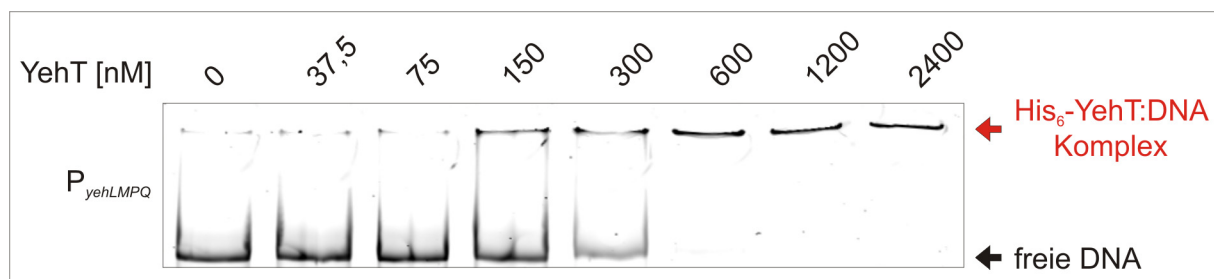


Abbildung 3.1: Bindung von His₆-YehT an putative Promotor DNA des *yehLMPQ* Operons. Das 6-FAM markierte DNA-Fragment der 5'-UTR des *yehLMPQ* Operons wurden mit gereinigtem His₆-YehT in steigenden Konzentrationen zwischen 0 und 2400 nM inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 7,5%-igen (w/v) TAE gepuffertem Polyacrylamid-Gel (2.5.10.2) und wurde wie beschrieben visualisiert. Freie DNA-Fragmente konnten bei den Experimenten in das Gel einlaufen, DNA-YehT-Komplexe verblieben aufgrund der größeren Masse in den Taschen bzw. wanderten nur geringfügig in das Gel ein.

Die Konzentration von His₆-YehT, bei der die Hälfte der DNA gebunden ist, entspricht dem K_d -Wert (Daten nicht gezeigt) und betrug ca. 250 nM. Die K_d -Werte betragen bei allen Fragmenten zwischen ca. 300 nM und ca. 400 nM (Tab. 3.2). Im Vergleich zu P_{*yjiY*-300/+1} 5'-UTR (K_d -Wert ca. 75 nM, siehe 3.6.2.2.2) war die Interaktion von gereinigtem His₆-YehT mit

dem putativen *yehS* Promotor um den Faktor 3,6 geringer. Die Affinität von gereinigtem His₆-YehT zu den Promotoren von *yehLMPQ*, *mlrA* und *osmF-yehWXY* war um den Faktor 4,3 geringer und im Vergleich zu dem *yehR* Promoter um den Faktor 5,7 geringer. Daher wurden diese Interaktionen als unspezifisch bewertet.

Tabelle 3.2: -35/-10 Box, Fragmentgröße und Affinität der 5'-UTR benachbarter Gene von *yehU/yehT*. Das 3'-Ende der mit BProm vorhergesagten -35 und -10 Box ist relativ zum Translationsstartpunkt des jeweiligen Gens angegeben. Alle Fragmente erstreckten sich direkt von 5' des Gens stromaufwärts in die 5'-UTR, die jeweilige Fragmentgröße ist angegeben. Die Dissoziationskonstante K_d gibt diejenige His₆-YehT Konzentration an, bei welcher die Hälfte der DNA gebunden ist und ist somit ein Maß für die Affinität. [Nt]: Nukleotide.

| Gen/Operon | -35 Box [Nt] | -10 Box [Nt] | Größe des Fragments [bp] | K_d [nM] |
|--------------------|--------------|--------------|--------------------------|------------|
| <i>yehLMPQ</i> | -272 | -251 | 500 | 300 |
| <i>yehR</i> | -147 | -123 | 281 | 400 |
| <i>yehS</i> | -56 | -33 | 500 | 250 |
| <i>mlrA</i> | -93 | -118 | 500 | 300 |
| <i>osmF-yehWXY</i> | -214 | -188 | 500 | 300 |

3.2 Validierung der Ergebnisse der Expressionsanalyse von Oshima *et al.* (2002)

Oshima *et al.* (2002) veröffentlichten eine global angelegte Studie zur Identifizierung von Expressionsunterschieden zwischen *E. coli* BW25113 Wildtyp und den Deletionsmutanten aller SHK/AR-Systemen. Die Zellen wurden dabei in LB Medium bei 37°C kultiviert, in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, die Gesamt-RNA präpariert und die Genexpression via Microarray analysiert. In der *E. coli* BW25113 *yehU/yehT* Doppeldeletionsmutante waren die Expression von neun Genen verringert: Die Expressionsfaktoren waren gegenüber BW25113 0,36 bei *yafT*, 0,24 bei *cspB*, 0,46 bei *rfc*, 0,16 bei *yehR*, 0,05 bei *yehU*, 0,05 bei *yehT*, 0,41 bei *rfaS*, 0,41 bei *yjhC* und 0,28 bei *yjhA*. Bei 13 Genen erhöhte sich die Expression in der *E. coli* BW25113 *yehU/yehT* Doppeldeletionsmutante gegenüber dem WT um die Expressionsfaktoren 2,1 bei *mlc*, 3,19 bei *hemH*, 2,26 bei *focA*, 2,07 bei *yccY*, 3,44 bei *narG*, 3,48 bei *narK*, 2,04 bei *napD*, 4,93 bei *nirB*, 2,26 bei *feoA*, 2,25 bei *malT*, 2,92 bei *nikA*, 2,09 bei *ilvC* und 3,23 bei *yjfO* (Oshima *et al.*, 2002). *yehU* und *yehT* wurden wegen der Deletion nicht mehr exprimiert, *yehR* wurde bereits oben behandelt (3.1). Die von Oshima *et al.* (2002) beschriebene differentielle Expression der genannten Gene in WT und *yehU/yehT* Doppeldeletionsmutante, konnten weder mittels Northern Blot Hybridisierung (Fried, 2009, persönliche Kommunikation), noch mittels Expressionsanalyse bei

Überproduktion des RR His₆-YehT bestätigt werden (siehe Anhang CD A3). Parallel wurden die Interaktion der stromaufwärts gelegenen putativen regulatorischen Sequenzen der Gene *yafT*, *cspB*, *rfc*, *rfaS*, *yjhC*, *yjhA*, *mlc* und *yjfO* mit gereinigtem His₆-YehT getestet (Daten nicht gezeigt) und die apparente Dissoziationskonstante berechnet (Tab. 3.3). Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Bindung von His₆-YehT an die unterschiedlichen regulatorischen DNA-Fragmente (Tab. 3.3), die Dissoziationskonstanten lagen zwischen 700 nM und 1200 nM.

Tabelle 3.3: -35/-10 Box, Fragmentgröße und Affinität der 5'-UTR potentieller YehU/YehT regulierter Gene. Das 3'-Ende der mit BProm vorhergesagten -35 und -10 Box ist relativ zum Translationsstartpunkt des jeweiligen Gens angegeben. Alle Fragmente erstreckten sich direkt von 5' des Gens (+1) stromaufwärts in die 5'-UTR, die jeweilige Fragmentgröße ist angegeben. Der Beginn und das Ende des Fragments sind auch relativ zum Translationsstartpunkt des jeweiligen Gens angegeben. Die Dissoziationskonstante K_d gibt diejenige His₆-YehT Konzentration an, bei welcher die Hälfte der DNA gebunden ist und ist somit ein Maß für die Affinität. Diese wurde hier mit Tris/Glycin gepufferten Gelen bestimmt (2.5.10.2). Daher sind die absoluten Werte ca. doppelt bis dreimal so hoch wie in den übrigen EMSA Experimenten. [Nt]: Nukleotide.

| Gen/Operon | -35 Box [Nt] | -10 Box [Nt] | Lage des Fragments [Nt] | K_d [nM] |
|--------------|--------------|--------------|-------------------------|------------|
| <i>yafT</i> | -109 | -84 | +1 bis -310 | 1000 |
| <i>cspB1</i> | -230 | -202 | +1 bis -262 | 1100 |
| <i>cspB2</i> | - | - | -250 bis -522 | 800 |
| <i>rfc1</i> | -223 | -197 | +1 bis -254 | 600 |
| <i>rfc2</i> | - | - | -197 bis -500 | 1200 |
| <i>rfaS</i> | -236 | -210 | +1 bis -441 | 1000 |
| <i>yhjC1</i> | -65 | -41 | +1 bis -326 | 700 |
| <i>yhjC2</i> | -447 | -427 | -326 bis -626 | 1300 |
| <i>yjhA1</i> | -147 | -119 | +1 bis -360 | 800 |
| <i>yjhA2</i> | -609 | -581 | -360 bis -698 | 1200 |
| <i>Mlc</i> | -69 | -45 | +1 bis -294 | 800 |
| <i>yjfO</i> | -57 | -34 | +1 bis -300 | 600 |

Des weiteren wurden bei bioinformatischen Analysen der stromaufwärts gelegenen regulatorischen Sequenzen der von Oshima *et al.* (2002) identifizierten potentiellen Zielgene von YehU/YehT keinerlei gemeinsame Motive mit MEME (Bailey und Elkan, 1994) und GLAM2 (Frith *et al.*, 2008) identifiziert (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die von Oshima *et al.* (2002) veröffentlichte differentielle Expression der angegebenen Gene nur in *E. coli* BW25113 zutrifft oder indirekt auf die Deletion von *yehU/yehT* zurückzuführen ist.

3.3 Die LytTR-bindende Konsensus DNA-Sequenz und YehU/YehT homologe ZKS

Eine alternative Möglichkeit zur Klärung der Funktion von SHK/AR-Systemen ist die Extrapolation bekannter Daten von homologen Systemen. Daher wurden zunächst die Konsensus DNA-Bindesequenz von LytTR-artigen AR auf das *E. coli* Genom abgebildet. Informationen zu Zielgenen des homologen LytR/LytS-Systems aus *S. aureus* wurden auf *E. coli* übertragen.

3.3.1 Extrapolation der LytTR-artigen Konsensus DNA-Bindesequenz

Die DNA-bindende Domäne von YehT gehört der Klasse der LytTR-artigen DNA-Bindedomänen an. Die Konsensus DNA-Bindesequenz bekannter LytTR-artiger RR besteht aus einer direkten Wiederholung der Sequenz [TA][AC][CA]GTTN[AG][TG], die durch einen 12 – 13 Nukleotide langen *spacer* getrennt ist (Nikolskaya und Galperin, 2002). Solche Sequenzen wurden mit Hilfe der „Pattern Search“ Funktion des „Genolist Web Servers“ (Lechat *et al.*, 2008) im *E. coli* Genom identifiziert. Dabei wurde in der Konsensussequenz kein Fehler erlaubt. Der *spacer* wurde mit 11-15 Nukleotiden variabler gestaltet.

Zudem wurden nur potentielle Bindestellen berücksichtigt, welche maximal 600 Nukleotide stromaufwärts der korrespondierenden Gene lagen. In der 5'-UTR von acht Genen konnte dieses Motiv identifiziert werden (*yafQ*, *dinJ*, *flgA*, *thiK*, *yddB*, *mtfA*, *hyfA*, *ygdD*; Tabelle 3.4). Das Expressionsprofil dieser Gene unterschied sich nicht signifikant nach Überproduktion von His₆-YehT von der Kontrolle (His₆-KdpE Überproduktion). Die Expression war in allen Fällen signifikant (≥ 100 rF). Allerdings war teilweise die Streuung (p) relativ hoch. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.4 und Anhang CD A4 zusammengefasst. Es wurde ausschließlich die Expression von *mtfA* mittels Northern Blot Hybridisierung in Wildtyp und *yehU/yehT* Doppeldeletionsmutante validiert und die Bindung von His₆-YehT an den Promotor von *mtfA* getestet, da *mtfA* ein Regulator von *mfc* ist (vgl. 3.2 und Oshima *et al.*, 2002). Die Expression unterschied sich nicht (Luitpold Fried, 2009, persönliche Kommunikation), K_d -Wert der His₆-YehT-5'-UTR Interaktion lag bei ca. 600 nM (Daten nicht gezeigt). Insgesamt deutete dies an, dass *mtfA* nicht von YehT reguliert wird.

Tabelle 3.4: Gene, deren 5'-UTR eine LytTR-artige DNA-Bindesequenz beinhalten. Die zweifache direkte Motivwiederholung [TA][AC][CA]GTTN[AG][TG] wurde mit der „Pattern Search“ Funktion des „Genolist Web Servers“ (Lechat *et al.*, 2008) im *E. coli* Genom identifiziert. Die Position der gesamten Motivwiederholung mit *spacern* von 12, 13, 14 oder 15 Nukleotiden (N_{12} , N_{13} , N_{14} , N_{15}) ist relativ zum Translationsstartpunkt in Nukleotiden [nt] angegeben. Zudem sind die Ergebnisse der Transkriptomanalyse bei His₆-YehT bzw. His₆-KdpE Überproduktion als log₂ Ratio (Logarithmus zur Basis 2 des Verhältnisses rF(YehT)/rF(KdpE)) und die Wahrscheinlichkeit angegeben (p: Signifikanz (t-Test)). Alle Gene waren exprimiert, die rF betrug stets ≥ 100 (Anhang CD A4).

| Gen | b-Nummer | Position [Nt] | Motivwiederholung | log ₂ Ratio | p |
|-------------|----------|---------------|----------------------------------|------------------------|-------|
| <i>yafQ</i> | b0225 | -374 | TCAGTTAAT- N_{12} -TCCGTTTAT | 0,33 | 0,084 |
| <i>dinJ</i> | b0226 | -111 | | 0,36 | 0,014 |
| <i>flgA</i> | b1072 | -575 | TCCGTTAAT- N_{13} -AACGTTTCAT | 0,20 | 0,356 |
| <i>thiK</i> | b1106 | -179 | ACAGTTAGG- N_{14} -ACAGTTTAG | 0,09 | 0,351 |
| <i>yddB</i> | b1495 | -438 | ACAGTTGGT- N_{13} -ACCGTTAAT | 0,63 | 0,039 |
| <i>mtfA</i> | b1976 | -120 | TCCGTTTCAG- N_{15} -TCCGTTTCAG | 0,08 | 0,621 |
| <i>hyfA</i> | b2481 | -136 | AACGTTAAT- N_{15} -ACCGTTTCAG | -0,95 | 0,021 |
| <i>ygdD</i> | b2807 | -322 | ACAGTTGGG- N_{13} -AACGTTTCAG | 0,41 | 0,093 |

3.3.2 Das homologe SHK/AR-System LytS/LytR aus *S. aureus*

Die AS Sequenz des gut charakterisierten SHK/AR-System LytS/LytR in *S. aureus* ist ähnlich zu YehU/YehT (29% bzw. 32% Identität, Altschul *et al.*, 1997). Es reguliert die Expression des Operons *IrgA/IrgB*, welches wiederum homolog zu *yohJ/yohK* in *E. coli* ist (Brunskill und Bayles, 1996b). *yohJ/yohK* wurden in *yehU/yehT* defizienten *E. coli* nicht differentiell im Vergleich zum WT exprimiert (Luitpold Fried, 2009, persönliche Kommunikation). Auch nach Überproduktion des AR His₆-YehT konnte kein Unterschied in der rF bezüglich der Kontrolle (in beiden Fällen ca. 800 AU) detektiert werden (siehe Anhang CD A5). His₆-YehT interagiert ebenso nicht spezifisch mit dem 6-FAM markierten 500 bp DNA-Fragment der Promotorregion des Operons. Das Fragment enthielt eine putative -35 und -10 Box. Die apparente Dissoziationskonstante betrug ca. 600 nM (Daten nicht gezeigt).

3.4 Anreicherung His₆-YehT bindender DNA Fragmente in vitro

Da die Extrapolation bekannter Datensätze (z.B. benachbarte Gene, Transkriptomanalysen *yehU/yehT* defizienter Mutanten, Oshima *et al.*, 2002) nicht zur Identifizierung YehU/YehT-abhängiger Gene führte, um YehT regulierte Gene zu identifizieren, wurden folgende in vitro Strategien angewendet, um YehT bindende DNA-Fragmente zu isolieren (2.5.10.1).

Zum einen wurde His₆-YehT in MG1655 Δ yehUT überproduziert. Nach einer globalen Quervernetzung mit Formaldehyd wurden die Zellen aufgeschlossen und His₆-YehT:DNA Komplexe analog zur His₆-YehT Reinigung extrahiert, die Quervernetzung aufgehoben und die DNA Fragmente in pBR322 kloniert. 24 klonierte Fragmente wurden sequenziert. In einem parallelen Ansatz wurde zunächst chromosomale *E. coli* DNA mit Ultraschall fragmentiert und mit immobilisiertem His₆-YehT inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten wurde die DNA extrahiert und in pUC19 kloniert. 34 unterschiedliche Plasmide wurden sequenziert.

Schließlich wurde eine *E. coli* MG1655 Genombibliothek in pUC19 hergestellt. Diese diente als Matrize für die Amplifizierung der klonierten Fragmente mit pUC19-spezifischen Oligonukleotiden via PCR. Die PCR Produkte wurden mit His₆-YehT inkubiert und His₆-YehT:DNA Komplexe gereinigt. Anschließend wurde die DNA abgetrennt und wieder mit PCR und pUC19 spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Es wird angenommen, dass so His₆-YehT bindende Fragmente systematisch und exponentiell angereichert werden (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*, SELEX). Eine Stichprobe von 19 Plasmiden wurde nach drei Anreicherungsrounden sequenziert, nachdem definierte PCR Produkte entstanden und kloniert worden waren. Alle Plasmide sind in Tab. 2.5 aufgeführt. Die Sequenzierungen ergaben, dass entgegen der Annahme der Anreicherung, stets unterschiedliche Fragmente isoliert wurden. Es wurden codierende Gensequenzen und intergene Regionen isoliert. Teilweise waren die Gene in Operonen organisiert. Die Sequenzen hatten keine gemeinsamen Motive und die Gene bzw. die Genprodukte keine gemeinsame Funktion (MEME, GLAM2, BLAST; Daten nicht gezeigt; (Altschul *et al.*, 1997, Bailey und Elkan, 1994, Frith *et al.*, 2008).

Die Expression von den 23 bzw. 34 direkt identifizierten plus 222 indirekt betroffenen Genen (Operone, benachbarte Gene) wurde mit der Transkriptomanalyse nach Überproduktion von His₆-YehT abgeglichen (Anhang CD A6). Die Expression von 23 Genen war zwischen zweifach und sechsfach erhöht. Die Expression von 34 Genen war zweifach bis 32-fach reprimiert. Nur in ca. der Hälfte der Fälle war dieses Ergebnis bezüglich des t-Tests der biologischen Experimente signifikant. Die Interaktion der angereicherten Fragmente wurde zusätzlich in vitro mit gereinigtem His₆-YehT in Gel-Retardations Experimenten (2.5.10.2) überprüft. Die K_d-Werte lagen bei ≥ 250 nM (Daten nicht gezeigt). Dies lag über dem K_d-Wert von P_{yjiY}^{-300/+1}. Keines der insgesamt 280 Gene (Anhang CD A6) bzw. der korrespondierenden Promotoren erfüllte alle Kriterien, welche für eine (YehU/YehT abhängige Expression notwendig sind: eine YehT-Bindestelle (3.7.2), eine signifikante Änderung der Expression nach YehT Überproduktion oder Deletion und eine hochaffine Interaktion mit His₆-YehT. Daher wurde gefolgert, dass mit diesen Anreicherungsverfahren

keine Fragmente isoliert bzw. Gene identifiziert werden konnten, deren Expression direkt von YehU/YehT abhängt.

3.5 Expressionsprofil aller *E. coli* Gene nach Überproduktion von His₆-YehT

Sind der detektierte Reiz eines SHK/AR-Systems und dessen regulierte Gene unbekannt, kann die Genexpression durch Überproduktion des Antwortregulators artifiziell induziert werden (Masuda und Church, 2002). Dabei reicht die erhöhte zelluläre Konzentration des DNA-bindenden Proteins aus, um Genexpression zu induzieren; es ist keine Aktivierung des AR durch eine Phosphorylierung notwendig. Die Überproduktion von His₆-KdpE Überproduktion wurde als Kontrolle benutzt, da bekannt ist, dass KdpE ausschließlich das *kdpFABC* Operon reguliert (Weber, 2003 und Kirsten Jung, persönliche Kommunikation, 2009).

In jeweils drei unabhängigen biologischen Experimenten wurden *E. coli* MG3/pBAD24-*yehT* und MG3/pBAD24-*kdpE* bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 in LB bei 37°C kultiviert. Dann wurde die *his₆-yehT*- und *his₆-kdpE*-Expression mit 0,2% (w/v) Arabinose induziert. Die Probennahme nach 45 min Induktion und die RNA Extraktion wurden wie beschrieben durchgeführt. Die Produktion von His₆-YehT und His₆-KdpE wurde mittels SDS-PAGE und immunologischem Nachweis überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Integrität der RNA wurde mittels TAE-Agarosegelelektrophorese nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Chromosomale DNA wurde durch DNase I Verdau entfernt und die RNA mit einem RNA Reinigungskit (SLG) gereinigt. Die Transkriptomanalyse mit dem Affymetrix *E. coli* 2.0 Chips wurde von der Firma KFB (Regensburg) durchgeführt.

Es wurden jeweils drei Chips für die Expressionsanalyse nach Überproduktion von His₆-KdpE und His₆-YehT hybridisiert. Die Auswertung erfolgte seitens der Firma mit der Software „MAS5“ (Affymetrix), eine parallele Auswertung erfolgte in Kooperation mit Björn Schwalb und Achim Tresch (LMU, Genzentrum) mittels „R“ (Daten nicht gezeigt). In beiden Fällen wurde in der Auswertung stets die Ansätze der His₆-YehT-Überproduktion als Experiment- und die der His₆-KdpE-Überproduktion als Kontroll-Gruppe definiert. Die Auswertungen stimmten, bis auf wenige Details (Daten nicht gezeigt) überein. Alle hier präsentierten Daten beziehen sich auf die Auswertung des KFB (Regensburg). Als Qualitätskontrolle wurde die log₂-Intensitäten der rF von jedem signifikant differentiell exprimierten Gen eines Microarrays a) gegen die Replikate innerhalb der eigenen Gruppen und b) gegen die Replikate der jeweils anderen Gruppen geplottet (Abb. 3.2). Die Streuung innerhalb der His₆-YehT- und His₆-KdpE-Überproduktion Gruppe ist sehr gering: 96% der rF-Werte waren im Durchschnitt in der KdpE Gruppe identisch, während 98,6% der Werte in der YehT Gruppe identisch waren. Werden die einzelnen Replikate der YehT Gruppe gegen die Replikate der KdpE

Gruppen aufgetragen, werden deutliche Unterschiede im Expressionsmuster anhand der Korrelation von nur noch ca. 77% deutlich. Dies bedeutet, dass die einzelnen Replikate innerhalb His₆-YehT- bzw. His₆-KdpE-Gruppe gut korrelieren und dass die Überproduktion von His₆-KdpE ein anderes globales Expressionsprofil erzeugt, als die von His₆-YehT.

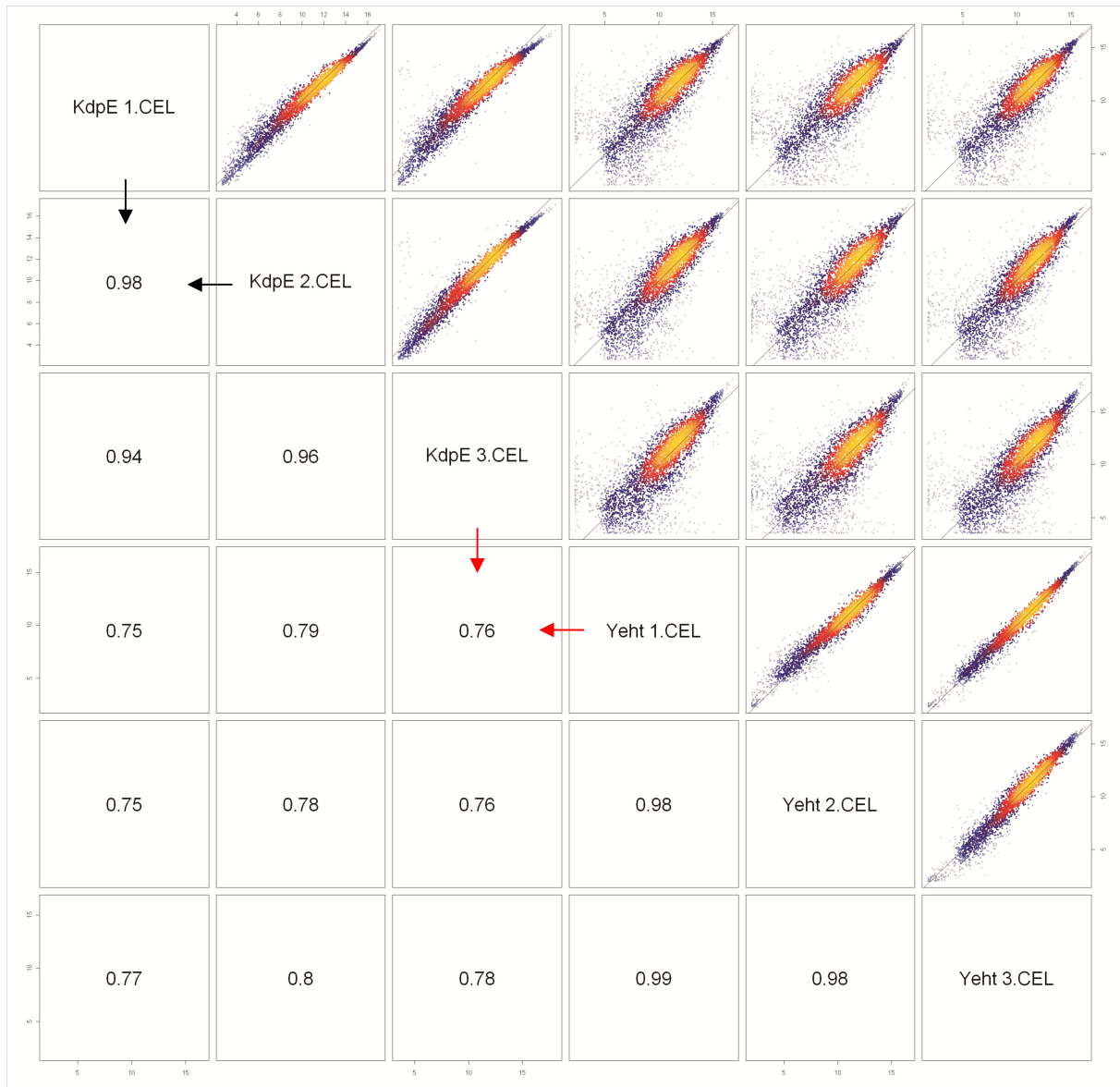


Abbildung 3.2: Scatterplot der log₂ Intensitäten der ca. 700 signifikant differentiell exprimierten Gene nach der His₆-YehT und His₆-KdpE Überproduktion. KdpE1-3 repräsentieren den log₂-Wert der rF der einzelnen, differentiell regulierten Gene der drei parallel angefertigten Microarrays bei His₆-KdpE Überproduktion (Kontrollgruppe), YehT 1-3 analog die Ergebnisse der His₆-YehT Überproduktion (Versuchsgruppe). Im Plot wird der log₂-Wert der rF jedes Gens eines Replikats gegen den log₂-Wert der rF aller anderen Replikate aufgetragen (Zahlenwerte am Rand der Kästen). Dadurch wird die Korrelation der einzelnen Replikate einer Gruppe bzw. die Korrelation der Replikate unterschiedlicher Gruppen visualisiert. Wird z.B. die log₂-Werte der rF jeden Gens des Microarrays KdpE1 gegen die log₂-Werte der rF des jeweiligen Gens des Replikats KdpE2 geplottet, angedeutet durch die schwarzen Pfeile, ergibt sich der Quotient 0,98, also eine 98%ige Übereinstimmung. Wird hingegen KdpE3 gegen YehT1 geplottet, beträgt der Quotient 0,76 (rote Pfeile). Die Streuung der Punkte ist somit ein Maß für die Differenz der Expression. Diese Auswertung wurde von Björn Schwalb (AG Achim Tresch, Genzentrum LMU) angefertigt und zur Verfügung gestellt.

Als interne Kontrolle wurde die Expression von *yehT*, *kdpE* und *kdpFABC* gewertet, siehe Tab. 3.5. *kdpE* (ca. 900 rF) und *yehT* (ca. 2000 rF) werden konstitutiv exprimiert, die Expression konnte signifikant gesteigert werden. In MG3 ist ein *yehT* Transkript vorhanden, da *yehT* durch die Insertion einer Resistenzkassette unterbrochen und somit inaktiviert war. Daher wurde davon ausgegangen, dass das Gen zwar abgelesen wird (was zu einem positiven Signal führt), aber kein funktionelles Protein produziert wurde. Das *yehT*-Transkript wurde außerdem durch Northern Blot Hybridisierung visualisiert. Die Größe betrug ca. 2000 Nukleotide, was der Summe aus *yehT* und der Kassette entspricht (Luitpold Fried, 2010, persönliche Kommunikation). Die Gene des *kdpFABC*-Operons wurden in der YehT-Gruppe zwischen 50 rF und 600 rF exprimiert, die Überproduktion von His₆-KdpE führte zu einer 16-fachen bis 64-fachen Erhöhung der rF-Werte (Tab. 3.5). Dies wurde als interne Kontrolle gewertet: Die artifizielle Überproduktion des AR His₆-KdpE führte zur Stimulus unabhängigen, signifikanten Expression des *kdpFABC* Operons.

Tabelle 3.5: Expression von *yehT*, *kdpE* und *kdpFABC* nach Überproduktion von His₆-YehT und His₆-KdpE. Die AR His₆-YehT und His₆-KdpE wurden in *E. coli* MG3 wie im Text beschrieben überproduziert, die RNA gereinigt und das Expressionsprofil mit Affymetrix *E. coli* Genom 2.0 Chips durch die Firma KFB analysiert. Die Auswertung erfolgte seitens des KFB mit der Software MAS5. Die relative Fluoreszenz (dimensionslos) ist ein Maß für die Menge an Transkript in der analysierten Probe. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzen für die angegebenen Gene. Da *kdpFABC* ausschließlich von KdpD reguliert wird, wurde deren Expression als interne Positivkontrolle des Versuchs gewertet.

rF: Arithmetisches Mittel der relativen Fluoreszenz der *E. coli* Genom 2.0 Chip Auswertung dreier biologischer Experimente bei His₆-YehT oder His₆-KdpE Überproduktion, b-Nummer: *E. coli* MG1655 Identifikationsnummer, log₂ ratio: Logarithmus zur Basis 2 des Verhältnisses rF(YehT)/rF(KdpE), p: Signifikanz (t-Test) anhand der einzelnen (nicht aufgeführten) rF-Werte.

| Gen | b-Nummer | rF (YehT) | rF (KdpE) | log ₂ ratio | p |
|-------------|----------|-----------|-----------|------------------------|---------|
| <i>yehT</i> | b2125 | 11244,5 | 2059,2 | 2,45 | ≤ 0,01 |
| <i>yehU</i> | b2126 | 634,9 | 1090,3 | - 0,75 | 0,065 |
| <i>kdpE</i> | b0694 | 931,1 | 17376,5 | -4,17 | 0,013 |
| <i>kdpD</i> | b0695 | 564,6 | 7374,4 | -3,71 | ≤ 0,001 |
| <i>kdpF</i> | b4513 | 51,2 | 5018,7 | -6,63 | ≤ 0,001 |
| <i>kdpA</i> | b0698 | 593,8 | 10203,6 | -4,10 | ≤ 0,001 |
| <i>kdpB</i> | b0697 | 424,7 | 7567,3 | -4,16 | ≤ 0,001 |
| <i>kdpC</i> | b0696 | 627,1 | 10131,6 | -4,02 | ≤ 0,001 |

Innerhalb der Parallelen (Anhang CD A1) waren insgesamt über 700 Gene differentiell exprimiert, davon ca. 300 signifikant im Bezug auf Signalintensität (relative Fluoreszenz ≥ 100) und Streuung (p ≤ 0,001). Wegen der artifiziellen Rahmenbedingungen wurden in den

folgenden Analysen ausschließlich diejenigen Gene berücksichtigt, deren Expressionsniveau in mindestens einer Gruppe (His₆-YehT- oder His₆-KdpE-Überproduktion) mindestens 100 relative Fluoreszenzeinheiten (rF) aufwiesen und die Änderung der Expression mindestens achtfach war. Intergene Bereiche wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt. In Tab. 3.6 und Anhang CD A7 sind die 37 signifikant regulierten Gene dargestellt, welche im Folgenden näher analysiert wurden. 14 Gene wurden bei His₆-YehT-Überproduktion verstärkt exprimiert, 23 Gene wurden reprimiert. Im Folgenden wurde analysiert, ob die verstärkte bzw. verminderte Expression direkt abhängig von His₆-YehT oder His₆-KdpE war, oder ob es sich um indirekte Effekte handelte.

Tabelle 3.6: Gene mit den höchsten Expressionsunterschieden nach Überproduktion von His₆-YehT und His₆-KdpE. Die AR His₆-YehT und His₆-KdpE wurden in *E. coli* MG3 wie im Text beschrieben überproduziert, die RNA gereinigt und das Expressionsprofil mit Affymetrix *E. coli* Genom 2.0 Chips durch die Firma KFB analysiert. Die Auswertung erfolgte seitens des KFB mit der Software MAS5. Die relative Fluoreszenz (dimensionslos) ist ein Maß für die Menge an Transkript in der analysierten Probe. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzen für die angegebenen Gene.

rF: Arithmetisches Mittel der relativen Fluoreszenz der *E. coli* 2.0 Chip Auswertung dreier biologischer Experimente bei His₆-YehT oder His₆-KdpE Überproduktion, b-Nummer: *E. coli* MG1655 Identifikationsnummer, log₂ ratio: Logarithmus zur Basis 2 des Verhältnisses rF(YehT)/rF(KdpE), p: Signifikanz (t-Test) anhand der einzelnen (nicht aufgeführten) rF-Werte. NB: Transkriptionsanalyse mittels Northern Blot, Daten wurden freundlicherweise von Luitpold Fried (2010) zur Verfügung gestellt. Transkripte der angeführten Gene wurden in der Gesamt-RNA von MG1655Δ*yehUT*, MG3 und MG1655 nach His₆-YehT- und His₆-KdpE-Überproduktion nachgewiesen. Die Kultivierung der Zellen und die RNA Präparation entsprach der im Text beschriebenen Vorgehensweise. YehT↑: durch YehT Überproduktion exprimiert, YehT↓: durch YehT Überproduktion reprimiert, KdpE↑: durch KdpE Überproduktion exprimiert KdpE↓: durch YehT Überproduktion reprimiert. Fett markiert sind diejenigen Gene und korrespondierenden Daten, deren Expression auch im NB von der His₆-YehT Überproduktion abhängen.

| Gen | b-Nummer | rF (YehT) | rF (KdpE) | log ₂ Ratio | p | NB |
|--------------|--------------|---------------|--------------|------------------------|-------------------------|---------------|
| yjiY | b4354 | 9171,5 | 46,3 | 7,64 | ≤10⁻³ | YehT ↑ |
| evgA | b2369 | 3023,6 | 71,8 | 5,40 | ≤10⁻³ | YehT ↓ |
| yobA | b1841 | 3175,0 | 171,8 | 4,21 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↓ |
| nlpA | b3661 | 1318,3 | 73,8 | 4,15 | 0,003 | YehT ↓ |
| evgS | b2370 | 737,7 | 42,2 | 4,15 | ≤10⁻³ | YehT ↓ |
| G7562 | b3007 | 4623,0 | 310,0 | 3,94 | ≤10⁻³ | YehT ↓ |
| yebZ | b1840 | 2097,9 | 147,9 | 3,84 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↓ |
| nupA | b0411 | 1728,1 | 144,0 | 3,57 | 0,001 | KdpE ↓ |
| ivbL | b3672 | 3713,8 | 329,2 | 3,51 | ≤10⁻³ | YehT ↓ |
| ompT | b0565 | 8207,4 | 765,5 | 3,48 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↓ |
| yahN | b0328 | 529,2 | 56,6 | 3,33 | ≤10⁻³ | YehT ↓ |
| yebK | b1853 | 1884,9 | 210,3 | 3,17 | ≤10⁻³ | YehT ↓ |

Tabelle 3.6: Gene mit den höchsten Expressionsunterschieden nach Überproduktion von His₆-YehT und His₆-KdpE (Fortsetzung).

| Gen | b-Nummer | rF (YehT) | rF (KdpE) | log2 Ratio | p | NB |
|--------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|-------------------------|------------------|
| <i>cysB</i> | b1275 | 1887,0 | 229,7 | 3,04 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↓ |
| <i>kdsB</i> | b0918 | 2393,5 | 300,4 | 3,00 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↓ |
| <i>cspl</i> | b1552 | 304,1 | 2481,7 | -3,03 | 0,010 | YehT ↓ |
| <i>fimB</i> | b4312 | 952,3 | 7806,3 | -3,08 | 0,001 | KdpE ↑ |
| <i>yhhH</i> | b3483 | 122,4 | 1101,1 | -3,19 | ≤10 ⁻³ | kein Transkript |
| <i>yadC</i> | b0135 | 54,4 | 512,6 | -3,24 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↑ |
| <i>yigF</i> | b3817 | 54,4 | 512,6 | -3,30 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↑ |
| <i>ryjA</i> | b4459 | 41,1 | 406,1 | -3,31 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↑ |
| <i>gadB</i> | b1493 | 746,3 | 7343,4 | -3,53 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↑ |
| <i>iraM</i> | b1160 | 175,5 | 2032,4 | -3,57 | 0,004 | kein Unterschied |
| <i>yhaI</i> | b3104 | 93,7 | 1106,7 | -3,58 | ≤10 ⁻³ | kein Transkript |
| <i>arpB</i> | b1721 | 35,2 | 416,4 | -3,88 | 0,001 | KdpE ↑ |
| <i>ybbC</i> | b0498 | 35,2 | 416,4 | -4,18 | 0,001 | KdpE ↑ |
| <i>alsA</i> | b4087 | 175,3 | 3111,2 | -4,39 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↑ |
| <i>yibG</i> | b3596 | 25,5 | 529,9 | -4,47 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↑ |
| <i>yeiL</i> | b2163 | 26,9 | 592,5 | -4,47 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↑ |
| <i>yfcV</i> | b2339 | 45,7 | 1016,4 | -4,56 | 0,003 | KdpE ↑ |
| <i>ytfI</i> | b4215 | 11,2 | 182,7 | -4,76 | 0,008 | KdpE ↑ |
| <i>yfiL</i> | b2602 | 30,2 | 827,7 | -4,96 | 0,001 | KdpE ↑ |
| <i>yIbH</i> | b0499 | 179,9 | 5478,0 | -5,13 | 0,001 | KdpE ↑ |
| <i>ybcK</i> | b0544 | 72,5 | 2540,8 | -5,19 | ≤10 ⁻³ | KdpE ↑ |
| <i>fimE</i> | b4313 | 10,9 | 396,6 | -5,28 | 0,003 | KdpE ↑ |
| <i>yhjX</i> | b3547 | 81,1 | 3120,9 | -5,33 | ≤10⁻³ | YehT ↓ |
| <i>arpB</i> | b1720 | 197,3 | 7979,1 | -6,92 | 0,000 | KdpE ↑ |
| <i>ypjB</i> | b2649 | 14,9 | 1786,7 | -8,26 | ≤10⁻³ | YehT ↓ |

3.6 Evaluation der Transkriptomanalyse

Die Analyse der rF-Werte gab keine Aufschlüsse über direkte und indirekte Effekte auf die Genexpression nach einer AR-Überproduktion. Die Expression der in Tab. 3.6 gelisteten Gene wurde in den *E. coli* Stämmen MG1655Δ*yehUT*, MG3 und MG1655 nach His₆-YehT-

und His₆-KdpE-Überproduktion mittels Northern Blot Hybridisierung analysiert (Fried, 2010, persönliche Kommunikation). Wegen des unterschiedlichen genetischen Hintergrunds der Stämme konnten einige falsch positive bzw. falsch negative Regulationsmechanismen identifiziert werden. 23 Gene wurden ausschließlich durch His₆-KdpE-Überproduktion differentiell exprimiert. Bei den Genen *evgA/evgB*, *b3007*, *ivbL*, *yahN*, *yebK* und *nlpA* lieferte die NB Analyse konträre Ergebnisse zu den Microarray Daten. Die unterschiedlichen Ergebnisse bzgl. der Expression der genannten Gene lässt sich wie folgt erklären: Im WT, der nicht in der Microarray Analyse berücksichtigt wurde, war die Expression dieser Gene deutlich höher als in der His₆-YehT-Überproduktion-Gruppe und in der His₆-KdpE-Überproduktion-Gruppe. Die His₆-YehT-Überproduktion reduzierte die Expression der Gene gegenüber dem WT, und die His₆-KdpE-Überproduktion reduzierte die Expression noch stärker (Luitpold Fried, persönliche Kommunikation, 2010).

Die Expression der Gene *yjiY*, *b3007*, *cspl*, *evgA/evgS*, *ivbL*, *nlpA*, *yahN*, *yebK*, *ypjB* und *yhjX* wurde ausschließlich in Abhängigkeit von der His₆-YehT-Überproduktion reguliert (Tab. 3.6). Die folgenden Analysen wurden nur bezüglich dieser Gene durchgeführt.

3.6.1 *In silico* Analyse der 5'-UTR YehT-abhängig exprimierter Gene

Die korrespondierenden Promotorregionen wurden zunächst *in silico* nach gemeinsamen Sequenzmotiven durchsucht. Die stromaufwärts gelegenen potentiellen regulatorischen Sequenzen wurden mit MEME und GLAM2 verglichen (Bailey und Elkan, 1994, Frith *et al.*, 2008). Zusätzlich wurden potentielle -35/-10 Boxen mit BProm (siehe unten) vorhergesagt. Weder in stark erweiterten Sequenzen (-1000 Nt relativ zum Translationsstartpunkt) noch in 200 Nt stromaufwärts der putativen -35/-10 Box gelegenen Sequenzen aller Kandidaten konnten gemeinsame Motive ermittelt werden. Im direkten Vergleich der *yjiY* und *yhjX* stromaufwärts gelegenen Sequenzen wurde ein gemeinsames Motiv identifiziert, welches zudem eine Ähnlichkeit zur beschriebenen LytTR Konsensus DNA-Bindesequenz hat (Abb. 3.3). Allerdings lag dieses Motiv 682 Nt (*yjiY*) bzw. 1169 Nt (*yhjX*) stromaufwärts des Translationsstartpunkts. Diese *far upstream sequences* (FUS) Bindesequenzen wurden in pUC19 kloniert, 6-FAM-markierte DNA-Fragmente hergestellt und die Interaktion mit His₆-YehT mit Gel Retardationsexperimenten analysiert. Die Spezifität der Bindung wurde anhand mutierter Sequenzen überprüft, in welchen die Konsensussequenz systematisch mutiert wurde (Purin gegen Pyrimidin: A gegen C; T gegen G). In allen Fällen lag die Dissoziationskonstante bei ca. 600 nM (Daten nicht gezeigt). Es gab keine Unterschiede der Interaktion mit His₆-YehT zwischen den originalen und den mutierten Sequenzen. Daraus wurde gefolgert, dass His₆-YehT diese Sequenz nicht spezifisch bindet.

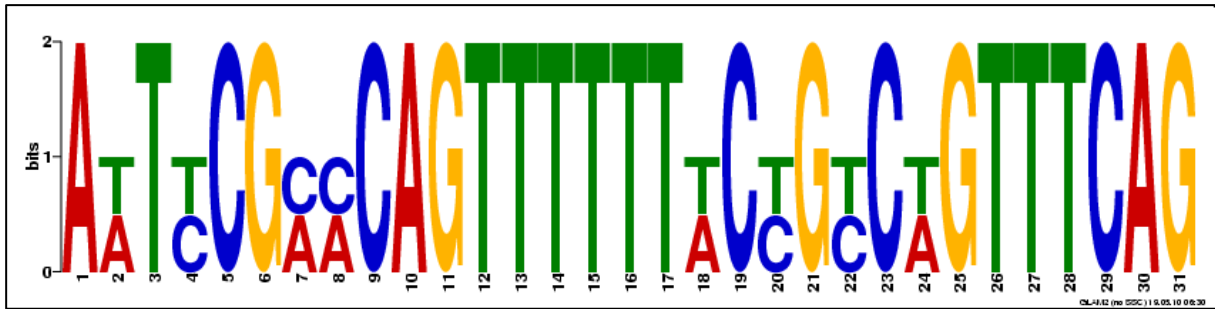


Abbildung 3.3: LytTR-ähnliche *far upstream sequence* stromaufwärts von *yhjX* und *yjiY*. Die Sequenz wurde mit MEME (2.6.2) 682 bp Stromaufwärts von *yjiY* und 1169 bp stromaufwärts von *yhjX* identifiziert (Bailey und Elkan, 1994). Die Graphik wurde mittels MEME erstellt. Auffällig ist die Wiederholung des zentralen Motivs GTTN (Nukleotide 11, 12, 13 und 25, 26, 27) der LytTR-artigen Konsensus DNA-Bindesequenz [TA][AC][CA]GTTN[AG][TG].

3.6.2 Kartierung der Transkriptionsstartpunkte (5'RACE)

Diese Ergebnisse führten zu einer grundlegenden Änderung der Strategie: Es wurde angenommen, dass nicht alle in Tab. 3.6 angeführten Gene direkt von YehT reguliert werden. Es wurde zudem angenommen, dass YehT nicht zwangsläufig an eine LytTR-artige Konsensus DNA-Bindesequenz bindet. Um die Identifizierung der YehT-Bindesequenz zu vereinfachen, wurde daher für jeweils sieben positiv (*evgA* und *evgS* bilden ein Operon) und drei negativ durch His₆-YehT-Überproduktion regulierte Gene der Transkriptionsstartpunkt mittels 5'-RACE identifiziert.

Ausgangsmaterial war die identische Gesamt-RNA, welche auch für die Transkriptomanalyse herangezogen wurde. Die RNA wurde am 5'-Ende mit 5'-RNA-Polyphosphatase dephosphoryliert (Kontrolle: keine Dephosphorylierung), an einen RNA-Adapter ligiert und mit Gen-spezifischen Oligonukleotiden in cDNA umgeschrieben. Diese wurde als Matrize für PCR Reaktionen mit jeweils einem Gen-spezifischen und einem Adaptor-spezifischem Oligonukleotid verwendet. Dieses PCR Produkt wurde zum einen auf einem 2%-igen (w/v) Agarose-Gel analysiert, ein Aliquot wurde für eine sekundäre PCR mit verschachtelten Oligonukleotiden eingesetzt. Das Ergebnis für die ausschließlich YehT-abhängig regulierten Gene (Tab. 3.6) ist in Abb. 3.4 dargestellt. Im Falle der *yjiY*, *nlpA*, *yhjX* und *ypjB* 5'-UTR wurde nur eine Bande im Versuchsansatz detektiert, in der Kontrolle befanden sich keine PCR-Produkte. In den übrigen Fällen wurden weitere PCR-Produkte detektiert. Diese können auf unspezifische Amplifizierung, prozessierte oder degradierte RNA zurückgeführt werden.

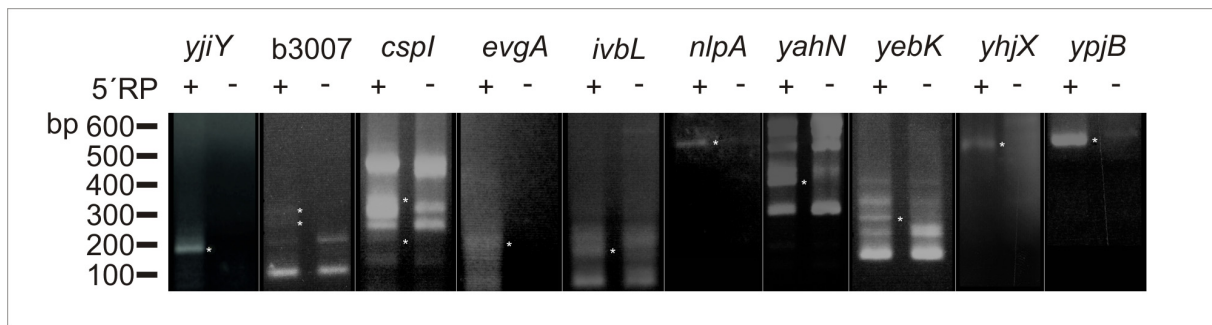


Abbildung 3.4: Amplifikate der 5'-UTR potentieller Zielgene von YehU/YehT. Gezeigt ist ein 2%iges (w/v) Agarose-Gel, auf welchem die zweite PCR aufgetrennt wurde, um die Transkriptionsstartpunktes der oben angeführten Gene zu kartieren (2.4.12). Die Fragmentgröße wurde anhand der 2log DNA Standard Leiter ermittelt. Mit weißem * sind diejenigen Fragmente gekennzeichnet, welche nur im Versuchansatz (+: 5'-RNA-Polyphosphatase RPP) und nicht in der Kontrolle (-: ohne Enzym) vorkamen. Die markierten Fragmente wurden gereinigt, kloniert und sequenziert.

PCR Fragmente, welche nur im Versuchansatz (dephosphorylierte RNA) und nicht in der Kontrolle (keine Dephosphorylierung) vorhanden waren, wurden in pUC19 kloniert und sequenziert (2.4.12). Der jeweilige Transkriptionsstartpunkt wurde durch Sequenzalignments der Sequenzierungsdaten und der WT-Genomsequenz bestimmt (Daten nicht gezeigt). In vier Fällen wurden mehrere unterschiedlich lange Fragmente aus einer extrahierten Bande kloniert und sequenziert. Dieser Unterschied ist in einem 2% (w/v) Agarose-Gel nicht aufzulösen. Der Transkriptionsstartpunkt lag, relativ zum Translationsstartpunkt, bei Nt -88 im Fall von *yjiY*, -97/-123/-156 bei *b3007*, -45/-145 bei *cspI*, -114/-124 bei *evgA/evgB*, -28 bei *ivbL*, -24 bei *nlpA*, -78 bei *yahN*, -54/-62 bei *yebK*, -37 bei *yhjX* und -389 bei *ypjB*. Die vollständig kartierte *yjiY* 5'-UTR ist in Abb. 3.7 dargestellt, die übrigen sind nicht gezeigt.

3.6.3 His₆-YehT:Promotor Interaktion

Alle potentiellen Promotoreregionen wurden anschließend systematisch in pUC19 kloniert. Es wurden jeweils ein Fragment ± 150 bp um den Transkriptionsstartpunkt hergestellt, bzw. wurden drei korrespondierende 100 bp große Teilfragmente hergestellt. Alle Fragmente konnten somit durch Amplifizierung mit 6-FAM-konjugiertem Primer hergestellt und markiert werden. Gel-Retardationsexperimente sollten klären, ob His₆-YehT in vitro spezifisch mit den potentiellen Promotorregionen interagiert. Der Versuchsaufbau war analog zu 3.1.2.3. Die Wechselwirkung mit den 300 bp Fragmenten (*cspI* 400 bp) aller Promotoren wurde mit EMSA getestet (Abb. 3.5), die Fluoreszenz der freien DNA quantifiziert (Daten nicht gezeigt) und der K_d -Wert berechnet. Als Kontrolle diente der *lysP* Promoter (276 bp; Ruiz *et al.* 2011) und die pUC19 *multiple cloning site* (117 bp), die mit den selben Oligonukleotiden amplifiziert wurde. His₆-YehT hatte die höchste Affinität zu $P_{yjiY-300/+1}$ (K_d ca. 75 nM).

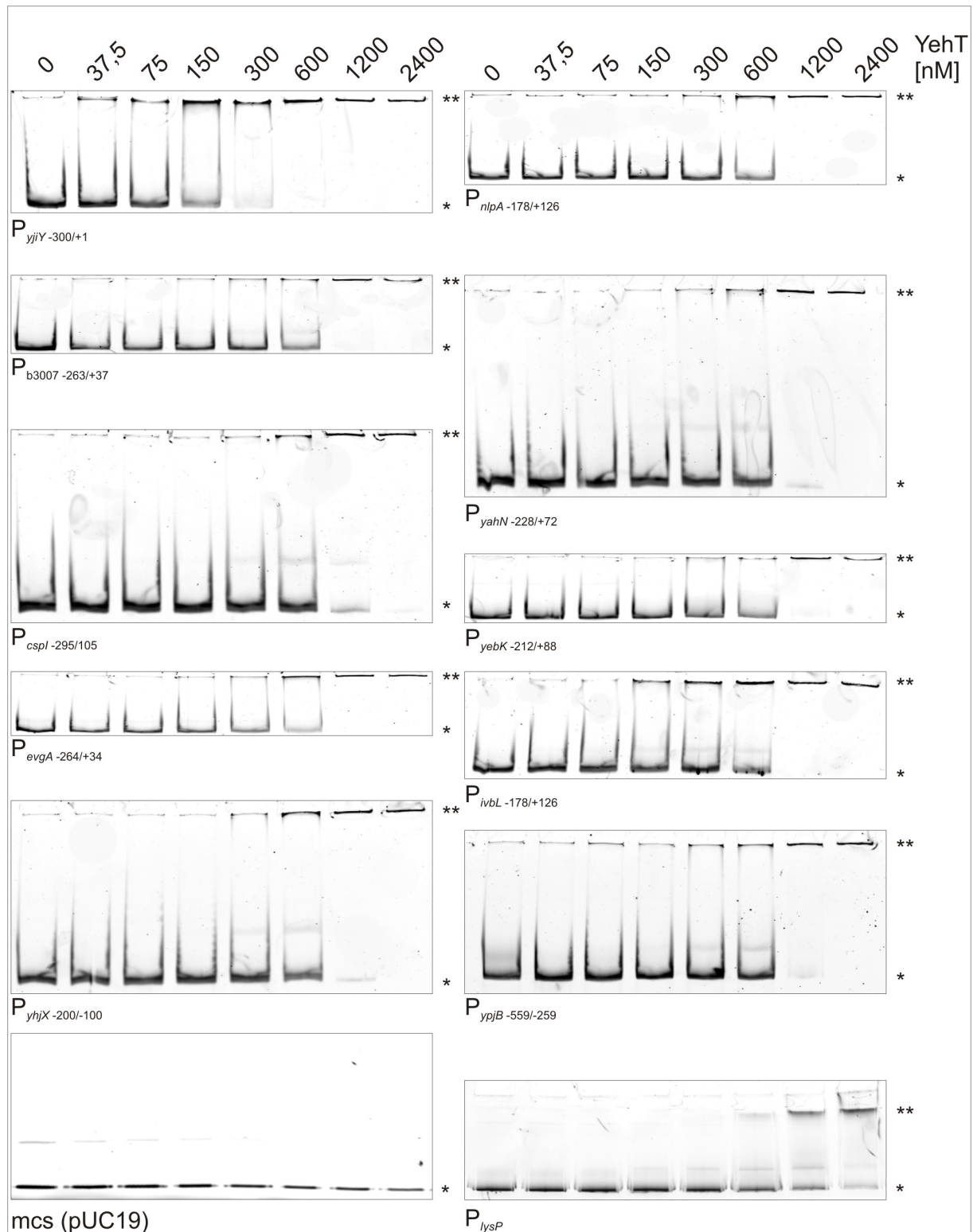


Abbildung 3.5: Bindung von His₆-YehT an putative Promotoren DNA. 6-FAM markierte DNA-Fragmente der 5'-UTR der genannten Gene wurden mit gereinigtem His₆-YehT in steigenden Konzentrationen zwischen 0 und 2400 nM inkubiert. Die Lage der Fragmente ist relativ zum Translationsstartpunkt angegeben. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 7,5%igen (w/v), TAE gepuffertem PAA-Gel (2.5.10.2). Freie DNA-Fragmente (*) konnten bei den Experimenten in das Gel einlaufen, DNA-YehT-Komplexe (**) verblieben aufgrund der größeren Masse in den Taschen bzw. wanderten nur geringfügig in das Gel ein. Neben den Promotoren der Gene *yjiY*, *b3007*, *cspI*, *evgA*, *yhjX*, *nlpA*, *yahN*, *yebK*, *ivbL*, und *ypjB* wurde als Kontrollen die *multiple cloning site* (mcs) von pUC19 und der *lysP* Promoter P_{lysP} getestet. Letzterer wurde freundlicherweise von Jimena Ruiz zur Verfügung gestellt (Ruiz *et al.*, 2011). Details zu den DNA-Fragmenten sind dem Text zu entnehmen.

His₆-YehT band die übrigen 5'-UTR DNA-Fragmente mit geringerer Affinität von 350 nM (b3007), 275 nM (*cspI*), 300 nM (*evgA/evgB*), 625 nM (*ivbL*), 275 nM (*nlpA*), 250 nM (*yahN*), 350 nM (*yebK*), 800 nM (*ypjB*) und 900 nM (*lysP*). Die *multiple cloning site* von pUC19 wurde nicht gebunden. Die Unterschiede der Affinität von His₆-YehT zu den Kontrollenfragmenten ist auf unterschiedliche Fragmentgröße (117 bp *multiple cloning site* – 276 bp P_{*lysP*}) zurückzuführen. Anhand dieser Affinitäten konnte die Spezifität der Interaktion von His₆-YehT mit DNA abgeschätzt werden. Es wurde willkürlich festgelegt, dass unspezifische Interaktionen einen mindestens dreifach höheren K_d-Wert als P_{*yjiY*}^{-300/+1} aufweisen. Die apparenten Dissoziationskonstanten der Bindung von His₆-YehT und His₆-YehT-D54E waren annähernd identisch und lagen bei ca. 75 nM (*yjiY*) bzw. ca. 250 nM – 600 nM bei den übrigen Fragmenten (Daten nicht gezeigt).

3.7 Der *yjiY* Promotor P_{*yjiY*}

His₆-YehT interagiert signifikant und affin mit der potentiellen regulatorischen DNA-Sequenz von *yjiY* (3.6.2.1). Die Interaktion wurde im Detail charakterisiert. Zunächst wurde die YehT Bindestelle mittels DNase I Schutzexperimenten kartiert. Das Ergebnis wurde dann mit Gel-Retardationsexperimenten bestätigt und die potentielle Bindestelle *in silico* und *in vitro* im Detail definiert.

3.7.1 Eingrenzung der YehT Bindestelle: DNase I Schutzexperiment

Zur Bestimmung des DNA-Bindemotivs von YehT im 5'-UTR regulatorischen Bereich von *yjiY*, wurden DNase I-Schutzexperimente durchgeführt (2.5.10.3). 6-FAM-markierte P_{*yjiY*}^{-300/+1} DNA wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen His₆-YehT prä-inkubiert und dann mit unterschiedlichen Mengen DNase I verdaut. Die Fragmentgrößen der DNA wurden in einem ABI 3730 Sequencer relativ zu den Standard GSLIZ 500_3730 bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Peakscanner Software v1.0 (2.6.3). Geschützte Sequenzen wurden optisch identifiziert und die Position anhand des Längenstandards festgelegt. In Abb. 3.6 sind die *footprints* des gesamten Fragments und zwei Ausschnitte (bp 115 – 235 bp bzw. 140 – 215, Abb. 3.6 B und C dargestellt. Ein Schutzeffekt zeigt sich durch die Verringerung von Fluoreszenzsignalen, da die Bindung des Proteins die Degradation durch die DNase I verhindert. Die Fluoreszenzsignale ohne His₆-YehT Schutz sind rot gefärbt (nähere Angaben siehe Abb. 3.6). 58 bp von P_{*yjiY*}^{-300/+1}, welche -131 bp bis -189 bp (relativ zum Translationsstartpunkt) lagen, wurde durch His₆-YehT vor DNase I Verdau geschützt.

Der Schutzeffekt konnte mit steigender His₆-YehT Konzentration titriert werden (Abb. 3.6 C).

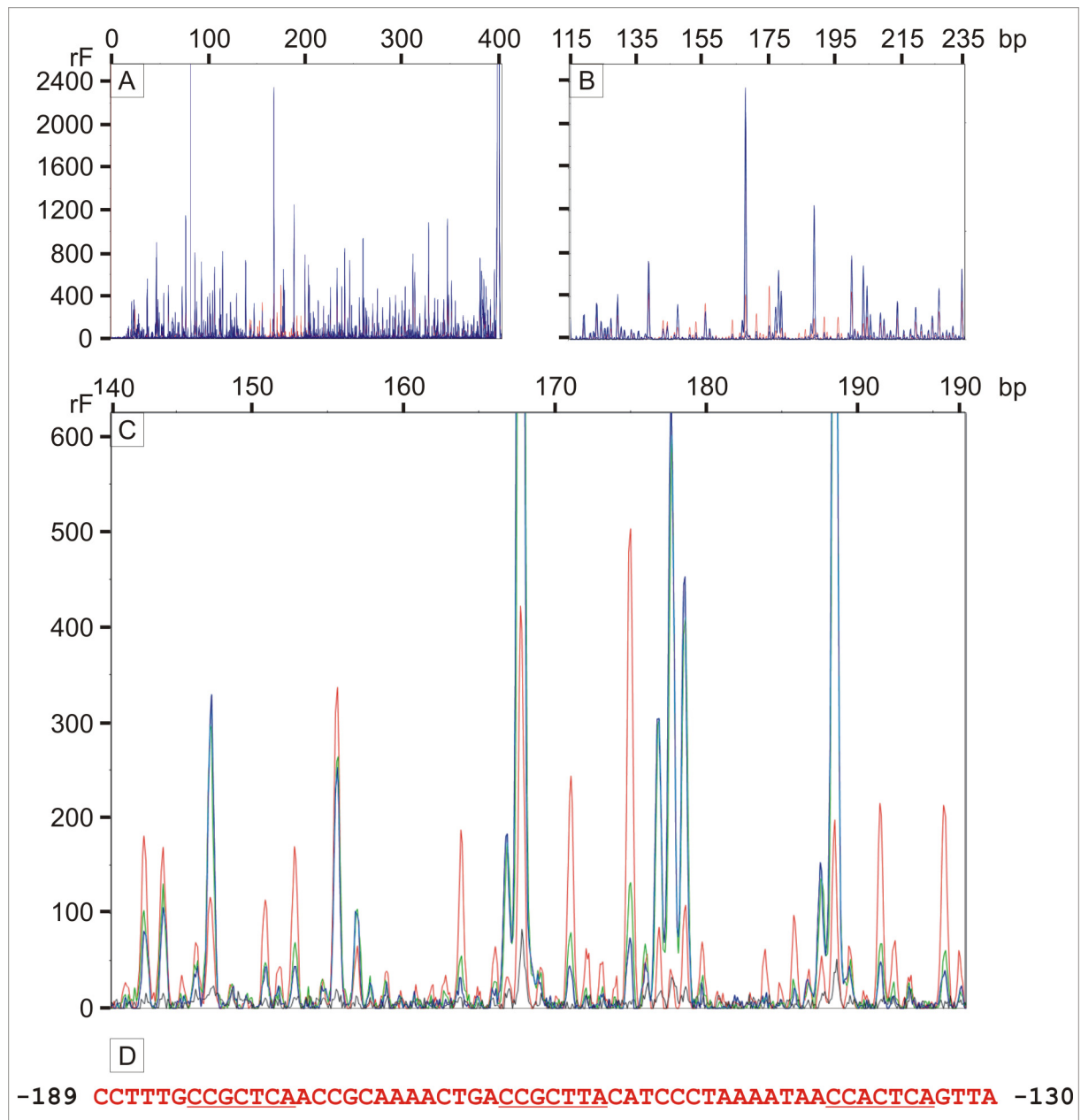


Abbildung 3.6: YehT schützt ein definiertes Fragment der *yjiY* 5'-UTR vor DNase I Verdau. Der DNase I footprint wurde wie unter 2.5.10.3 beschrieben durchgeführt und ausgewertet (2.6.3). 6-FAM markierte P_{*yjiY*-300/+1} DNA wurde 2 min mit 0,01 U DNase I und mit unterschiedlichen Konzentrationen His₆-YehT inkubiert. Rote Linie 0 nM, grüne Linie 1,35 mM (nur in C) blaue Linie 2,7 mM, schwarze Linie 5,4 mM (nur in C) His₆-YehT. A) Übersicht über das Gesamtlängen P_{*yjiY*-300/+1} Konstrukt nach DNase I Verdau. B) Ausschnitt des gleichen Ansatzes von Basenpaar 115 – 235 des Fragments. C) Detaillierte Ansicht der Fragmentlängenanalyse des Bereichs von bp 140 - 195 bp des Gesamtfragments mit unterschiedlichen His₆-YehT Konzentrationen. D) Geschützte Sequenz, unterstrichen ist eine Motivwiederholung. Das Gesamtfragment hat 403 bp, da es aus pUC19 mit Standardprimern amplifiziert wurde und daher am 5'- und an 3'-Ende Sequenzen der multiplen Klonierseite von pUC19 vorhanden sind. Alle Positionsangaben in A, B und C beziehen sich auf das 403 bp Testfragment. Die unter D angeführte Position bezieht sich auf die Lage der geschützten Sequenz relativ zum Translationsstartpunkt von *yjiY* auf dem *E. coli* MG1566 Chromosom. Die Größe der Fragmente wurde von der Peakscanner Software v1.0 automatisch anhand eines beigefügten Längenstandards berechnet. rF relative Fluoreszenz, dimensionslos.

Dies bedeutet, dass der Schutzeffekt mit höherer His₆-YehT Konzentration sich ausschließlich in der beschriebenen Region erhöhte. Die Fluoreszenzsignale aller His₆-YehT-Konzentrationen (inkl. BSA Kontrolle) waren im übrigen Fragment annähernd deckungsgleich. Die exakte geschützte Sequenz ist in Abb. 3.6 D dargestellt. Eine in silico Analyse mit MEME (Bailey und Elkan, 1994) lieferte eine mögliche Interpretation dieser Sequenz. In der geschützten Sequenz liegt das Motiv CCGCTCA-N₁₃-CCGCTTA-N₁₄-CCACTCA bzw. eine dreifache Wiederholung des Motivs CC[GA]CT[CA]A, welches durch einen 13 Nt bzw. einen 14 Nt *spacer* getrennt ist. Wird die Motivsuche in den ungeschützten Bereich ausgedehnt, kann eine weitere (weniger) konservierte Wiederholung des Motivs 13 bp stromaufwärts der geschützten Sequenz identifiziert werden. Das 3'-Ende des gesamten Motivs liegt 13 bp stromaufwärts der putativen -35 Box und -135 bp relativ zum Translationsstartpunkt (Abb. 3.7).

3.7.2 Definition der His₆-YehT Bindestelle in P_{yjiY}

Das DNase I Schutzexperiment verdeutlichte eine spezifische Interaktion zwischen His₆-YehT und der Sequenz von -131 bp bis -189 bp relativ zum Translationsstartpunkt von *yjiY*. Die Interaktion sollte bestätigt und das in silico vorgeschlagene Bindemotiv genauer definiert werden. P_{yjiY -300/+1} wurde in drei 100 bp Fragmente geteilt und die Bindung an His₆-YehT bestimmt (Abb. 3.7 und 3.8).

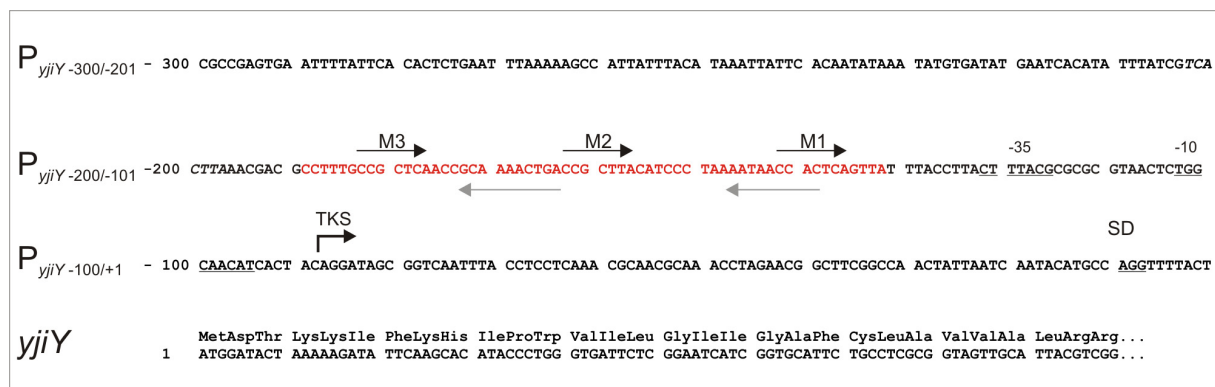


Abbildung 3.7: Karte des *yjiY* Promotors. *yjiY* wurde im Zuge der Charakterisierung des *E. coli* K12 Genoms annotiert (Riley *et al.*, 2005). Die Gensequenz (Startcodon Nukleotid 1), die stromaufwärts gelegene 5'-UTR und die korrespondierende AS Sequenz wurden (Keseler *et al.*, 2009) übernommen und sind in Auszügen dargestellt. P_{yjiY -100/+1}, P_{yjiY -200/-101} und P_{yjiY -300/-201} entsprechen den Fragmenten, welche mit EMSA analysiert wurden und ergeben zusammen P_{yjiY -300/+1}. →TKS bezeichnet den mit 5'-RACE identifizierten Transkriptionsstartpunkt. Die rot dargestellte Sequenz P_{yjiY P} wird durch His₆-YehT vor DNase I Verdau geschützt. Die Sequenzen der vorhergesagten -35 und -10 Box (BProm, Softberry) sind unterstrichen. Die Lokalisation der Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) ist markiert. Zwei mögliche Interpretationen der YehT bindenden DNA-Sequenz (inklusive spacer) befinden sich in P_{yjiY -200/-101}. Motiv 1-3 (M1-M3) wurden von MEME vorhergesagt. M4 (Sequenz kursiv) ist im Gegensatz zu M1-M3 weniger konserviert. Die LytTR-ähnliche Bindesequenz, welche invers orientiert ist, wurde mit VectorNTI identifiziert (graue Pfeile).

Das Fragment $P_{yjiY-200/-101}$ umfasste die im DNase I Schutzexperiment geschützte Sequenz. Während His₆-YehT das Gesamtlängenfragment $P_{yjiY-300/+1}$ und das Teilfragment $P_{yjiY-200/-101}$ mit annähernd identischem K_d -Wert von ca. 75 nM band, interagierte His₆-YehT mit den anderen Fragmenten $P_{yjiY-100/+1}$ und $P_{yjiY-300/-201}$ mit geringerer Affinität von 500 nM und 600 nM (Abb. 3.8 und Tab 3.7).

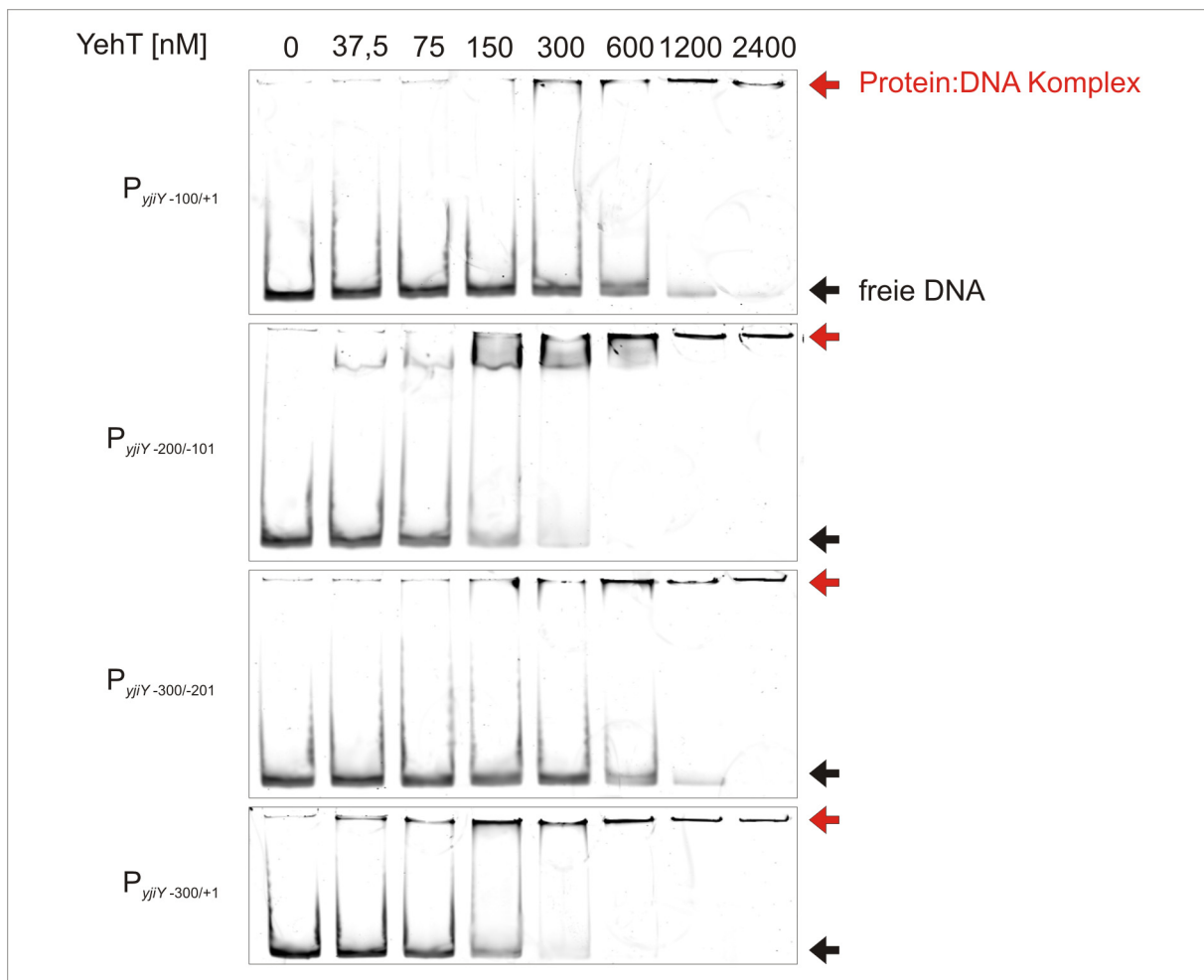


Abbildung 3.8: Bindung von His₆-YehT an die putative *yjiY* Promotor DNA. 6-FAM markierte DNA-Fragmente der 5'-UTR von *yjiY* wurden mit gereinigtem His₆-YehT in steigenden Konzentrationen zwischen 0 und 2400 nM inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 7,5%-igen (w/v), TAE gepuffertem PAA-Gel (2.5.10.2). Freie DNA-Fragmente konnten bei den Experimenten in das Gel einlaufen, DNA-YehT-Komplexe verblieben aufgrund der größeren Masse in den Taschen bzw. wanderten nur geringfügig in das Gel ein. Details zu den DNA Fragmenten sind dem Text und Abb. 3.7 zu entnehmen.

Parallel wurde das 58 bp Fragment $P_{yjiY P}$ (Nt -189 bis -130 relativ zum Transkriptionsstartpunkt), welches durch His₆-YehT geschützt wurde (Abb. 3.6), kloniert und mit 6-FAM-konjugiertem Oligonukleotid amplifiziert. Zudem wurden Derivate hergestellt, in denen die potentiellen Sequenzmotive systematisch mutiert wurden. (Purin gegen Pyrimidin: A gegen C; T gegen G; Abb. 3.9). Die Interaktion dieser Fragmente mit His₆-YehT wurde im Gel-

Retardationsexperiment getestet. Das verkürzte Derivat $P_{yjiY P}$ wurde mit ähnlicher Affinität von His₆-YehT gebunden wie $P_{yjiY -200/-101}$ und $P_{yjiY -300/+1}$ (K_d ca. 75 nM). Wurde das dritte Motiv M3 substituiert, änderte sich die Affinität geringfügig (K_d $P_{yjiY M3}$ ca. 120 nM). Wurde zusätzlich M2 ($P_{yjiY M23}$) mutagenisiert, sank die die Affinität auf ein Drittel (K_d ca. 280 nM). Eine weitere Mutation des Motivs 1 ($P_{yjiY M123}$) änderte den K_d -Wert nicht mehr. Daraus wurde geschlossen, dass His₆-YehT in vitro primär an das Motiv 1 und 2 bindet und Motiv 3 der Stabilisierung dient. Darüber hinaus führten auch die Mutationen innerhalb des *spacers* zu einer Verringerung der Affinität (Abb. 3.9). Im Fragment $P_{yjiY MS}$ wurden beide *spacer* substituiert. Die Bindung sank dadurch auf einen K_d -Wert von 300 nM. Schließlich wurde noch die LytTR-ähnliche Konsensus DNA-Bindesequenz mutagenisiert (Abb. 3.9). Auch hier sank die Affinität zu His₆-YehT auf einen K_d -Wert von 425 nM (siehe auch Abb. 3.9). Daher wird angenommen, dass im *spacer* ein oder mehrere Nukleotid(e) mit YehT interagieren. Diese werden gegenwärtig identifiziert (Stefan Behr, 2010, persönliche Kommunikation). Dies ist noch nicht abgeschlossen, daher wird die bisherige Nomenklatur (Motiv und *spacer*) beibehalten.

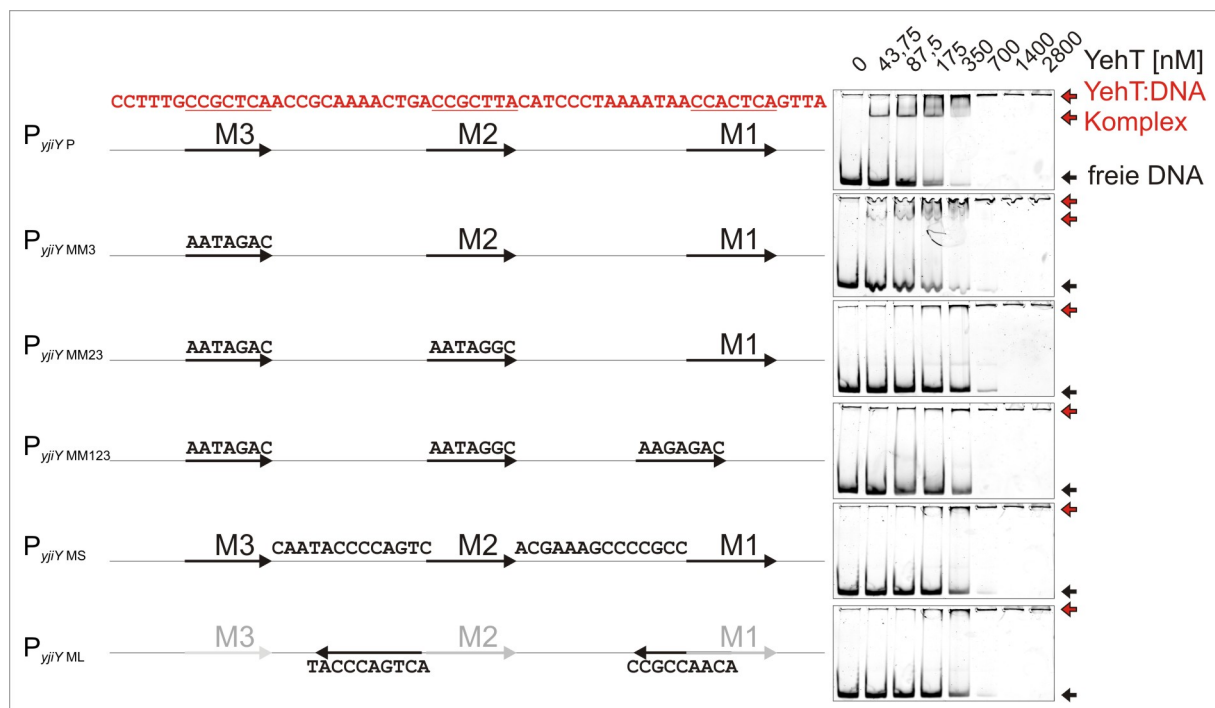


Abbildung 3.9: Gerichtete Mutagenese der YehT Bindestelle in der *yjiY* 5'-UTR und Interaktion mit His₆-YehT. Die Motive 1-3 (M1-M3), der *spacer* und die LytTR-artige DNA-Konsensussequenz innerhalb von $P_{yjiY P}$ (oben, rot) wurden durch die angegebenen Sequenzen ersetzt. 6-FAM markierte DNA-Fragmente wurden mit gereinigtem His₆-YehT in steigenden Konzentrationen zwischen 0 und 2400 nM inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 7,5%igen (w/v) TAE-gepuffertem PAA-Gel und visualisiert (2.5.10.2). Freie DNA-Fragmente konnten bei den Experimenten in das Gel einlaufen, DNA-YehT-Komplexe verblieben aufgrund der größeren Masse in den Taschen bzw. wanderten nur geringfügig in das Gel ein. Details zu den DNA Fragmenten sind dem Text und Abb. 3.7 zu entnehmen.

Die Mutagenese der reversen und komplementären LytTR-ähnlichen Bindesequenz führte ebenso zu einer Abnahme der Affinität (K_d ca. 300 nM). Allerdings überschneidet sich diese mit Motiv 2 und Motiv 3, sodass dieses Ergebnis nur geringe Aussagekraft besitzt.

Wegen der Assoziation von *yehS* mit *yehU/yehT* wurde spekuliert, ob YehS mit Bestandteilen des YehU/YehT-Systems interagiert (Behr, 2010, persönliche Kommunikation). Daher wurde analysiert, ob His₆-YehS Einfluss auf die Affinität von His₆-YehT zur DNA hat. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden, da sich die Affinität weder von His₆-YehT noch von His₆-YehT-D54E zur P_{yjiY} DNA in Anwesenheit eines 5-fachen molaren Überschusses von His₆-YehS änderte (Tab. 3.7). Die Affinitäten von His₆-YehT-D54E (Tab. 3.7) und -D54N (Daten nicht gezeigt) waren nahezu identisch mit den Affinitäten von His₆-YehT. Dies gilt auch für alle anderen hier präsentierten 5'-UTR, deren Interaktion mit YehT aufgrund der genomischen Assoziation (3.1), der Homologien (3.3) und der Transkriptomanalyse (3.6), analysiert wurden (Daten nicht gezeigt). YehS, das keine DNA-bindende Domäne aufweist, besaß selbst eine äußerst geringe Affinität zur jeweiligen DNA, der K_d -Wert lag bei 1300 nM und höher. Vermutlich ist dies ausschließlich auf die positive Ladung des Proteins zurückzuführen (berechneter pI = 9,2).

Tabelle 3.7: Apparente Dissoziationskonstanten der Interaktion von His₆-YehT, His₆-YehT-D54E und His₆-YehS mit *yjiY*-Promotor DNA. EMSA Experimente und die Quantifizierung wurde wie unter 2.5.10.2 und 2.6.4 beschrieben durchgeführt. Dargestellt sind die apparenten Dissoziationskonstanten K_d in [nM] für die Interaktion mit His₆-YehT, His₆-YehT-D54E und His₆-YehS. His₆-YehS wurde im 5-fachen molaren Überschuss zu His₆-YehT zugegeben. Die Definitionen der DNA-Fragmente sind dem Text und Abb. 3.7 zu entnehmen.

| DNA Fragment | K_d -Werte [nM] | | | | |
|-----------------------------|-------------------|-------------|-----------|------------------|-------|
| | YehT | YehT + YehS | YehT D54E | YehT D54E + YehS | YehS |
| P _{yjiY} -100/+1 | 625 | >500 | 600 | >300 | 1300 |
| P _{yjiY} -200/-101 | 75 | 150 | 100 | 100 | >3500 |
| P _{yjiY} -300/-201 | 525 | >500 | 500 | 275 | >3500 |
| P _{yjiY} -300/+1 | 75 | 150 | 75 | 75 | 1500 |

3.8 Extrapolation: Identifizierung putativer YehT-Bindestellen in silico

Die Identifizierung der Motivwiederholung in der YehT-Bindestelle von P_{yjiY}-300/+1 erfolgte, wie unter 3.6.2.2 dargestellt u.a. mit MEME (Bailey und Elkan, 1994). Dieses Programm bietet die Abbildung der ermittelten dreifachen Wiederholung des Motivs auf 5'-UTR des *E. coli* K12 Genoms an (MAST, Bailey und Gribskov, 1998). Es wurde die Kategorie „Upstream Sequences“ gewählt und die Datenbank „*Escherichia coli* K12 substrain MG1655 (upstream/

(nucleotide only)“. Mit dieser Methode konnte keine weitere Promotorregion identifiziert werden, welche diese Motivwiederholung enthält (Daten nicht gezeigt).

Da gezeigt werden konnte, dass das Motiv 3 kein wesentlicher Bestandteil der von YehT gebundenen Sequenz ist, wurde die Suche auf Motiv 1 und 2 beschränkt. Vermutlich sind einzelne Nukleotide in den Motiven stärker degeneriert. Dies konnte bei der Definition im *yjiY* Promotor in dieser Arbeit nicht aufgedeckt werden. Daher wurde die im *yjiY*-Promotor ermittelte zweifache Motivwiederholung (M1 und M2) mit dem GenoList Multi-Genome Browser auf das *E. coli* K12 Genom abgebildet. Dabei wurde pro Motiv die bisher degenerierten Nukleotide durch ein beliebiges Nukleotid ersetzt (CCNCTNA) und der *spacer* mit erlaubten 11-15 Nukleotiden variabler gestaltet (Tab. 3.8). Zusätzlich wurden nur Sequenzen berücksichtigt, welche sich maximal 500 Nukleotide stromaufwärts eines Gens befanden. Mit dieser Suche wurden 14 5'-UTR (inklusive der *yjiY* 5'-UTR) identifiziert. Diese sind in Tab. 3.8 dargestellt. Zudem wurde die Expression der korrespondierenden Gene mit dem Expressionsprofil nach His₆-YehT Überproduktion abgeglichen. Wurde pro Motiv ein Fehler zugelassen, erhöhte sich die Zahl der Treffer auf über 2500, was der Hälfte der *E. coli* Genen entspricht. Dies macht eine weitere Auswertung sinnlos.

In einer alternativen Suche wurden die vermutlich konservierten Nukleotide im *spacer* mit einbezogen. Das Motiv lautete somit AAANTNACCNCTNA. Es wurde nach einer Wiederholung des Motivs im Abstand von 5 – 9 Nukleotiden gesucht, pro Motiv wurden 4 Fehler erlaubt, allerdings nicht in dem Kernbereich (CCNCTNA). Es wurden 9 Promotoren identifiziert (Tab. 3.8 und Tab 3.9). Die identifizierten Promotoren sind deckungsgleich mit den in der vorherigen Suche identifizierten (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Extrapolation der identifizierten YehT-bindenden DNA Sequenz. Die Motiwiederholung CNCTNA wurde wie im Text beschrieben auf 5'-UTR des *E. coli* MG1655 Genoms abgebildet. Angegeben ist der korrespondierende Gennamen und die Funktion des Genprodukts. In dieser Spalte ist in Klammern angegeben, in wie vielen Positionen sich die spacer Sequenz von den möglicherweise 10 konservierten Nt (unterstrichen) der spacer in der *yjiY* Promotorsequenz unterscheidet. Zudem ist die Identifikationsnummer (b-Nummer) angeführt. Mehr als 8 Fehler wurden nicht vermerkt. Die rot markierten Gene wurden in zwei parallelen Suchen identifiziert. 5' [Nt] zeigt den Abstand des jeweiligen Motivs zum korrespondierenden Transkriptionsstartpunkt an. In der jeweiligen Sequenz ist das Motiv fett gedruckt. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Δ -35/-10 gibt den Abstand vom 3'-Ende der Motiwiederholung zum 5'-Ende der -35/-10 Box an (Vorhersage mit BProm).

| Gen, Funktion Genprodukt, (Fehler) | b-Nummer | 5' [Nt] | Sequenz | Δ -35/-10 |
|--|----------|---------|---|------------------|
| <i>ycbV</i> , unbekannt, (7) | b0943 | -151 | CGCAAAAGTCAGCAAGAAATCCCGCTCAATCAGGTCAGCCCTCTTAACGGCCCTTAAAAAAGCCGGGGAT | 26 |
| <i>ycgX</i> , unbekannt, (8) | b1161 | -227 | TATAAAGTCATCTTTCATGGCCCCCTAAATTTTACACCTTTATCCCGGCCCTTACAGAGAAATGTTATAAATCTG | spacer |
| <i>hisL</i> : <i>his</i> Operon leader Peptid, (6) | b2018 | -139 | CCATCAGCTAAGAGGACAGTCCCTCTTAAGCCCCCTCCCTTCCCGCTCAATTCATTAACAATAATCCATTG | 0 |
| <i>hisG</i> : ATP Phosphoribosyltransferase, (6) | b2019 | -335 | | |
| <i>yfcI</i> , unbekannt, (7) | b4338 | -136 | GGGAATTTGGGAGTCAGCTTCCCGCTGAAATGTAAAAGTTACAGTCCGGCTAAATAATCTTCTGAATTCGC | 304 |
| <i>yglL</i> , unbekannt, (7) | b2732 | -407 | GAAATTGATGTGGCAGCTGCTCTCAATTTGAAACTCTGGCCGCTTATGCACACGAACTGGCAGAGT | 190 |
| <i>mufH</i> : Methyl-gelenkte mismatch Reparatur, (4) | b2831 | -300 | GTATTTATCCACAGAAATGTCGCACATAAAGTAAAGCACTGAACCACTAAAAAAGTGGAGTTTCCTCGCAC | 52 |
| <i>yrfE</i> , unbekannt, (5) | b3397 | -195 | CATTAAGCACATCACAGTAAACCGCTGATCATATAGCAAAACCCCTGTGAAGCGGGAATATCAGCAAAAT | 188 |
| <i>rfaP</i> : LPS core Biosynthese, (8) | b3630 | -309 | TGTCTCAGAAATTAATGGCAGCCGCTGATTTTATCTGATCCCGCTTATCAGGAAGCCCGGGTATCG | 77 |
| <i>rarD</i> , <i>yicH</i> , unbekannt, (7) | b3819 | -237 | GTCGGGGTGTCTCAGCAGCCGCTGATTTTGCAGTTTGGCCCTGAAATGGCTGAAAAAACCTGCTCT | 263 |
| <i>ubiB</i> (<i>aarF</i>), Regulator 2-N-Acetyltransferase bei Ubiquinon Produktion, (6) | b3835 | -232 | CGACCCCTGGGAACTGCTGGCCCCCTTATACCGGTGATATCCCGCTGAAGGAATCAGCAAAAGCCATGC | 152 |
| <i>fecE</i> : Transport, (9) | b4287 | -396 | GCTTTGTGAGGATGCCATCCCGCTGATGATTTTATTTTCTGCGCCGCTGAGCCCTGAGTTTTTTCGGCGGAT | 4 |
| <i>mcrB</i> : Restriktion der DNA am 5-Methylcytosin, (6) | b4346 | -127 | GGTAAACCAACCGGAGCCCTTCCACTGACTCAATAGAAAATTTCCCCCTCAGTAAAATATTTACCAGTCTG | 38 |
| <i>yjiY</i> , unbekannt (0) | b4351 | -163 | CCGCTCAACCGCAAAAATGACCGCTTACATCCCTAAAAATAACCACTCAGTTATTTTACCCTACTTTACG | 13 |

Wurden pro Motiv mehr Fehler zugelassen, erhöhte sich die Zahl der Treffer auf ca. 600. Alle 5'-UTR der zweiten Suche tauchen aufgrund der gewählten Parameter in der ersten Gruppe auf. Um die Interpretation dieser Daten zu erleichtern, wurde die Expression dieser Gene nach His₆-YehT-Überproduktion verglichen (Tab. 3.9). Das Ergebnis ist im Vergleich zur *yjiY* Expression nicht eindeutig. Am ähnlichsten zum *yjiY* Promotor (14 Nukleotide Abstand der Kernmotive) sind die 5'-UTR Sequenzen von *hisLG*, *rfaP*, *ubiB* und *fecE*. Die Expression von *hisLG* wird durch Überproduktion von His₆-YehT leicht induziert, die von *fecE* kaum verändert. Andererseits ist nur in zwei Fällen der Abstand von potentieller Bindestelle zur -35/-10 Box ähnlich wie im *yjiY* Promotor (*ycbV*, *mcrB*). Bei *ycgX*, *hisL* und *fecE* ist der Abstand deutlich geringer, in den restlichen Fällen deutlich größer. Drei Gene (*yfcl*, *ycbV*, *ygbL*) wurden nach Überproduktion von His₆-YehT kaum exprimiert und die Expression ist an der Grenze der Messbarkeit. Es ist denkbar, dass eine gesteigerte Expression aufgrund einer geringen RNA Stabilität nicht nachweisbar war. Klarheit können hier nur weiterführende Experimente bringen.

Tabelle 3.9: Expression von Genen mit putativer YehT-Bindestelle nach His₆-YehT Überproduktion. Kandidaten, welche eine putative YehT-bindende Sequenz in der 5'-UTR auswiesen, wurden wie im Text und Tab. 3.8 beschrieben identifiziert. Die Expression der angeführten Gene wurde wie im Text (siehe 3.5) beschrieben bestimmt. rF: Arithmetisches Mittel der relativen Fluoreszenz [dimensionslos] der Affymetrix *E. coli* 2.0 Genom Chip Auswertung dreier biologischer Experimente bei YehT- bzw. KdpE-Überproduktion, log₂ ratio: Logarithmus zur Basis 2 des Verhältnisses rF(YehT)/rF(KdpE), p: Signifikanz (t-Test),

| Gen | b-Nummer | rF (YehT) | rF (KdpE) | log ₂ Ratio | P |
|-------------|----------|-----------|-----------|------------------------|--------------------|
| <i>ycbV</i> | b0943 | 67,4 | 59,9 | 0,25 | 0,604 |
| <i>ycgX</i> | b1163 | 42,0 | 270,3 | -2,72 | ≤ 10 ⁻³ |
| <i>hisL</i> | b2018 | 4773,3 | 2368,5 | 1,05 | 0,005 |
| <i>hisG</i> | b2019 | 2382,3 | 735,7 | 1,72 | 0,000 |
| <i>ygbL</i> | b2732 | 117,6 | 171,4 | -0,55 | 0,036 |
| <i>mutH</i> | b2831 | 370,5 | 278,4 | 0,41 | 0,027 |
| <i>yrfE</i> | b3397 | 840,3 | 643,3 | 0,38 | 0,033 |
| <i>rfaP</i> | b3630 | 718,8 | 1120,6 | -0,67 | 0,287 |
| <i>rarD</i> | b3819 | 213,3 | 81,3 | 1,39 | 0,011 |
| <i>ubiB</i> | b3835 | 2768,3 | 1565,8 | 0,83 | ≤ 10 ⁻³ |
| <i>fecE</i> | b4287 | 683,7 | 413,1 | 0,72 | 0,004 |
| <i>yfcl</i> | b4338 | 35,0 | 22,8 | 0,59 | 0,126 |
| <i>mcrB</i> | b4346 | 2047,8 | 893,6 | 1,21 | ≤ 10 ⁻³ |
| <i>yjiY</i> | b4351 | 9171,5 | 46,3 | 7,64 | ≤ 10 ⁻³ |

3.9 Der Aktivierungsmechanismus des YehU/YehT-Systems

Die biochemische Charakterisierung der Bestandteile eines SHK/AR Systems ist unerlässlich für das Verständnis der Signaltransduktion. Zudem kann der gereinigte AR, wie bereits dargestellt, zu AR:DNA Interaktionsstudien genutzt werden. Im Folgenden sind die Reinigung von His₆-YehT, YehU-His₆ und potentieller akzessorischer Proteine, der Nachweis deren Aktivität und initiale Experimente zur Phosphorylierungskaskade dargestellt.

3.9.1 Reinigung von His₆-YehT

yehT bzw. die Mutanten, welche zu den AS Substitutionen D54E und D54N führen, wurde wie beschrieben in pBAD24 kloniert (Behr, 2007, Guggenberger, 2007, Fried, persönliche Gabe 2010) und dabei mit einer codierenden Sequenz für einem His₆-Tag versehen. Die Proteine wurden in *E. coli* BL21 (DE3) überproduziert und gereinigt (Abb. 3.10). Der Großteil von His₆-YehT befand sich bei optimaler Pufferzusammensetzung im Zytosol, was durch immunologischen Nachweis nach Fraktionierung des Rohextraktes in *low speed pellet* (Zelltrümmer, Einschlußkörper und nicht aufgeschlossenen Zellen), *high speed pellet* (Membranen) und Zytoplasma gezeigt wurde (Abb. 3.10 B). Das Protein wurde wie in Material und Methoden beschrieben über Ni²⁺NTA- Agarose Affinitätschromatographie gereinigt. Da der Antwortregulator für spätere DNA-Interaktionsstudien in möglichst geringer Salzkonzentration vorliegen sollte, wurden unterschiedliche Reinigungsstrategien angewendet. Als Pufferkomponente diente stets Tris/HCl (50 mM, pH 7,5), da diese nicht mit späteren Phosphorylierungsexperimenten interferiert.

Zudem enthielten alle Puffer 10% (v/v) Glycerol. Auf Mg²⁺ wurde verzichtet, da His₆-YehT in Anwesenheit 2-wertiger Ionen schon beim Zellaufschluss präzipitierte (Daten nicht gezeigt). Die Anwesenheit KCl führte ebenso zur Präzipitation von His₆-YehT (Guggenberger, 2007, persönliche Kommunikation). Auch eine geringe NaCl Konzentration (50 mM) beim Zellaufschluß führte zur Präzipitation des Antwortregulators (Daten nicht gezeigt). Daher wurde Zellaufschluss, Affinitätschromatographie und Reinigung in Anwesenheit von 500 mM NaCl durchgeführt. His₆-YehT blieb dabei löslich. Die exakte Reinigungsvorschrift ist unter 2.5.1 und 2.5.2 wiedergegeben. Der Fortschritt der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. immunologischem Nachweis dokumentiert (siehe Abb. 3.10 A und B). Die Reinheit wurde auf 90% geschätzt. His₆-YehT wurde dann über 6 Stufen (500 mM NaCl → 300 mM NaCl → 150 mM NaCl → 100 mM NaCl → 75 mM NaCl → 50 mM NaCl) dialysiert. Größere NaCl Konzentrationsunterschiede führten wieder zur Präzipitation von His₆-YehT (Daten nicht gezeigt). Auch eine stufenweise Verringerung der Salzkonzentration

während der Waschschritte bei der His₆-YehT Reinigung führte zur Präzipitation des Proteins (Daten nicht gezeigt). Die His₆-YehT Derivate D54E und D54N wurden analog überproduziert und gereinigt.

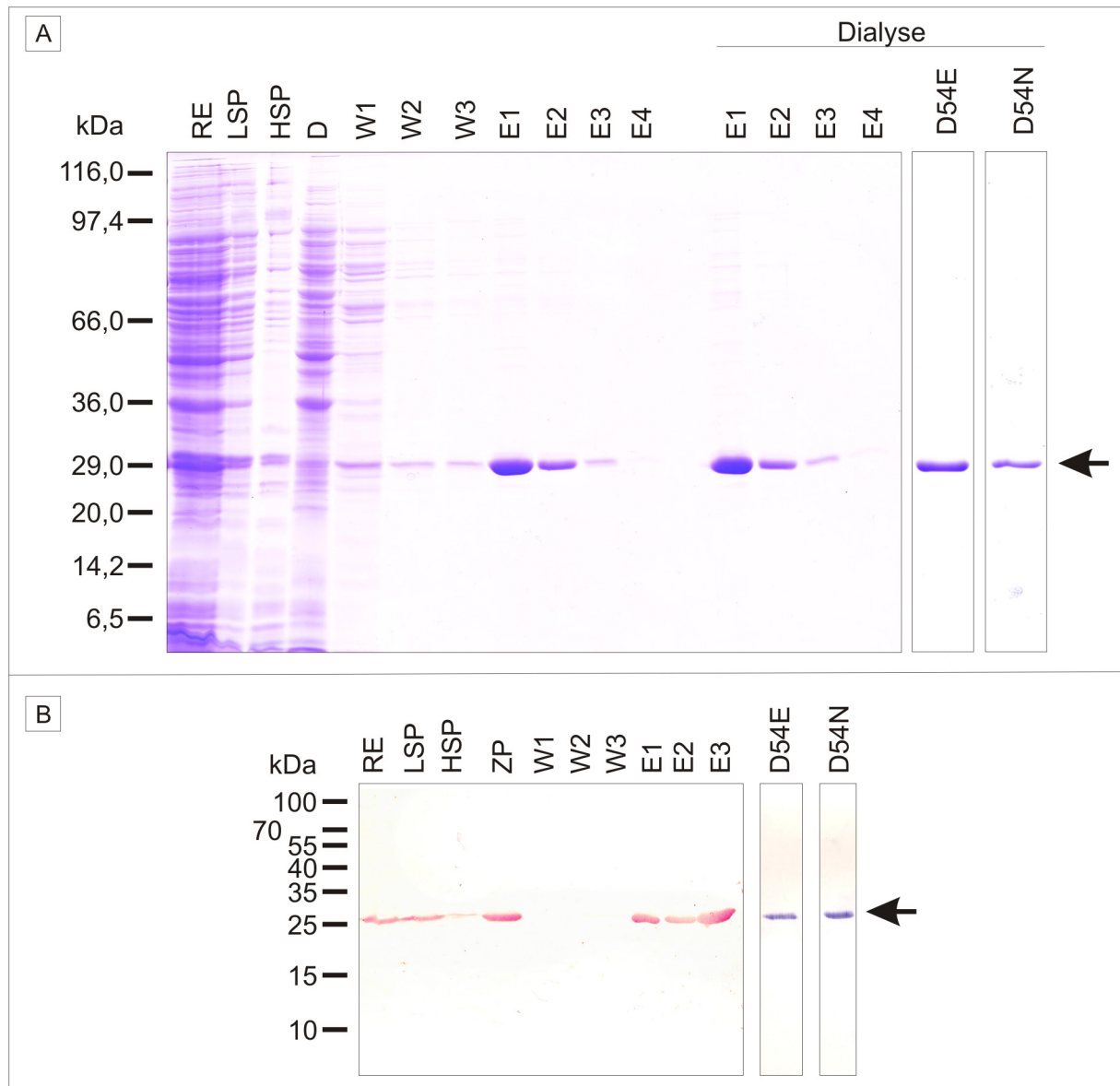


Abbildung 3.10: Reinigung und Immunologischer Nachweis von His₆-YehT und Derivaten. His₆-YehT und His₆-YehT-D54E (D54E) und His₆-YehT-D54N (D54N) wurden wie unter 2.3.1 beschrieben überproduziert und wie unter 2.5.1 und 2.5.2 gereinigt. Der Verlauf der Reinigung ist unter A) dargestellt. Die Proben ZP (Zytoplasma), LSP (*low speed pellet*), HSP (*high speed pellet*), D (Durchfluss), W1-W3 (Waschfraktionen 1-3) und E1-E4 (Elutionsfraktionen 1-4) vor und nach Dialyse wurden mit 5xSDS-Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch über ein 12,5%iges (w/v) PAA-SDS-Gel (2.5.5) aufgetrennt. Pro Spur wurden jeweils gleiche Volumina (5 μ L) aufgetragen. Der Rohextrakt hatte eine Proteinkonzentration von ca. 10 mg/mL. Die Proteinkonzentration in Elutionsfraktion 1-4 betragen 1 mg/mL, 0,45 mg/ml, 0,1 mg/mL und 0,03 mg/mL. Von D54E und D54N wurden nur gereinigtes und dialysiertes Protein (2,5 μ g) aufgetragen. A) Das Gel wurde mit Coomassie (2.5.5) gefärbt. B) Immunologischer Nachweis des His₆-Tags von YehT und Derivaten. Nach SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulose Membran wurden die His₆-getaggten Proteine immunologisch nachgewiesen (2.5.6).

3.9.2 Oligomerisierung von His₆-YehT und Derivaten

In der Regel liegen nicht-phosphorylierte Antwortregulatoren als Monomer vor und dimerisieren nach einer Phosphorylierung (z.B. durch die korrespondierende Histidinkinase). Diese Dimerisierung lässt sich durch die Massenzunahme in einer analytischen Gelfiltration nachweisen. Die Masse von gereinigtem His₆-YehT, His₆-YehT-D54N und His₆-YehT-D54E wurde mit dieser Methode geschätzt. Dabei wurden 100 µL einer 1 mg/ml konzentrierten Proteinlösung mittels einer Äkta „Purifier“ Anlage und einer „Superdex 75 10/300 GL“ Säule aufgetrennt. Es wurden Elutionsfraktionen zu je 1 mL gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert (Daten nicht gezeigt). His₆-YehT und auch die Derivate His₆-YehT D54N und His₆-YehT D54E bildeten einen (löslichen) Komplex, welcher an der Ausschlussgrenze (ca. 80 kDa) der Säule eluierte (Abb. 3.11).

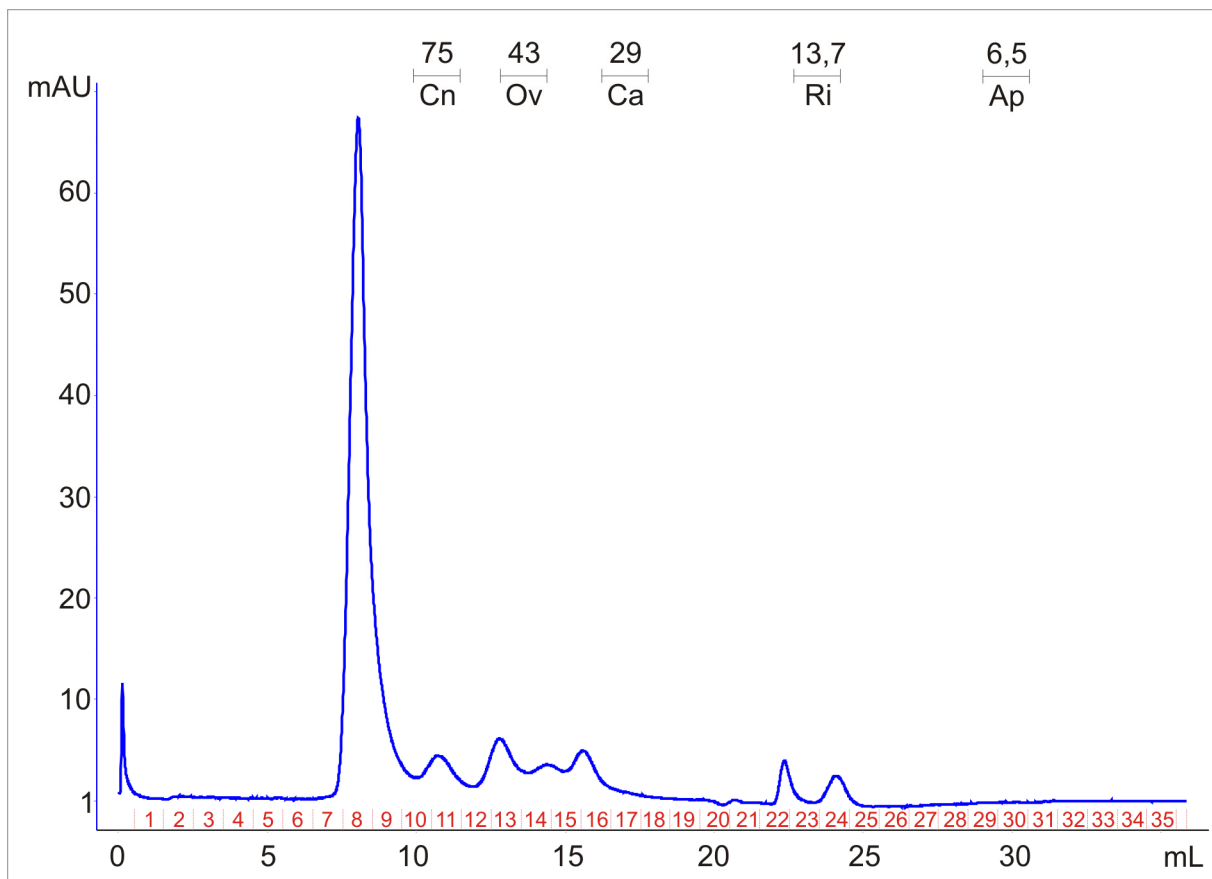


Abbildung 3.11: Analytische Gelfiltration von gereinigtem His₆-YehT und Derivaten. 100 µg gereinigtes und dialysiertes His₆-YehT wurden wie unter 2.5.8 beschrieben mittels Superdex 75 10/300 GL Säule anhand des Molekulargewichts aufgetrennt. Die Säule wurde zunächst mit dem LMW Standard Kit (GE Healthcare) kalibriert (Daten nicht gezeigt). Die Maxima der Eichproteine und deren Molekulargewicht in kDa sind oben in der Abbildung eingetragen (Cn Conalbumin, Ov Ovalbumin, Ca Carbonic Anhydrase, Ri Ribonuklease A, Ap Aprotinin). His₆-YehT eluierte knapp unter der Ausschlussgrenze der Säule bei ca. 80 kDa (8 mL). Die übrigen eluierten Proteine entsprachen Verunreinigungen (vgl. Abb. 3.10). mAU: milli *arbitrary units*, willkürliche Einheit der Absorption bei 280 nm.

Der Komplex ließ sich durch SDS-Probenpuffer wieder auflösen (Daten nicht gezeigt). Die Phosphorylierung mit Acetylphosphat hatte keinen sichtbaren Effekt auf den Oligomerisierungszustand (Daten nicht gezeigt).

3.9.3 Aktivität des gereinigten Antwortregulators YehT

Aktive Antwortregulatoren lassen sich in Anwesenheit von niedermolekularen Phosphodonatoren, wie z.B. Acetylphosphat phosphorylieren (Lukat *et al.*, 1992). His₆-YehT konnte nach dem ersten Dialyseschnitt (Entfernung von Imidazol, Endkonzentrationen des Puffers 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol) phosphoryliert werden (Abb. 3.12 A), und blieb auch während der gesamten Dialyse konstant aktiv (Abb. 3.12 B). Eine unspezifische Bindung von Acetylphosphat an His₆-YehT konnte ausgeschlossen werden, da mit Hitze (90°C, 15 min) und 1% (w/v) SDS denaturiertes His₆-YehT nicht phosphoryliert wurde (Abb. 3.12 A).

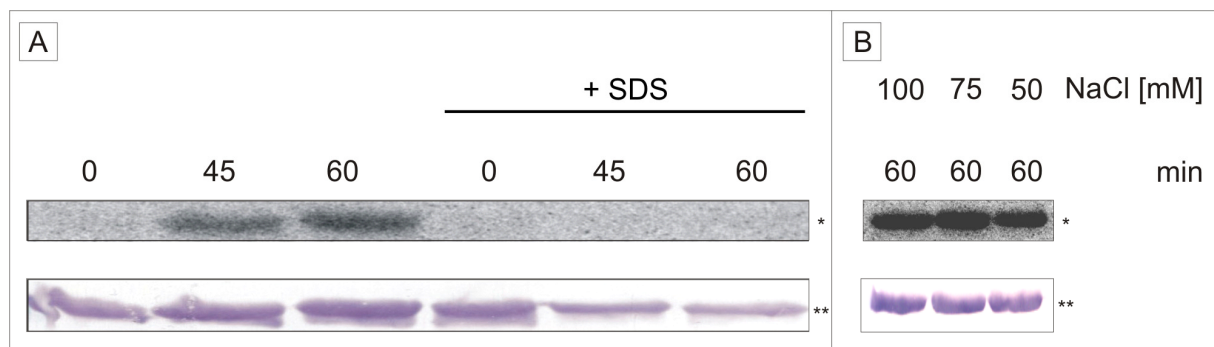


Abbildung 3.12: Phosphorylierung von gereinigtem His₆-YehT mit ³²P-Acetylphosphat. A) 3 µg gereinigtes His₆-YehT (3.1.2.1) wurden nach dem ersten Dialyseschnitt (500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM β-Mercaptoethanol) mit 20 mM ³²P-Acetylphosphat und 20 mM MgCl₂ inkubiert und die Reaktion nach 0, 45 und 60 Minuten mit SDS-Probenpuffer abgestoppt (2.5.9.2). In der Kontrolle (+ SDS) war zu allen Zeitpunkten zusätzlich 1% (w/v) SDS anwesend, His₆-YehT wurde zudem vor der Inkubation mit ³²P-Acetylphosphat 15 min bei 90°C inaktiviert. Die Proben wurden via SDS-PAGE aufgetrennt, mittels einer Semidry Blot Apparatur (BioRad) auf eine Membran übertragen und ein immunologischer Nachweis (2.5.6) erbracht. Radioaktiv markiertes Protein wurde, wie unter 2.5.9.2 beschrieben, detektiert und visualisiert (*). Der entwickelte Westernblot als Beladungskontrolle ist in der zweiten Zeile dargestellt (**). B) Während der Dialyse von His₆-YehT wurden nach jedem Schritt Protein entnommen und wie oben dargestellt phosphoryliert. Gezeigt sind die phosphorylierten Proteinproben der letzten drei Dialyseschritte 100 mM, 75 mM, und 50 mM NaCl. Die Inkubationsdauer mit ³²P-Acetylphosphat betrug 60 Minuten. Das Gel wurde wie unter 2.5.9.2 beschrieben getrocknet und visualisiert (*). In diesem Fall wurde der immunologische Nachweis (2.5.6) in einem parallelen, nicht radioaktiven Gel mit gleichen Volumen aus der identischen Proteinprobe geführt (**).

Zudem wurde der DNA-bindende Anteil von His₆-YehT bestimmt, indem His₆-YehT mit einem Überschuss *yjiY* Promotor-DNA inkubiert wurde. 1,92 pmol, 3,85 pmol und 7,7 pmol, His₆-YehT wurde mit einem Gemisch aus 0,385 pmol 6-FAM markierter P_{*yjiY*-300/+1} und 3,465 pmol nicht markierter P_{*yjiY*-300/+1} DNA inkubiert, in einem nativen Gel elektrophoretisch aufgetrennt (2.5.10.2, Daten nicht gezeigt) und in einem Typhoon Scanner visualisiert. Die gebundene Fraktion wurde mit dem Programm Image Quant quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Ungefähr 10% des Proteins war aktiv.

3.9.4 Klassische Komponenten eines ZKS: SHK (YehU) und AR (YehT)

Die Charakterisierung der Phosphorylierungskaskade ist für das Verständnis der Funktion eines ZKS unerlässlich. YehU-His₆ und His₆-YehT wurden mit γ -³²P-ATP, γ -³²P-GTP, und zusätzlich in Anwesenheit einer Reihe von potentiellen niedermolekularen Stimuli und akzessorischer Proteine inkubiert. Einige Hinweise für den Mechanismus wurden von Erkenntnissen (sequenz-) homologer Systeme abgeleitet. In der Regel führt die Reizerkennung durch die SHK zur Autophosphorylierung am konservierten Histidinrest in der DHP-Domäne. Die Anwesenheit von ATP kann *in vitro* zur Phosphorylierung von Histidinkinase führen. Dies wurde mit radioaktiven γ -³²P-ATP visualisiert. *yehU* bzw. die Derivate *yehU*-H382Q, *yehU*- Δ GAF und *yehU*-H382Q- Δ GAF wurden wie beschrieben in pBAD24 kloniert und dabei mit einem His₆-Tag versehen (Guggenberger, 2007, Behr, 2007). YehU-His₆ und die Derivate wurden in *Escherichia coli* TKR2000 überproduziert und die Membranen präpariert bzw. die Proteine über Affinitätschromatographie gereinigt (2.5.1, 2.5.3). YehU-His₆ und die Derivate befanden sich in der Membranfraktion (Behr, 2007). Die Membranvesikel enthielten geschätzte fünf Prozent YehU-His₆ bezogen auf die gesamte Proteinkonzentration. Diese Membranvesikel wurden zunächst direkt für die Optimierung der Phosphorylierung *in vitro* benutzt. Es wurde gezeigt, dass in Puffern mit 250 mM und 500 mM KCl und 10% (v/v) Glycerol, 50 mM Tris/HCl pH 7,5) eine (sehr geringe) Phosphorylierung von YehU-His₆ durchgeführt werden konnte. Nach einer Minute konnte phosphoryliertes YehU-His₆ detektiert werden. Die Phosphorylierung erreichte nach 5 Minuten ein Maximum und blieb 15 Minuten stabil. Danach verringerte sich das radioaktive Signal (Abb. 3.13, 3.16 und Guggenberger, 2006). Die Signale des radioaktiven Proteins waren allerdings zu gering für eine aussagekräftige Quantifizierung. Puffer mit KCl sind nicht geeignet, um den Phosphotransfer auf His₆-YehT zu demonstrieren, welches in Anwesenheit von KCl präzipitiert (3.1.2.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher Versuche zur alleinigen Phosphorylierung von YehU-His₆ und Derivaten in Puffer mit 250 mM KCl durchgeführt und Interaktionsexperimente in Puffern mit 50 mM NaCl.

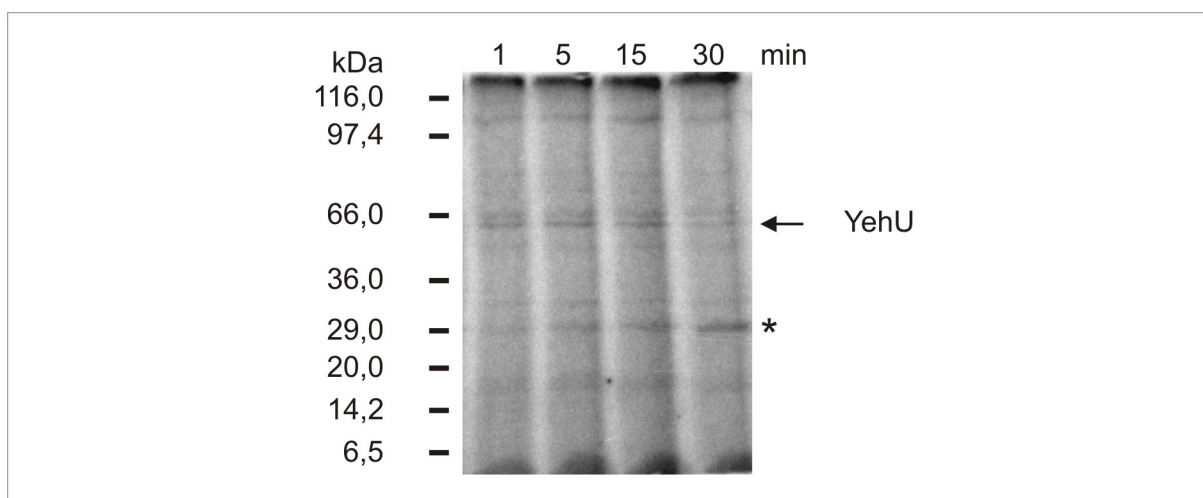


Abbildung 3.13: Autophosphorylierung von YehU-His₆ in MV in vitro. YehU-His₆ wurden wie beschrieben in TKR2000 überproduziert und die Membranen präpariert. Die Phosphorylierung erfolgte wie in Abschnitt 2.5.9.3 beschrieben mit γ -³²P-ATP (0,016 μ M) in 250 mM KCl enthaltendem Puffer. Die Reaktion wurde durch Zugabe γ -³²P-ATP (0,016 μ M; 111 TBq/mmol) gestartet und zu den angegebenen Zeitpunkten mit SDS-Probenpuffer abgestoppt (2.5.9.3). Die Inkubationszeit ist in Minuten angegeben. Pro Spur sind ca. 100 μ g Gesamtprotein (Membranen) aufgetragen entsprechend ca. 5 μ g His₆-YehU (60 pmol). Die Proben wurden via SDS-PAGE aufgetrennt. YehU-His₆ (←) wurde anhand des Molekulargewichts und durch parallelen immunologischen Nachweis identifiziert (Daten nicht gezeigt). * markiert die Phosphorylierung eines in MV enthaltenen Proteins, welches das identische MW wie His₆-YehT besitzt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Phosphorylierung in NaCl-Puffer war vergleichbar mit der Phosphorylierung in KCl (Abb. 3.13 und 3.16). Der Phosphotransfer auf His₆-YehT konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, da in den Membranvesikeln ein phosphorylierbares Protein mit einem ähnlichen Molekulargewicht wie His₆-YehT anwesend war (Abb. 3.13 und Guggenberger, 2006). Daher wurde YehU-His₆ aus den Membranen gereinigt. Für eine optimale Reinigung ist die Wahl des Detergenzes zur Solubilisierung der Membran entscheidend. Daher wurden zunächst Vorversuche zur Solubilisierung der Membranen unternommen. Die Membranen wurden in unterschiedlichen Detergenzien solubilisiert und anschließend durch Ultrazentrifugation in die lösliche und unlösliche Fraktion getrennt. Solubilisat und unlösliche Fraktion wurden mittels SDS-PAGE analysiert. YehU-His₆ ließ sich am besten in Lauryldimethylaminoxid LDAO) mit 0,6 M KCl solubilisieren, da hier ca. 50% des Proteins im Solubilisat vorlag (Abb. 3.14). In den übrigen Fällen lag die Ausbeute bei ca. 30% für Dodecyl-Maltosid und unter 10% für Decylmaltosid und Octylglycosid.

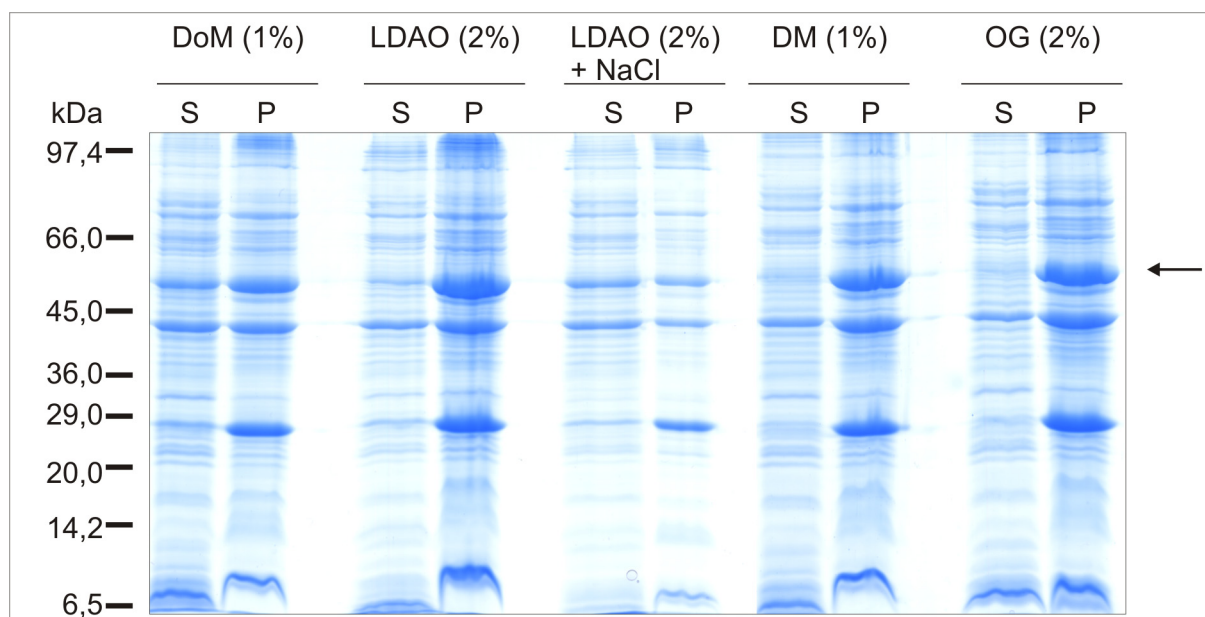


Abbildung 3.14: Optimierung der Solubilisierung von YehU-His₆. TKR2000 Membranen welche YehU-His₆ (2.5.1) enthielten, wurden mit den Detergenzien Dodecyl-Maltosid (DDM), Lauryldimethylaminoxid, (LDAO + NaCl), Decylmaltosid (DM) und Octylglycosid (OG) solubilisiert (2.5.3). Die Konzentration des Gesamtproteins betrug 5 mg/mL. Das Solubilisat wurde mit Ultrazentrifugation in solubilisierten Überstand (S) und nicht-lösliches Pellet (P) getrennt. Letzteres wurde im gleichen Probenvolumen 1xSDS Auftragspuffer resuspendiert. Jeweils 8 μ L der Fraktionen wurden mit SDS-PAGE in einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (2.5.5). YehU-His₆ (\leftarrow) wurde anhand des Molekulargewichts identifiziert, parallel wurden YehU-His₆ immunologisch nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Die Reinigung erfolgte dann wie unter 2.5.3 beschrieben über Affinitätschromatographie in Anwesenheit von LDAO (Abb. 3.15). Die Reinheit von YehU-His₆ und YehU-H382Q-His₆ wurde auf 80% geschätzt, die der Derivate YehU- Δ GAF-His₆ und YehU Δ GAF-HQ-His₆ ca. 50%.

Ca. 50% des gereinigten Proteins konnte rekonstituiert werden (2.5.4), was durch SDS-PAGE, Coomassie Färbung und immunologischen Nachweis von His₆-YehU überprüft wurde (Daten nicht gezeigt). Gereinigtes und rekonstituiertes YehU-His₆ ließ sich schwach phosphorylieren. In Abb. 3.16 sind Autoradiogramme von MV mit YehU-His₆ und rekonstituiertes YehU-His₆ gegenübergestellt.

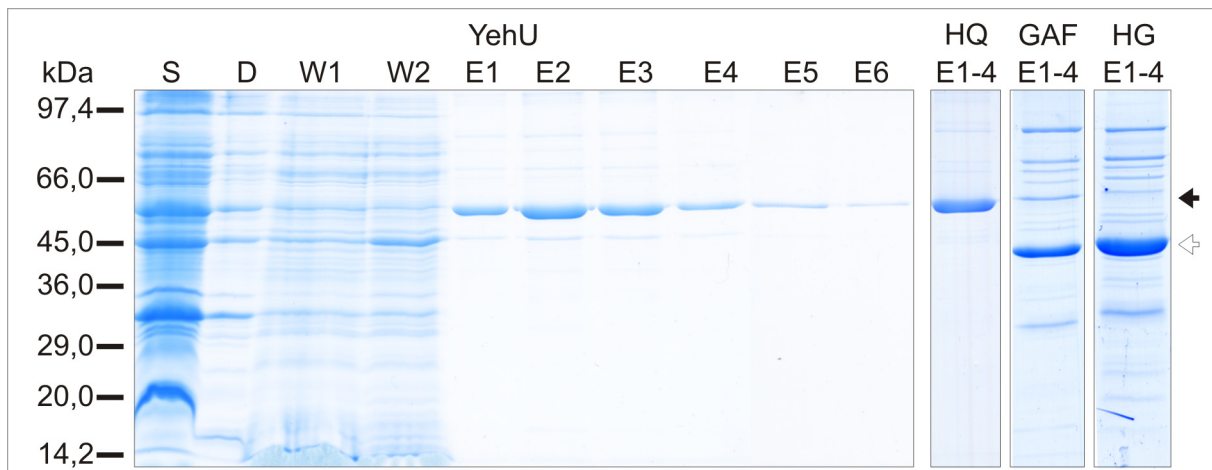


Abbildung 3.15: Reinigung von His₆-YehU und Derivaten. TKR2000 Membranen mit YehU-His₆, YehU-H382Q His₆ (HQ), YehUΔGAF-His₆ (GAF) und YehUΔGAF-H382Q His₆ (HG) wurden wie unter 2.5.1 beschrieben hergestellt, solubilisiert und die Proteine wie unter 2.5.3 beschrieben gereinigt. Gezeigt ist ein Coomassie gefärbtes 12,5% (w/v) PAA-SDS-Gel mit ausgewählten Proteinproben zur Dokumentation der Reinigung von YehU-His₆ und Derivaten. Die Konzentration des Gesamtproteins im Solubilisat betrug 5 mg/mL. Es wurden gleiche Volumina (8 μ L) von Solubilisat (S), Durchlauf der Säule (D) Waschschritte 1 und 2 (W1, W2) und sechs Elutionsfraktionen (E1-E6) auf das Gel aufgetragen. Die Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen betrug 0,3 (E1), 0,5 (E2), 0,3 (E3), 0,2 (E4), 0,1 (E5) und 0,08 mg/mL (E6). Von HQ, GAF und HG sind nur die vereinigten Eluate 1-4 (E1-4; 0,5, 0,5 und 0,8 mg/mL) dargestellt. Die Proteine wurden anhand des MW und parallel immunologisch identifiziert, YehU und HQ besitzen die gleiche Masse von ca. 62 kDa (schwarzer Pfeil), GAF und HG wegen der Deletion der GAF-Domäne 45 kDa (weißer Pfeil). Erfahrungsgemäß laufen Membranproteine in einen SDS-Gel unterhalb ihrer tatsächlichen molekularen Masse.

Phosphoryliertes YehU-His₆ ließ sich in MV bereits nach einer Minute Inkubationszeit mit γ -³²P-ATP detektieren. Rekonstituiertes YehU-His₆ konnte hingegen erst nach 30 Minuten visualisiert werden (Abb. 3.16). Es konnte kein Phosphotransfer auf His₆-YehT gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

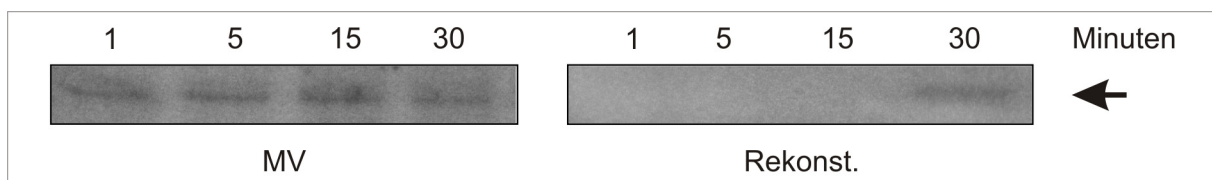


Abbildung 3.16: Autophosphorylierung von YehU-His₆ in vitro. Es ist der Ausschnitt des Autoradiogramms dargestellt, in welchem Proteine mit der Molekülmasse von ca. 62 kDa liefen (\leftarrow). YehU-His₆ wurde in einem parallelen nicht radioaktivem Ansatz immunologisch nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Phosphorylierung von YehU-His₆ wurde durch Zugabe γ -³²P-ATP (0,016 μ M; 111 TBq/mmol) in 250 mM KCl enthaltendem Puffer gestartet und zu den angegebenen Zeitpunkten mit SDS-Probenpuffer abgestoppt (2.5.9.3). YehU-His₆ lag in Membranvesikel von TKR2000 (MV) oder in LDAO gereinigt und rekonstituiert (Rekonst.) vor (2.5.1, 2.5.3). Pro Spur der MV sind ca. 100 μ g Gesamtprotein aufgetragen, entsprechend ca. 5 μ g YehU-His₆ und ca. 5 μ g (60 pmol) gereinigtes und rekonstituiertes YehU-His₆. Die Proben wurden via SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel getrocknet und visualisiert (2.5.9.3).

3.9.5 Alternativer Phosphatdonor GTP und niedermolekulare Stimuli

Neben ATP kann auch GTP als Phosphat-Donor der Histidinkinase dienen (Scaramozzino *et al.*, 2009). Membranvesikel mit YehU-His₆ wurden mit γ -³²P-GTP (0,016 μ M, spezifische Radioaktivität 222 TBq/mmol) inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Radioaktivität visualisiert (2.5.9.3). YehU-His₆ konnte sowohl in Membranvesikel, als auch gereinigt und rekonstituiert nicht mit γ -³²P-GTP phosphoryliert werden. Es traten phosphorylierte Proteine auf, welche in den ATP Ansätzen nicht vorhanden waren, aber keines mit einer Molekülmasse von His₆-YehU (Daten nicht gezeigt).

In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Sensor-Histidinkinase QseE *in vitro* nur in Anwesenheit des passenden Stimulus selbst phosphorylierte (Reading *et al.*, 2009).

Daher wurde YehU-His₆ mit einer Vielzahl an möglichen Stimuli, unter anderem mögliche C- und N-Quellen, Salze, LPS Bestandteile, bekannte Autoinduktoren und eukaryotische Signalmoleküle, Kulturüberstände und Naturproben präinkubiert und die Autophosphorylierung analysiert (2.5.9.3). Die einzelnen Stoffe/Gemische und die eingesetzten Konzentrationen sind in Tab. 3.10 dargestellt. Keine der angeführten Substanzen konnte die Autophosphorylierungsaktivität von YehU-His₆ erhöhen; das Phosphorylierungsmuster entsprach Abb. 3.13 bzw. 3.16 (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst bekräftigte dies, dass sich YehU-His₆ wegen der molekularen Modifikation in der ATP Binderegion nur im sehr geringem Umfang autophosphorylieren kann (Whitchurch *et al.*, 1996). Daher wurde untersucht, ob akzessorische Proteine die Autophosphorylierung vermitteln können.

Tabelle 3.10: Mögliche Stimuli zur Aktivierung der SHK YehU. Homologe Systeme und das Zielgen *yjiY* von YehT lassen auf eine Reihe unterschiedlicher potentieller Stimuli schließen. AI-2 wurde von Claudia Anetzberger zur Verfügung gestellt. Frisch und Faulschlammproben wurden 01/2007 in der Kläranlage München Nord gezogen, steril filtriert und bei -80°C gelagert. Alle Kulturüberstände wurden lyophilisiert, in 1/10 Volumen aufgenommen und wie dargestellt eingesetzt.

| Substanz | Konzentration | Begründung/Kommentar |
|---|---------------|---|
| C-/N-Quelle: C-Limitation (siehe unten) | | |
| Glucose | 15 mM | C-Limitation (siehe Zielgen <i>yjiY</i>) |
| Mannose | 15 mM | C-Limitation (siehe Zielgen <i>yjiY</i>) |
| Fumarat | 15 mM | C-Limitation (siehe Zielgen <i>yjiY</i>) |
| Glutamin | 15 mM | C-/N-Quelle |
| Prolin | 15 mM | C-/N-Quelle |
| Salze | | |
| Eisenchlorid | 150 μ M | Aktivierung QseE (Reading <i>et al.</i> , 2009) |

Tabelle 3.10: Mögliche Stimuli zur Aktivierung der SHK YehU (Fortsetzung).

| Substanz | Konzentration | Begründung/Kommentar |
|-----------------------------------|---------------|--|
| Salze (Fortsetzung) | | |
| Ammoniumsulfat | 15 mM | Aktivierung QseE (Reading <i>et al.</i> , 2009) |
| LPS Baustein | | |
| N-Acetylglucosamin | 1 mM | Homologie zu LytS/LytR |
| Pro-/Eukaryotische Signalmoleküle | | |
| AI-2 | 150 µM | prokaryotisches Signalmolekül |
| α-Aminobuttersäure | 150 µM | eukaryotisches Signalmolekül |
| Adrenalin | 150 µM | eukaryotisches Signalmolekül/ <i>inter-kingdom</i> Signal |
| Indol | 1 mM | Signalmolekül <i>E. coli</i> |
| Kultur-Überstände | | |
| <i>B. subtilis</i> o/n Kultur | 1x + 2x | Gram-positive Signalmoleküle und Sekundärmetabolite, LPS Bausteine |
| <i>E. coli</i> MG1655 o/n Kultur | 1x | Signalmoleküle, Sekundärmetabolite |
| <i>V. harveyi</i> 9h Kultur | 1x | Natives Autoinduktorengemisch |
| <i>V. fischerii</i> 2 Tageskultur | 1x | Natives Autoinduktorengemisch |
| <i>P. lumineszens</i> OD~25 | 1x | Signalmoleküle und Sekundärmetabolite |
| Frischschlamm | 1x + 2x | Naturprobe mit pro- und eukaryotischen Metaboliten |
| Faulschlamm | 1x + 2x | Naturprobe mit pro- und eukaryotischen Metaboliten |

3.9.6 Akzessorische Proteine: YehS, Rsd und Ndk

Bei Sequenzvergleichen wurde festgestellt, dass sowohl in FimS aus *Pseudomonas aeruginosa*, als auch in YehU in der Proteinprimärsequenz ein Teil des ATP-Bindemotivs mit der AS Sequenz DxGxG unvollständig ist. Daher wird oftmals die Notwendigkeit akzessorische Proteine zur Phosphorylierung dieser Histidinkinase diskutiert (Whitchurch *et al.*, 1996). Es wurden YehU-His₆ enthaltende TKR2000 Membranvesikeln benutzt und als Kontrollen His₆-YehT-D54E und YehU-H382Q-His₆. Die AS Substitution des konservierten Histidins nach Glutamin bzw. des konservierten Aspartats nach Glutamat sollte eine Phosphorylierung verhindern. Das SHK/AR-System FimS/AlgR aus *P. aeruginosa* ist an der Expression und Produktion von Pathogenitätsfaktoren wie z.B. der Alginateproduktion beteiligt (Deretic und Konyecsni, 1989). Es wurde spekuliert, dass die Nukleosid-Diphosphatkinase Ndk oder der anti-σ-Faktor Rsd an der Phosphorylierung beteiligt sein könnten (Roychoudhury *et al.*, 1992, Schlichtman *et al.*, 1994). Es existieren homologe Proteine in *E.*

coli. Die korrespondierenden Gene wurden kloniert, die Proteine überproduziert. *yehS* befindet sich direkt stromabwärts vom *yehU/yehT* Operon (Abb. 1.3) und wird autonom reguliert (Fried, 2009, persönliche Kommunikation). Die Funktion von YehS in *E. coli* ist nicht bekannt, es wurden auch keine homologen Proteine charakterisiert. Es wurde spekuliert, ob YehS eine Funktion bei der Phosphorylierungskaskade besitzt. *yehS* wurde kloniert, His₆-YehS wurde überproduziert. His₆-YehS, His₆-Rsd und His₆-Ndk lagen zu 90% löslich im Zytoplasma vor, was durch Zellfraktionierung und immunologische nachgewiesen wurde (2.5.1, 2.5.5, 2.5.6; Daten nicht gezeigt). Sie wurden analog zu His₆-YehT gereinigt (Abb. 3.17).

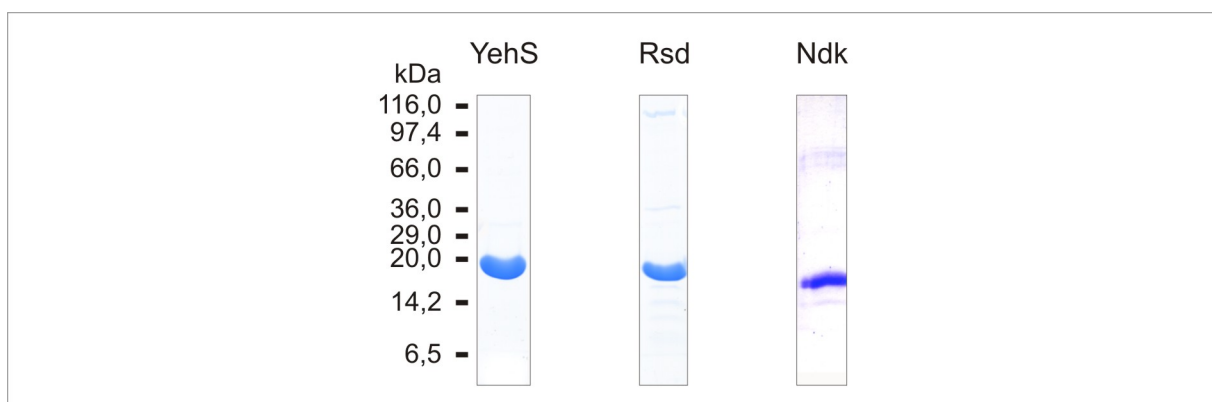


Abbildung 3.17: Reinigung von His₆-YehS, His₆-Rsd und His₆-Ndk. Die Proteine wurden wie unter 2.3.1 beschrieben überproduziert und via Affinitätschromatographie gereinigt (2.5.1 und 2.5.2). Dargestellt ist ein Coomassie-gefärbtes 12,5% (w/v) PAA SDS-Gel auf welchem je 5 µg gereinigtes und dialysiertes Protein aufgetrennt wurde (2.5.5).

His₆-YehS und His₆-Rsd vollzogen keine Autophosphorylierung (Daten nicht gezeigt). YehU-His₆ und His₆-YehT wurden parallel mit His₆-YehS und His₆-Rsd inkubiert (Abb. 3.18). In allen Ansätzen wurde stets ein ca. 34 kDa Protein phosphoryliert, welches sich in der Membranfraktion befand. YehU-His₆ wurde anhand des Molekulargewichts identifiziert und im Umkehrschluss durch Ansatz E-G 7 (Abb. 3.18 E-G): YehU-H382Q-His₆ wurde nicht autophosphoryliert. Im Autoradiogramm findet man ein phosphoryliertes Protein, allerdings hat dieses Protein eine größeres Molekulargewicht und der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung unterscheidet sich von den Ansätzen mit YehU-His₆. His₆-YehS sowie His₆-Rsd hatten, sowohl einzeln als auch zusammen, keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung von YehU-His₆ (Abb. 3.18 B, C und Daten nicht gezeigt). Der Phosphotransfer auf His₆-YehT kann ausgeschlossen werden, da zum einen in der Reaktion mit His₆-YehT-D54E (Abb. 3.18 D) die vermeintliche His₆-YehT Phosphorylierungsbande auftritt, zum anderen tritt diese Bande auch in Membranvesikeln mit YehU-His₆ auf (Daten nicht gezeigt).

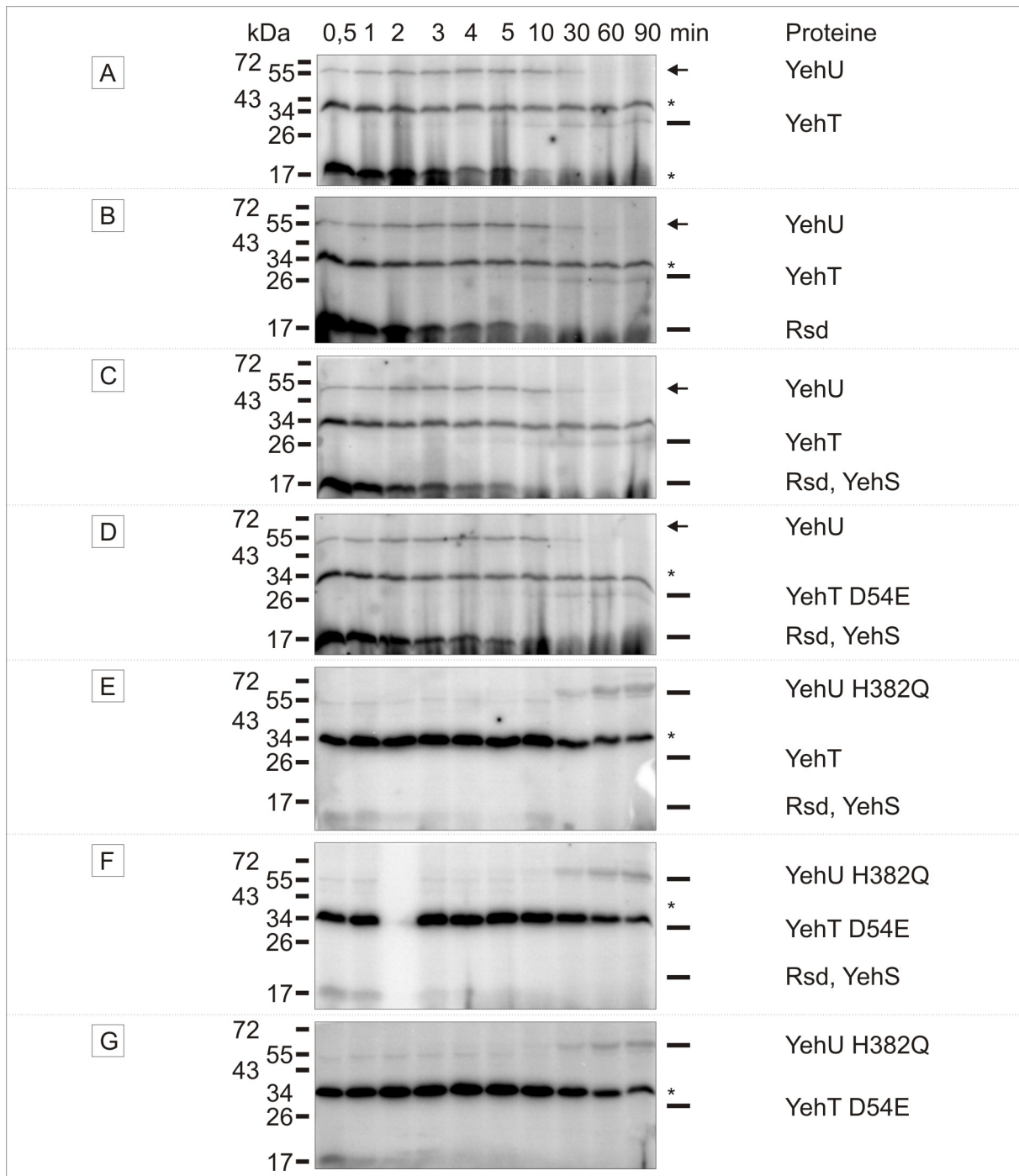


Abbildung 3.18: Rekonstitution der Phosphorylierungskaskade YehU/YehT und putativer akzessorischer Proteine in vitro. Die Proteine wurden wie im Text beschrieben überproduziert und gereinigt bzw. die Membranen präpariert. Die Phosphorylierung erfolgte wie in Abschnitt 2.5.9.3 beschrieben mit γ - 32 P-ATP (0,016 μ M; 111 TBq/mmol) in 50 mM NaCl enthaltendem Puffer. Die Reaktion wurde durch Zugabe γ - 32 P-ATP gestartet und zu den angegebenen Zeitpunkten mit SDS-Probenpuffer abgestoppt (2.5.9.3). Die Inkubationszeit ist in Minuten angegeben. YehU-His₆ und Derivate lagen in Membranvesikel von TKR2000 vor. Pro Spur sind ca. 125 μ g Gesamtprotein (Membranen) aufgetragen entsprechend ca. 6,25 μ g His₆-YehU (100 pmol) und je 200 pmol gereinigtes His₆-YehT, His₆-YehS und His₆-Rsd. Die Proben wurden via SDS-PAGE aufgetrennt. Striche und Proteinennamen geben die erwartete Laufhöhe anhand des Molekulargewichts an, Pfeile eindeutig identifizierte phosphorylierte Proteine, * unspezifische Phosphorylierung. Die Testansätze enthielten A) YehU-His₆ und His₆-YehT; B) YehU-His₆, His₆-YehT und His₆-Rsd; C) YehU-His₆, His₆-YehT, His₆-Rsd und His₆-YehS; D) YehU-His₆, His₆-YehT D54E, His₆-Rsd und His₆-YehS; E) YehU-His₆ H382Q, His₆-YehT, His₆-Rsd und His₆-YehS; F) YehU-His₆ H382Q, His₆-YehTD54E, His₆-Rsd und His₆-YehS; G) YehU-His₆ H382Q und His₆-YehT D54E. Weitere Erläuterungen siehe Text.

YehU-His₆ phosphorylierte sich innerhalb von 5 Minuten maximal (Abb. 3.18 A-D). Danach nahm die Menge von P~YehU-His₆ ab und auf Höhe von His₆-YehT erschien eine Bande. Das Maximum der Phosphorylierung war nach 90 Minuten erreicht. Allerdings ist diese Bande auch im Ansatz vorhanden, in welchem His₆-YehT-D54E, das nicht phosphorylierbare Derivat, vorhanden war (Abb. 3.18 D). Diese Bande war auch in Gelen zu sehen, in welchen nur MV mit YehU-His₆ mit γ -³²P-ATP inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Wurden YehU-H382Q-His₆ und His₆-YehT-D54E (auch zusammen mit His₆-YehS und His₆-Rsd) inkubiert, konnte keinerlei Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb. 3.18 E-G). His₆-Ndk vollzog eine sehr starke Autophosphorylierung (Abb. 3.19), konnte die Phosphorylgruppe aber weder auf YehU-His₆ (Daten nicht gezeigt) noch auf His₆-YehT (Stefan Behr, 2010, persönliche Kommunikation) übertragen. Rekonstituiertes His₆-YehU ließ sich, analog zu Abb. 3.16, auch in Anwesenheit von His₆-YehT, His₆-YehS, His₆-Ndk und His₆-Rsd nur schwach phosphorylieren (Daten nicht gezeigt).

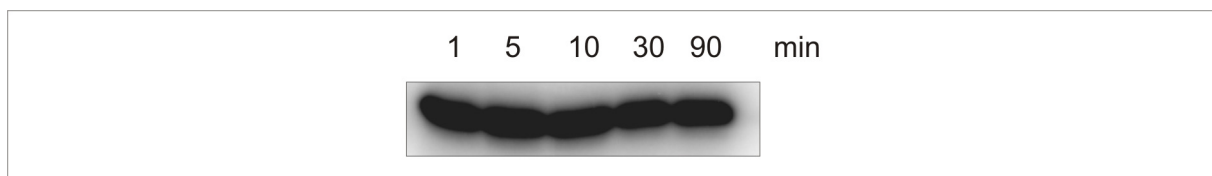


Abbildung 3.19: Autophosphorylierung von His₆-Ndk. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Radiogramms. Das Protein wurde wie im Text beschrieben überproduziert und gereinigt. Die Phosphorylierung erfolgte wie in Abschnitt 2.5.9.3 beschrieben mit γ -³²P-ATP (0,016 μ M) in 50 mM NaCl enthaltendem Puffer. Die Reaktion wurde durch Zugabe γ -³²P-ATP (0,016 μ M; 111 TBq/mmol) gestartet und zu den angegebenen Zeitpunkten mit SDS-Probenpuffer abgestoppt (2.5.9.3). Die Inkubationszeit ist in Minuten angegeben. Pro Spur sind 200 pmol gereinigtes His₆-Ndk aufgetragen. Die Proben wurden via SDS-PAGE aufgetrennt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4. Diskussion

SHK/AR-Systeme ermöglichen eine rasche Adaptation an wechselnde physikalische und chemische Umweltbedingungen sowie die Sensierung anderer Lebewesen. *Escherichia coli* besitzt 23 orthodoxe Sensor-Histidinkinasen (SHK), eine nicht orthodoxe Sensorkinase (CheA), fünf Hybridsensorkinasen, ein Histidintransferprotein und 32 Antwortregulatoren (AR) (Mizuno, 1997). Das YehU/YehT-System wurde anhand von Sequenzhomologien klassifiziert. Die LytS-artige SHK YehU und der LytTR-artige AR YehT kommen in etlichen Ordnungen und Spezies vor und wurden in 319 Genomen identifiziert (Ralf Heermann, persönliche Kommunikation, NCBI Datenbank Stand 2009). In dieser Arbeit werden die ersten detaillierten Ergebnisse zur Funktion des YehU/YehT Systems präsentiert.

4.1 Identifizierung YehU/YehT regulierter Gene

Oftmals kann die Funktion eines SHK/AR-Systems durch eine phänotypische Charakterisierung abgeleitet werden. Dies war im Fall von YehU/YehT nicht möglich. Es wurde gezeigt, dass die Überproduktion des AR YehT eine moderat gesteigerte Resistenz gegen einige Agenzien, wie z.B. Desoxycholat und Fosfomycin vermittelt (Hirakawa *et al.*, 2003). Diese Phänotypen wurden auch bei der Überproduktion anderer AR beobachtet, was auf indirekte Effekte hindeutete (Hirakawa *et al.*, 2003). Einer *yehU/yehT*-Deletionsmutante konnte kein signifikanter Phänotyp bezüglich der Nutzung von Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphat- und Schwefelquellen zugewiesen werden (Zhou *et al.*, 2003). Im Zuge dieses Projekts wurde mikroskopisch festgestellt, dass die *yehU/yehT* Doppeldeletionsmutante eine Tendenz zur Aggregation aufweist. Zudem konnte eine Deformation des periplasmatischen Raums visualisiert werden (Behr, 2009, Fried, 2008, Guggenberger, 2007; Kraxenberger und Wanner, 2007, Daten nicht gezeigt). Aggregation kann durch Ladungsveränderung bzw. Hydrophobizität der Zelloberfläche erklärt werden (Rosenberg *et al.*, 1980), welche u.a. durch extrazelluläre Strukturen wie Flagellen, Adhäsine (Sherlock *et al.*, 2005), Curli (Barnhart und Chapman, 2006), Exopolysaccharide (Prigent-Combaret *et al.*, 2000) oder Pili (Bieber *et al.*, 1998) zustande kommen. Flagellierung, Exopolysaccharide und Curlibildung, sowie die grundsätzliche Änderung der Hydrophobizität der *yehU/yehT* Deletionsmutante konnten ausgeschlossen werden (Behr, 2009, Guggenberger, 2007). Eine Deformation des periplasmatischen Raums kann auf eine Veränderung der (Protein-)Zusammensetzung des periplasmatischen Raums, durch Veränderungen des Peptidoglycans, der äußeren oder inneren Membran zustande kommen. Das Proteom des Periplasmas, der inneren und äußeren Membran der *yehU/yehT* Doppeldeletionsmutante unterschied sich nicht vom WT

(Fried, 2008) und kann daher als Ursache für diesen Phänotyp ausgeschlossen werden. Eine alternative Strategie zur Identifizierung YehU/YehT abhängiger Gene war die Analyse der genomischen Umgebung von *yehU/yehT*. Oftmals sind die Gene eines Transkriptionsregulators oder eines SHK/AR-Systems mit den Genen assoziiert, welche sie regulieren. *kdpD/kdpE* ist mit *kdpFABC* in einem Operon organisiert (Heermann und Jung, 2010) und *lytS/lytR* in *S. aureus* mit *IgrAB* assoziiert (Brunskill und Bayles, 1996b). Allerdings gibt es auch Beispiele, bei denen diese Assoziation der Gene nicht gegeben ist. Das EnvZ/OmpR-System reguliert neben *ompC* und *ompF* (Forst *et al.*, 1989) auch die Expression von *tppB* (Goh *et al.*, 2004) oder *omrA* (Guillier und Gottesman, 2006). Die Gene *yehS*, *mlrA*, *yehLMPQ*, *osmF-yehWXY* und *yehR* (Abb. 1.3), welche sich in direkter Nachbarschaft zu *yehU/yehT* befinden, werden nicht durch YehU/YehT reguliert. Es wurde durch Expressionsanalysen (Luitpold Fried, 2009, persönliche Kommunikation, 3.5 und Tab. 3.1) ausgeschlossen, dass YehU oder YehT an der Expression von *osmF*, *yehS* und *yehR* beteiligt sind. *yehS* wurde zwar in der Doppeldeletionsmutante nicht exprimiert, allerdings konnte mit einer MG1655 Mutante gezeigt werden, in welcher *yehT* durch die Insertion einer Kassetten inaktiviert wurde (MG3), dass die Deletion des gesamten *yehU/yehT*-Operons per se die Expression verhinderte. Vermutlich überschneiden sich die 5'-regulatorische Sequenz von *yehS* und das Strukturgen *yehT*. Die Expression von *yehR* unterschied sich in MG3 nicht vom WT (Luitpold Fried, 2009, persönliche Kommunikation). Obwohl dieses Gen revers und komplementär zu *yehU/yehT* codiert vorliegt, scheinen polare Effekte der Deletion die Expression zu verhindern. Die Expression von *osmF* unterschied sich nicht in WT und *yehT*-Deletionsmutante. In den übrigen Fällen war die Transkriptmenge zu gering, weshalb die Affinität von YehT zu den potentiellen Promotoren gemessen wurde. His₆-YehT bindet die Promotor-DNA der *yehU/yehT* benachbarten Gene mit einem K_d-Wert von ca. 250 – 800 nM und somit mit drei- bis zehnfach geringerer Affinität als den *yjiY* Promoter (Abb. 3.1 und Tab. 3.2). Zudem ist die genomische Umgebung von *yehU/yehT* nicht konserviert: Die Organisation der Gene *yehU*, *yehT*, *mlrA* und *yehS* trifft nur auf einige *E. coli*, *Shigella* und *Salmonella* Spezies zu. Eine Anordnung aller genannten Gene, wie sie in Abb. 1.3 dargestellt ist, existiert nur in *E. coli*. Dagegen ist z.B. die Organisation des *kdp*-Regulons in den meisten Spezies wie in *E. coli* aufgebaut (Jensen *et al.*, 2009).

Als weiterer Ansatz wurden die Ergebnisse einer komparativen Transkriptionsanalyse SHK/AR-defizienter *E. coli* BW25113 auf MG1655 übertragen. Die Daten wurden schon von diversen Arbeitsgruppen als Grundlage für weiterführende Arbeiten benutzt und führten z.B. zur näheren Charakterisierung der EnvZ/OmpR vermittelten *tppB* Expression (Goh *et al.*, 2004). In der *yehU/yehT* BW25113 Deletionsmutante verringerte sich die Expression von sieben Genen (*yafT*, *cspB*, *rfc*, *yehR*, *rfaS*, *yjhC*, *yjhA*). Die Expression dieser Gene in unterschiedlichen MG1655 Mutanten unterschied sich mit Ausnahme von *yehR* nicht vom

WT (Tab. 3.3 und Luitpold Fried, 2008, persönliche Kommunikation). Bei 13 Genen erhöhte sich die Expression in der *yehU/yehT* BW25113 Deletionsmutante (*mlc*, *henH*, *focA*, *yccY*, *narG*, *narK*, *napD*, *nirB*, *feoA*, *malT*, *nika*, *ilvC*, *yjfO*; Oshima *et al.*, 2002) gegenüber dem WT. Die Expression von *mlc* und *yjfO* unterschied sich in MG1655 Mutanten vom WT (Tab. 3.3 und Luitpold Fried, 2008, persönliche Kommunikation). Die K_d -Werte der Bindung von His₆-YehT an die korrespondierenden Promotoren lag bei ca. 600 - 1300 nM und somit deutlich höher als bei P_{yjiY} (Tab. 3.3). Zudem gab es keine Sequenzähnlichkeiten zwischen den Promotoren (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die von Oshima *et al.* (2002) vorgeschlagenen Gene nicht direkt von YehU/YehT reguliert werden. Dies kann zum einen auf polare Effekte der Deletion zurückgeführt werden. Zudem unterscheidet sich *E. coli* BW25113 genetisch von *E. coli* MG1655 (Baba *et al.*, 2006).

Als weitere Möglichkeit zur Identifizierung von YehT regulierten Genen wurden Daten sequenzhomologer Systeme extrapoliert. Es wurde vorgeschlagen, dass LytTR-artige Antwortregulatoren wegen ihrer charakteristischen Struktur eine direkte Wiederholung des konservierten DNA-Motivs [TA][AC][CA]GTTN[AG][TG] binden, deren Abstand zwischen 12 und 13 Nukleotiden beträgt (Nikolskaya und Galperin, 2002). Dies wurde z.B. für *S. aureus* AgrA (Koenig *et al.*, 2004, Sidote *et al.*, 2008) und *P. aeruginosa* AlgR (Mohr *et al.*, 1991) nachgewiesen. Ein Strukturmodell von der C-terminalen Domäne von YehT mit HHPred (Söding *et al.*, 2005), das auf der Kristallstruktur von AgrA (PDB Datei 3bs1, Sidote *et al.*, 2008) beruht, bekräftigte den Aufbau aus β -Strängen. Direkte Wiederholungen des Motivs [TA][AC][CA]GTTN[AG][TG] im Abstand von 11-15 Nukleotiden wurde bioinformatisch im *E. coli* Genom identifiziert (Lechat *et al.*, 2008). Die infrage kommenden Sequenzen und deren Lage sind in Tab. 3.4 dargestellt. Die Expression aller angeführten Gene wurde durch His₆-YehT Überproduktion nicht induziert. Der *mtfA* Promotor enthielt eine perfekte Wiederholung des Motivs. Da MtfA die Expression von *mlc* reguliert, was ein Teilergebnis von Oshima *et al.* (2002) erklärt hätte, wurde die Expression detaillierter untersucht. Es konnten keine Unterschiede in der Expression zwischen WT und Doppeldeletionsmutante nachgewiesen werden (Luitpold Fried, 2008, persönliche Kommunikation). Zudem band His₆-YehT nicht spezifisch an den korrespondierenden Promotor (Daten nicht gezeigt). AlgR erkennt das weniger konservierte Motiv CCGTKBKTC (Lizewski *et al.*, 2004). Diese ist im *E. coli* Genom nicht vorhanden (Daten nicht gezeigt). Es sollte an dieser Stelle betont werden, dass eine Vorhersage mit mehr Variablen nicht auswertbar ist. Wird pro Motiv eine Nt-Variation zusätzlich erlaubt, erhöht sich die Zahl auf über 500 Treffer (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden die Daten von vollständig charakterisierten homologen Systemen extrapoliert. Das gut charakterisierte SHK/AR-System LytR/LytS in *S. aureus* ist sequenzhomolog zu YehU/YehT. LytR/LytS regulieren die Expression des Operons *IrgA/IrgB*. Diese Gene wiederum sind homolog zum Operon *yohJ/yohK* in *E. coli* (Brunskill

und Bayles, 1996b). Die Genprodukte sind an der Zellwandsynthese beteiligt. *yohJ/yohK* wurden in *yehU/yehT* defizienten *E. coli* nicht differentiell exprimiert (Luitpold Fried, 2008, persönliche Kommunikation), nach Überproduktion des AR änderte sich die Expression nicht (siehe Anhang CD A-5). His₆-YehT interagiert auch nicht spezifisch mit der Promotorregion des Operons (Daten nicht gezeigt).

Schließlich wurde auf artifizielle in vitro Systeme zurückgegriffen. Mit Hilfe von YehT:DNA Co-Reinigung wurde versucht, YehT bindende DNA Fragmente aus dem *E. coli* Chromosom anzureichern. Kovalent mit Formaldehyd fixierte His₆-YehT:DNA Komplexe wurden analog zur His₆-YehT Reinigung extrahiert. Die 24 sequenzierten Fragmente hatten weder gemeinsame DNA-Motive noch banden sie spezifisch an His₆-YehT (Daten nicht gezeigt). Durch die Quervernetzung werden offensichtlich auch unspezifische und transiente Interaktionen kovalent stabilisiert. Chromatin-Immunopräzipitation wird in Eukaryoten erfolgreich angewendet, allerdings wird dabei der Transkriptionsfaktor nicht überproduziert, was unspezifische Interaktionen deutlich reduziert (Ballestar und Esteller, 2010). Daneben wurde chromosomale *E. coli* DNA mit gereinigtem His₆-YehT in vitro angereichert (*spda*). Parallel sollten YehT-bindende Fragmente einer *E. coli* Genombibliothek durch alternierende Protein-Bindung und PCR Amplifikation angereichert werden (SELEX). Diese Methode führte z.B. zur Identifizierung von RstA-bindenden Fragmenten (Ogasawara *et al.*, 2007). 34 *spda* und 19 SELEX Fragmente wurden sequenziert. Diese wiesen keine gemeinsamen Motive auf, zwischen den Genen konnte keine funktionale Verbindung hergestellt werden (Daten nicht gezeigt). In Gel-Retardationsexperimenten band His₆-YehT die isolierten Fragmente mit geringer Affinität.

Da der Stimulus unbekannt ist, der YehU/YehT aktiviert, wurde durch His₆-YehT Überproduktion die zelluläre Konzentration stark erhöht, so dass eine YehT-abhängige Genexpression induziert wurde. Das globale Expressionsprofil wurde mit Affymetrix *E. coli* Genom 2.0 Chips erfasst. Diese Vorgehensweise war unter anderem erfolgreich bei der Charakterisierung der Rap Proteine in *Bacillus subtilis* (Auchtung *et al.*, 2006) oder bei der Identifizierung EvgA regulierter Gene in *E. coli* (Masuda und Church, 2002). Zudem konnte mit dieser Methode die Gene der Regulone von DegU, ComA and PhoP in *Bacillus subtilis* bestätigt werden (Ogura *et al.*, 2001). Die Überproduktion von His₆-KdpE wurde als Kontrollgruppe gewählt, da das Signal (K⁺-Limitation) und die Zielgene von KdpD/KdpE bekannt sind (*kdpFABC*, Heermann und Jung, 2010). Es sind keine weiteren KdpE-Bindestellen bzw. KdpE-regulierten Gene im *E. coli* Genom bekannt (Weber, 2003).

Die *yehT* Expression war fünffach gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Eine *yehT* Expression wurde auch in der *kdpE*-Gruppe gemessen, weil *yehT* in MG3 durch eine Resistenzkassette unterbrochen wurde, was zur Bildung eines nicht-translatierbaren Transkripts führte. Dieses war ungefähr 2000 Nukleotide lang (720 Nukleotide *yehT* plus ca.

1300 Nukleotide der Kasette) und konnte auch im Northern Blot visualisiert werden (Luitpold Fried, 2010, persönliche Kommunikation). Die Expression von *kdpE* wurde gegenüber der YehT-Gruppe 18-fach induziert. In der Kontrollgruppe konnte die Stimulus-unabhängige Expression von *kdpFABC* nach Überproduktion von His₆-KdpE beobachtet werden (Tab. 3.5).

Über 700 Gene wurden nach *yehT* Überexpression im Vergleich zur *kdpE* Kontrollgruppe differentiell exprimiert (Anhang CD A-1), was eine ungewöhnlich große Zahl ist. Wegen des artifiziellen Induktionssystems wurde die Transkriptionsanalyse als *screening* verstanden, dessen Ergebnisse im Detail validiert werden mussten. Daher waren die üblichen Auswertungen einer Transkriptomanalyse (Gen-Cluster Berechnungen, etc.) nicht sinnvoll und wurden nicht ausgeführt. Es wurden nur die Gene/Promotoren weiter analysiert, deren Expression in einer Gruppe (His₆-YehT- oder His₆-KdpE-Überproduktion) mindestens 100 Fluoreszenzeinheiten aufwies und die Änderung der Expression mindestens achtfach war. In Tab. 3.6 sind 37 signifikant regulierte Gene dargestellt. 14 Gene wurden verstärkt exprimiert, bei 23 verringerte sich die Expression. Die Expression einer Auswahl dieser Gene nach Überproduktion von His₆-YehT bzw. His₆-KdpE wurde in *E. coli* MG3, *yehU/yehT* Doppeldeletionsmutante und Wildtyp) mit Northern Blot Hybridisierung analysiert. Dabei wurde deutlich, dass die Expression der Gene *yjiY*, *b3007*, *cspl*, *evgA/evgB*, *ivbL*, *nlpA*, *yahN*, *yebK*, *yhjX* und *ypjB* ausschließlich in Abhängigkeit von YehT reguliert wurde, in den übrigen Fällen führten vermutlich sekundäre Effekte wie die Kalium-Aufnahme durch das KdpFABC-System zu einer veränderten Genexpression (Luitpold Fried 2010, persönliche Kommunikation).

Zunächst wurden die potentiellen regulatorischen Bereiche dieser Gene bioinformatisch analysiert. Vergleiche aller zehn 5'-UTR der oben genannten Gene mit MEME und GLAM2 (Bailey und Elkan, 1994, Frith *et al.*, 2008) erbrachten keine signifikanten Gemeinsamkeiten. Im direkten Vergleich der stromaufwärts gelegenen Sequenzen von *yjiY* und *yhjX* wurde ein gemeinsames Motiv identifiziert, welches große Ähnlichkeit zur beschriebenen LytTR Konsensus DNA-Bindesequenz hat (Abb. 3.3). Das Motiv lag 682 bp von *yjiY* und 1169 bp stromaufwärts von *yhjX*. Wegen der großen Entfernung wurde dieses Motiv bei der oben diskutierten Suche nach LytTR-artigen Konsensus DNA-Bindesequenzen nicht identifiziert. *far upstream sequences* (FUS) Bindesequenzen sind für den AR AlgR in *P. aeruginosa* bekannt. Sie liegen zwischen -533 und -332 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes und sind zur vollen Induktion der Expression von *algD* nötig, welches für ein Schlüsselenzym der Alginatproduktion codiert. Vermutlich spielen diese Bindestellen eine Rolle bei der Deformation der DNA zur Initialisierung der Transkription. FUS beinhalten aber nur ein AlgR Bindemotiv (Mohr *et al.*, 1991). Die Interaktion von His₆-YehT mit den *yjiY* und *yhjX* FUS wurde quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Spezifität der

Bindung wurde anhand mutierter Sequenzen überprüft, in welchen die Konsensussequenz systematisch mutiert wurde. In allen Fällen lag die Dissoziationskonstante bei ca. 600 nM. Es gab keine Unterschiede zwischen den originalen und den mutierten Sequenzen. Daraus wurde geschlossen, dass YehT diese Sequenzen nicht bindet.

Daher wurde die Arbeitshypothese geändert. Es wurde in Erwägung gezogen, dass YehT nicht zwangsläufig mit dem klassischen LytTR-artigen DNA-Bindemotiv [TA][AC][CA]GTTN[AG][TG] (Nikolskaya und Galperin, 2002) interagiert. Des Weiteren wurde angenommen, dass der genannte Datensatz der Transkriptomanalyse noch Gene beinhaltet, die nicht direkt von YehT reguliert werden. Mittels 5'-RACE wurde der Transkriptionsstartpunkt für *yjiY*, *b3007*, *cspI*, *evgA/evgB*, *ivbL*, *nlpA*, *yahN*, *yebK*, *yhjX* und *ypjB* bestimmt, um die Lage der YehT Bindestelle abschätzen zu können (Abb. 3.4 und 3.7). Der Abstand des Transkriptionsstartpunktes betrug - 88 Nt bei *yjiY*, -97/-123/-156 Nt bei *b3007*, -45/-145 Nt bei *cspI*, -114/-124 Nt bei *evgA/evgB*, -28 Nt bei *ivbL*, -24 Nt bei *nlpA*, -78 Nt bei *yahN*, -54/-62 Nt bei *yebK*, -37 Nt bei *yhjX* und -389 Nt bei *ypjB*. Details zu *yjiY* sind in Abb. 3.7 zu sehen. Multiple Startpunkte sind nicht ungewöhnlich und dienen der differentiellen Regulation des Gens durch verschiedene Transkriptionsregulatoren oder auch der Regulation der RNA Stabilität durch unterschiedlich lange 5'-UTR. Es konnte bereits bekannte Transkriptionsstartpunkte bestätigt werden: Die beiden Transkriptionsstartpunkte von *evgA/evgS* sind bereits bekannt (Tanabe *et al.*, 1998). Von *cspI* ist bereits der Transkriptionsstartpunkt Nt -145 bekannt (Wang *et al.*, 1999), ebenso wie der Transkriptionsstartpunkt von *nlpA* (Bodero *et al.*, 2007). Leichte Differenzen gab es bei der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *ivbL*. Der der Startpunkt wurde durch in vitro Transkription bei Nt -35 geschätzt (Friden *et al.*, 1982), hier wurde -28 bestimmt. Die Daten zu den neu charakterisierten Transkriptionsstartpunkten sind stimmig. In *E. coli* beginnt die Transkription stromabwärts der -35/-10 Box im Abstand von durchschnittlich sieben (± 1) Nukleotiden (Harley und Reynolds, 1987). Dieser Abstand besteht in allen Fällen zwischen der vorhergesagten -35/-10 Boxen und der experimentell bestimmten Transkriptionsstartpunkte. Dieser kann im Extremfall bis zu mehrere hundert Nt vom Translationsstartpunkt entfernt sein, befindet sich aber statistisch am häufigsten zwischen 30 und 40 Nt stromaufwärts des Translationsstartpunkts. Der Transkriptionsregulator bindet dann statistisch weitere 50 Nt stromaufwärts. Allerdings kann ein AR von 150 (oder mehr) Nt stromaufwärts und bis zu 150 Nt stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts binden (Mendoza-Vargas *et al.*, 2009). Bei der QseB Autoregulation ist der Transkriptionsstartpunkt 77 Nt stromaufwärts von *qseB* lokalisiert, eine QseB Bindestelle befindet sich 464 Nukleotide, eine andere aber nur vier Nt stromaufwärts (Clarke und Sperandio, 2005a, Clarke und Sperandio, 2005b). Die Sonden zur Charakterisierung der YehT:Promotor Interaktion umfassten jeweils 150 bp stromaufwärts und stromabwärts des

Transkriptionsstartpunkts um den statistisch häufigsten Bindebereiche abzudecken. In YehT:DNA Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass His₆-YehT ausschließlich die P_{yjiY -300/+1} Sonde spezifisch mit einem K_d-Wert von ca. 75 nM band. Alle übrigen Fragmente wurden mit einem K_d-Wert von 250 nM – 600 nM gebunden (Abb. 3.5). Die Expression von *b3007*, *cspl*, *evgA/evgB*, *ivbL*, *nlpA*, *yahN*, *yebK*, *yhjX* und *ypjB* war zwar von der Überproduktion von His₆-YehT abhängig (Tab. 3.6). Allerdings sind hierfür vermutlich indirekte Effekte verantwortlich. Die direkte Interaktion von YehT mit einem Promotor wurde in dieser Arbeit höher bewertet als die Expression eines Gens in Deletionsmutanten oder nach AR-Überproduktion.

4.2 Der YehT-abhängige Promotor von *yjiY*

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass YehT mit einer apparenten Dissoziationskonstante von 75 nM 13 Nt stromaufwärts der -35/-10 Box an den *yjiY* Promotor band (siehe oben und Abb. 3.7 bzw. 4.1). Der Promotor P_{yjiY -300/+1} wurde daher im Detail charakterisiert. Zunächst wurde die spezifische Interaktion mit His₆-YehT in einem DNase I Schutzexperiment bestätigt (Abb. 3.6). Es wurde stets dasselbe 68 bp Fragment der P_{yjiY -300/+1} Sonde geschützt. Der geschützte Bereich lag 8 Nukleotide stromaufwärts der putativen -35 Box, 42 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts bzw. 131 Nukleotide stromaufwärts des Translationsstartpunkts. Der Schutzeffekt ließ sich durch Erhöhung der His₆-YehT Konzentration titrieren, was die Spezifität der Interaktion bestätigte. Bioinformatische Analysen zeigten, dass der geschützte Bereich eine direkte dreifache Wiederholung des Motivs CC[G/A]CT[C/A]A beinhaltete, welche durch 13 und 14 Nukleotide getrennt waren (Abb. 3.16 und 4.1). Wurde ein Fehler im Motiv erlaubt, kann die potentielle Bindestelle auf eine vierfache Wiederholung ausgeweitet werden. Um die direkte Interaktion an der beschriebenen Position zu bestätigen, wurde das Fragment P_{yjiY -300/+1} in drei 100 bp große Teilfragmente unterteilt: P_{yjiY -100/+1}, P_{yjiY -200/-101} und P_{yjiY -300/-201}. Nur P_{yjiY -200/-101} interagiert spezifisch mit His₆-YehT (Abb. 3.8), was mit der YehT-Bindestelle ausgezeichnet übereinstimmt, die im DNase I Schutzexperiment bestimmt wurde. Das auf 68 bp verkürzte Fragment P_{yjiY P}, welches nur den geschützten Bereich repräsentiert, wurde mit der gleichen Affinität wie P_{yjiY -300/+1} und P_{yjiY -200/-101} mit einem K_d-Wert von ca. 75 nM von His₆-YehT gebunden (Abb. 3.8). Daher wurde im Umkehrschluss abgeleitet, dass das weniger konservierte Motiv 4 nicht zur Interaktion mit His₆-YehT notwendig ist. Motiv 4 wurde auch im DNase I Schutzexperiment nicht geschützt. Zusätzlich wurden unterschiedliche mutagenisierte Fragmente hergestellt, um die Bedeutung der Motive innerhalb des geschützten Fragments zu charakterisieren. Wurde Motiv 3 substituiert, sank die Affinität

geringfügig. Dies indizierte, dass Motiv 3 zur Stabilisierung der YehT:DNA-Interaktion notwendig ist. Alle weiteren Mutationen in Motiv 2 und Motiv 1 führten zu einer dramatischen Abnahme der Affinität. Daraus wurde gefolgert, dass dies die Interaktionssequenzen mit His₆-YehT sind. Im Zuge dieser Bindestudien wurde zudem ausgeschlossen, dass YehS zur Bindung des (phosphorylierten) AR beiträgt. In Anwesenheit von YehS änderte sich der K_d-Wert weder für His₆-YehT, noch für His₆-YehT-D54E.

Interessanterweise führte auch die Mutagenese des *spacers* zwischen den Motiven zu einer Abnahme der Bindungsaffinität (Abb. 3.8). Daher wurde postuliert, dass dieser Bereich zur Interaktion notwendig ist. Weitere Versuche zeigten, dass drei Adeninbasen stromaufwärts der Motive 1 und 2 zur Bindung beitragen (Stefan Behr, 2010, persönliche Kommunikation). Das erweiterte Bindemotiv ist somit AAANNACC[G/A]CT[C/A]A-N7-AAANNACC[G/A]CT[C/A]A und steht bezüglich der Sequenz, der Länge der Motive und des Abstands im Gegensatz zum vorhergesagten Motiv [TA][AC][CA]GTTN[AG][TG] (Nikolskaya und Galperin, 2002).

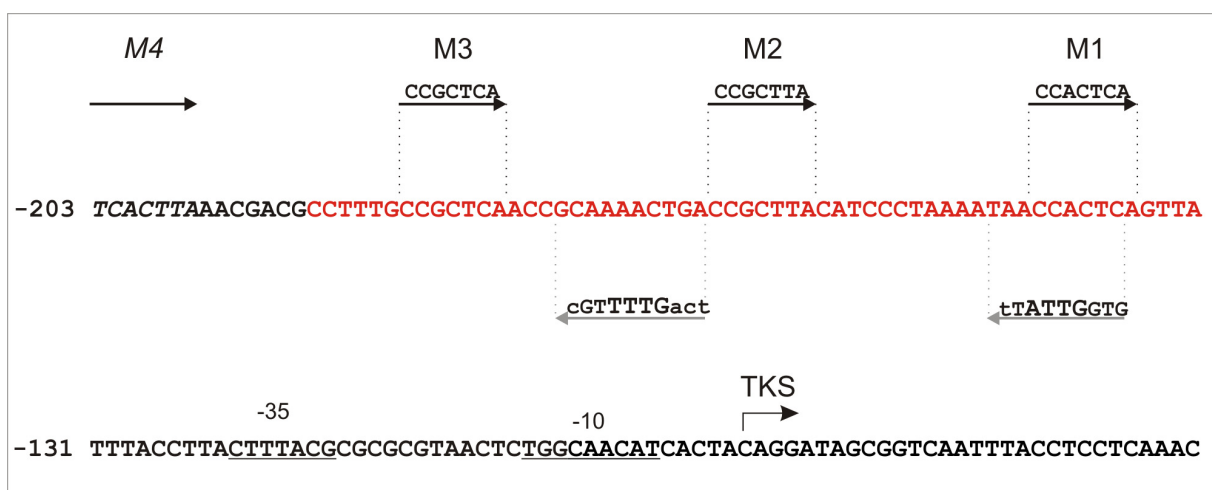


Abbildung 4.1: Der *yjiY* Promotor in *E. coli*. Die Abb. fasst alle experimentellen und bioinformatischen Informationen zum relevanten Teil der 5'-UTR von *yjiY* zusammen. Dargestellt ist die Sequenz von Nt 203 bis Nt 59 der 5'-UTR von *yjiY*. →TKS bezeichnet den mit 5-RACE identifizierten Transkriptionsstartpunkt. Die rot dargestellte Sequenz P_{*yjiY*}_P wird durch His₆-YehT vor DNase I Verdau geschützt. Die Sequenzen der vorhergesagten -35 und -10 Box (BProm, Softberry) sind unterstrichen. Zwei mögliche Interpretationen der von YehT erkannten DNA-Sequenz sind dargestellt. Motiv 1-3 (M1-M3) wurden von MEME vorhergesagt. M4 (Sequenz kursiv) ist im Gegensatz zu M1-M3 degeneriert. Die LytTR-artige Bindesequenz (Lyt) wurde mit VectorNTI identifiziert. Sie ist auf dem komplementären DNA-Strang revers lokalisiert. Kleinbuchstaben zeigen von der Konsensus-Sequenz abweichende Nucleotide an.

Es existieren zwei LytTR-ähnliche Motivwiederholungen im *yjiY* Promotor. Allerdings sind diese wenig konserviert, der Abstand der Motive beträgt 16 Nucleotide und sie sind zudem noch auf dem komplementären DNA-Strang revers orientiert. Ein Beispiel für einen ungewöhnlichen Bindungsmodus ist die Bindung von AlgR in *P. aeruginosa* an den *hcnA*

Promotor, welcher eine LytTR Konsensus-Bindesequenz auf dem komplementären Strang aufweist (Carterson *et al.*, 2004). Zwischen diesen beiden Interpretationen des Bindemotivs im *yjiY* Promotor kann schlecht unterschieden werden, da sie in Motiv 1 und den *spacern* überlappen. Möglicherweise können diese Sequenzen auch nicht getrennt werden, da die hier identifizierte Bindesequenz aus der LytTR-artigen evolvierte. Das beschriebene Bindemotiv konnte in keiner anderen 5'-UTR der in dieser Arbeit analysierten bzw. diskutierten Gene identifiziert werden. Die Bindesequenz von His₆-YehT im *yjiY* Promotor kann nur mit Einschränkungen auf das *E. coli* Genom abgebildet werden. Die Interpretation der Extrapolation der YehT-Bindesequenz ist insgesamt schwierig und muss mit Vorsicht betrachtet werden. Die Bindestelle wurde anhand einer Sequenz bestimmt und es ist nicht klar, ob und welche Nukleotide konserviert sind (siehe oben, AlgR Konsensussequenz). Nur der *yjiY* Promotor enthält laut bioinformatischer Analyse die exakte Sequenz CCGCTTA-N₁₄-CCACTCA (Lechat *et al.*, 2008). Alle folgenden Aussagen zur Expression einzelner Gene beziehen sich auf das Expressionsprofil nach Überproduktion von His₆-YehT. Empirisch kann nicht festgelegt werden, wie die zugelassenen Variablen zu bewerten sind. Beispielsweise ist der Abstand der ermittelten Motive nur in den 5'-UTR von drei Genen (*fecE*, *rfaP* und *hisL/hisG*) exakt wie im *yjiY* Promotor, wobei nur *hisGL* nach His₆-YehT Überproduktion geringfügig stärker exprimiert wurde. *ybcV*, *yfcl* und *rarD* wurden in diesem Versuchsansatz nicht signifikant exprimiert, was aber ebenso auf eine geringe Stabilität der mRNA zurückzuführen sein könnte (Selinger *et al.*, 2003).

Eine perfekte Wiederholung des Motivs wies nur *muthH* auf, dieses Gen wurde aber nicht differentiell exprimiert. Der Einfluss des Abstands der Motivwiederholung zu der potentiellen -35/-10 Box ist ebenso eine Variable, welche nicht kognitiv bewertet werden kann. Einige Gene waren in Operonen organisiert (*waaQGP-rfaS-waaBIJY-rfaZ-waaK*, *ubiEPB*, *fecABCDE*, *mcrBC*). Das gesamte Operon *ubiEPB* wurde nicht differentiell exprimiert. Die Expression von *fecABCDE* und *mcrBC* verdoppelte sich, und die einzelnen Gene des Operons *waaQGP-rfaS-waaBIJY-rfaZ-waaK* wurden nicht, vermindert oder höher exprimiert. In keinem Fall ist das Ergebnis so eindeutig wie bei *yjiY*. Daher stellt Tab. 3.8 den ersten Vorschlag einer Extrapolation dar und muss eingehend geprüft werden. Abgesehen von den Promotorbereichen besteht laut STRING 8.3 Datenbank (Jensen *et al.*, 2009) keine Zusammenhang zwischen den in Tabelle 3.8 aufgeführten Genen bzw. den Proteinen. Vermutlich enthält die hier dargestellte Extrapolation noch falsch positive Kandidaten. Diese müssen durch in vivo und in vitro Experimente identifiziert werden.

Alleine der *yjiY* bzw. der korrespondierende Promoter erfüllte drei Kriterien, welche für eine (YehU)YehT abhängige Expression notwendig sind: eine signifikante Änderung der Expression nach YehT Überproduktion oder Deletion, eine YehT-Bindestelle (3.7.2) und eine affine Interaktion mit His₆-YehT.

Die physiologische Bedeutung des YehU/YehT-Systems bzw. des Zielgens *yjiY* ist unklar. *yjiY* (2151 bp) ist unter Standardbedingungen (12 h Wachstum in angereichertem LB, aerob, 37°C) ein nicht-essentielles Gen in *E. coli* (Gerdes *et al.*, 2003). Das korrespondierende 716 AS Protein ist mit 16-18 Transmembrandomänen in der inneren Membran von *E. coli* verankert (Daley *et al.*, 2005). Dies erklärt, warum die veränderte Produktion des Proteins nach Überproduktion des AR YehT in einer Proteomanalyse nicht detektiert wurde (Luitpold Fried, 2010, persönliche Kommunikation). Das Gen befindet sich bei 98,87 Centrisomen zwischen *yjiX* und *tsr*. Die Microarray Daten legen nahe, dass die die Expression von *tsr* von der AR-Überproduktion nicht beeinflusst wurde. Vermutlich wird *yjiY* separat reguliert und exprimiert (Keseler *et al.*, 2009, Salgado *et al.*, 2004). In einigen Organismen sind das *yehU/yehT* Operon bzw. sequenzähnliche Systeme mit *yjiY* assoziiert. Beispiele sind unter anderem *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, mehrere *Shewanella* Spezies, *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus*, *Clostridium* Spezies (u.a. *C. botulinum* 19397) und *Bacillus anthracis*. Diese Assoziation spricht für eine genetische Regulation durch YehU/YehT.

YjiY gehört zur CstA Familie. *YjiY* und CstA sind zu 60,3% identisch (Daten nicht gezeigt). Zu dieser Familie gehören CstA Homologe u.a. in *Aquifex aeolicus*, *B. subtilis*, *Helicobacter pylori* J99, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, CstA und *YjiY* in *E. coli* (Jain *et al.*, 2009). CstA ist ein Peptidtransporter, der vermutlich an der Verwertung von Peptiden beteiligt ist (Schultz und Matin, 1991). Die *cstA* Expression wird durch cAMP und CRP reguliert und bei C-Mangel induziert. Die Translation ist von CsrA abhängig, da dieses Protein die Ribosomenbindestelle der *cstA* mRNA blockiert (Dubey *et al.*, 2003, Schultz und Matin, 1991). Die Deletion von *yehU/yehT* verhindert die Expression von *yjiY* (Fried, 2010, persönliche Kommunikation). Die *yehUT* Deletionsmutante wies keinen signifikanten Stoffwechsel-Phänotyp auf (Zhou *et al.*, 2003). Daher kann spekuliert werden, ob die Abwesenheit von *YjiY* z.B. durch CstA kompensiert wird, oder ob *YjiY* eine sehr spezialisierte (Transport-)Aufgabe besitzt, welche in dieser Analyse nicht berücksichtigt wurde. Aus Homologiedaten ist die Funktion von *YjiY* nicht ableitbar.

4.3 Biochemische Charakterisierung von YehU und YehT

Die Phospho-Biochemie ist der zentrale Schritt der Signaltransduktion eines SHK/AR Systems. Die Rekonstitution des Systems *in vitro* ermöglicht eine exakte biochemische Charakterisierung. His₆-YehT, sowie die Derivate His₆-YehT-D54N und His₆-YehT-D54E wurden wie beschrieben gereinigt. Aspartat 54 ist der konservierte, phosphorylierbare Rest (Luitpold Fried, 2010, persönliche Kommunikation). Die AS Substitution D54N stellt somit theoretisch einen konstitutiv inaktiven, und D54E einen konstitutiv aktivierten AR dar. Die

Reinigungsprozedur und Dialysepuffer wurden bezüglich Ionenzusammensetzung und Salzkonzentration optimiert. Interessant ist, dass YehT in Anwesenheit von ≥ 10 mM Mg^{2+} präzipitiert. In der Regel sind Mg^{2+} -Ionen oder auch andere zweiwertige Ionen für die Funktion von Antwortregulatoren notwendig. Das aktive Zentrum der Signaleingangsdomäne weist typischerweise eine $(\alpha/\beta)_5$ Topologie auf. Drei Aspartatreste binden ein divalenten Metallion, welches für die Phospho-Biochemie unerlässlich ist. Einer dieser Aspartatreste wird auch phosphoryliert. Die Aktivität von gereinigten AR lässt sich *in vitro* durch die Phosphorylierung mit dem niedermolekularen Phosphatdonor Acetylphosphat nachweisen (Lukat *et al.*, 1992). YehT ließ sich durch ^{32}P -Acetylphosphat phosphorylieren, allerdings nur in Anwesenheit von 20 mM Mg^{2+} (Abb. 3.10). Daher ist anzunehmen, dass gereinigtes His₆-YehT während dieser Prozedur denaturiert. Die Phosphorylierung von YehT mit kaltem Acetylphosphat in Anwesenheit von 20 mM Mg^{2+} verringerte die DNA-bindende Aktivität zeitabhängig (Daten nicht gezeigt). Eine unspezifische Bindung konnte ausgeschlossen werden, da denaturiertes His₆-YehT nicht phosphoryliert wurde. Die für AR charakteristische Dimerisierung nach der Phosphorylierung konnte für His₆-YehT nicht gezeigt werden. Wurde His₆-YehT (\pm Acetylphosphat), das (biologisch) inaktive Derivat His₆-YehT-D54N, und auch das Phospho-Mimikry His₆-YehT-D54E mittels ihrer Masse in einer Gelfiltrationssäule aufgetrennt, wurden alle Derivate zu mehr als 90% als extrem großer Komplex eluiert. Die Masse betrug mehr als 80 kDa. Eine Interpretation dieser Daten ist schwierig, da His₆-YehT nach der Gelfiltration zu verdünnt für EMSA Experimente vorlag und/oder keine Bindung mehr festgestellt werden konnte. Bisher ist eine spezifische Multimerisierung nur für NtrC1, NtrC4 und DctC, den Mitgliedern NtrC Sub-Familie bekannt. Diese liegen inaktiv (unphosphoryliert) als Dimer vor. Erst nach der Phosphorylierung oligomerisieren diese und werden dadurch zur DNA Bindung aktiviert. Die Oligomerisierung ist von einer AAA+ ATPase-Domäne abhängig (Batchelor *et al.*, 2008, Doucleff *et al.*, 2005, Nixon *et al.*, 2005). Solch eine Domäne existiert nicht in YehT. Der Komplex stellt möglicherweise unspezifisch aggregiertes His₆-YehT dar, welches dem inaktiven Anteil der DNA-Promotor:YehT Interaktion entsprach. Dieses Phänomen ist auch für andere AR bzw. DNA-bindende Proteine bekannt, z.B. AgrA (Koenig *et al.*, 2004). Allerdings war das His₆-YehT-Aggregat im Gegensatz zum AgrA-Aggregat löslich.

Ob das Phosphorylgruppen Mimikry D54E in His₆-YehT ausreicht, um den AR auch *in vitro* konstitutiv zu aktivieren, ist nicht sicher. Für CtrA und RcsB konnte *in vivo* gezeigt werden, dass solche Derivate gegenüber einer D nach N Substitution konstitutiv aktiv sind (Gupte *et al.*, 1997, Siam und Marczyński, 2003). Interessanterweise wurde die Affinität von CtrA zur DNA durch die Substitution D51E *in vitro* nicht verändert, was auch auf YehT zutrifft (Tab. 3.7). Auf der anderen Seite ist eine Substitution D nach E in manchen Systemen

kontraproduktiv, wie z.B. im Falle von ArcA (Jeon *et al.*, 2001). Hier inaktivierte die AS Substitution den AR in vitro, eine Bindung an DNA wurde eliminiert.

Mit Gel-Retardationsexperimenten wurde die aktive Fraktion von His₆-YehT bestimmt. Etwa 10% des gereinigten AR war aktiv. Trotzdem konnte die YehT:DNA Interaktion verlässlich dargestellt und quantifiziert werden und unspezifische und spezifische Bindung definiert werden. His₆-YehT band den *yjiY* Promotor mit einer apparenten Dissoziationskonstante von 75 nM (Abb. 3.8). Dies war die höchste Affinität, die im Zuge dieser Arbeit gemessen wurde und diente daher als Referenz für alle anderen Affinitäten. Die C-terminale LytTR-artige DNA-bindende Domäne von AgrA bindet die Ziel-DNA als Monomer mit einem K_d-Wert von ca. 80 nM (Sidote *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu bindet das native Gesamtlängenprotein AgrA mit K_d-Werten von 3,8 nM und 0,16 nM für das nicht-phosphorylierte und phosphorylierte Protein (Koenig *et al.*, 2004). Unter der Annahme, dass nur 10% von His₆-YehT aktiv ist, bindet der nicht phosphorylierte AR den *yjiY* Promotor mit einer vergleichbaren Aktivität.

Parallel wurde die Autophosphorylierung von in Membranvesikel angereichertem bzw. gereinigtem und rekonstituiertem YehU-His₆ analysiert. Wie in Abb. 3.13 und Abb. 3.16 dargestellt, ist nur eine geringe Autophosphorylierung zu beobachten. Gemessen an der Autophosphorylierung der charakterisierten SHK KdpD wurde geschätzt, dass YehU-His₆ maximal 1% von dessen Aktivität aufweist (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Histidin 382 der phosphorylierbare Rest ist, denn YehU-H382Q-His₆ konnte nicht phosphoryliert werden (Abb. 3.16). Es konnte kein Phosphotransfer auf His₆-YehT nachgewiesen werden (Abb. 3.16). Im Folgenden wurden mögliche Ursachen für die geringe Autophosphorylierung und den fehlenden Phosphotransfer untersucht.

Neben ATP kann auch GTP als Phosphat-Donor der Histidinkinase dienen (Scaramozzino *et al.*, 2009). Dazu ist allerdings das ATP-Bindemotiv der G1 Box DxGxG durch das Motiv NNGPM ersetzt. Dieses Motiv ist in dieser Form auch in YehU nicht enthalten (DN-AG; (Whitchurch *et al.*, 1996). YehU-His₆ konnte mit γ -³²P-GTP nicht phosphoryliert werden (Daten nicht gezeigt).

Es ist bekannt, dass erst die Anwesenheit des spezifischen Stimulus die Kinaseaktivität signifikant erhöht. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass QseE in EHEC nur in Anwesenheit der spezifischen Stimuli signifikante Autophosphorylierung vollzieht. QseE ist neben QseC der zweite Rezeptor, der Epinephrin sensiert und daneben noch Sulfat und Phosphat (Reading *et al.*, 2009). Daher wurde die Kinaseaktivität in Anwesenheit potentieller Stimuli analysiert. Die Autophosphorylierung von YehU-His₆ wurde in keinem Fall beeinflusst. Getestet wurden in Hinblick auf das unten diskutierte Zielgen *yjiY* die C- (und N-) Quellen Glukose, Mannose, Fumarat, Glutamin und Prolin. Daneben wurde Eisenchlorid und Ammoniumsulfat zugesetzt. Auch N-Acetylglucosamin, das wegen der Sequenzähnlichkeit

zum LytS/LytR-System getestet wurde, hatte keinen Einfluss. Aufgrund der Sequenzhomologie der Signaleingangsdomäne von YehU zu homologen SHK in Pathogenen (vgl. Einleitung 1.3) wurde der Einfluss einer Auswahl an eu- und prokaryotischer Signalmolekülen und Stoffgemischen auf die Kinaseaktivität von YehU-His₆ analysiert. Die Autophosphorylierung änderte sich nicht signifikant in Anwesenheit von unter anderem AI-2, Adrenalin, Indol, Überstände einer *Bacillus subtilis* und *E. coli* MG1655 Übernachtskultur. Es ist klarzustellen, dass dies nur eine sehr geringe Auswahl an möglichen Stimuli darstellt und jeweils nur eine bis zwei Konzentrationen getestet wurden (Tab. 3.10).

Im Folgenden wurde untersucht, ob akzessorische Proteine zur Erhöhung der Autokinaseaktivität notwendig sind. Das FimS/AlgR-System reguliert Pathogenitätsfaktoren z.B. die Cyanid- und Alginatproduktion (Carterson *et al.*, 2004, Mohr *et al.*, 1991). Interessanterweise wurde bei Sequenzvergleichen festgestellt, dass sowohl in FimS aus *P. aeruginosa*, als auch in YehU in der Proteinprimärsequenz ein Teil des ATP-Bindemotivs unvollständig ist (Whitchurch *et al.*, 1996). Es wurde vorgeschlagen, dass AlgR durch das Protein AlgR2 (auch AlgQ genannt) phosphoryliert wird (Roychoudhury *et al.*, 1992, Roychoudhury *et al.*, 1993). Das homologe Protein in *E. coli* ist Rsd und interagiert in vivo und in vitro mit AlgR2 bzw. kann dieses Protein ersetzen (Jishage und Ishihama, 1998). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass AlgR2 die Expression der Nukleosid-Diphosphat Kinase Ndk reguliert und dass letztendlich Ndk AlgR phosphoryliert (Schlichtman *et al.*, 1995). In allen angeführten Arbeiten wurde keine direkte Interaktion von AlgR2 oder Ndk mit AlgR gezeigt. Daher wurden die homologen Gene *rsd* und *ndk* aus *E. coli* kloniert, überproduziert, gereinigt und zusammen mit YehU-His₆ und His₆-YehT in einer Phosphorylierungsreaktion inkubiert. His₆-Rsd hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierungsreaktion (Abb. 3.16). His₆-Ndk kann YehU-His₆ nicht phosphorylieren, da Ndk selbst eine Histidinkinase ist. Auch His₆-YehT wurde von Ndk nicht phosphoryliert (Stefan Behr, 2010, persönliche Kommunikation). In *E. coli*, *Shigella* sp. und *Salmonella* Spezies ist das *yehU/yehT* Operon laut STRING 8.3 mit dem Gen *yehS* assoziiert (Jensen *et al.*, 2009). Bezüglich dieses Proteins, dessen Funktion nicht vorhergesagt werden kann, wurden zwei Arbeitshypothesen erstellt. Da in vivo mit YehT-D54E und der GAF Domäne von YehU interagiert (Stefan Behr, 2010, persönliche Kommunikation), wurde postuliert, dass YehS ein Teil des Signaltransduktionsmechanismus ist und entweder a) Einfluss auf die Phosphorylierungsreaktion nimmt oder b) die DNA:YehT Interaktion unterstützt (siehe unten). YehS hatte aber keinen Einfluß auf die Phosphorylierungsreaktion mit ATP und GTP (Abb. 3.16 und Daten nicht gezeigt). Daher wurde diese Hypothese verworfen.

Wie oben diskutiert, besitzt YehU nur eine äußerst geringe Autokinaseaktivität. Die beiden anderen klassischen Aktivitäten einer SHK konnten nicht dargestellt werden. Der Phosphotransfer findet nicht statt. YehT, welches mit ³²P-Acetylphosphat phosphoryliert

wurde, kann durch weder durch YehU-His₆ noch durch dessen Derivate dephosphoryliert werden (Luitpold Fried, 2010, persönliche Kommunikation). Eventuell sind zur Herstellung der Phosphataseaktivität der Stimulus, akzessorische Proteine oder beides notwendig. Offensichtlich lassen sich weder der Mechanismus, noch die YehU/YehT regulierten Gene aus homologen Systemen ableiten.

Ausblick

In Zuge dieser Arbeit konnten Einblicke in die Funktion des SHK/AR Systems YehU/YehT in *Escherichia coli* gewonnen werden. Es wurden die Grundlagen gelegt, um alle drei wesentlichen Bestandteile der Signaltransduktion, die Reizwahrnehmung, dessen Weiterleitung und die vermittelte Genexpression im Detail zu analysieren.

Ein YehT reguliertes Gen, *yjiY*, sowie die YehT Bindestelle in dessen Promotorregion wurden identifiziert. Die Bindestelle weist Motive auf, welche für die Bindung obligatorisch sind. Allerdings konnte die exakte DNA Sequenz, welche YehT bindet, nicht abschließend bestimmt werden. Weitere gezielte Mutationen in der Binderegion können die exakte, Nukleotid genaue, Interaktionssequenz des AR YehT mit der DNA klären. Dies kann mit den etablierten Gel-Retardationsexperimenten nachgewiesen werden. Zudem ist es unerlässlich, diese Daten in vivo zu validieren. Die Promotoraktivität von *yjiY* sollte mit Promotor-Reporter Genen quantifiziert werden. Solange der Stimulus nicht bekannt ist, kann der AR YehT überproduziert werden um Genexpression zu induzieren. Zudem bietet ein verlässliches Reportersystem die Möglichkeit, den Reiz zu identifizieren, welcher von der SHK YehU erkannt wird.

Darüber hinaus muss geklärt werden, ob und welche weiteren Gene durch YehT reguliert werden. Dies kann, neben komparativer Transkriptomanalysen und Gel-Retardationsexperimenten, durch Promotor-Reporter Genen realisiert werden. Zunächst muss die YehT-abhängige Expression der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Gene analysiert werden.

Die Aufklärung des Mechanismus des Phosphotransfers ist unerlässlich für das Verständnis der Funktion eines Zweikomponentensystems. Daher muss die Phosphorylierungskaskade weiter charakterisiert werden. YehU und YehT können in aktiver Form gereinigt werden. YehU ist nur begrenzt zur Autophosphorylierung fähig, bisher konnte keine Phosphatase-Aktivität nachgewiesen werden. YehT ist voll phosphorylierbar. Es sollte untersucht werden, ob weitere Proteine zur Aktivierung des YehU/YehT Systems notwendig sind.

Um die globale Funktion von YehU/YehT zu definieren, müssen die vorgeschlagenen Experimente durch eine phänotypische Charakterisierung ergänzt werden. Dabei sollte der Fokus auf der physiologischen Bedeutung von *YjiY* liegen. Das zu *YjiY* homologe Protein CstA ist Teil der C-Quellen-Mangel Reaktion von *E. coli* und anderen Spezies. Es wird spekuliert, dass CstA bei der Aufnahme und Verwertung von Peptiden beteiligt ist. Daher sollte mit geeigneten Reportern und auch in vitro getestet werden, ob Aminosäuren oder Peptide zur Aktivierung von YehU/YehT führen. Zum anderen könnte beispielsweise mit Deletionsmutanten geklärt werden, ob CstA die Funktion von *YjiY* komplementieren kann.

5. Zusammenfassung

YehU/YehT ist ein Sensor-Histidinkinase/Antwortregulator-System in *Escherichia coli*. YehU gehört zur Klasse der LytS-artigen SHK und weist eine GAF-Domäne auf. Der AR YehT wurde anhand der LytTR-artigen DNA-bindenden Domäne klassifiziert. Dieses SHK/AR-System wurde bisher nur oberflächlich analysiert. In dieser Arbeit werden die ersten detaillierten Ergebnisse zum SHK/AR-System YehU/YehT in *E. coli* präsentiert.

1. Folgende *E. coli* Stämme und Plasmide wurden (z.T. im Rahmen von Diplomarbeiten und Praktika) konstruiert, um das System langfristig und im Detail zu analysieren:

- Die Doppeldelensionsmutante MG1655 Δ yehUT und der Stamm MG3 (MG1655-rpsL150-yehT::rpsL-neo) fanden in dieser Arbeit Verwendung. In MG6 wurde yehU inaktiviert (MG1655-rpsL150-yehU::rpsL-neo).
- yehU und yehT, sowie die Derivate yehU-H382Q, yehU Δ GAF, yehU-H382Q- Δ GAF und yehT-D54N wurden in pBAD24 kloniert und dabei mit der codierenden Sequenz für einen His₆-Tag versehen. Analog wurden ndk, rsd und yehS kloniert.

2. Um die Mechanismen der YehU/YehT vermittelten Signaltransduktion zu charakterisieren, wurde eine Vielzahl von zytoplasmatischen und membranintegrierten Proteinen überproduziert, angereichert, gereinigt und initial biochemisch in vitro analysiert.

- Die SHK YehU-His₆ und deren Derivate befanden sich in der Zytoplasmamembran und konnten in *E. coli* TKR2000 Membranen angereichert, aber auch nach Solubilisierung der Membranen mit LDAO gereinigt und rekonstituiert werden.
- YehU-His₆ und YehU-His₆- Δ GAF wiesen eine geringe Autokinaseaktivität auf. Der Phosphatdonor ist ATP, nicht GTP.
- Die Deletion der GAF Domäne von YehU-His₆ modulierte die Autokinaseaktivität nicht. Die Substitution Histidin 382 nach Glutamin verhinderte die Autophosphorylierung, was zeigte, dass H382 der in SHK konservierte phosphorylierbare AS-Rest ist.
- Verschiedene C-Quellen, Salze, LPS-Bestandteile, eukaryotische Hormone und bakterielle Autoinduktoren und diverse Kulturüberstände hatten keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung von YehU-His₆.
- Es fand kein Phosphotransfer von YehU-His₆ auf gereinigtes His₆-YehT statt.
- His₆-YehS, His₆-Rsd und His₆-Ndk hatten keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung von YehU-His₆ und ermöglichten nicht den Phosphotransfer von YehU-His₆ auf gereinigtes His₆-YehT.
- His₆-YehT und dessen Derivate wurden löslich aus dem Zytoplasma gereinigt, ca. 10% des Proteins war aktiv. Dies wurde durch Phosphorylierung mit ³²P-Acetylphosphat und über spezifische Protein:DNA-Interaktion nachgewiesen.
- His₆-YehS hat keinen Einfluss auf die His₆-YehT:DNA Interaktion.

3. Der Schwerpunkt dieser Arbeit war die Identifizierung YehU/YehT regulierter Gene. Alle potentiellen YehT-abhängigen Gene wurden anhand von Expressionsdaten und quantifizierten YehT:Promotor Interaktionsstudien bewertet.

- Die mit *yehU/yehT* genomisch assoziierten Gene/Operone *yehLMPQ*, *yehR*, *yehS*, *mlrA* und *osmF/yehYXW* werden nicht von YehU/YehT reguliert.
- Die Promotoren von acht *E. coli* Genen (*yafQ*, *dinJ*, *flgA*, *thiK*, *yddB*, *mtfA*, *hyfA*, *ygdB*) beinhalten die Konsensus-Bindesequenz von LytTR-artigen AR. Diese Gene stehen nicht unter der Kontrolle von YehU/YehT.
- *yohJ* und *yohK*, homologe Zielgene des zu YehU/YehT sequenzhomologen Systems LytS/LytR in *S. aureus* werden nicht durch YehU/YehT reguliert.
- Oshima *et al.* (2002) identifizierten 22 Gene, welche in *E. coli* BW25113 Δ *yehUT* differentiell exprimiert wurden. Diese Gene werden in *E. coli* MG1655 nicht durch YehU/YehT reguliert.
- Um YehU/YehT regulierte Gene zu identifizieren, wurde das globale Expressionsprofil nach Überproduktion von His₆-YehT aufgenommen.
- 37 Gene wurden nach Überproduktion von YehT signifikant differentiell exprimiert.
- Der Transkriptionsstartpunkt von 10 YehT-abhängig exprimierten Genen wurde bestimmt.
- His₆-YehT bindet mit hoher Affinität den *yjiY* Promotor (K_d -Wert = 75 nM). Die Affinität von YehT zu den anderen Promotoren war durch eine niedrigere Affinität gekennzeichnet (K_d -Wert von 250 nM - 800 nM).
- His₆-YehT schützte *in vitro* Nukleotid -132 bis -189 des *yjiY* Promotors (relativ zum Translationsstartpunkt) vor DNase I Degradation. His₆-YehT bindet exklusiv dieses Fragment des Promotors mit hoher Affinität.
- Das geschützte 68 bp Fragments enthält eine dreifache Wiederholung des Motivs CCNCTNA im Abstand von 13 bzw. 14 Nukleotiden.
- Motiv 1 und Motiv 2, welche stromaufwärts der -35/-10 Box liegen, sind für die Bindung von YehT essentiell. Dagegen stabilisiert das am weitesten entfernte Motiv 3 die Bindung, dessen Substitution erhöhte den K_d -Wert geringfügig auf ca. 120 nM.
- In der zunächst als *spacer* definierten Region zwischen den Motiven sind weitere Nukleotide an der Interaktion mit His₆-YehT beteiligt. Die Mutagenese des *spacers* führt zu einer starken Abnahme der Affinität (K_d -Wert von ca. 500 nM). Das von YehT erkannte Motiv im *yjiY*-Promotor lautet somit AAANNACCG[G/A]CT[C/A]A.
- Eine Extrapolation dieser Daten ermöglicht die Vorhersage weiterer potentieller Bindestellen stromaufwärts der Gene *ycbV*, *ycgX*, *hisL*, *hisG*, *ygbL*, *muth*, *yrfE*, *rfaP*, *rarD*, *ubiB*, *fecE*, *ypdC* und *mcrB*.

6. Literatur

Aiba, H., Adhya, S. und de Crombrughe, B. (1981): Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells. J. Biol. Chem. **256**(22): 11905-11910

Alex, L. A. und Simon, M. I. (1994): Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. Trends Genet. **10**(4): 133-138

Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. **25**(3389 - 3402

Anantharaman, V. und Aravind, L. (2003): Application of comparative genomics in the identification and analysis of novel families of membrane-associated receptors in bacteria. BMC Genomics **4**(1): 34

Anetzberger, C., Pirch, T. und Jung, K. (2009): Heterogeneity in quorum sensing-regulated bioluminescence of *Vibrio harveyi*. Mol. Microbiol. **73**(2): 267-277

Aravind, L. und Ponting, C. P. (1997): The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. Trends Biochem. Sci. **22**(12): 458-459

Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E. G. H., Margalit, H. und Altuvia, S. (2001): Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. Cur. Biol. **11**(12): 941-950

Auchtung, J. M., Lee, C. A. und Grossman, A. D. (2006): Modulation of the ComA-dependent quorum response in *Bacillus subtilis* by multiple Rap proteins and Phr peptides. J. Bacteriol. **188**(14): 5273-5285

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. und Mori, H. (2006): Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol Syst Biol **2**

Bailey, T. L. und Elkan, C. (1994): Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 28-36

Bailey, T. L. und Gribskov, M. (1998): Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. Bioinformatics **14**(1): 48-54

- Ballestar, E. und Esteller, M. (2010):** Examining DNA–protein interactions with genome-wide chromatin immunoprecipitation analysis. *Mod. Mol. Biol.* 33-45
- Barnhart, M. M. und Chapman, M. R. (2006):** Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**(1): 131-147
- Batchelor, J. D., Doucleff, M., Lee, C.-J., Matsubara, K., De Carlo, S., Heideker, J., Lamers, M. H., Pelton, J. G. und Wemmer, D. E. (2008):** Structure and regulatory mechanism of *Aquifex aeolicus* NtrC4: Variability and evolution in bacterial transcriptional regulation. *J. Mol. Biol.* **384**(5): 1058-1075
- Behr, S. (2009):** Expressionsanalyse YehU/YehT-regulierter Gene in *Escherichia coli*. Diplomarbeit
- Behr, S. (2007):** Herstellung von YehU und YehT Derivaten. Forschungspraktikum
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. und Bourne, P. E. (2000):** The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**(1): 235-242
- Bieber, D., Ramer, S. W., Wu, C.-Y., Murray, W. J., Tobe, T., Fernandez, R. und Schoolnik, G. K. (1998):** Type IV Pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**(5372): 2114-2118
- Blattner, F. R., Plunkett, G., III, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. und Shao, Y. (1997):** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**(5331): 1453-1462
- Bochner, B. R., Gadzinski, P. und Panomitros, E. (2001):** Phenotype MicroArrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res.* **11**(7): 1246-1255
- Bodero, M. D., Pilonieta, M. C. und Munson, G. P. (2007):** Repression of the inner membrane lipoprotein NlpA by Rns in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**(5): 1627-1632
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. und Falkow, S. (1977):** Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**(2): 95-113
- Bourret, R. B. (2010):** Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**(2): 142-149
- Bradford, M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**(1-2): 248-254

Bren, A. und Eisenbach, M. (2000): How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation. *J. Bacteriol.* **182**(24): 6865-6873

Brown, P. K., Dozois, C. M., Nickerson, C. A., Zuppardo, A., Terlonge, J. und Curtiss, R. (2001): MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **41**(2): 349-363

Brunskill, E. und Bayles, K. (1996a): Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**: 611 - 618

Brunskill, E. und Bayles, K. (1996b): Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**(19): 5810-5812

Carterson, A. J., Morici, L. A., Jackson, D. W., Frisk, A., Lizewski, S. E., Jupiter, R., Simpson, K., Kunz, D. A., Davis, S. H., Schurr, J. R., Hassett, D. J. und Schurr, M. J. (2004): The transcriptional regulator AlgR controls cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **186**(20): 6837-6844

Casino, P., Rubio, V. und Marina, A. (2009): Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **139**(2): 325-336

Checroun, C. und Gutierrez, C. (2004): σ^S -Dependent regulation of *yehZYXW*, which encodes a putative osmoprotectant ABC transporter of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **236**(2): 221-226

Cherepanov, PP und Wackernagel W (1995): Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**(1):9-14.

Clarke, M. B. und Sperandio, V. (2005a): Transcriptional autoregulation by quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC) in enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC). *Mol. Microbiol.* **58**(2): 441-455

Clarke, M. B. und Sperandio, V. (2005b): Transcriptional regulation of *flhDC* by QseBC and σ^{28} (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **57**(6): 1734-1749

Corpet, F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**(22): 10881-10890

Daley, D. O., Rapp, M., Granseth, E., Melen, K., Drew, D. und von Heijne, G. (2005): Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science* **308**(5726): 1321-1323

Deretic, V. und Konyecsni, W. M. (1989): Control of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: transcriptional regulation of *algR* and identification of the second regulatory gene, *algQ*. J. Bacteriol. **171**(7): 3680-3688

Doucleff, M., Chen, B., Maris, A. E., Wemmer, D. E., Kondrashkina, E. und Nixon, B. T. (2005): Negative regulation of AAA+ ATPase assembly by two component receiver domains: A transcription activation mechanism that is conserved in mesophilic and extremely hyperthermophilic bacteria. J. Mol. Biol. **353**(2): 242-255

Dubey, A. K., Baker, C. S., Suzuki, K., Jones, A. D., Pandit, P., Romeo, T. und Babitzke, P. (2003): CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. J. Bacteriol. **185**(15): 4450-4460

Epstein, W. und Kim, B. S. (1971): Potassium Transport Loci in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **108**(2): 639-644

Forst, S., Delgado, J., und Inouye M. (1989): Phosphorylation of OmpR by the osmosensor EnvZ modulates expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **86**(16):6052-6056.

Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R. und Bateman, A. (2010): The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. **38**(suppl 1): D211-D222

Francez-Charlot, A., Frunzke, J., Reichen, C., Ebnetter, J. Z., Gourion, B. und Vorholt, J. A. (2009): Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**(9): 3467-3472

Friden, P., Newman, T. und Freundlich, M. (1982): Nucleotide sequence of the *ilvB* promoter-regulatory region: a biosynthetic operon controlled by attenuation and cyclic AMP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**(20): 6156-6160

Fried, L. (2008): Einfluss des Zwei-Komponenten-Systems YehU/YehT auf das Proteom von *Escherichia coli*. Diplomarbeit

Frith, M. C., Saunders, N. F. W., Kobe, B. und Bailey, T. L. (2008): Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions. PLoS Comput. Biol. **4**(5): e1000071

Galperin, M. Y. (2010): Diversity of structure and function of response regulator output domains. Curr. Opin. Microbiol. **13**(2): 150-159

Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N. und Koonin, E. V. (2001): Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**(1): 11-21

Gama-Castro, S., Jiménez-Jacinto, V., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Peñaloza-Spinola, M. I., Contreras-Moreira, B., Segura-Salazar, J., Muñoz-Rascado, L., Martínez-Flores, I., Salgado, H., Bonavides-Martínez, C., Abreu-Goodger, C., Rodríguez-Penagos, C., Miranda-Ríos, J., Morett, E., Merino, E., Huerta, A. M., Treviño-Quintanilla, L. und Collado-Vides, J. (2008): RegulonDB (version 6.0): gene regulation model of *Escherichia coli* K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated promoters and Textpresso navigation. *Nucleic Acids Res.* **36**(suppl 1): D120-D124

Gao, R. und Stock, A. M. (2009): Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**(1): 133-154

Gedes, S. Y., Scholle, M. D., Campbell, J. W., Balazsi, G., Ravasz, E., Daugherty, M. D., Somera, A. L., Kyrpides, N. C., Anderson, I., Gelfand, M. S., Bhattacharya, A., Kapatral, V., D'Souza, M., Baev, M. V., Grechkin, Y., Mseeh, F., Fonstein, M. Y., Overbeek, R., Barabasi, A.-L., Oltvai, Z. N. und Osterman, A. L. (2003): Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J. Bacteriol.* **185**(19): 5673-5684

Goh, E.-B., Siino, D. F. und Igo, M. M. (2004): The *Escherichia coli tppB (ydgR)* gene represents a new class of OmpR-regulated genes. *J. Bacteriol.* **186**(12): 4019-4024

Groisman, E. A. (2001): The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol.* **183**(6): 1835-1842

Guggenberger, C. (2007): Initiale Untersuchungen des Zweikomponentensystems YehUT in *Escherichia coli*. Diplomarbeit

Guillier, M. und Gottesman, S. (2006): Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol. Microbiol.* **59**(1): 231-247

Gupte, G., Woodward, C. und Stout, V. (1997): Isolation and characterization of *rscB* mutations that affect colanic acid capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **179**(13): 4328-4335

Guzman, L., Belin, D., Carson, M. und Beckwith, J. (1995): Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**(14): 4121-4130

Harley, C. B. und Reynolds, R. P. (1987): Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **15**(5): 2343-2361

Heermann, R. und Jung, K. (2010): The complexity of the 'simple' two-component system KdpD/KdpE in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **304**(2): 97-106

Heermann, R., Weber, A., Mayer, B., Ott, M., Hauser, E., Gabriel, G., Pirch, T. und Jung, K. (2009): 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(R)/ET(R) Recombination. Microb. Cell Fact. **7**(1): 14

Hellman, L. M. und Fried, M. G. (2007): Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. Nat. Protocols **2**(8): 1849-1861

Hemm, M. R., Paul, B. J., Schneider, T. D., Storz, G. und Rudd, K. E. (2008): Small membrane proteins found by comparative genomics and ribosome binding site models. Mol. Microbiol. **70**(6): 1487-1501

Hess, J. F., Oosawa, K., Kaplan, N. und Simon, M. I. (1988): Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. Cell **53**(1): 79-87

Hirakawa, H., Nishino, K., Hirata, T. und Yamaguchi, A. (2003): Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **185**(6): 1851-1856

Ho, Y.-S. J., Burden, L. M. und Hurley, J. H. (2000): Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. EMBO J. **19**(20): 5288-5299

Hoch, J. A. (2000): Two-component and phosphorelay signal transduction. Curr. Opin. Microbiol. **3**(2): 165-170

Hoch, J. A. und Varughese, K. I. (2001): Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. J. Bacteriol. **183**(17): 4941-4949

Hughes, D. T. und Sperandio, V. (2008): Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. Nat. Rev. Microbiol. **6**(2): 111-120

Island, M. D. und Kadner, R. J. (1993): Interplay between the membrane-associated UhpB and UhpC regulatory proteins. J. Bacteriol. **175**(16): 5028-5034

Island, M. D., Wei, B. Y. und Kadner, R. J. (1992): Structure and function of the *uhp* genes for the sugar phosphate transport system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **174**(9): 2754-2762

Jain, E., Bairoch, A., Duvaud, S., Phan, I., Redaschi, N., Suzek, B., Martin, M., McGarvey, P. und Gasteiger, E. (2009): Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics* **10**(1): 136

Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., Bork, P. und von Mering, C. (2009): STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* **37**(suppl 1): D412-D416

Jeon, Y., Lee, Y. S., Han, J. S., Kim, J. B. und Hwang, D. S. (2001): Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. *J. Biol. Chem.* **276**(44): 40873-40879

Jishage, M. und Ishihama, A. (1998): A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major σ subunit of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(9): 4953-4958

Jones, D. T. (2007): Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics* **23**(5): 538-544

Jung, K., Tjaden, B. und Altendorf, K. (1997): Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**(16): 10847-10852

Käll, L., Krogh, A. und Sonnhammer, E. L. L. (2004): A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.* **338**(5): 1027-1036

Kenney, L. J. (2010): How important is the phosphatase activity of sensor kinases? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**(2): 168-176

Keseler, I. M., Bonavides-Martínez, C., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Gunsalus, R. P., Johnson, D. A., Krummenacker, M., Nolan, L. M., Paley, S., Paulsen, I. T., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Shearer, A. G. und Karp, P. D. (2009): EcoCyc: A comprehensive view of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Res.* **37**(suppl 1): D464-D470

Kim, H., Melén, K., Österberg, M. und von Heijne, G. (2006): A global topology map of the *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**(30): 11142-11147

Koenig, R. L., Ray, J. L., Maleki, S. J., Smeltzer, M. S. und Hurlburt, B. K. (2004): *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-agr regulatory region. *J. Bacteriol.* **186**(22): 7549-7555

- Kollmann, R. und Altendorf, K. (1993):** ATP-driven potassium transport in right-side-out membrane vesicles via the Kdp system of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**(1): 62-66
- Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M.-E. und Ramos, J. L. (2010):** Bacterial sensor kinases: Diversity in the recognition of environmental signals. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**(1): 539-559
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L. L. (2001):** Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**(3): 567-580
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685
- Lechat, P., Hummel, L., Rousseau, S. und Moszer, I. (2008):** GenoList: an integrated environment for comparative analysis of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* **36**(suppl 1): D469-D474
- Levit, M., Liu, Y., Surette, M. und Stock, J. (1996):** Active site interference and asymmetric activation in the chemotaxis protein histidine kinase CheA. *J. Biol. Chem.* **271**(50): 32057-32063
- Lipmann, F. und Tuttle, L. C. (1945):** A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. *J. Biol. Chem.* **159**(1): 21-28
- Liu, Y., Kung, C., Fishburn, J., Ansari, A. Z., Shokat, K. M. und Hahn, S. (2004):** Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. *Mol. Cell. Biol.* **24**(4): 1721-1735
- Lizewski, S. E., Schurr, J. R., Jackson, D. W., Frisk, A., Carterson, A. J. und Schurr, M. J. (2004):** Identification of AlgR-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa* by use of microarray analysis. *J. Bacteriol.* **186**(17): 5672-5684
- 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
- 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**(2): 718-722
- Lukat, G. S., Stock, A. M. und Stock, J. B. (1990):** Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry* **29**(23): 5436-5442

Mascher, T., Helmann, J. D. und Uden, G. (2006): Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**(4): 910-938

Masuda, N. und Church, G. M. (2002): *Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA. *J. Bacteriol.* **184**(22): 6225-6234

McCleary, W. R., Stock, J. B. und Ninfa, A. J. (1993): Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* **175**(10): 2793-2798

Mendoza-Vargas, A., Olvera, L., Olvera, M., Grande, R., Vega-Alvarado, L., Taboada, B., Jimenez-Jacinto, V., Salgado, H., Juárez, K., Contreras-Moreira, B., Huerta, A. M., Collado-Vides, J. und Morett, E. (2009): Genome-wide identification of transcription start sites, promoters and transcription factor binding sites in *E. coli*. *PLoS ONE* **4**(10): e7526

Minagawa, S., Ogasawara, H., Kato, A., Yamamoto, K., Eguchi, Y., Oshima, T., Mori, H., Ishihama, A. und Utsumi, R. (2003): Identification and molecular characterization of the Mg²⁺ Stimulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**(13): 3696-3702

Mizuno, T. (1997): Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* **4**(2): 161-168

Mohr, C. D., Hibler, N. S. und Deretic, V. (1991): AlgR, a response regulator controlling mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to the FUS sites of the *algD* promoter located unusually far upstream from the mRNA start site. *J. Bacteriol.* **173**(16): 5136-5143

Ng, W.-L. und Bassler, B. L. (2009): Bacterial quorum-sensing network architectures. *Ann. Rev. Genet.* **43**(1): 197-222

Nikolskaya, A. N. und Galperin, M. Y. (2002): A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Res.* **30**(11): 2453-2459

Ninfa, A. J. und Magasanik, B. (1986): Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**(16): 5909-5913

Ninfa, E. G., Atkinson, M. R., Kamberov, E. S. und Ninfa, A. J. (1993): Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J. Bacteriol.* **175**(21): 7024-7032

- Nixon, B. T., Ronson, C. W. und Ausubel, F. M. (1986):** Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**(20): 7850-7854
- Nixon, B. T., Yennawar, H. P., Doucleff, M., Pelton, J. G., Wemmer, D. E., Krueger, S. und Kondrashkina, E. (2005):** SAS solution structures of the Apo and Mg^{2+}/BeF_3^{-} -bound receiver domain of DctD from *Sinorhizobium meliloti*. *Biochemistry* **44**(42): 13962-13969
- Ogasawara, H., Hasegawa, A., Kanda, E., Miki, T., Yamamoto, K. und Ishihama, A. (2007):** Genomic SELEX search for target promoters under the control of the PhoQP-RstBA signal relay cascade. *J. Bacteriol.* **189**(13): 4791-4799
- Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K.-i., Fujita, Y. und Tanaka, T. (2001):** DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Res.* **29**(18): 3804-3813
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B. L., Mori, H. und Mizuno, T. (2002):** Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **46**(1): 281-291
- Parkinson, J. S. (2010):** Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor Kinases. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**(1): 101-122
- 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
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. und Ferrin, T. E. (2004):** UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**(13): 1605-1612
- 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**(7): 2145-2151
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P. und Dorel, C. (2000):** Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ. Microbiol.* **2**(4): 450-464
- Promega (1994):** Technical manual: Altered sites II in vitro mutagenesis systems

Reading, N. C., Rasko, D. A., Torres, A. G. und Sperandio, V. (2009): The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**(14): 5889-5894

Rigaud, J., Pitard, B. und Lévy, D. (1995): Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1231**(223-246)

Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K. B., Blattner, F. R., Chaudhuri, R. R., Glasner, J. D., Horiuchi, T., Keseler, I. M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N. T., Plunkett, G., Rudd, K. E., Serres, M. H., Thomas, G. H., Thomson, N. R., Wishart, D. und Wanner, B. L. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot—2005. *Nucleic Acids Res.* **34(1): 1-9**

Rosenberg, M., Gutnick, D. und Rosenberg, E. (1980): Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**(1): 29-33

Roychoudhury, S., Sakai, K., Schlichtman, D. und Chakrabarty, A. M. (1992): Signal transduction in exopolysaccharide alginate synthesis: phosphorylation of the response regulator AlgR1 in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Gene* **112**(1): 45-51

Roychoudhury, S., Zielinski, N. A., Ninfa, A. J., Allen, N. E., Jungheim, L. N., Nicas, T. I. und Chakrabarty, A. M. (1993): Inhibitors of two-component signal transduction systems: inhibition of alginate gene activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**(3): 965-969

Ruiz, J., Haneburger, I. und Jung, K. (2011): Identification of ArgP and Lrp as transcriptional regulators of *lysP*, the gene encoding the specific lysine permease in *Escherichia coli*. *J. Bac.* Akzeptiertes Manuskript.

Rumbaugh, K. P., Diggle, S. P., Watters, C. M., Ross-Gillespie, A., Griffin, A. S. und West, S. A. (2009): Quorum sensing and the social evolution of bacterial virulence. *Curr. Biol.* **19**(4): 341-345

Saito, H. (2001): Histidine Phosphorylation and Two-Component Signaling in Eukaryotic Cells. *Chem.Rev.* **101**(8): 2497-2510

Salgado, H., Gama-Castro, S., Martínez-Antonio, A., Díaz-Peredo, E., Sánchez-Solano, F., Peralta-Gil, M., Garcia-Alonso, D., Jiménez-Jacinto, V., Santos-Zavaleta, A., Bonavides-Martínez, C. und Collado-Vides, J. (2004): RegulonDB (version 4.0): transcriptional regulation, operon organization and growth conditions in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **32**(suppl 1): D303-D306

Sambrook, J. und Russell, D. (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**(12): 5463-5467

Scaramozzino, F., White, A., Perego, M. und Hoch, J. A. (2009): A unique GTP-dependent sporulation sensor histidine kinase in *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. **191**(3): 687-692

Schlichtman, D., Kavanaugh-Black, A., Shankar, S. und Chakrabarty, A. M. (1994): Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: role of the tricarboxylic acid cycle. J. Bacteriol. **176**(19): 6023-6029

Schlichtman, D., Kubo, M., Shankar, S. und Chakrabarty, A. (1995): Regulation of nucleoside diphosphate kinase and secretable virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: roles of *algR2* and *algH*. J. Bacteriol. **177**(9): 2469-2474

Schultz, J. E. und Matin, A. (1991): Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **218**(1): 129-140

Selinger, D. W., Saxena, R. M., Cheung, K. J., Church, G. M. und Rosenow, C. (2003): Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. Genome Res. **13**(2): 216-223

Senadheera, D. und Cvitkovitch, D. G. (2008): Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets **631**(178-188)

Servant, F., Bru, C., Carrère, S., Courcelle, E., Gouzy, J., Peyruc, D. und Kahn, D. (2002): ProDom: Automated clustering of homologous domains. Briefi. Bioinform. **3**(3): 246-251

Sherlock, O., Vejborg, R. M. und Klemm, P. (2005): The TibA adhesin/invasin from Enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. Infect. Immun. **73**(4): 1954-1963

Shimada, T., Fujita, N., Maeda, M. und Ishihama, A. (2005): Systematic search for the Cra-binding promoters using genomic SELEX system. Genes Cells **10**(9): 907-918

Siam, R. und Marczynski, G. T. (2003): Glutamate at the phosphorylation site of response regulator CtrA provides essential activities without increasing DNA binding. Nucleic Acids Res. **31**(6): 1775-1779

Sidote, D. J., Barbieri, C. M., Wu, T. und Stock, A. M. (2008): Structure of the *Staphylococcus aureus* AgrA LytTR domain bound to DNA reveals a beta fold with an unusual mode of binding. *Structure* **16**(5): 727-735

Sigma (2003): GenElut Gel Extraction Kit Manual

Snider, J., Gutsche, I., Lin, M., Baby, S., Cox, B., Butland, G., Greenblatt, J., Emili, A. und Houry, W. A. (2006): Formation of a distinctive complex between the inducible bacterial lysine decarboxylase and a novel AAA+ ATPase. *J. Biol. Chem.* **281**(3): 1532-1546

Söding, J., Biegert, A. und Lupas, A. N. (2005): The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **33**(suppl 2): W244-W248

Stadtman, E. R. (1957): Preparation and assay of acetyl phosphate. *Methods Enzymol.* **3**(228-231)

Stewart, R. C. (2010): Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**(2): 133-141

Stock, A. M., Robinson, V. L. und Goudreau, P. N. (2000): Two-component signal transduction. *Ann. Rev. Biochem.* **69**(1): 183-215

Studier, W. F., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990): Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **Volume 185**(60-89)

Surette, M. G., Levit, M., Liu, Y., Lukat, G., Ninfa, E. G., Ninfa, A. und Stock, J. B. (1996): Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **271**(2): 939-945

Tanabe, H., Yamasaki, K., Katoh, A., Yoshioka, S. und Utsumi, R. (1998): Identification of the promoter region and the transcriptional regulatory sequence of the *evgAS* operon of *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **62**(2): 286-290

Taylor, B. L. und Zhulin, I. B. (1999): PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**(2): 479-506

Taylor, R. G., Walker, D. C. und McInnes, R. R. (1993): *E.coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* **21**(7): 1677-1678

- Tetsch, L., Koller, C., Haneburger, I. und Jung, K. (2008):** The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Mol. Microbiol.* **67**(3): 570-583
- Timmen, M., Bassler, B. L. und Jung, K. (2006):** Al-1 Influences the kinase activity but not the phosphatase activity of LuxN of *Vibrio harveyi*. *J. Biol. Chem.* **281**(34): 24398-24404
- Tsuzuki, M., Ishige, K. und Mizuno, T. (1995):** Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcB, of *Escherichia coli*: in vitro studies with mutants. *Mol. Microbiol.* **18**(5): 953-962
- Volz, K. (1993):** Structural conservation in the CheY superfamily. *Biochemistry* **32**(44): 11741-11753
- Wade, J.T., Roa, D.C., Grainger, .DC., Hurd, D., Busby, S.J., Struhl, K. und Nudler, E. (2006):** Extensive functional overlap between sigma factors in *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**(9):806-14
- Wang, N., Yamanaka, K. und Inouye, M. (1999):** Cspl, the ninth member of the CspA family of *Escherichia coli*, is induced upon cold shock. *J. Bacteriol.* **181**(5): 1603-1609
- Weber, A. (2003):** Transkriptom- und Proteom-Analysen von *Escherichia coli* unter hyperosmotischen Stressbedingungen und biochemische Charakterisierung von UspG. Dissertation
- Whitchurch, C. B., Alm, R. A. und Mattick, J. S. (1996):** The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(18): 9839-9843
- Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R. und Ishihama, A. (2005):** Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**(2): 1448-1456
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985):** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1): 103-119
- Yokoyama, K., Makino, K., Kubota, Y., Watanabe, M., Kimura, S., Yutsudo, C. H., Kurokawa, K., Ishii, K., Hattori, M., Tatsuno, I., Abe, H., Yoh, M., Iida, T., Ohnishi, M., Hayashi, T., Yasunaga, T., Honda, T., Sasakawa, C. und Shinagawa, H. (2000):** Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene* **258**(1-2): 127-139
- Yura, T., Nagai, H. und Mori, H. (1993):** Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**(1): 321-350

Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M.G. und Alon U. (2006): A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat. Methods.* **3**(8):623-8.

Zhou, L., Lei, X.-H., Bochner, B. R. und Wanner, B. L. (2003): Phenotype MicroArray Analysis of *Escherichia coli* K-12 Mutants with Deletions of All Two-Component Systems. *J. Bacteriol.* **185**(16): 4956-4972

Zianni, M., Tessanne, K., Merighi, M., Laguna, R. und Tabita, F. R. (2006): Identification of the DNA bases of a DNase I footprint by the use of dye primer sequencing on an automated capillary DNA analysis instrument. *J. Biomol. Tech.* **17**(2): 103-113

Anhang: CD mit Daten der Expressionsanalyse mit Affymetrix *E.coli* 2.0 Chips

Auf dieser CD sind die originalen Daten gespeichert, welche von dem KFB übermittelt wurden. Diese wurde gefiltert, wie jeweils im Text beschrieben.

Es sind (grau hinterlegt) jeweils die Affymetrix Identifikationsnummer (Probe Set ID), die Funktion des Genproduktes (Gene Title), der Genname (Gene Symbol) angegeben. Es folgen die Messwerte der rF von drei unabhängigen Experimenten der His₆-YehT-Überproduktion (gelb hinterlegt) und eine Einteilung ob das Gen exprimiert (*P present*), nicht exprimiert (*A absent*), oder nicht definierbar (*M median*) wurde. Anschließend sind (orange hinterlegt) die Messwerte der rF von drei unabhängigen Experimenten der His₆-KdpE-Überproduktion angegeben, wieder gefolgt von der Einteilung ob das Gen exprimiert (*P present*) nicht exprimiert (*A absent*) oder nicht definierbar (*M median*) war. Dann ist die Auswertung angegeben: Logarithmus zur Basis 2 des Verhältnisses der mittleren rF(YehT)/rF(KdpE) (Mean SignalLog2 ratio) und die Signifikanz (p (ttest). Zur besseren Übersicht ist die Signifikanz signifikanter Unterschied in der Expression (regulated by significance and FoldChange) mit X gekennzeichnet. In der letzten Spalte sind die in NCBI üblichen Gen Identifikationsnummer und der zugehörige *E. coli* Stamm angegeben.

A1 - Daten aller gelisteten Gene/intergenen Regionen der angegebenen *E. coli*-Stämme

A2 - Genomische Nachbarschaft von *yehU/yehT*

A3 - Abgleich mit Oshima *et al.* (2002)

A4 - Gene mit LytTR-artiger 5'-UTR

A5 - Homologe Zielgene *yohJK*

A6 - Co-Reinigung YehT bindender DNA-Fragmente

A7 - 37 Gene mit den größten Expressionsunterschieden

A8 – Extrapolation YehT Bindestelle

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Kirsten Jung für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, am YehU/YehT Projektes zu arbeiten. Es war eine außergewöhnliche Erfahrung, die Entwicklung dieses faszinierenden Projekts von Beginn an aktiv mitgestalten zu können. Ganz besonders möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken und für die exzellente Betreuung, die unermüdliche Diskussionsbereitschaft und den moralischen Beistand! Ich habe immer mit viel Spaß und Freude am Projekt und in der Arbeitsgruppe gearbeitet und konnte sehr viel lernen.

Ebenfalls bedanke ich mich sehr herzlich bei Professor Dr. Torsten Mascher, der sich als Zweitgutachter für meine Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Dr. Ralf Heermann danke ich für die Bereitstellung von Abb. 1.3, Jimena Ruiz für die *lysP*-Promotor-DNA und Claudia Anetzberger für AI-2. Achim Tresch und Björn Schwalb danke ich sehr herzlich für die Auswertung der Microarrays.

Größter Dank gebührt auch den ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern des YehU/YehT Projektes Christoph Guggenberger, Luitpold Fried, Stefan Behr, Sonja Kroll und Claudia Specker. Ich konnte mich immer auf eure menschliche und wissenschaftliche Unterstützung verlassen!

Bedanken möchte ich mich bei allen weiteren aktuellen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen, ebenso wie bei Professor Dr. Heinrich Jung und seinen Mitarbeitern für die angenehme Zeit inner- und außerhalb des Labors. Es war immer Verlass auf eure Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie moralische Unterstützung. Danke Claudia, Sophie, Korinna, Günther, Ina, Ralf, Nicole, Nicola, Christian, Martina (1), Martina (2), Matthias, Sabine, Hannah, Valentina, Susi, Ingrid, Katja, Michi, Daniel, Ara, Thorsten! Aus Platzgründen gibt es nur ein allgemeines, aber ebenso herzliches Danke für alle Ehemaligen!

1000 Dank an meine Julia und meine Freunde fürs da sein, Spaß haben, mal nicht über die Arbeit reden, dann doch wieder über die Arbeit reden, zuhören, aushalten, aufbauen, ablenken...

Nicht zuletzt wäre ohne die moralische und finanzielle Unterstützung und das Vertrauen meiner Eltern mein Studium und auch diese Arbeit bestimmt weniger erfolgreich verlaufen.

Vielen Dank für alles.

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|--------------------|-------------------------------|
| Name | Tobias Sebastian Kraxenberger |
| Geburtsdatum/ -ort | 14.03.1979 in Altötting |
| Familienstand | ledig |

Beruflicher Werdegang/Ausbildung

| | |
|-------------------|---|
| seit 12/2010 | Scientist Microbiology, AMSilk GmbH; Planegg/Martinsried |
| 11/2006 – 08/2010 | Promotion am Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, AG Professor Dr. Kirsten Jung. Dissertation: „Zur Funktion des Histidinkinase/ Antwortregulator Systems YehU/YehT in <i>Escherichia coli</i> .“ |
| 06/2006 – 10/2006 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München AG Professor Dr. Kirsten Jung. Ungerichtete Mutagenese zur Identifizierung akzessorischer Aktivatoren der CadC vermittelten Säurestressantwort in <i>Escherichia coli</i> . |
| 05/2005-05/2006 | Praktische Diplomarbeit, Labor Professor Dr. Kirsten Jung Diplomarbeit: „Zum Aktivierungsmechanismus des membran-integrierten Transkriptionsaktivators CadC in <i>Escherichia coli</i> “ |
| 10/2000 – 05/2006 | Diplom-Studiengang Biologie, Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München Hauptfach Mikrobiologie Nebenfächer Biochemie, Zellbiologie, Immunologie Diplom, Note sehr gut (1,1) |
| 1999 | Abitur, König-Karlmann-Gymnasium Altötting |

Veröffentlichung

- 2011 Kraxenberger, T., Fried, L., Behr, S., Guggenberger, C.: „Identification of YehU/YehT Regulated Genes in *Escherichia coli*“; Journal of Bacteriology, in Vorbereitung.

Tagungen/Weiterbildung (Hier wurden Auszüge dieser Arbeit präsentiert)

- 2006 – 2009 Jahrestagungen der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM), Posterbeiträge
- 2008 27th Symposium “Mechanisms of Gene Regulation”, Vortrag
- 2007 European School of Genetic Medicine „7 th Course of Bioinformatics for Molecular Biologists“

Betreuung von Diplomanden

- 2010 Claudia Specker: „Genetische und phänotypische Charakterisierung von *Escherichia coli* MG1655 Δ yehUT (2007)“.
- 2009 Stefan Behr: „Expressionsanalyse YehU/YehT-regulierter Gene in *E. coli*“.
- 2008 Luitpold Fried: „Einfluss des Zwei-Komponenten-Systems YehU/YehT auf das Proteom von *Escherichia coli*“.
- 2007 Christoph Guggenberger: „Initiale Untersuchungen des Zweikomponentensystems YehU/YehT in *Escherichia coli*“.

Kooperationen

- 2009/2010 AMSilk GmbH (Planegg/Martinsried): Hochzelldichte-Fermentation von *Escherichia coli* im 100 l Maßstab
- 2007 Professor Dr. Gerhard Wanner (LMU München): Elektronenmikroskopie (REM/TEM) zur Ultrastrukturanalyse der Zellkompartimente von *E. coli* Δ yehUT(2007)

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

.....

Tobias Kraxenberger

Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen
Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, den

.....

Tobias Kraxenberger