

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für
Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Expression und Funktion der ABC-Transporter für
anorganisches Phosphat und Glycerin-3-phosphat
in *Halobacterium salinarum* R1**

Katarina Furtwängler
aus München

2009

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Dieter Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 03.03.2010

Katarina Furtwängler

.....
Katarina Furtwängler

Dissertation eingereicht am 14.09.2009

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Förstemann

Mündliche Prüfung am 16.12.2009

Publikationsliste

Tarasov, V. Y., Besir, H., Schwaiger, R., Klee, K., Furtwängler, K., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D. (2008) A small protein from the *bop-brp* intergenic region of *Halobacterium salinarum* contains a zinc finger motif and regulates *bop* and *crtB1* transcription. *Mol Microbiol* 67-4: 772-80.

Wende, A., Furtwängler, K. and Oesterhelt, D. (2009) Phosphate dependent behavior of the archaeon *Halobacterium salinarum* strain R1. *J. Bacteriol* 191: 3852-3860.

Furtwängler, K., Tarasov, V.Y., Wende, A., Schwarz, C. and Oesterhelt, D. (2010) Regulation of phosphate uptake via Pst transporters in *Halobacterium salinarum* R1. *Mol Microbiol* (in press)

Fliegmann, J., Furtwängler, K., Malterer, G., Cantarello, C., Maischak, H., Hause, B., Schüler, G., Ebel, J. and Mithöfer, A. (2010) Flavone synthase II (CYP93B16) from soybean (*Glycine max* L.). *Phytochemistry* (in press)

Schwaiger, R., Schwarz, C., Furtwängler, K., Tarasov, V. Y., Wende, A. and Oesterhelt, D. (2010) Transcriptional control by two leucine-responsive regulatory proteins in *Halobacterium salinarum* R1. *BMC Molecular Biology* (under review)

Tarasov, V.Y.*, Furtwängler, K.*, Schwaiger, R. and Oesterhelt, D. (2010) The expression of A and B flagellin genes from *Halobacterium salinarum* depends on DNA topology and is attuned by 5' UTRs. (in preparation) (*equal contribution)

Sonstige öffentliche Bekanntmachung der vorliegenden Arbeit:

- Posterpräsentation auf dem „International Congress of Genetics“ in Berlin, 12.-17. Juli 2008.
- Vortrag auf der Jahrestagung des Schwerpunktprogrammes „SPP1112: Genomfunktion und Genregulation in Archaea“ in Schmitten, 22.-23. September 2008

Für meine Eltern

Was kann für mich phantastischer
sein als die Wirklichkeit?

F. M. Dostojewski

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 <i>Phosphatabhängige Genexpression in Mikroorganismen</i>	5
1.1.1 Das PHO-Regulon in gramnegativen Bakterien	7
1.1.2 Das PHO-Regulon in grampositiven Bakterien	9
1.1.3 Das PHO-Regulon in Eukaryoten	11
1.1.4 Das PHO-Regulon in Archaeen	12
1.2 <i>Die phosphatabhängigen ABC-Transportsysteme Pst und Ugp</i>	15
1.3 <i>Einführung in das halophile Archaeon Halobacterium salinarum</i>	21
1.4 <i>Phosphat-Taxis</i>	25
1.5 <i>Umsetzung der genetischen Information in Archaeen</i>	27
1.5.1 Transkription in Archaeen	28
1.5.2 Regulation archaealer Transkription	31
1.5.3 Archaeale Transkripte und Mechanismen der Translationsinitiation	33
1.6 <i>Zielsetzung dieser Arbeit</i>	35
2 Material und Methoden	36
2.1 <i>Material</i>	36
2.1.1 Stämme der verwendeten Organismen	36
Escherichia coli	36
Halobacterium salinarum	36
Deletions-Stämme (<i>H. salinarum</i> R1):	36
Knockout-Stämme (<i>H. salinarum</i> R1):	36
Überexpressions-Stämme (<i>H. salinarum</i> R1):	36

Inhaltsverzeichnis

Promotorfusions-Stämme (<i>H. salinarum</i> R1):	37
2.1.2 Vektoren.....	38
Vektoren für die Klonierung in <i>E. coli</i>	38
Vektoren für die Herstellung von Mutanten in <i>H. salinarum</i>	38
Vektorkonstrukte zur Herstellung von Mutanten in <i>H. salinarum</i>	38
Vektorkonstrukte zur Herstellung von Promotorfusions-Transformanten für bgaH- Expressionsstudien in <i>H. salinarum</i>	39
2.1.3 Oligonukleotide.....	40
Oligonukleotide zur Herstellung der Deletionskonstrukte	40
Oligonukleotide zur Herstellung der <i>knockout</i> -Konstrukte	40
Oligonukleotide zur Herstellung der Überexpressions-Konstrukte.....	40
Oligonukleotide zur Herstellung der Promotorfusionskonstrukte	41
Oligonukleotide zur PCR-Kontrolle, für Southernblot und Sequenzierung	42
Oligonukleotide für die reverse Transkription und anschließende PCR (RT-PCR).....	43
Oligonukleotide für 5'-RACE	43
Oligonukleotide für RT-qPCR	44
2.1.4 Enzyme und Proteine	45
Restriktionsenzyme.....	45
DNA-Polymerasen, weitere Enzyme und Proteine	45
2.1.5 Reaktionssysteme und Kits	45
2.1.6 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	46
2.1.7 Nährmedien.....	47
2.1.7.1 Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	48
Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium nach (Sambrook, 1989)	48
SOB-Flüssigmedium	48
2.1.7.2 Nährmedien für <i>Halobacterium salinarum</i>	48
Halo-Medium (HM) nach (Oesterhelt & Krippahl, 1983).....	48
Synthetisches Medium (SM).....	49
2.1.8 Antibiotika	50
2.1.9 Antikörper	50
2.1.10 Geräte und Zubehör.....	50
2.1.11 Software-Programme und Datenbanken.....	51
2.2 <i>Mikrobiologische Methoden</i>	52
2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	52
2.2.2 Kultivierung, Überführung und Stammhaltung von <i>H. salinarum</i>	52

Inhaltsverzeichnis

2.2.3	Messung von Wachstumskurven	52
2.2.4	„Chemical in plug“ (CIP)-Test	52
2.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	53
2.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)	53
2.3.1.1	Schnelle Isolierung genomischer DNA aus <i>H. salinarum</i>	53
2.3.1.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>H. salinarum</i>	53
2.3.1.3	Isolierung von Vektor-DNA aus <i>E. coli</i>	54
2.3.1.4	Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	54
2.3.1.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>H. salinarum</i>	54
2.3.2	DNase-Behandlung der Gesamt-RNA	55
2.3.3	Spezifische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	55
2.3.3.1	Analytischer Restriktionsverdau	55
2.3.3.2	Präparativer Restriktionsverdau	55
2.3.3.2.1	Verdau von Vektor-DNA	55
2.3.3.2.2	Verdau genomischer DNA	56
2.3.4	Ligation	56
2.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	56
2.3.5.1	Amplifikation von DNA	56
2.3.5.2	Amplifikation von RNA	57
2.3.5.2.1	Synthese von cDNA und qualitative PCR (RT-PCR)	57
2.3.5.2.2	Synthese von cDNA und quantitative PCR (RT-qPCR)	58
2.3.5.2.3	Synthese und Amplifikation von cDNA-Enden (5'-RACE)	58
2.3.6	DNA-Sequenzierung	59
2.3.7	Agarose-Gelelektrophorese	60
2.3.7.1	Auftrennung von DNA	60
2.3.7.2	Auftrennung von RNA	60
2.3.8	Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA (dsDNA) und RNA	61
2.3.9	Topoklonierung	61
2.3.10	Transformation in <i>E. coli</i>	62
2.3.10.1	Herstellung RbCl-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	62
2.3.10.2	Transformation in RbCl-kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	62
2.3.11	Transformation in <i>H. salinarum</i>	62
2.3.12	Herstellung von Deletions-Stämmen	63
2.3.13	Herstellung von <i>knockout</i> - und Überexpressions-Stämmen	66
2.3.14	Herstellung von Promotorfusions-Stämmen	66

Inhaltsverzeichnis

2.3.15	Southernblot	66
2.3.16	Northernblot	68
2.4	<i>Biochemische Methoden</i>	69
2.4.1	Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität	69
2.4.1.1	X-Gal-Test	69
2.4.1.2	ONPG-Enzymtest	70
2.4.2	Herstellung von Rohextrakten zur Bestimmung der Proteinkonzentration	70
2.4.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels BCA-Assay	71
2.4.4	Aktivitätsmessungen der Alkalischen Phosphatase	71
2.4.5	Messung intrazellulärer Phosphatkonzentrationen	72
2.4.6	Phosphat-Aufnahme-Test mit Na_2HPO_4	72
2.4.7	Phosphat-Aufnahme-Test mit $^{32}\text{P}_i$	73
3	Ergebnisse	74
3.1	<i>Charakterisierung der Operons <i>pst1</i>, <i>pst2</i> und <i>ugp</i> in <i>Halobacterium salinarum</i></i>	74
3.1.1	<i>In silico</i> Analyse der Gencluster <i>pst1</i> , <i>pst2</i> und <i>ugp</i>	75
3.1.2	Bestimmung der Transkriptionseinheiten <i>pst1</i> und <i>pst2</i> mittels RT-PCR	78
3.1.3	Transkriptionsstartbestimmung der Transkriptionseinheiten <i>pst1</i> , <i>pst2</i> und <i>ugp</i> mittels 5'-RACE	81
3.1.4	Untersuchung der <i>pst1</i> -, <i>pst2</i> - und <i>ugp</i> -Promotoren durch <i>bgaH</i> -Reportergen-Fusion	84
3.1.4.1	<i>In silico</i> Analyse der Promotorsequenzen <i>pst1</i> , <i>pst2</i> und <i>ugp</i>	87
3.1.4.2	Herstellung verschiedener <i>pst1</i> -, <i>pst2</i> - und <i>ugp</i> -Promotorfusions-Konstrukte.	91
3.1.4.3	Transkriptionsstartbestimmung der <i>pst1</i> -Promotorfusionskonstrukt- Transformante KF1A mittels 5'-RACE	93
3.1.4.4	Kinetik der phosphatabhängigen <i>pst1</i> -, <i>pst2</i> - und <i>ugp</i> -Expression	95
3.1.4.5	Bestimmung von <i>cis</i> -aktiven Elementen in den <i>pst1</i> - und <i>pst2</i> -Promotoren	98
3.1.4.5.1	Schritt-für-Schritt-Deletionen der Promotorregion	99
3.1.4.5.2	Bestimmung der TATA-Box	104
3.1.4.5.3	Bestimmung eines AT-reichen P-Box Motivs	110
3.1.4.5.4	Untersuchung einer RY-Box in der <i>pst1</i> -Promotorregion	115
3.1.4.5.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung von <i>cis</i> -aktiven Elementen in den <i>pst1</i> - und <i>pst2</i> -Promotoren	116
3.2	<i>Phosphatabhängige Unterschiede auf Transkriptionsebene und in der Translationseffizienz des <i>pst1</i>-Operons</i>	118

Inhaltsverzeichnis

3.3	<i>Konstruktion verschiedener Knockout-Stämme in H. salinarum R1</i>	124
3.3.1	Konstruktion der Deletions-Stämme KF101 (R1 Δ pst1), KF100 (R1 Δ pst2), KF102 (R1 Δ ugp), KF103 (R1 Δ aph Δ ugp) und KF104 (R1 Δ phoU4).....	125
3.3.2	Konstruktion der <i>knockout</i> -Stämme KF105 (ko:pstC ₁ -OE4471R) und KF106 (ko:pstC ₂ -phoU ₂).....	130
3.3.3	Wachstumsverhalten der verschiedenen Knockout-Stämme.....	132
3.4	<i>Die phosphatabhängigen ABC-Transporter Pst1, Pst2 und Ugp</i>	134
3.4.1	Homologievergleiche der Proteine der ABC-Transporter Pst1, Pst2 und Ugp.....	135
3.4.2	Kinetische Charakterisierung des Phosphattransports und der Affinität der Pst1- und Pst2-Transporter in <i>H. salinarum</i>	141
3.4.2.1	Kinetik der Na ₂ HPO ₄ -Aufnahme des Wildtyps und der Deletions-Mutanten KF101 und KF100.....	142
3.4.2.2	Kinetik der ³² P _i -Aufnahme des Wildtyps und der Knockout-Mutanten KF101, KF100, KF105 und KF106	144
3.4.2.2.1	Vergleich von Wildtyp mit den Deletions-Mutanten KF101 (Δ pst1) und KF100 (Δ pst2).....	144
3.4.2.2.2	Vergleich von Wildtyp mit den <i>knockout</i> -Mutanten KF105 (ko:pstC ₁ -OE4471R) und KF106 (ko:pstC ₂ -phoU ₂).....	147
3.4.3	Glycerin-3-phosphat-Aufnahme durch den Ugp-Transporter in <i>H. salinarum</i>	150
3.5	<i>Untersuchung der Phosphat-Taxis in H. salinarum</i>	152
3.6	<i>Suche nach regulatorischen Proteinen des PHO-Stimulons in H. salinarum</i>	155
3.6.1	Regulatorsuche mit Hilfe der Knockout-Stämme KF100, KF101, KF104, KF105 und KF106	156
3.6.2	Regulatorsuche mit Hilfe der Überexpressions-Mutanten KF201 (<i>Pbop-phoU₃</i>) und KF202 (<i>Pbop-trh3</i>).....	159
3.6.2.1	Konstruktion der Überexpressions-Mutanten KF201 (<i>Pbop-phoU₃</i>) und KF202 (<i>Pbop-trh3</i>)	159
3.6.2.2	Wachstumsverhalten der Überexpressions-Mutanten KF201 (<i>Pbop-phoU₃</i>) und KF202 (<i>Pbop-trh3</i>)	161
3.6.2.3	Untersuchung der Überexpressions-Mutanten KF201 (<i>Pbop-phoU₃</i>) und KF202 (<i>Pbop-trh3</i>) mit Hilfe der RT-qPCR.....	162

Inhaltsverzeichnis

4	Diskussion.....	165
4.1	<i>Pst1 und Pst2 - zwei primäre Transporter für anorganisches Phosphat</i>	166
4.1.1	Phosphattransporter im Genom von <i>H. salinarum</i>	166
4.1.2	Funktion der beiden Pst-Transporter in <i>H. salinarum</i>	167
4.1.3	Die Bedeutung von Pst1 für die Phosphat-Taxis in <i>H. salinarum</i>	168
4.1.4	Affinität und Interaktion der Phosphatbindeproteine PstS ₁ und PstS ₂	170
4.2	<i>Die Transkripte des pst1-, pst2- und ugp-Operons</i>	173
4.2.1	Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Transkripte.....	173
4.2.2	Untersuchung der alternativen <i>pst1</i> -Transkripte mit Hilfe des <i>bgaH</i> -Reportersystems	175
4.2.3	Die biologische Bedeutung der alternativen <i>pst1</i> -Transkripte	176
4.3	<i>Untersuchung der pst1-, pst2-, und ugp-Promotoren</i>	178
4.3.1	Phosphatabhängige Expression der <i>pst1</i> -, <i>pst2</i> -, und <i>ugp</i> -Operons.....	178
4.3.2	Die Promotorstruktur der Operons <i>pst1</i> und <i>pst2</i>	180
4.3.2.1	TATA-Box	180
4.3.2.2	P-Box – eine AT-reiche Sequenz	181
4.3.3	Das Regulationsmodell für den <i>pst1</i> -Promotor	183
4.4	<i>Regulation des PHO-Stimulons</i>	185
	<i>Suche nach einem Regulator des PHO-Stimulons</i>	185
4.5	<i>Fazit und Ausblick</i>	188
5	Literaturverzeichnis.....	190
6	Abkürzungsverzeichnis	206
7	Anhang	209
	Danksagung.....	216
	Curriculum vitae	218

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Regulation der Genexpression des PHO-Regulons in <i>E. coli</i> modifiziert nach (Wanner, 1994).	8
Abb. 2: Promotoren der Gene des PHO-Regulons in <i>E. coli</i> (Vershina & Znamenskaia, 2002).	9
Abb. 3: Promotoren der Gene des PHO-Regulons in <i>B. subtilis</i> (Vershina & Znamenskaia, 2002).	10
Abb. 4: Modell zur Aufnahme von Substraten durch ABC-Transportsysteme (Oldham <i>et al.</i> , 2007).	17
Abb. 5: Die Komponenten der ABC-Transporter Pst und Ugp (A) sowie die zugehörigen Operons <i>pst</i> und <i>ugp</i> (B) in <i>E. coli</i> .	18
Abb. 6: Phylogenetischer Stammbaum der Lebewesen.	21
Abb. 7: Schematische Darstellung der basalen Transkription in Archaeen (modifiziert nach (Reeve, 2003).	30
Abb. 8: Herstellung der Deletionsplasmide pKF_Δxy (A) zur <i>in-frame</i> Deletion durch homologe Rekombination (C) von bestimmten Genen bzw. Operons (B) in <i>H. salinarum</i> .	64
Abb. 9: Vermutete Topologie des ABC-Transporters Pst1 oder Pst2 (A), genetische Karte des <i>pst1</i> -, <i>pst2</i> - (B) und <i>ugp</i> -Genclusters (C).	77
Abb. 10: RT-PCR-Analyse der Gencluster <i>pst1</i> (A) und <i>pst2</i> (B).	79
Abb. 11: Analyse der PCR-Produkte für das <i>pst1</i> - (A) und <i>pst2</i> -Gencluster (B) durch Agarosegel-Elektrophorese.	80
Abb. 12: Schematische Darstellung der TOPO-Klon-Herstellung für das <i>pst2</i> -Operon (A) mit Gelbild des PCR-Produkts (5'-RACE-Fragment) (B) und dessen Lage im TOPO-Vektor (C).	82
Abb. 13: Schematische Darstellung der Transkriptionsstarts der <i>pst1</i> - (A), <i>pst2</i> - (B) und <i>ugp</i> -Operons (C).	84
Abb. 14: Putative <i>cis</i> -aktive Elemente der Promotoren des <i>pst1</i> -, <i>pst2</i> - und <i>ugp</i> -Operons: P <i>pst1</i> , P <i>pst2</i> und P <i>ugp</i> .	87
Abb. 15: Homologievergleich der Promotorregion des ersten Gens der <i>pst</i> -Gencluster von <i>Halobacterium salinarum</i> (H.s.), <i>Haloquadratum walsbyi</i> (H.w.), <i>Natronomonas pharaonis</i> (N.p.) und <i>Haloarcula marismortui</i> (H.m.).	90
Abb. 16: Schematische Darstellung der Promotor- <i>bgaH</i> -Fusionskonstrukte für den <i>pst1</i> -, <i>pst2</i> - bzw. <i>ugp</i> -Promotor im Expressionsvektor pReport.	92
Abb. 17: Mutierte und deletierte Promotorbereiche des <i>pst1</i> - und <i>pst2</i> -Operons (P <i>pst1</i> und P <i>pst2</i>).	92
Abb. 18: Schematische Darstellung der beiden Transkriptionsstarts des Reportergens <i>bgaH</i> in der Transformante KF1A, die das Promotorkonstrukt <i>pst1</i> (-155) enthält.	94
Abb. 19: Darstellung des kinetischen Verlaufs der phosphatabhängigen <i>pst1</i> -, <i>pst2</i> - und <i>ugp</i> -Expression mit Hilfe der β-Galaktosidase-Aktivität im <i>bgaH</i> -Reportersystem.	96
Abb. 20: Darstellung der <i>pst1</i> -, <i>pst2</i> - und <i>ugp</i> - Genexpression unter P _i -gesättigten und P _i -limitierten Bedingungen mit Hilfe der β-Galaktosidase-Aktivität im <i>bgaH</i> -Reportersystem.	97
Abb. 21: Schematische Darstellung des <i>pst1</i> (-155 – -56)-Promotor- <i>bgaH</i> -Fusions-konstrukts im Expressionsvektor pReport.	100

Abbildungsverzeichnis

Abb. 22: Graphische Darstellung der <i>pst1</i> -Promotor-Deletionskonstrukte (A) und der β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den dazugehörigen Promotorfusions-Transformanten (B).....	101
Abb. 23: Graphische Darstellung der 5'-Deletionskonstrukte des <i>pst2</i> -Promotors (A) und der β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den dazugehörigen Promotorfusions-Transformanten (B).	103
Abb. 24: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-1-Box im <i>pst1</i> -(155 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).....	105
Abb. 25: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-2-Box im <i>pst1</i> -(155 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).....	106
Abb. 26: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-2-Box im <i>pst1</i> -(101 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).....	107
Abb. 27: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-Box im <i>pst2</i> -(227 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).....	108
Abb. 28: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-Box im <i>pst2</i> -(43 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).....	109
Abb. 29: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen P-Box im <i>pst1</i> -(155 bp)-Promotor (A) und der β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den dazugehörigen Promotorfusions-Transformanten (B).	111
Abb. 30: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-2-Box im <i>pst1</i> -(155 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).....	112
Abb. 31: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-2-Box im <i>pst1</i> -(101 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).....	113
Abb. 32: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen P-Box im <i>pst2</i> -(64 bp)-Promotor (A) und der β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den dazugehörigen Promotorfusions-Transformanten (B).	114
Abb. 33: Graphische Darstellung der Gesamt-Länge (155 bp) des <i>pst1</i> -Promotors mit nativer Sequenz in der putativen RY-Box (CACA) und 3 Varianten einer Punktmutation (mut1-3) in dieser Sequenz (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).	116
Abb. 34: Vergleich der Northernblot-Analyse zur Detektion der <i>bgaH</i> -mRNA mit mittels ONPG-Enzymtest gemessener BgaH-Aktivität in verschiedenen <i>pst1</i> -Transformanten.....	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 35: Southernblot-Analyse zur Detektion der <i>pst1</i> (A+B)-, <i>pst2</i> (C+D)- und <i>phoU4</i> (E+F)-Deletions-Mutanten.	128
Abb. 36: Southernblot-Analyse zur Detektion der <i>ugp</i> –Deletions-Mutante und <i>aph-ugp</i> -Doppeldeletions-Mutante.....	129
Abb. 37: Schematische Darstellung des Knockouts des <i>pst2</i> -Operons über die Integration des <i>knockout</i> -Vektors in das Genom von <i>H. salinarum</i> (A) und Gelbild des PCR-Produkts für die Mutanten-Verifizierung (B). .	131
Abb. 38: Wachstumskurven der Deletions-Mutanten KF101 ($\Delta pst1$) und KF100 ($\Delta pst2$) (A) sowie der <i>knockout</i> -Mutanten KF105 (ko: <i>pstC1-OE4471R</i>) und KF106 (ko: <i>pstC2-phoU2</i>) (B) verglichen mit dem Wildtyp R1..	133
Abb. 39: Wachstumskurven der Deletions-Mutanten KF102 (Δugp) und KF103($\Delta aph\Delta ugp$) (A), sowie ($\Delta phoU4$) (B) im Vergleich zum Wildtyp R1.	134
Abb. 40: Verwandtschaftsanalyse der Phosphatbindeproteine PstS.....	139
Abb. 41: Graphische Darstellung der Kinetik der Aufnahme von Na_2HPO_4 in den Stämmen R1 (Wildtyp), KF101 (R1 $\Delta pst1$) und KF100 (R1 $\Delta pst2$).	143
Abb. 42: Graphische Darstellung der $^{32}P_i$ -Aufnahme für Wildtyp (schwarz), $\Delta pst1$ (grün) und $\Delta pst2$ (blau) im Hyperbel-Diagramm nach Michaelis-Menten (A) und im linearisierten Diagramm nach Hanes (B).....	145
Abb. 43: Graphische Darstellung der $^{32}P_i$ -Aufnahme für Wildtyp (schwarz), $\Delta pst1$ (grün), $\Delta pst2$ (blau), ko: <i>pstC1-OE4471R</i> (hellgrün) und ko: <i>pstC2-phoU2</i> (hellblau) im Hyperbel-Diagramm nach Michaelis-Menten (A) und im linearisierten Diagramm nach Hanes (B).	147
Abb. 44: Graphische Darstellung des Wachstums von <i>H. salinarum</i> Wildtyp R1 und den Deletions-Mutanten KF102 (R1 Δugp) und KF103 (R1 $\Delta aph\Delta ugp$) mit 0 mM bzw. 1 mM Na_2HPO_4 (P_i) (A-1) oder 1 mM Glycerin-3-phosphat (G3P) (A-1) als einzige Phosphatquelle in $-P_i$ -Medium.	151
Abb. 45: Chemotaktisches Verhalten der <i>H. salinarum</i> -Stämme R1 (Wildtyp), $\Delta pst1$ und $\Delta pst2$ auf Phosphat im CIP-Test.....	153
Abb. 46: Schematische Darstellung der Überexpression des <i>phoU3</i> -Operons über die Integration des Überexpressions-Vektors in das Genom von <i>H. salinarum</i> (A) und Gelbild des PCR-Produkts für die Mutanten-Verifizierung (B).	161
Abb. 47: Wachstumskurven der Überexpressions-Mutanten KF201 (<i>Pbop-phoU3</i>) (A) und KF202 (<i>Pbop-trh3</i>) (B) verglichen mit dem Wildtyp R1.	162
Abb. 48: Interaktionsmodell der Bindeproteine mit den Permeasen der Transporter Pst1 und Pst2.....	173
Abb. 49: Mögliche Haarnadelstruktur der 60 nt langen 5'-UTR im <i>pst1</i> -Promotor (Ppst1).....	177
Abb. 50: Regulationsmodell der Transkription des <i>pst1</i> -Operons.	184
Abb. 51: Vektorkarten der Plasmide pVT und pKF10.....	209
Abb. 52: Vektorkarten der Plasmide pKF20 und pReport.	210
Abb. 53: Gesamter Promotorbereich des <i>pst1</i> -, <i>pst2</i> - und <i>ugp</i> -Operons im pReport-Vektor (Ppst1, Ppst2 und <i>Pugp</i>).	214
Abb. 54: Mutierte und deletierte Promotorbereiche des <i>pst1</i> - und <i>pst2</i> -Operons (Ppst1 und Ppst2).	215

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme zur Herstellung der Deletionsfragmente für verschiedene zu deletierende Operons.....	65
Tab. 2: Liste der Gene der Gencluster <i>pst1</i> , <i>pst2</i> und <i>ugp</i> in <i>H. salinarum</i>	76
Tab. 3: Vergleich der PHO-Box ähnlichen Struktur in der Promotorregion des <i>pst2</i> -Operons von <i>H. salinarum</i> und der PHO-Box des <i>pst</i> -Operons in <i>E. coli</i>	89
Tab. 4: Verwendete Restriktionsenzyme und DIG-markierte Gensonden zur Detektion mittels Southernblot.	126
Tab. 5: Erwartete Fragmentgrößen chromosomaler DNA (Wildtyp und Deletions-Mutanten) im Southernblot.	127
Tab. 6: Vergleich der durch das <i>pst</i> -Operon kodierten Aminosäuresequenzen aus <i>E. coli</i> mit der durch das <i>pst1</i> - und <i>pst2</i> -Operon kodierten Aminosäuresequenzen aus <i>H. salinarum</i>	136
Tab. 7: Vergleich der durch das <i>ugp</i> -Operon kodierten Aminosäuresequenzen aus <i>E. coli</i> mit der aus <i>H. salinarum</i>	137
Tab. 8: Vergleich der durch das <i>pst1</i> , <i>pst2</i> - und <i>ugp</i> -Operon kodierten Aminosäuresequenzen aus <i>H. salinarum</i> mit den Aminosäuresequenzen, die durch die verschiedenen <i>pst</i> -Operons aus <i>Haloarcula marismortui</i> , <i>Haloquadratum walsbyi</i> und <i>Natronomonas pharaonis</i> kodiert werden.....	138
Tab. 9: Kandidaten mit den höchsten E-Werten aus dem Protein-Protein-BLAST der Phosphatbindepoteine PstS ₁ und PstS ₂ aus <i>H. salinarum</i> gegen die NCBI-Proteindatenbank von 55 Archaeen.	140
Tab. 10: Kinetische Parameter (K _M - und v _{max} -Werte) der Transporter Pst1 (Δ <i>pst2</i>), Pst2 (Δ <i>pst1</i>) und beider Transporter (Wildtyp).....	146
Tab. 11: Kinetische Parameter (K _M - und v _{max} -Werte) der Transporter Pst1+PstS ₂ und Pst2+PstS ₁	149
Tab. 12: Aph-Aktivität [U-/ OD ₆₀₀] der Deletions-Mutanten KF100, KF101 und KF104 von <i>H. salinarum</i> im Vergleich zum Wildtyp R1.	156
Tab. 13: Regulationsfaktoren (2 ^{-$\Delta\Delta$Ct} -Werte) für einige Gene des PHO-Stimulons in den Deletions-Mutanten KF100 und KF101 sowie in den <i>knockout</i> -Mutanten KF105 und KF106.	158
Tab. 14: Regulationsfaktoren (2 ^{-$\Delta\Delta$Ct} -Werte) für einige Gene des PHO-Stimulons in der Überexpressions-Mutante KF201 (<i>Pbop-phoU₃</i>).	163
Tab. 15: Regulationsfaktoren (2 ^{-$\Delta\Delta$Ct} -Werte) für einige Gene des PHO-Stimulons in der Überexpressions-Mutante KF202 (<i>Pbop-trh3</i>).....	164
Tab. 16: Liste der mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten aus Abb. 20 und Abb. 22B bis Abb. 33B.	211

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl die Expression als auch die Funktion der ABC-Transportsysteme Pst1, Pst2 (*Phosphate specific transport*) und Ugp (*Uptake glycerol phosphate*) von *Halobacterium salinarum* untersucht. Die Komponenten dieser Transporter werden von phosphatabhängig regulierten Operons (*pst1*, *pst2* und *ugp*) kodiert und stellen Homologe bekannter bakterieller Proteine dar.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die *pst1*- und *pst2*-Promotorregionen charakterisiert, sowie die unterschiedliche Regulation ihrer Operons untersucht. Es konnte hierbei belegt werden, dass beide Operons jeweils eine polycistronische Einheit darstellen und ihre Promotoren somit stromaufwärts des ersten Gens im Operon liegen. Für die *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Operons konnten die Transkriptionsstartstellen identifiziert werden.

In vorliegender Arbeit wurde dabei erstmalig ein archaeales Operon beschrieben, das alternative Promotoren besitzt. *H. salinarum* nutzt für das *pst1*-Operon zwei Transkriptionsstartstellen in Abhängigkeit von Phosphat, um zwei unterschiedlich lange mRNAs zu transkribieren. Durch einen bisher unbekanntem Regulationsmechanismus schaltet die Zelle dabei zwischen einem Transkript mit einer 60 nt langen *leader*-Sequenz unter phosphatgesättigten Bedingungen und einem ohne *leader*-Sequenz unter Phosphatmangel um. Die Transkripte des *pst2*- bzw. *ugp*-Operons haben dagegen unter beiden Phosphatbedingungen keine *leader*-Sequenz. Unter Verwendung des *bgaH*-Reportersystems stellte sich heraus, dass sich die Translationseffizienz der beiden *pst1*-Transkripte mit bzw. ohne *leader*-Sequenz stark unterscheidet. Das Transkript ohne 5'-UTR (*untranslated region*) hatte eine etwa 115-fach höhere Translationseffizienz als das Transkript mit 5'-UTR. Die Expression des *pst1*-Operons wird somit durch einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus moduliert.

Die phosphatabhängige Expression der *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Operons wurde ebenso untersucht, wobei sich herausstellte, dass das *pst2*-Operon unter phosphatgesättigten Bedingungen im Vergleich zum *pst1*-Operon stärker exprimiert wird. Die Expression des *pst1*-Operons wird dagegen unter phosphatlimitierten Bedingungen sehr stark induziert, hauptsächlich durch die hohe Translationseffizienz des *pst1*-Transkripts ohne *leader*-Sequenz. Mit Hilfe des *bgaH*-Reportersystems war es auch möglich die TATA-Boxen des *pst1*- und *pst2*-Promotors zu identifizieren sowie AT-reiche Motive, die in dieser Arbeit als P-Box

bezeichnet wurden. Mutationen in der P-Box mit der Konsensussequenz ATATWWW¹ führten sowohl beim *pst1*- als auch beim *pst2*-Promotor zu einer verringerten Promotoraktivität. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die TATA-2-Box des *pst1*-Promotors unter phosphatlimitierten Bedingungen als P-Box fungiert und die phosphatabhängige Promotoraktivität beeinflusst. Für die Regulation des *pst1*-Promotors wurde ein mögliches Modell vorgestellt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die auf Homologie basierend vermuteten Funktionen der Transporter Pst1, Pst2 und Ugp bestätigt und die kinetischen Parameter bestimmt. Dazu wurden verschiedene Knockout-Mutanten konstruiert. Es zeigte sich, dass die beiden Pst-Transporter unterschiedliche Phosphat-Affinitäten haben und die Phosphatbindeproteine PstS₁ und PstS₂ mit den Permeasen beider Transporter interagieren. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Pst1-Transporters eine starke Reduktion der Phosphat-Taxis zur Folge hat, was seine Relevanz für die phosphatgerichtete Chemotaxis der Zelle untermauert. Durch Wachstumsversuche wurde außerdem nachgewiesen, dass Ugp der einzige Glycerin-3-phosphat-spezifische Transporter in *H. salinarum* ist.

Ein regulatorisches Protein, das an der Regulation der durch eine Phosphatlimitierung induzierten Gene (PHO-Stimulon) beteiligt ist, konnte zwar nicht identifiziert werden, jedoch führte eine Deletion des *pst1*-Operons zu einer leichten Induktion des *pst2*-Operons.

Die Ergebnisse zeigen, dass *H. salinarum* zwei verschiedene Phosphattransportsysteme besitzt, die unterschiedlich genutzt werden. Unter phosphatgesättigten Bedingungen operiert die Zelle hauptsächlich mit dem weniger affinen Pst2-Transporter. Kommt es zu einem Phosphatmangel in der Umgebung wird hauptsächlich der hoch-affine Pst1-Transporter induziert, wodurch sich die Zelle effizienter mit dem überlebenswichtigen Nährstoff versorgen kann. Zudem ermöglicht der Pst1-Transporter eine Phosphat-Taxis. Da dieser sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert wird, kann die Zelle sich besonders schnell an einen veränderten Phosphatgehalt in der Umgebung anpassen und die Proteinsynthese nach Bedarf regulieren.

¹ W = A oder T

Summary

The effective uptake of inorganic phosphate by cells from the environment depends on specific transport systems. In bacteria, these uptake systems are well characterized and most species contain both secondary transporters as well as primary uptake systems belonging to the ABC-family of transporters. Under phosphate starvation, genes coding for high-affinity phosphate transporters are induced in bacteria as well as in eukarya. In *E. coli* these are genes of the phosphate-specific transport via Pst or the Glycerol-3-phosphate-specific transporter, Ugp. Archaea possess the PHO stimulon, which induces numerous genes in response to phosphate limitation. So far this stimulon has only been described for *Halobacterium salinarum* R1. The genome of *H. salinarum* encodes ABC transporters resembling the Pst and Ugp systems of *E. coli* which are upregulated under P_i-limited conditions.

In this study, the gene expression and function of the phosphate dependent operons *pst1*, *pst2* and *ugp* of *H. salinarum* were investigated.

First, it was shown that the three operons (*pst1*, *pst2* und *ugp*) are transcribed as one polycistronic unit. The respective promoters are located upstream of the first ORF (*open reading frame*) of the operons, and transcription start sites (TSS) were mapped. Two TSSs were found for the *pst1* operon, and are utilized in a phosphate dependent manner. Through an unknown regulation mechanism, the cell switches transcription of *pst1* mRNA to either a transcript with or without a 60 nt long leader sequence. The transcripts of the *pst2* and *ugp* operons have no 5'UTRs, regardless of phosphate concentration. Using a *Ppst1-bgaH* reporter system, it was observed that the transcripts with or without a leader sequence have different translation efficiencies. The transcript without a 5'UTR had a 150-fold higher translation efficiency than the transcript with a 5'UTR. It was concluded that the expression of the *pst1* operon is modulated through a post-transcriptional regulation mechanism. To our knowledge, this is the first identified archaeal protein-coding operon that is transcribed by alternative promoters. The differences in phosphate dependent gene expression of the *pst1*, *pst2* and *ugp* operons were investigated using the *bgaH* reporter system. Under phosphate saturated conditions, the expression of the *pst2* operon is stronger compared to the expression of the *pst1* operon, whereas under phosphate limited conditions, *pst1* operon expression is highly induced. This assay system also identified the TATA boxes of the *pst1* and *pst2* promoters as well as AT-rich motifs, named P boxes. Mutations in the P box, with the consensus

Summary

ATATWWW², reduced the promoter activity of both the *pst1* and *pst2* promoters. The results indicated that the TATA-2 box of the *pst1* promoter has an impact on the phosphate dependent promoter activity under phosphate limited conditions and could be used as a P box. In the second part of the study, the proposed functions of the transporters Pst1, Pst2 and Ugp and the kinetic parameters were determined. Different knockout mutants were constructed, and these showed that the Pst transporters had different phosphate affinities. It was concluded from the results that the binding proteins PstS₁ and PstS₂ can interact with both transporters. The phosphate transport systems Pst1 and Pst2 are used differently. Under phosphate saturated conditions the cell operates mainly with the lower-affinity Pst2 transporter. If phosphate becomes limiting in the environment, predominantly the high-affinity transporter Pst1 is induced. This process is regulated on the transcriptional as well as on the post-transcriptional level. Furthermore, it was shown that a deletion of the Pst1 transporters leads to a loss of phosphate-directed chemotaxis under P_i-stress. This result confirms the importance of the Pst1 transporter under phosphate limited conditions. In related studies, growth experiments showed that the Ugp transporter is the only transporter for glycerol-3-phosphate in *H. salinarum*. In addition, the search for a regulatory protein that is involved in the regulation of the genes of the PHO stimulon did not reveal any likely candidates, but it was shown that deletion of the *pst1* operon leads to an induction of the *pst2* operon.

² W = A or T

1 Einleitung

1.1 Phosphatabhängige Genexpression in Mikroorganismen

Phosphor stellt einen essentiellen Makronährstoff für das Wachstum und den Zellstoffwechsel in Mikroorganismen dar, und wird in Form von Phosphaten in zentrale Bausteine der Zelle integriert. Anorganisches Phosphat, das Orthophosphatanion (P_i), ist Bestandteil von Nucleinsäuren, Phospholipiden sowie Lipopolysacchariden und einigen nicht-proteinogenen Aminosäuren und Proteinen, in die es nach posttranslatinaler Modifikation eingebaut wird. Eine zentrale Rolle spielen Phosphorsäureverbindungen wie ATP und diverse Cofaktoren für den Energiestoffwechsel der Zelle.

Unter natürlichen Bedingungen zählt für die Biosynthese nicht nur die in der Umgebung vorhandene Menge an Phosphat, sondern vor allem seine Löslichkeit. Diese wird von vorhandener alkalischer Erde, Schwermetallen, dem pH-Wert und weiteren Faktoren beeinflusst. Der Großteil des Phosphats liegt immobilisiert in organischen Verbindungen vor. Die bevorzugte Phosphat-Quelle der Mikroorganismen ist jedoch anorganisches Phosphat (P_i), welches von der Zelle mit Hilfe verschiedener Transportsysteme aufgenommen werden kann.

In *Escherichia coli* beispielsweise, wird P_i über zwei Transportsysteme, Pit und Pst, über die Cytoplasmamembran in die Zelle aufgenommen (Wanner, 1993). Es wird im Rahmen der Glykolyse (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), des Citratzyklus (Succinyl-CoA-Synthetase), der oxidativen Phosphorylierung (ATP-Synthase) und bei einigen Bakterien in der gemischten Säuregärung (Phosphotransacetylase) oder Argininfermentation (Ornithin-Carbamoyltransferase) in den Stoffwechsel integriert.

Einige Organophosphate werden in *E. coli* zunächst über die äußere Membran transportiert und im Periplasma durch Phosphatasen, wie die alkalische Phosphatase, hydrolysiert. Somit wird das P_i freigesetzt und kann in die Zelle geschleust werden. Das Glycerin-3-phosphat wird direkt über das Transportsystem Ugp als Phosphoester aufgenommen. Auch Phosphonate werden entweder in die Zelle transportiert oder abgebaut und dienen so als weitere Phosphorquelle.

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit des Phosphats sind Mikroorganismen darauf angewiesen dieses zu speichern. P_i wird in den meisten Zellen als Polyphosphat (PolyP) gespeichert, das einen deutlichen osmotischen Vorteil gegenüber freiem P_i hat.

Das komplexe Phosphorassimilationssystem unterliegt einer strengen Kontrolle in Abhängigkeit des Bedarfs und der Verfügbarkeit von Phosphor im Lebensraum.

Unter Phosphat-Mangelbedingungen werden sogenannte *psi* (*phosphate starvation inducible*)-Gene (Hulett, 1996, Makino *et al.*, 1994) induziert. Diese kodieren Proteine, die am Transport von anorganischem Phosphat und anderen Phosphat-enthaltenden Substraten beteiligt sind. Weiter werden Gene induziert, die für Phosphomonoesterasen wie Saure und Alkalische Phosphatasen oder 5'-Nukleotidasen und Phosphodiesterasen kodieren. Auch Proteine, die an der Biosynthese von Zellwandbestandteilen und dem Gebrauch von Polyphosphaten und Phosphonaten beteiligt sind, werden induziert. Alle diese *psi*-Gene, die auch Teil des PHO (*phosphate starvation*)-Regulons sind, unterliegen derselben physiologischen und genetischen Kontrolle. Ein Regulon definiert sich als die Summe aller Gene, die durch ein gemeinsames Regulatorprotein positiv (verstärkte Transkription) und/oder negativ (verringerte Transkription) reguliert werden.

Sämtliche Gene, die von einem Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem reguliert werden, das aus dem Proteinpaar PhoB–PhoR in gramnegativen bzw. PhoP–PhoR in grampositiven Bakterien besteht, werden als *pho*-Gene bezeichnet. Die Antwortregulatoren PhoB und PhoP sind Transkriptionsregulatoren, die direkt an den Promotoren der *pho*-Gene binden. PhoR ist eine transmembrane sensorische Histidinproteinkinase, die auf vorhandenes Phosphat im Medium reagiert und den Antwortregulator phosphoryliert. Die Transkription der *pho*-Gene wird durch die phosphorylierte Form des Antwortregulators induziert (Hulett, 1996, Makino *et al.*, 1989, Makino *et al.*, 1988).

Ein auf Phosphatmangel im Medium antwortendes System ist außer in Bakterien (Hulett, 1996, Vershinina & Znamenskaia, 2002, Wanner, 1994) und in Cyanobakterien (Hirani *et al.*, 2001) auch in dem einzelligen Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben worden (Magbanua *et al.*, 1997b). Ein PHO-Regulon wurde des Weiteren für Archaeen in Erwägung gezogen (Osorio & Jerez, 1996, Wende *et al.*, 2009).

1.1.1 Das PHO-Regulon in gramnegativen Bakterien

Ein auf Phosphatmangel im Medium antwortendes System wurde in mehreren gramnegativen Bakterien beschrieben, unter anderem in *Salmonella typhimurium* (Conlin *et al.*, 2001, Foster & Spector, 1986, Jiang *et al.*, 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (Anba *et al.*, 1990, Siehnel *et al.*, 1988), *Agrobacterium tumefaciens* (Aoyama *et al.*, 1991, Mantis & Winans, 1993), *Sinorhizobium meliloti* (Bardin & Finan, 1998, Mendrygal & Gonzalez, 2000, Summers *et al.*, 1998), *Bradyrhizobium japonicum* (Minder *et al.*, 1998), *Vibrio cholerae* (von Kruger *et al.*, 1999) und *Acinetobacter* spp. (Geissdorfer *et al.*, 1998, Schembri *et al.*, 1995). Eines der am besten erforschten PHO-Regulons in gramnegativen Bakterien ist das des Modellorganismus *Escherichia coli*.

E. coli ist ein peritrich begeißelter, stäbchenförmiger Bewohner des Säugerdarms und gehört zur Familie der Enterobakterien. Es ist fakultativ anaerob und somit in der Lage seine Energie unter anaeroben Bedingungen durch Gärung und unter aeroben durch die Atmungskettenphosphorylierung zu gewinnen.

Bei Phosphatmangelbedingungen wird die Diffusion von phosphathaltigen Stoffen in *E. coli* durch eine Pore in der äußeren Membran, das PhoE, erleichtert (Tomassen & Dekroon, 1987). Da die meisten vom Medium ins Periplasma gelangten Substanzen auf Grund ihrer Größe die cytoplasmatische Membran nicht weiter passieren können, werden sie entweder von alkalischen (PhoA) bzw. sauren (AppA) Phosphatasen oder 5'-Nukleotidasen zu anorganischem Phosphat (P_i) hydrolysiert (Rao & Torriani, 1988). Das periplasmatische P_i wird vom Phosphatbindeprotein PstS gebunden und durch das Pst (*phosphate specific transport*)-System (siehe Abb. 1) ins Cytoplasma transportiert. Unter P_i -gesättigten Bedingungen wird P_i durch das sogenannte Pit (*phosphate inorganic transport*)-System transportiert (Rosenberg *et al.*, 1977).

E. coli ist auch in der Lage *sn*-Glycerin-3-phosphat (G3P) und Glycerinphosphodiester durch das Ugp (*uptake glycerol phosphate*)-System aufzunehmen und durch die Phosphodiesterase UgpQ zu hydrolysieren. Mit Hilfe von verschiedenen Proteinen wird das aufgenommene Phosphat von der Zelle verstoffwechselt (Wackett *et al.*, 1987).

All diese Proteine werden durch das PhoB-PhoR-System reguliert (Abb. 1) (Wanner, 1994). Unter gesättigten Phosphatbedingungen wird die Expression der Gene des PHO-Regulons durch die Ausbildung eines Repressorkomplexes reprimiert. Dieser wird von PhoR, PhoU und den Proteinen des Pst-Transporters gebildet. Das PhoU-Protein hat hier eine Mediatorfunktion zwischen Pst und PhoR, dessen Mechanismus bisher noch unbekannt ist. Unter Phosphat-Mangelbedingungen liegt das Phosphatbindeprotein PstS nicht länger mit P_i

gesättigt vor. In Folge dessen kommt es zu einer Konformationsänderung im Pst-System, die dazu führt, dass sich das Gleichgewicht vom Repressor-Komplex PhoR^R zum dimeren Aktivator-Komplex PhoR^A verschiebt. Die aktivierte Histidinkinase PhoR^A wird autophosphoryliert und transferiert ihre Phosphoryl-Gruppe auf den Antwortregulator PhoB wodurch sich $\text{PhoB}\sim\text{P}$ bildet. Das phosphorylierte PhoB bindet an Zielsequenzen in Promotoren und induziert so die Transkription der *pho*-Gene (Abb. 1) (Wanner, 1994).

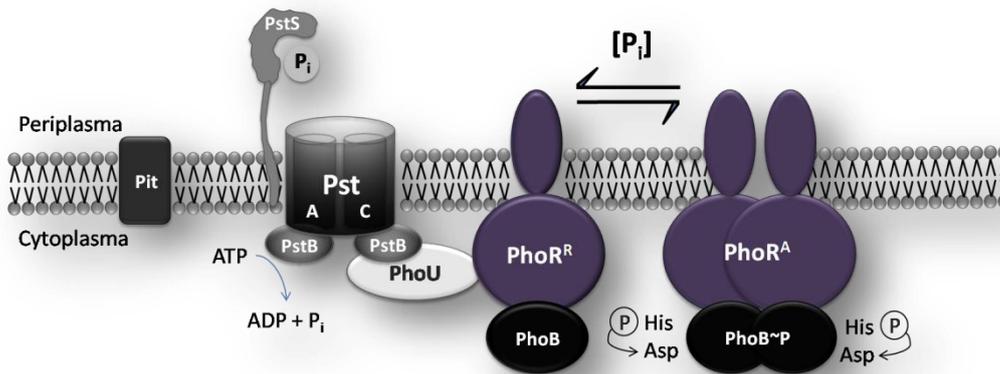


Abb. 1: Schematische Darstellung der Regulation der Genexpression des PHO-Regulons in *E. coli* modifiziert nach (Wanner, 1994).

Unter phosphatgesättigten Bedingungen im Medium wird die Expression der Gene des PHO-Regulons durch die Ausbildung eines Repressorkomplexes, der von PhoR^R , PhoU und dem Pst-Transporter gebildet wird, reprimiert. Unter Phosphat-Mangelbedingungen, liegt das Phosphatbindeprotein PstS nicht P_i -gesättigt vor. In Folge kommt es zu einer Konformationsänderung im Pst-System, die dazu führt, dass der Repressor-Komplex PhoR^R spontan in den Aktivator-Komplex PhoR^A übergeht. Die aktivierte Histidinkinase PhoR^A wird autophosphoryliert und transferiert seine Phosphoryl-Gruppe auf den Antwortregulator PhoB wodurch sich $\text{PhoB}\sim\text{P}$ bildet. Das phosphorylierte PhoB bindet an Zielsequenzen in Promotoren und induziert die Transkription der Gene des PHO-Regulons.

Die Zielsequenzen sind sogenannte PHO-Boxen, die in den Promotoren der *pho*-Gene auftreten. Promotoren der *pho*-Gene enthalten die konservierte Sequenz in der -10 Region, die wichtig für die Interaktion mit der σ^{70} -haltigen RNA-Polymerase ist, jedoch fehlt ihnen die konservierte Sequenz in der -35 Region (Abb. 2). Die *pho*-Promotoren enthalten dagegen eine spezifische Zielsequenz, die 10 Nukleotide stromaufwärts der -10 Region liegt und wichtig für die Interaktion mit dem Regulatorprotein PhoB ist. Diese sogenannte PHO-Box (Abb. 2) wird aus 18 Nukleotiden gebildet: zwei identische Heptanukleotide, die durch vier AT-reiche Nukleotide geteilt werden CTGTCATA(A/T)A(T/A)CTGTCA(C/T) (Makino *et al.*, 1994).

1 Einleitung

```

                                                                 -10
CAGTAAAAAGTTAATCTTTTCAACAGCCTGTCATAAAGTTGTCACGGCCGAGACTTATAGTCGCTTTG phoA
                                                                 -10
ATAACCTGAAGATATGTGCGACGAGCTTTCATAAATCTGTCATAAATCTGACGCATAATGACGTCG phoB
                                                                 -10
GCTGAAAGCACACAGCTTTTTTCATCACTGTCATCCTGTCATCCTTCCAGTAGAAACTAATGTCA phoH
                                                                 -10
ACCACATTTTAAGAATATTATTAATCTGTAATATATCTTTAACAATCTCAGGTTAAAACTTTCCTG phoE
                                                                 -10
TCTCTGTCATAAACTGTCATATTCTTACATATAACTGTCACCCTGTTTGCTATTTTGCTTCTC pstS
                                                                 -10
TTGTCATCTTCTGACACCTTACTATCTTACAAATGTAACAAAAAAGTTATTTTCTGTAATCGAGCATGTCATGTTACCCC ugp

```

Die Konsensussequenz der PHO-Box in *E. coli*:

CTGTCATA(A/T)A(T/A)CTGTCA(C/T)

Abb. 2: Promotoren der Gene des PHO-Regulons in *E. coli* (Vershina & Znamenskaia, 2002).

Die Konsensussequenz der PHO-Boxen nach (Makino *et al.*, 1994) wird angegeben. Die jeweiligen PHO-Boxen sind unterstrichen und in fetten Buchstaben angegeben. Die -10 Region ist unterstrichen.

1.1.2 Das PHO-Regulon in grampositiven Bakterien

Bisher wurde ein System, das auf Phosphatmangel antwortet, in grampositiven Bakterien für einige *Streptomyces* (Esteban *et al.*, 2008, Mendes *et al.*, 2007, Sola-Landa *et al.*, 2005), *Streptococcus pneumoniae* (Novak *et al.*, 1999) und *Clostridium acetobutylicum* (Fiedler *et al.*, 2008, Fischer *et al.*, 2006) beschrieben. Das am detailliertesten erforschte PHO-Regulon grampositiver Bakterien ist das von *Bacillus subtilis*.

B. subtilis ist ein begeißeltes, stäbchenförmiges Bodenbakterium, das unter schlechten Wachstumsbedingungen thermoresistente Sporen bildet. Es wurde lange Zeit für obligat aerob gehalten, bis sich herausstellte, dass es auch fakultativ anaerob wachsen kann (Nakano & Zuber, 1998). Somit gewinnt *B. subtilis* seine Energie zwar vorzugsweise über oxydative Phosphorylierung, kann aber unter anaeroben Bedingungen auch Nitrat oder Nitrit als terminalen Elektronenakzeptor nutzen (Nakano & Zuber, 1998). Zudem ist *B. subtilis* in der Lage ausschließlich durch Gärungsstoffwechsel (Erzeugung von Milchsäure, Ethanol, Acetoin und 2,3-Butandiol) zu überleben.

Ein wesentlicher Unterschied zu beispielsweise *E. coli* liegt in der Eigenschaft der Bazillen Endosporen bilden zu können. Die Sporenbildung erfordert über 100 Proteine, deren Synthese durch eine Kaskade von Reaktionen mit der Beteiligung verschiedener σ -Faktoren reguliert wird (Burbulys *et al.*, 1991, Perego *et al.*, 1996).

Das PHO-Regulon in *B. subtilis* ist ähnlich organisiert wie das in *E. coli*. Zusätzlich zum PhoP–PhoR Signaltransduktionssystem von *B. subtilis*, welches homolog zum PhoB–PhoR System aus *E. coli* ist, besitzt es zwei weitere regulatorische Systeme: das vielschichtige System der Spo-Proteine, das die Sporenbildung reguliert (Jensen *et al.*, 1993), und das Zweikomponentensystem ResD–ResE, das die aerobe und anaerobe Atmung reguliert (Sun *et al.*, 1996, Zhang & Hulett, 2000).

Wie bei *E. coli* wird bei Phosphatmangel die Transkription mehrerer Gene induziert. Der Umweltreiz wird hier jedoch nicht über den Pst-Transporter, sondern über die Elektronentransportkette in der Cytoplasmamembran vermittelt. Zu den induzierten Genen gehören beispielsweise das der Alkalischen Phosphatase *phoA* und die Gene der Phosphomonoesterasen *phoB* und *phoD*, welches zusätzlich noch eine Phosphodiesterase ist. Weiter werden das *tua*-Operon (Teichuronsäuresynthese) und zwei *tag*-Operone (Teichonsäuresynthese) induziert. Das *pst*-Operon (Phosphattransport) und das *phoP-phoR*-Operon, das für die Regulatorproteine des PHO-Regulons kodiert, zählen auch dazu. Der phosphorylierte Antwortregulator PhoP~P bindet analog zu PhoB~P aus *E. coli* bestimmte Sequenzen in den Promotoren der Gene des PHO-Regulons, die auch hier PHO-Boxen genannt werden, aber eine andere Konsensussequenz (siehe Abb. 3) aufweisen (Hulett, 1996). Diese besteht aus zwei Hexanukleotiden TT(A/T/C)ACA, die von fünf nichtkonservierten Nukleotiden geteilt werden (Eder *et al.*, 1999). Die –10 Region enthält eine Konsensussequenz, die von der σ^A -haltigen RNA-Polymerase erkannt wird und obwohl die –35 Region kein Konsensusmotiv enthält, bindet das Regulatorprotein PhoP daran.

```

-95      -85      -75      -65      -55      -45      -35      -25      -10
GTAAAAGAGTTTAACACATTTATCAGAAAAAACACGTAATTCACACTTTTAACATACCATTTACATCCAATTTAACATCCGTCCTGCTAAAACTGACTGGCAT tuaA
GCAAGATAACGAAAAGCGTTTTTTCATTTTCTTTTACAAGGGCTTTACTTATTGTTTTACATGATCAACAGCCGCATTTAACAAAGTTCCCTAACATGATAAACGG phoA (U02550)
ATGATGTGGGCGTTTTTTTTATACAAAAAACGCACTGATTTACAAAACCTTTTACAATTCGGTTCAAAACCCCTTTTACATAGAACCCTTACTCTATACGTG pstS (D58414)
GGTGCCAGTTCATTATTCTTGTAAAATCCAATCTTTTAAAATCGATTAATACTAGCTTTTACAAGTTTAAAAATATAATTGGGTTG phoB (M33634)
CAGCAGGCTTGTGAGGGAAGACCTGTTTTTAATGTTTCAGCGCTTACAATCAGTTCACACTTCTTTCACAGTCGTTTTTACAATGATTTCCCTATAATGGAGACG phoD (U49060)
CAGAGCACTGGCGGATCACGGTAAAAACGCTTCTAAATTTACAATAACCTTCAAAAAGTAAGAAATGTGAAATGAACGTGCAATGATATAATGAATGGA resA
GAAAGCGACACAGTTCTCAAACTTCTCTCACGATTTGATAAAATGAAAGTAA resD

```

Die Konsensussequenz der PHO-Box in *B. subtilis*:
TT(A/T/C)ACA

Abb. 3: Promotoren der Gene des PHO-Regulons in *B. subtilis* (Vershina & Znamenskaia, 2002).

Die Konsensussequenz der PHO-Boxen nach (Birkey *et al.*, 1998, Liu & Hulett, 1998) wird angegeben. Die PHO-Boxen sind unterstrichen und in fetten Buchstaben angegeben. Die -10 Region ist unterstrichen. In Klammern sind die GenBank *accession numbers of sequences* angegeben.

1.1.3 Das PHO-Regulon in Eukaryoten

Auch eukaryotische Organismen haben verschiedene Anpassungsmechanismen entwickelt, die eine Überwindung der durch P_i -Mangel induzierten Stresssituationen ermöglichen. Die Systeme sind hier erwartungsgemäß sehr komplex aufgebaut. In der Literatur werden *psi* (*phosphate starvation inducible*)-Gene beispielsweise in höheren Pflanzen wie *Lycopersicon esculentum* (Goldstein *et al.*, 1988a, Goldstein *et al.*, 1988b, Goldstein *et al.*, 1989, Liu *et al.*, 1998) beschrieben. Für Pflanzen wird ein PHO-Regulon postuliert, das dem der Pilze gleicht. PHO-Regulons in Pilzen wurden in *Glomus versiforme* (Harrison & van Buuren, 1995) und *Neurospora crassa* (Furukawa *et al.*, 1987) beschrieben. Das am besten erforschte PHO-Regulon in Pilzen ist das von *Saccharomyces cerevisiae*.

Die Bierhefe (*S. cerevisiae*) ist ein einzelliger Pilz, der sich sowohl haploid, als auch diploid durch Spross- oder Ascusbildung vermehrt. Er gehört zu der Untergruppe der Ascomyceten und wächst sowohl anaerob (Gärung) als auch aerob (Atmungskette).

In *S. cerevisiae* konnte ein *psi*-System charakterisiert werden (Lenburg & O'Shea, 1996, Oshima, 1997, Persson *et al.*, 2003). Bei P_i -Mangel werden beispielsweise das P_i -Transportsystem Pho84p und die extrazelluläre saure (Pho5p) oder vakuoläre alkalische (Pho8p) Phosphatase aktiviert. Weiter werden regulatorische Faktoren induziert wie die beiden Regulatoren Pho4p und Pho2p. Diese binden an stromaufwärts gelegene Aktivatorsequenzen (UAS: *upstream activator sequence*) in den Promotoren der *PHO*-Gene und aktivieren dadurch deren Expression (Magbanua *et al.*, 1997a, Ogawa *et al.*, 1995, Vogel *et al.*, 1989). Den Kern der Transkriptionsregulatoren der *PHO*-Gene bilden die Cyclin-abhängige Kinase (CDK) Pho85p, ein Cyclin Pho80p, der CDK-Inhibitor (CKI) Pho81p und die Transkriptionsfaktoren Pho2p und Pho4p. Die Aktivität von Pho4p wird, in Abhängigkeit vom P_i -Gehalt des Mediums, durch seine Phosphorylierung durch den Pho80p-Pho85p-Komplex reguliert. Bei hohen P_i -Konzentrationen ist das Pho4p durch Phosphorylierung inaktiviert. Unter P_i -Mangelbedingungen wird die Phosphorylierung von Pho4p durch Inhibierung des Pho80p-Pho85p-Komplexes durch den Faktor Pho81p verhindert (Barbaric *et al.*, 1996, Lenburg & O'Shea, 1996).

Durch Deletions-Analysen des *PHO5*-Promotors wurden zwei regulatorische Elemente bzw. UAS (*upstream activator sequence*), UASp1 und UASp2, entdeckt (Rudolph & Hinnen, 1987). Beide wurden von Pho4p *in vivo* unter P_i -Limitierung, jedoch nicht unter P_i -Sättigung gebunden (Venter *et al.*, 1994). Es wurde gezeigt, dass der Aktivator Pho4p an die Bindungssequenz CACGT(G/T) bindet (Oshima, 1997). Zumindest eine Kopie dieses

Konsensus konnte in den Promotoren mit Ausnahme von einem in allen 22 beschriebenen *PHO*-regulierten Genen gefunden werden (Ogawa *et al.*, 2000).

Der Transkriptionsfaktor Pho2p, der auch als Bas2p oder Grf10p bekannt ist, ist ein Homeoprotein (*helix-turn-helix* Motiv), das an eine AT-reiche Sequenz mit dem Konsensus (T/C)TAA(T/A)T(T/G)AAT bindet (Barbaric *et al.*, 1996). Pho2p ist auch an der Regulation diverser anderer Gene beteiligt und interagiert mit mehreren anderen Proteinen, unter anderem auch mit Pho4p. Pho2p konnten zwei Funktionen zugeordnet werden. Einerseits rekrutiert es den Aktivator Pho4p an UASp1 und andererseits verstärkt es dessen aktivierendes Potential bei der Bindung von UASp2 (Barbaric *et al.*, 1998).

1.1.4 Das PHO-Regulon in Archaeen

Darüber, wie Archaeen auf einen P_i -Mangel reagieren ist bisher sehr wenig bekannt.

Eine Studie mit dem Crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* untersuchte die Proteinexpression in der Zelle unter Phosphatmangel (Osorio & Jerez, 1996). Mit Hilfe von 2D-Gelelektrophorese wurde beobachtet, dass einige Proteine nur unter $-P_i$ -Bedingungen exprimiert wurden. Es fanden jedoch weder weiterführende Experimente zur Identifikation der Proteine noch eine Untersuchung des Regulationsmechanismus statt. Weiter ließ eine Southernblot-Analyse vermuten, dass das Genom von *S. acidocaldarius* ein Zweikomponentensystem enthält, das dem PhoR-PhoB-System aus *E. coli* gleicht.

In *H. salinarum* konnten mit Hilfe von Transkriptomanalysen mehrere Gene als phosphatabhängig reguliert identifiziert werden (Wende *et al.*, 2009). Alle Gene, deren Transkriptmenge durch eine Phosphatlimitierung anstieg, wurden als Gene des PHO-Stimulons definiert (Wende *et al.*, 2009). Ein Stimulon ist als die Summe aller Gene definiert, die auf einen bestimmten Außenreiz (*Stimulus*), in diesem Fall Phosphat, mit verstärkter oder verringerter Transkription reagieren. Zum Kern dieser durch Phosphat verstärkt transkribierten Gene gehören die Gene des *pst1*- *pst2*- und *ugp*-Genclusters sowie das Gen *aph* (Wende *et al.*, 2009). Unter den phosphatabhängig induzierten Genen wurde das *pst1*- und *ugp*-Gencluster am stärksten reguliert, dagegen wurde das *pst2*-Gencluster wesentlich schwächer induziert. Dies ist ein erster Hinweis für die unterschiedliche Expression der zwei Gencluster *pst1* und *pst2*.

Der Einfluss eines potentiellen Regulators dieser Gene wurde mit Hilfe eines Aph-Enzymtests untersucht (Wende *et al.*, 2009). Die Aph-Aktivität verschiedener Deletions-Stämme wurde sowohl unter $+P_i$ - als auch $-P_i$ -Bedingungen untersucht und somit als Reporter für das

PHO-Stimulon verwendet. *H. salinarum* besitzt keinen Antwortregulator, der homolog zu den klassischen Vertretern PhoP oder PhoB ist. Es sind jedoch fünf andere Antwortregulatoren, CheY und CheB (Antwortregulatoren des Zweikomponentensystems der Chemotaxie) eingeschlossen, im halobakteriellen Genom vertreten. Die für Antwortregulatoren typische Empfängerdomäne (*receiver domain*) kann auch in einigen Histidinkinasen enthalten sein, die dann Hybridkinasen genannt werden. *H. salinarum* besitzt zwei Hybridkinasen, die eine N-terminale Empfängerdomäne enthalten.

Die Phosphatmangel-Antwort von Mutanten, die je eines von fünf Antwortregulator-Genen, je eines von fünf der zwölf Histidinkinase-Genen oder je eines von einem der zwei Hybridkinasen deletiert hatten, zeigte keinen Unterschied zur Induktion der Aph-Aktivität im Wildtyp. Daraus wurde geschlussfolgert, dass *H. salinarum* nicht von einem *klassischen* Zweikomponentensystem (PhoR-PhoP/PhoB) reguliert wird, wie es in allen bisher untersuchten Bakterien der Fall ist (Wende, 2006). Keiner der Antwortregulatoren oder die Hybridkinase alleine sind an der Regulation des PHO-Stimulons beteiligt. Die Redundanz der Antwortregulatoren wurde auf Grund der geringen Homologie der Effektorbereiche als unwahrscheinlich erachtet.

Die phosphatabhängige Regulation von *Halobacterium* NRC-1, das ein fast identisches Genom mit *H. salinarum* R1 teilt, wurde durch systembiologische Methoden und Expressionsstudien modelliert (Bonneau *et al.*, 2007, Bonneau *et al.*, 2006). In diesen beiden Studien wurden einige regulatorische Proteine genannt, die durch systembiologische Modelle für die Regulation der Phosphattransporter vorausgesagt wurden. Dabei wurde vermutet, dass der globale Regulator SirR die Regulation eines Clusters kontrolliert, zu dem unter anderem Gene für den Transport von Eisen, Mangan, Cobalt und Phosphat zugeordnet sind. Eine *sirR*-Knockout-Mutante bestätigte eine gestörte Regulation der Gene des Phosphattransports (Bonneau *et al.*, 2007). In einer anderen Transkriptomanalyse mit der Deletions-Mutante $\Delta sirR$ konnte der Einfluss auf die Transkription der Gene des halobakteriellen PHO-Stimulons jedoch nicht bestätigt werden (Schwaiger, 2009). Dennoch wurde *sirR* als Antwort auf eine 10-stündige Phosphatlimitierung signifikant induziert, und das Gen eines weiteren globalen Regulators *lrp* in den ersten 4 h des Experiments reprimiert (Wende, 2006). Die Genexpression des metallabhängigen Regulators SirR wird von Lrp kontrolliert (Schwaiger, 2009). In der Deletions-Mutante Δlrp wurden sowohl *sirR* als auch die Gene *pstC₂* und *pstB₂* des *pst2*-Genclusters reprimiert. In einer Überexpressions-Mutante des *lrp*-Gens, die nach der in Kapitel 3.6.2 beschriebenen Methode konstruiert wurde, waren *sirR* und *pstC₂* induziert (Schwaiger, 2009). Diese Ergebnisse könnten auf einen möglichen Einfluss

von Lrp auf die Transkription des *pst2*-Genclusters hindeuten. Ob SirR an der Regulation mitwirken könnte, kann aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse aus den Transkriptomanalysen von (Bonneau *et al.*, 2007) und (Schwaiger, 2009) nicht beantwortet werden.

Von (Bonneau *et al.*, 2006) wurde ein anderes Mitglied der LrpA/AsnC-Familie, das Lrp-Homolog Trh3, als ein Repressor für die Transkription der Gene von Phosphataufnahme-Systemen durch systembiologische Methoden vorausgesagt. Weiter wurde für die PhoU-Homologen PhoU₂ und PhoU₃ eine regulative Funktion angenommen.

Die nur in Bakterien und Archaeen vorkommenden PhoU-Homologe finden sich auch im Genom von *H. salinarum*, welches insgesamt vier verschiedene PhoU-homologe Proteine kodiert. Davon befinden sich zwei in den jeweiligen *pst*-Genclustern, *phoU*₁ (OE4476R) und *phoU*₂ (OE1674R), und zwei in monocistronischen Operons, *phoU*₃ (OE1681F) und *phoU*₄ (OE2128F).

Das PhoU von *E. coli* ist an der Regulation der phosphatabhängigen Genexpression zusammen mit dem Pst-Transporter und PhoR beteiligt (siehe Kapitel 1.1.1). Der genaue Mechanismus der Mediatorfunktion von PhoU ist unbekannt. Für den P_i-Transportvorgang spielt PhoU keine Rolle (Steed & Wanner, 1993). Kürzlich wurde gezeigt, dass PhoU in *E. coli* die Aktivität und Menge des *pst*-Operons moduliert (Rice *et al.*, 2009). In *B. subtilis* ist kein PhoU vorhanden und die Phosphatregulation findet ohne dieses Mediatorprotein statt (Hulett, 1996).

Eine *in silico* Untersuchung der vier von *phoU*-Genen kodierten Proteine ergab ein unterschiedliches Verwandtschaftsmuster (Wende *et al.*, 2009). Das PhoU₂, das vom *pst2*-Gencluster kodiert wird, war das einzige der vier Proteine, das dem PhoU der Bakterien verwandtschaftlich und strukturell nahe steht. Als einziges der PhoUs in *H. salinarum* besitzt es zwei Bereiche, die homolog sind zu einer in der Datenbank Pfam (Finn *et al.*, 2006, Finn *et al.*, 2008) als bakterielles PhoU registrierten Region. Die drei Proteine PhoU₁, PhoU₃ und PhoU₄ sind etwa 100 Aminosäuren länger und besitzen nur einen PhoU-Bereich, der dem aus der Pfam-Datenbank gleicht. Darüber hinaus zeigen sie am N-Terminus eine etwa 60 Aminosäuren lange Region, die Homologien zu den Transkriptionsfaktoren AbrB bzw. SpoVT besitzt. Diese regulieren in *B. subtilis* mehrere Gene (Bagyan *et al.*, 1996, Furbass *et al.*, 1991). Die DNA-Bindeaktivität von AbrB wurde auf die ersten 55 Aminosäuren eingegrenzt (Xu & Strauch, 2001). Genau zu diesem Bereich weisen die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Gene *phoU*₁, *phoU*₃ und *phoU*₄ eine Homologie auf. Durch die Transkriptomanalyse zeigte sich eine signifikante Induktion des *phoU*₁ und *phoU*₃ als

Antwort auf eine Phosphatlimitierung (Wende *et al.*, 2009). Das *phoU₄* war nicht reguliert, das abgeleitete Protein zeigt jedoch auch die schwächste Konservierung des PhoU-Motivs (Wende *et al.*, 2009). Das *phoU₃* dagegen besitzt die stärkste Konservierung sowohl des AbrB/SpoVT- als auch des PhoU-Bereichs. Die phosphatabhängige Expression des *phoU₃* zeigte eine ähnliche Kinetik wie der bei 24 h Phosphatstress kontinuierlich stark induzierte Pst1-Transporter. Das *phoU₁* dieses Transporters zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit mit *phoU₃*. Von (Wende *et al.*, 2009) wurde daher eine funktionelle Redundanz als wahrscheinlich angenommen. Die Regulation des *phoU₂* glich der der anderen Gene des *pst2*-Genclusters, welches nur vorübergehend induziert wurde (Maximum bei 10 h Phosphatstress) (Wende *et al.*, 2009).

1.2 Die phosphatabhängigen ABC-Transportsysteme Pst und Ugp

Wie bereits erwähnt wurde, wird die Expression des PHO-Regulons in Mikroorganismen als Antwort auf einen Phosphatmangel in dem sie umgebenden Medium induziert. Der phosphatabhängig regulierte Transporter Pst (*phosphate specific transporter*) ist durch seine spezifische Aufnahme von anorganischem Phosphat (P_i) für die Versorgung der Zelle essentiell. Der Ugp (*uptake glycerol phosphate*)-Transporter transportiert hingegen spezifisch *sn*-Glycerin-3-phosphat (G3P), welches in der Zelle zu P_i abgebaut werden kann. Unter P_i -limitierten Bedingungen in *E. coli* wird die Expression des *pstSCAB-phoU*- und des *ugpBAECQ*-Operons von dem Zweikomponentensystem (Histidinkinase und Antwortregulator) PhoR-PhoB reguliert (Wanner, 1993).

Das Pst- und das Ugp-System sind Transportsysteme mit hoher Affinität zu ihren Substraten. Sowohl das phosphatspezifische Transportsystem Pst als auch das *sn*-Glycerin-3-phosphat-spezifische Transportsystem Ugp aus *E. coli* werden der Superfamilie der ATP-bindenden Kasette (englisch: ATP binding cassette = ABC) zugeordnet. Mitglieder der Superfamilie der ABC-Transporter transportieren Substrate spezifisch und aktiv über eine Zellmembran, wodurch sie zu den primär aktiven Transportern gehören, da für die Überführung der Substrate, die gegen einen Konzentrationsgradienten befördert werden, Energie durch die Bindung und Hydrolyse von ATP aufgewandt werden muss. ABC-Transporter besitzen zwei ATP-bindende Walker-Motive, Walker A und Walker B (Walker *et al.*, 1982), sowie ein ABC-Signaturmotiv (LSGGQ), einen Q-loop und eine H-Region (Davidson & Chen, 2004).

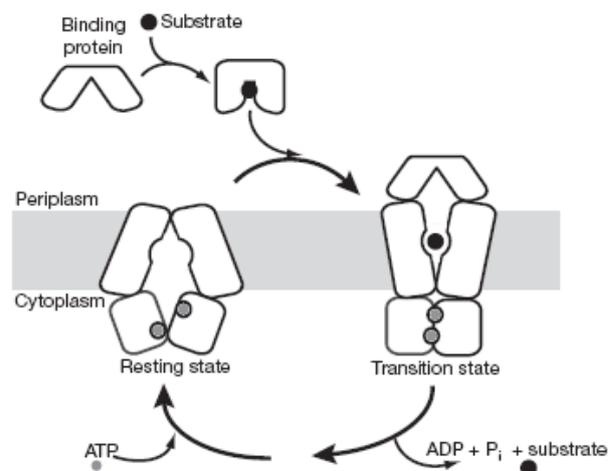
In Bakterien werden die Substrate (z.B. Ionen, Aminosäuren, Zucker, Lipiden, Oligosacchariden, Antibiotika) entweder in Zellen oder Organellen hinein (Import) oder aus diesen heraus (Export) befördert, wie zahlreiche Stoffwechselprodukte. Zu diesen zählen beispielsweise toxische Stoffe und Virulenzfaktoren pathogener Bakterien. Zudem werden Signalsubstanzen für die Kommunikation mit benachbarten Zellen in das umgebende Medium sekretiert, wie auch Antibiotika, die diesen Bakterien eine Resistenz verleihen (Schneider, 2000). Ein funktionaler prokaryotischer ABC-Transporter ist meist als Tetramer aufgebaut und kann sowohl aus diesen vier Untereinheiten, als auch aus zwei Homodimeren oder aus einer Mischung aus Homo- und Heterodimeren bestehen. Dagegen fungieren sämtliche eukaryotische ABC-Transporter als Exporter und sind in der Regel dimerisch zusammengesetzt; nur im Menschen sind sie meist Monomere, die aus ebenfalls insgesamt vier Untereinheiten aufgebaut sind (Davidson & Chen, 2004, Davidson *et al.*, 2008, Schneider, 2000).

ABC-Transporter sind von großem Interesse, da sie beispielsweise in Antibiotikaresistenzen von pathogenen Bakterien, in Herbizidresistenzen bei Pflanzen und humanen Krankheitsprozessen involviert sind (Di Giulio, 2007, Gottesman & Ambudkar, 2001, Yuan *et al.*, 2007). Das wohl bekannteste Beispiel einer Stoffwechselkrankheit ist die zystische Fibrose, die durch die Mutation eines humanen Gens, das den Chlorid-Ionenkanal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) kodiert, verursacht wird (Guggino & Stanton, 2006, Rowe *et al.*, 2005). Im Rahmen der Krebstherapie verleiht der ABC-Transporter MDR1 (*multiple drug resistance*) Krebszellen mit starker MDR-Expression eine erhöhte Toleranz gegenüber Cytostatika (Mizutani *et al.*, 2008).

Eine wichtige Untergruppe der ABC-Transporter bilden die Substratbindeprotein-abhängigen ABC-Transporter. Diese sind nur in Bakterien und Archaeen vertreten, nicht aber in Eukaryoten. Die Substratbindeproteine binden ihr Substrat spezifisch und mit hoher Affinität. Einer der am besten funktional charakterisierten ABC-Transporter ist der Maltose-spezifische ABC-Transporter aus *E. coli*, der im Komplex mit dem Maltosebindeprotein, Maltose und ATP kristallisiert werden konnte (Oldham *et al.*, 2007). Auch die Kristallstruktur eines archaealen Bindeprotein-abhängigen Molybdän-ABC-Transporter-Komplexes von *Archaeoglobus fulgidus* konnte gelöst werden (Hollenstein *et al.*, 2007). Beide Kristallstrukturen geben einen Einblick in die Architektur Substratbindeprotein-abhängiger ABC-Transporter und ermöglichten ein Modell zur Funktionsweise von ABC-Importsystemen daraus abzuleiten (siehe Abb. 4; (Oldham *et al.*, 2007)).

Abb. 4: Modell zur Aufnahme von Substraten durch ABC-Transportsysteme (Oldham *et al.*, 2007).

Das *resting state*-Modell basiert auf den Kristallstrukturen der ABC-Transporter ModB₂C₂A (Hollenstein *et al.*, 2007) und HI1470 (Pinkett *et al.*, 2007), das *transition state*-Modell auf der Struktur des Maltosetransporters aus *E. coli* (Oldham *et al.*, 2007).



Zu der Gruppe der Substratbindeprotein-abhängigen ABC-Transporter gehören auch die beiden bakteriellen phosphatabhängigen ABC-Transporter Pst und Ugp. Umfassend beschrieben wurde das Pst-System für *Escherichia coli* (Aguena *et al.*, 2002, Rao & Torriani, 1990, Wanner, 1996), *Bacillus subtilis* (Allenby *et al.*, 2004, Qi *et al.*, 1997) und *Sinorhizobium meliloti* (Yuan *et al.*, 2006), aber auch in *Pseudomonas aeruginosa* (Nikata *et al.*, 1996), *Mycobacterium tuberculosis* (Braibant *et al.*, 1996), *Streptococcus pneumoniae* (Novak *et al.*, 1999), *Clostridium acetobutylicum* (Fischer *et al.*, 2006) und *Campylobacter jejuni* (Wosten *et al.*, 2006). Einige Bakterien wie *E. coli* oder *Salmonella typhimurium* besitzen auch das Ugp-System (Argast & Boos, 1980, Hengge *et al.*, 1983).

Die einzelnen Komponenten dieser ABC-Transportsysteme sind in Abb. 5A dargestellt.

Die gezeigte Topologie ist repräsentativ für die meisten Pst- bzw. Ugp-Transporter in Bakterien und Archaeen. In *E. coli* bestehen sie aus folgenden Bausteinen: ein periplasmatisches Bindeprotein für P_i bzw. für G3P und Glycerinphosphodiester (PstS bzw. UgpB), zwei integrale innere Membranproteine, welche die Permease bilden (PstA und PstC bzw. UgpA und UgpE) und ATP-Bindeproteine (PstB bzw. UgpC) (siehe Abb. 5A). Analog zu anderen ABC-Transportern ist das ATP-Bindeprotein ein Dimer (Chan & Torriani, 1996). Sowohl das *pst*- als auch *ugp*-Operon in *E. coli* setzen sich aus 5 Genen zusammen (siehe Abb. 5B) (Overduin *et al.*, 1988, Steed & Wanner, 1993).

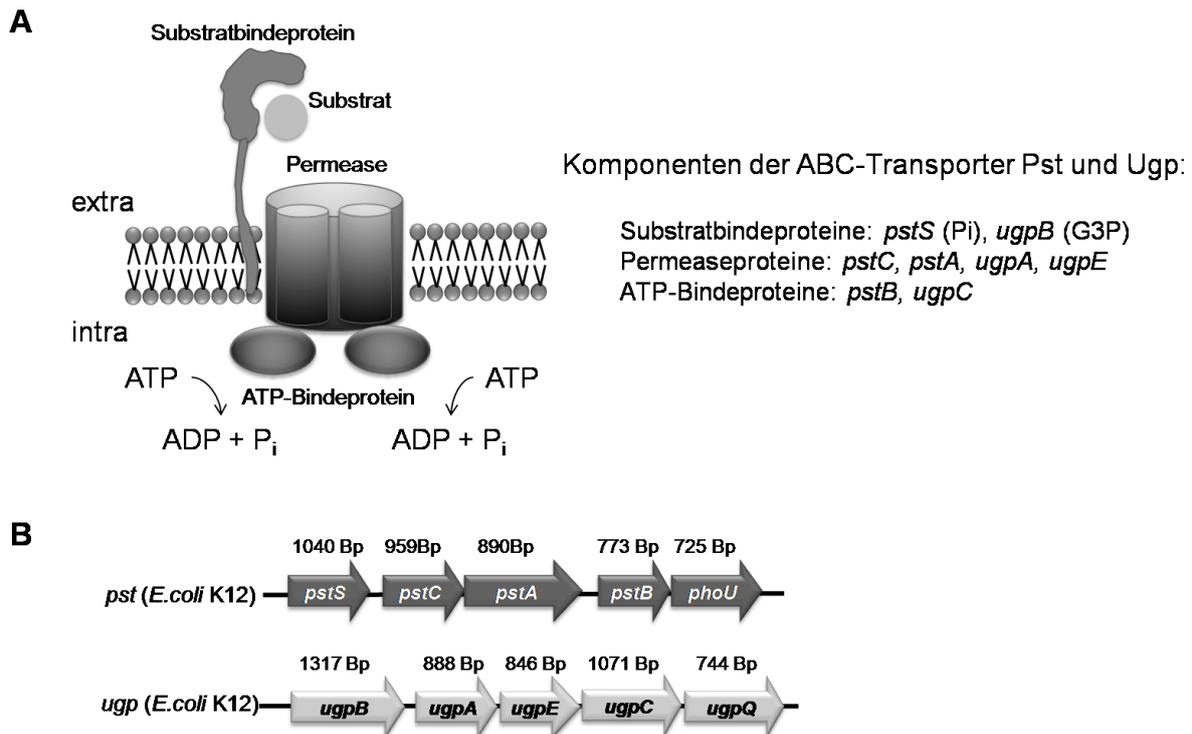


Abb. 5: Die Komponenten der ABC-Transporter Pst und Ugp (A) sowie die zugehörigen Operons *pst* und *ugp* (B) in *E. coli*. Pi = anorganisches Phosphat; G3P = Glycerin-3-phosphat.

Die Gene *pstS*, *pstC*, *pstA* und *pstB* sowie *ugpB*, *ugpA*, *ugpE* und *ugpC* kodieren für die oben genannten Bausteine der Transporter. Es wurde gezeigt, dass Mutationen in einem der *pst*-Gene die P_i-Aufnahme unter P_i-Mangelbedingungen unterbrechen (Cox *et al.*, 1981, Willsky *et al.*, 1973). Das letzte Gen im *pst*-Operon, das *phoU*, wird zur Repression des PHO-Regulons benötigt und scheint an der Regulation der *psi*-Gene beteiligt zu sein. Für den Phosphattransport spielt PhoU jedoch keine Rolle (Steed & Wanner, 1993). Eine weitere kürzlich gefundene Funktion von PhoU in *E. coli* ist die Modulierung der Aktivität des *pst*-Operons (Rice *et al.*, 2009).

Die Promotorsequenz des *pstSCAB-phoU*-Operons liegt stromaufwärts des *pstS*-Gens und das Operon wird als polycistronische Einheit transkribiert. Es wird vermutet, dass die instabile *pst*-mRNA kurz nach ihrer Synthese an definierten Schnittstellen von Endonukleasen in kleinere Fragmente geschnitten wird (Aguena & Spira, 2009, Aguena *et al.*, 2002).

Der Promotorbereich des *pst*-Operons in *E. coli* besitzt zwei PHO-Boxen an die der Antwortregulator PhoB bindet (Makino *et al.*, 1988) (siehe Abb. 2).

Die Proteine des Phosphattransporters Pst in *B. subtilis* sind homolog zu denen in *E. coli* (Takemaru *et al.*, 1996). Das Transportsystem besteht auch hier aus 4 Protein-Bausteinen, welche vom *pstSCAB₁B₂*-Operon kodiert werden. Das *pst*-Operon in *B. subtilis* enthält kein *phoU*-Gen. Es wurde gezeigt, dass Mutationen in den einzelnen *pst*-Genen die hoch-affine

P_i-Aufnahme drastisch senken und somit jeder Baustein des Pst-Systems für seine Funktionsfähigkeit entscheidend ist. Das Operon ist ein Teil des PHO-Regulons und wird durch das Zweikomponentensystem PhoP-PhoR reguliert (Hulett, 1995, Hulett, 1996, Hulett *et al.*, 1994). Die Bindungsstellen des PhoB (*E. coli*) und PhoP (*B. subtilis*) in den Promotorregionen sind strukturell ähnlich. In beiden Bakterien werden direkte Wiederholungen (*direct repeats*) von nicht konservierten Nukleotidsequenzen getrennt, jedoch unterscheiden sie sich in der Anzahl, Zusammensetzung und Entfernung dieser Wiederholungen (Liu & Hulett, 1997, Liu & Hulett, 1998). Die Promotorsequenz des *pstSCAB₁B₂*-Operons liegt stromaufwärts des *pstS*-Gens und das Operon wird als polycistronische Einheit transkribiert (Qi *et al.*, 1997).

B. subtilis besitzt kein *ugp*-Operon, jedoch ein dem letzten Gen (*ugpQ*) im *ugp*-Operon von *E. coli* (siehe Abb. 5B) homologes Gen (*glpQ*). Dieses kodiert auch für eine Phosphodiesterase, die Glycerinphosphodiester zu G3P hydrolysiert und ist Teil des PHO-Regulons in *B. subtilis* (Antelmann *et al.*, 2000, Brzoska & Boos, 1988). Für den G3P-Transport in *E. coli* sind nur die ersten 4 Gene des *ugp*-Operons entscheidend, das letzte Gen, *ugpQ*, ist für den Transport unwichtig (Brzoska & Boos, 1988, Tommassen *et al.*, 1991).

Die Proteine des *ugp*-Operons haben keine regulativen Effekte auf das PHO-Regulon (Brzoska *et al.*, 1994). Der *upgB*-Promotor besitzt 3 PHO-Boxen an die der Antwortregulator PhoB bindet (Makino *et al.*, 1988) (Abb. 2).

Auch die Genome von mehreren Archaeen kodieren Gene des *pst*- und *ugp*-Operons (www.halolex.mpg.de). Trotz der Existenz dieser Transporter in Archaeen, wurde bis heute ihre Funktion oder Regulation in der Literatur nicht beschrieben. Nur am Rande wird über den Pst-Transporter in dem Euryarchaeoten *Methanosarcina mazei* Gö1 berichtet, dass die Transkription des *pst*-Operons durch Salzstress induziert wird (Pfluger *et al.*, 2007). Die Existenz eines *pst*-Operons wird zudem in *Pyrococcus abyssi* beschrieben (Cohen *et al.*, 2003) und in *Methanobacterium thermoautotrophicum* lediglich vermutet (Krueger *et al.*, 1986). In *H. salinarum*, das im Genom zwei Kopien des *pst*-Operons besitzt, wurde gezeigt, dass die *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Gencluster unter Phosphatstress induziert werden (Wende *et al.*, 2009). Genauere Untersuchungen des *pst*-Operons und dem Pst-Proteinkomplex in Archaeen wurden bisher jedoch nicht durchgeführt.

Neben den ABC-Transportern entwickelten Organismen im Laufe der Evolution noch andere Transportsysteme für die Aufnahme von anorganischem Phosphat aus ihrer Umgebung.

Bekannte Phosphattransporter aus Eukaryoten sind beispielsweise in *S. cerevisiae* die H⁺- bzw. Na⁺-gekoppelten hoch-affinen Co-Transporter Pho84p und Pho89p, sowie die

niedrig-affinen Permeasen Pho87p, Pho90p und Pho91p. Auch in Pflanzen sind sowohl hoch- als auch niedrig-affine Transportsysteme bekannt (Chen *et al.*, 2008). Pflanzliche Phosphattransporter werden in drei Familien klassifiziert: Pht1, Pht2 und Pht3. Die Mehrzahl tritt in den Wurzeln auf und gehört der Pht1-Familie an, die homologe Regionen der H⁺/P_i-Symporter Pho84p aus Hefe aufweist (Bucher, 2007).

Im Genom von *H. salinarum* finden sich mehrere Gene, die aufgrund ihrer Homologie zu bekannten Transportsystemen aus Bakterien (van Veen, 1997) Transporter für die P_i-Aufnahme darstellen könnten. Neben den ABC-Transportern Pst1 und Pst2, sind auch die Gene *phoT2* und *phoT3* für putative Phosphattransporter vorhanden. Desweiteren kodiert *OE4236F* einen mutmaßlichen Phosphattransporter und *OE2113R* vermutlich eine Phosphat-Permease. Darüber hinaus sind Gene für den ABC-Transporter Phn (*phnDCE*) vorhanden. In *E. coli* werden durch Phn Phosphonate, in *Mycobacterium smegmatis* jedoch nur anorganisches Phosphat transportiert (Gebhard *et al.*, 2006, Metcalf & Wanner, 1991).

Neben dem Phosphat-spezifischen Pst-Transportsystem besitzen einige Bakterien einen Pit (*inorganic phosphate transport*) Transporter, der ein H⁺/P_i-Symportsystem ist und in *E. coli* konstitutiv exprimiert wird (Bennett & Malamy, 1970, Medveczky & Rosenberg, 1971, Willsky *et al.*, 1973). Pit hat eine relativ geringe Substratspezifität mit einem K_M-Wert von etwa 25 µM für P_i, während das Pst-System eine 100-fache höhere P_i-Affinität aufweist (K_M = 0,25 µM P_i) (Rosenberg *et al.*, 1977, Silver *et al.*, 1981, Willsky & Malamy, 1980a, Willsky & Malamy, 1980b). Anorganisches Phosphat kann in *E. coli* auch durch die Transportsysteme GlpT bzw. UhpT, welche spezifisch für Glycerin-3-phosphat bzw. Glucose-6-phosphat sind, aufgenommen werden (van Veen, 1997).

Im Genom von *H. salinarum* sind keine homologen Gene für die Transportsysteme Pit, GlpT oder UhpT vorhanden.

1.3 Einführung in das halophile Archaeon *Halobacterium salinarum*

Die Einteilung von Mikroorganismen in ein Reich der Archaea besteht erst seit etwa 30 Jahren. Zuvor wurden Bakterien und Archaeabakterien als Prokaryoten zusammengefasst. Moderne Methoden der Mikro- und Molekularbiologie, hauptsächlich Analysen der 16S rRNA (Woese & Fox, 1977), zeigten, dass die Archaeen, die früher als Archaeabakterien bezeichnet wurden, neben den Eukaryoten (Pflanzen, Tiere und Pilze) und *echten* Bakterien einen der drei Hauptäste (Abb. 6A) des phylogenetischen Stammbaums darstellen (Woese *et al.*, 1990).

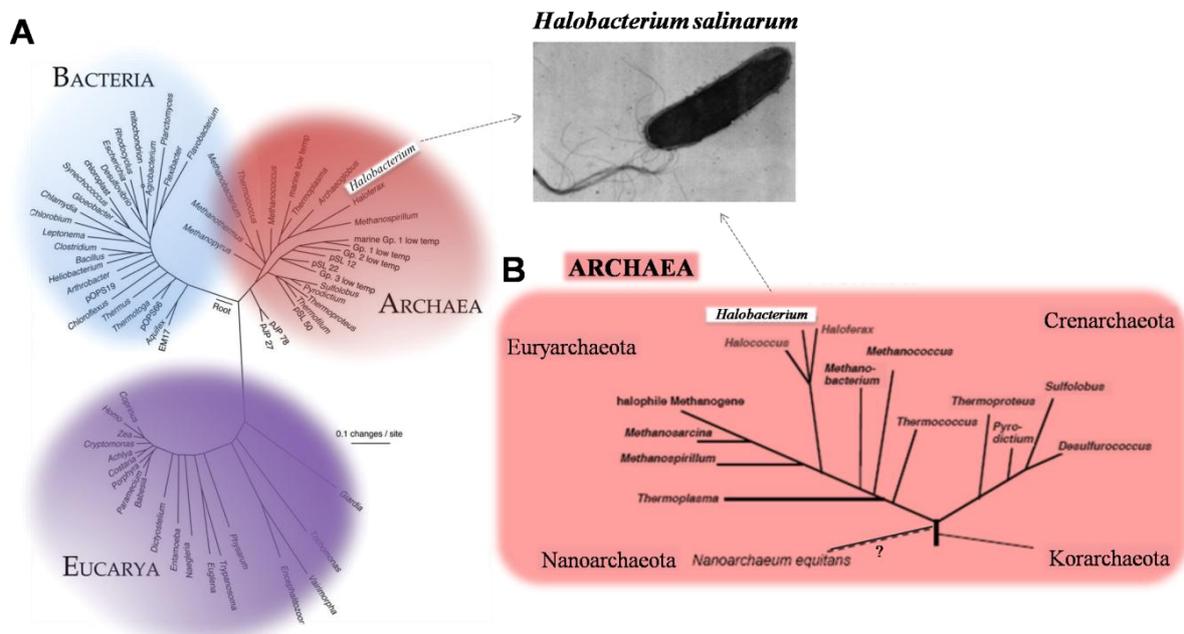


Abb. 6: Phylogenetischer Stammbaum der Lebewesen.

Die Einteilung der Lebewesen in Bacteria, Eucarya und Archaea wurde nach (Woese *et al.*, 1990) modifiziert (A). Phylogenetischer Stammbaum der Archaea (B). *Halobacterium salinarum* gehört zu den halophilen Archaea, die den Crenarchaeota zugeordnet werden (Woese, 2000). Die Abzweigung der Nanoarchaeota im Stammbaum ist unsicher und daher mit einem Fragezeichen versehen. Die elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. salinarum* ist mit einer 13.500-fachen Vergrößerung dargestellt (Quelle: www.biochem.mpg.de/oesterhelt).

Archaeen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von Bakterien. Sie weisen einige eukaryotische Merkmale auf und stehen im Stammbaum den Eukaryoten etwas näher. Ihre Abzweigung im phylogenetischen Stammbaum der Lebewesen liegt LUCA (*last universal common ancestor*), dem hypothetischen Urahn aller Lebewesen am Nächsten. Diese Hypothese wird durch die Tatsache bestärkt, dass auch in der heutigen Zeit noch viele

Archaeen unter Bedingungen leben, die denen auf der Erde am Beginn des Lebens gleichen könnten. Diese Bedingungen werden von den Organismen nicht nur toleriert, sondern sogar gebraucht, um optimal wachsen oder sogar überleben zu können. Einige Archaeen leben beispielsweise bei extrem hohen pH-Werten von 12 (Jones *et al.*, 1989) oder niedrigen bis unter null (Schleper *et al.*, 1995), bei Salzgehalten um die Sättigungskonzentration (Oren, 1994) oder bei Temperaturen um den Siedepunkt (Kashefi & Lovley, 2003). Ausgehend von einer neuen Studie war LUCA jedoch ein mesophiler Organismus aus dem sich erst später thermophile Organismen entwickelten (Boussau *et al.*, 2008). Allerdings leben Archaeen auch nicht nur unter extremen Bedingungen sondern sind ubiquitär vertreten (DeLong, 1992, DeLong & Pace, 2001, Fuhrman *et al.*, 1992).

Die ribosomale RNA der Archaeen ist der der Eukaryoten verwandtschaftlich näher als die der Bakterien. Desweiteren ähneln archaeale DNA-abhängige RNA-Polymerasen in ihrer DNA-Sequenz mehr den RNA-Polymerasen II der Eukaryoten als denen der einfacher aufgebauten Bakterien (Zillig *et al.*, 1988). Neben dem Transkriptionsapparat sind die Promotororganisation und Bereiche der Proteinsynthese der Archaeen homolog zu denen der Eukaryoten, obwohl sie eine ähnliche Stoffwechselvielfalt wie die Bakterien aufweisen und viele Gene in polycistronischen Operons organisiert sind. Morphologisch ähneln Archaeen den Bakterien. Sie sind genauso einzellig, kernlos und mikroskopisch klein. Die Archaeen bilden jedoch ein eigenes Reich, da ihre Lipide Phytanylether des Glycerins und nicht Fettsäureester wie bei Bakterien und Eukaryoten enthalten (Langworthy & Pond, 1986). Desweiteren ist ihre Zellwand aus einem S-Layer aus Glykoprotein aufgebaut und nicht aus Peptidoglykan (Konig, 1988).

Halobacterium salinarum (früher *H. halobium*) gehört zu den halophilen Archaeen, die zusammen mit einigen thermophilen Vertretern und den Methanogenen den Seitenzweig der Euryarchaeota bilden (siehe Abb. 6B). Zusammen mit den Crenarchaeota, welche zum Teil schwefelabhängig und hauptsächlich thermophil sind, sowie den noch wenig erforschten Korarchaeota und Nanoarchaeota bilden sie eine dritte Domäne im phylogenetischen Stammbaum der Lebewesen (Woese, 2000). Die Isolate der Korarchaeota konnten bisher nicht kultiviert werden, daher sind sie nur von 16S rRNA-Studien bekannt (Barns *et al.*, 1996, Reysenbach *et al.*, 2000). Von den Nanoarchaeota, deren Einteilung im Stammbaum der Lebewesen noch diskutiert wird (Brochier *et al.*, 2005, Di Giulio, 2007, Waters *et al.*, 2003), ist bisher nur *Nanoarchaeum equitans* als einziger Organismus bekannt (Huber *et al.*, 2002). Dieser ist eine kleine auf der Oberfläche von *Ignicoccus* sp. symbiotisch wachsende Zelle, die

keinen eigenen Stoffwechsel betreibt, aber alle Gene zur Zellteilung und Proteinbiosynthese besitzt.

Taxonomisch gesehen bilden halophile Archaeen die Klasse der Halobacteria, die Ordnung der Halobacteriales und die Familie der Halobacteriaceae. Dazu gehören 18 Gattungen mit insgesamt 50 Arten, von denen eine *Halobacterium salinarum* ist (Garrity, 2004, Grant, 1989, Kamekura, 1998, Ventosa & Oren, 1996). Extrem halophile Archaeen sind salzliebende Mikroorganismen, deren Wachstumsoptimum bei einer Salzkonzentration von 3,5 bis 4,5 M NaCl liegt, die aber auch in einer gesättigten Lösung mit 5,2 M NaCl noch wachsen können (Grant, 1989). Solch hohe Salzkonzentrationen kommen im Toten Meer, in Salinen und in hypersalinen Seen auf allen Kontinenten dieser Welt vor (Dundas, 1977). Die Ionenkonzentrationen in diesen verdunsteten Meeresgewässern können je nach dem Gestein in der Umgebung sehr variieren. Die vorherrschenden Kationen sind Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} , die vorherrschenden Anionen Cl^- , SO_4^{2-} und CO_3^{2-} (Rodriguez-Valera, 1993, Sehgal & Gibbons, 1960) Das Überleben in diesen hypersalinen Habitaten kann nur gewährleistet werden, wenn dem drohenden Wasserverlust durch die hohe äußere Salzkonzentration entgegen gewirkt wird. Grundsätzlich gibt es zwei Strategien, die zur Anpassung an sehr hohe Salzkonzentrationen der Umgebung bekannt sind.

Die erste Strategie, die *compatible solute*-Strategie genannt wird, ist die Herstellung oder Speicherung von niedermolekularen Verbindungen mit einem osmotischen Potential, sogenannte kompatible Solute. Diese Osmolyte sind z.B. Glycin-Betain, Ektoin, Glycerin oder verschiedene Zucker und ihre Derivate, die entweder von den Zellen synthetisiert oder aufgenommen werden (Martin, 1999). Der Vorteil ist, dass kompatible Osmolyte noch in hohen Konzentrationen in Wasser löslich sind und ungeladen oder als Zwitterionen vorliegen. Die Osmolyte interferieren somit auch bei hohen cytoplasmatischen Konzentrationen nicht mit dem Zellstoffwechsel.

Die zweite Strategie, die sogenannte *salt-in*-Strategie, ist die Kompensation durch eine ähnlich hohe Natrium- bzw. Kaliumchloridkonzentration im Cytosol, um den osmotischen Druck des Mediums auszugleichen (Dennis & Shimmin, 1997, Kushner, 1988). Vor allem halophile Archaeen wie *Halobacterium salinarum* verfolgen diese *salt-in*-Strategie, welche bei den meisten anderen Organismen zu einer Denaturierung der Proteine führen würde (Dym *et al.*, 1995, Lanyi, 1974). Proteine halophiler Archaeen haben aus diesem Grund einen extrem niedrigen isoelektrischen Punkt, der im Durchschnitt bei 4,7 liegt. Ihre Außenseite ist dicht mit sauren Aminosäuren besetzt, was den Proteinen erlaubt mit Hilfe der Wasserbindenden Carboxylgruppen in Lösung zu bleiben. *H. salinarum* enthält 4 M KCl und 1 M

NaCl, wobei das KCl meist in freier Form vorliegt (Grant, 1989, Shporer & Civan, 1977). *H. salinarum* ist in der Lage, Cl⁻-Ionen aktiv über das Retinalprotein Halorhodopsin ins Zellinnere aufzunehmen (Schobert & Lanyi, 1982). Der aktive Anionentransport in die Zelle wird durch einen passiven Einstrom von bevorzugt K⁺-Ionen kompensiert. Bei halophilen Archaeen kommt es zur osmotischen Lyse der Zellen, wenn diese in Niedrigsalz gelangen oder es zum Verlust der bivalenten Kationen (Mg²⁺, Ca²⁺) kommt (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971).

Halophile Archaeen sind in der Lage verschiedene Möglichkeiten zur Energiegewinnung zu nutzen. Außer der oxidativen Phosphorylierung können sie anstelle von Sauerstoff auch Nitrat, Fumarat, Dimethylsulfoxid oder Trimethylaminoxid als terminale Elektronenakzeptoren einsetzen, wenn anaerobe Bedingungen herrschen. Diese entstehen wegen der geringen Löslichkeit von Sauerstoff in Gewässern mit hoher Salzkonzentration und hohen Temperaturen. Weiter können sie ATP durch Fermentation von Arginin produzieren (Hartmann *et al.*, 1980). *Halobacterium salinarum* nutzt außerdem die Energiegewinnung aus Sonnenlicht durch einen retinalabhängigen Photosyntheseprozess, in dem das membranständige Protein Bakteriorhodopsin (BR) als lichtgetriebene Protonenpumpe fungiert (Oesterhelt & Stoeckenius, 1973).

Das Genom von *Halobacterium salinarum* R1 (DSM671) mit 2,67 Mbp wurde sequenziert und annotiert ((Pfeiffer *et al.*, 2008); www.halolex.mpg.de). Es setzt sich aus einem Chromosom (2 Mbp) und 4 Megaplasmiden von 40, 147, 194 und 284 kbp zusammen. Das Chromosom weist nahezu 100 % Sequenzidentität zum Chromosom von *H. salinarum* NRC-1 auf (Ng *et al.*, 2000). Ein Unterschied ist in der Gen-Annotation, d.h. in der Festlegung der Leserahmen (ORFs = *open reading frames*), zu finden. Außergewöhnlich sind ein starker Dinukleotid-Bias (CG>GC; TA<AT), ein 68 %iger GC-Gehalt und die geringe Anzahl von Stopcodons, was zu einer hohen Anzahl an Leserahmen führt. Doch nur 2878 von 9395 identifizierten ORFs werden für tatsächlich exprimierte Proteine gehalten (Pfeiffer *et al.*, 2008).

1.4 Phosphat-Taxis

Die gerichtete Bewegung eines Organismus in Richtung eines attraktiven Stoffes, oder von einem abschreckenden Stoff weg, wird als Chemotaxis bezeichnet.

Eine phosphatgerichtete Chemotaxis (Phosphat-Taxis) in Bakterien wurde bisher nur in *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* und *Enterobacter cloacae* beschrieben und findet erst unter Phosphatmangelbedingungen statt (Kato *et al.*, 1992, Kusaka *et al.*, 1997, Wu *et al.*, 1999). Der phosphatspezifische ABC-Transporter Pst spielt dabei in allen drei Bakterien eine wichtige Rolle. Der Pst-Transporter von *P. aeruginosa* und *P. putida* hat einen repressiven Effekt auf die Phosphat-Taxis ausschließlich unter phosphatgesättigten Bedingungen, wobei die Gene *phoU* und *pstB* essentiell für die Repression der Phosphat-Taxis in *P. aeruginosa* sind. Damit im Einklang hebt die Deletion der Gene des Pst-Transporters die Repression der Phosphat-Taxis unter phosphatgesättigten Bedingungen auf (Kato *et al.*, 1994, Nikata *et al.*, 1996, Wu *et al.*, 1999).

Konträr dazu zeigte *E. cloacae* bei Mutation des *pst*-Operons keine Phosphat-Taxis mehr und es stellte sich heraus, dass die Gene *pstA* und *pstB* essentiell für die Phosphat-Taxis sind (Kusaka *et al.*, 1997). Bei *E. cloacae* konnte bisher kein chemotaktischer Transducer, MCP (*methyl accepting chemotaxis protein*), für Phosphat identifiziert werden. Es wird vermutet, dass das Pst-System in *E. cloacae* eine positive Kontrolle auf die Phosphat-Taxis hat und einen bisher nicht identifizierten P_i -Chemorezeptor aktivieren könnte. Denkbar wäre aber auch, dass das Pst-System ein MCP-unabhängiges chemotaktisches Signal auslöst wie z.B. beim Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphattransferase System (PTS) in *E. coli* (Lux *et al.*, 1995, Lux *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu *E. cloacae* konnten bei *P. aeruginosa* zwei MCPs für P_i identifiziert werden, von denen CtpH konstitutiv exprimiert und CtpL unter Phosphatmangel induziert wird. CtpH kann 5 mM und höhere Phosphatkonzentrationen detektieren, das mit dem PHO-Regulon involvierte CtpL hingegen reagiert auf Phosphatquellen von 10-100 μ M (Wu *et al.*, 2000). Das Pst-Transportsystem in *P. aeruginosa* scheint eine negative Kontrolle auf die Phosphatdetektion durch CtpH unter hohen Phosphatbedingungen auf posttranskriptioneller Ebene zu haben. Im Gegensatz dazu ist das Pst-System unter phosphatlimitierten Bedingungen für die P_i -Detektion durch CtpL essentiell (Wu *et al.*, 2000).

Auch *H. salinarum* ist zu einer phosphatgerichteten Chemotaxis fähig (Wende, 2006). Zur Fortbewegung besitzt *H. salinarum* von einem Flagellarmotor angetriebene Flagellen, wie auch andere Archaeen und viele Bakterien. Vor Kurzem wurde gezeigt, dass die Rotation des

Flagellarmotors in *H. salinarum* ATP-abhängig ist (Streif *et al.*, 2008). Zur Vorwärtsbewegung drehen sich die rechtsgedrehten helikalen Flagellarfilamente im Uhrzeigersinn (CW, *clockwise*), zur Rückwärtsbewegung drehen sie sich gegen den Uhrzeigersinn (CCW, *counterclockwise*) (Alam & Oesterhelt, 1984). Wenn kein äußerer Reiz vorhanden ist, wird die Schwimmrichtung spontan alle 10 - 20 Sekunden geändert. Bei der Photo- und Chemotaxis, bei der ein äußerer Reiz wahrgenommen wird, ändert sich der zeitliche Abstand der Drehrichtungsänderung entsprechend. An der Chemotaxis in *H. salinarum* sind mehrere Proteine beteiligt und das Prinzip ähnelt dem vieler Bakterien (Szurmant & Ordal, 2004, Wadhams & Armitage, 2004). Der chemische Reiz wird direkt von den halobakteriellen Transducern (Htrs, *halobacterial transducer proteins*) oder von zugehörigen Bindeproteinen detektiert. Htrs sind strukturell und funktionell stark homolog zu den analogen bakteriellen Systemen, den MCPs (Rudolph *et al.*, 1995). Die Signalverarbeitung verläuft über ein Zweikomponentensystem, mit dem der aktivierte Htr interagiert. Das Zweikomponentensystem besteht aus der Histidinkinase CheA und dem Antwortregulator CheY, der von ersterer phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Daraufhin bindet CheY auf bisher ungeklärte Weise an den halobakteriellen Flagellarmotor und beeinflusst dadurch die Frequenz der Drehrichtungsänderung. Durch diese Signalkette ist *H. salinarum* in der Lage, sich stets den Umweltbedingungen entsprechend in optimaler Position aufzuhalten (Rudolph & Oesterhelt, 1995).

Untersucht wurde die phosphatgerichtete Chemotaxis in *H. salinarum* mit verschiedenen Phosphatquellen wie Natriumphosphat, Glycerin-3-phosphat, Glucose-1-phosphat und Glucose-6-phosphat (Wende, 2006). Bei Zellen, die in phosphatgesättigtem Medium vorkultiviert wurden, konnte keine Taxis beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die vor dem Versuch einem Phosphatmangel ausgesetzt waren, eine deutliche Reaktion. Der Auslöser der Phosphat-Taxis ist P_i , wie Untersuchungen des Δaph -Stamms, dem die Alkalische Phosphatase fehlt, zeigten. Eine Untersuchung des $\Delta cheY$ -Stamms zeigte, dass die Phosphat-Taxis in *H. salinarum* analog zu *P. aeruginosa* und *E. cloacae* über den Antwortregulator CheY verläuft (Wende, 2006). Desweiteren konnte beobachtet werden, dass sich *H. salinarum*-Zellen innerhalb eines Phosphatgradienten konstant im Konzentrationsbereich von 100 – 200 μM aufhalten (Wende, 2006).

1.5 Umsetzung der genetischen Information in Archaeen

Die Leserahmen (ORFs), die für funktionale Proteine kodieren, werden in dieser Arbeit als Gene bezeichnet. Archaeale Gene können sowohl in mono- als auch in polycistronischen Operons vorliegen, was bedeutet, dass ein Operon aus einem Gen oder aus mehreren Genen bestehen kann. Demgegenüber bilden eukaryotische Gene immer eine monocistronische Einheit, während bakterielle Gene bevorzugt in polycistronischen Operons organisiert sind.

Mehrere nahe beieinander liegende Gene, die in dieselbe Richtung orientiert auf dem Chromosom angeordnet sind, werden in vorliegender Arbeit als Gencluster bezeichnet. Als Operon werden sie dann bezeichnet, wenn sie auch eine transkriptionelle Einheit bilden, also von einem gemeinsamen Promotor gesteuert zu einer einzigen mRNA (Transkript) transkribiert werden.

Ursprünglich implizierte der Begriff Operon auch eine gemeinsame Funktion der kodierten Proteine. In dieser Arbeit wird der Operonbegriff synonym zum eigentlichen Begriff der Transkriptionseinheit, dem Cistron, verwendet. Das Transkript reicht von Transkriptionsstart bis Transkriptionsstop und beinhaltet daher zusätzlich zu den Gensequenzen auch die nicht-kodierenden Sequenzen.

Die Transkriptionsstartstelle kann bei Archaeen entweder in der Nähe des Startcodons für die Translation liegen oder mehrere Nukleotide stromaufwärts davon. Somit kann das Transkript eine 5'-UTR (*untranslated region*) besitzen, die auch als *leader*-Sequenz bezeichnet wird. Dieser Sequenzbereich der mRNA wird nicht translatiert. Transkripte ohne *leader*-Sequenz sind in Archaeen jene, die entweder keine oder weniger als 10 Nukleotide in ihrem 5'UTR aufweisen (Brenneis *et al.*, 2007).

Der Promotor eines Operons enthält mehrere *cis*-aktive Elemente (Regulationssequenzen), die von verschiedenen *trans*-aktiven Faktoren (Regulationsproteinen) erkannt und gebunden werden. Ein haloarchaealer Promotor mit basalen *cis*-aktiven Regulationssequenzen hat eine Länge von etwa 40 bp (Brenneis *et al.*, 2007).

Die archaeale Transkription und Genregulation ist bei weitem noch nicht so gut verstanden, wie die der Pro- und Eukaryoten. Die Erkenntnisse beschränken sich im Wesentlichen auf den Bereich der Transkriptions-Initiation, die sich am Promotor abspielt (Bartlett, 2005, Bell *et al.*, 2001, Brenneis *et al.*, 2007, Geiduschek & Ouhammouch, 2005, Soppa, 2001).

1.5.1 Transkription in Archaeen

Der archaeale Transkriptionsapparat setzt sich aus sowohl bakteriellen als auch eukaryotischen Merkmalen zusammen. Die basale Transkriptionsmaschinerie der Archaeen ähnelt zwar der der Eukaryoten, ist jedoch nicht so komplex. Während die eukaryotische Transkriptionsinitiation von Protein-kodierenden Genen über 40 verschiedene Proteine benötigt, kommen Archaeen mit nur etwa 16 aus (Hickey *et al.*, 2002). Die Regulation der Transkription gleicht jedoch eher der von Bakterien (siehe nächstes Kapitel).

Archaea besitzen eine einzige DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNAP), deren 12 Untereinheiten ortholog zum Multienzymkomplex der eukaryotischen RNA-Polymerase II (RNAP II) sind (Werner & Weinzierl, 2002). *In vitro*-Studien mit RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren aus methanogenen bzw. hyperthermophilen Archaea zeigten, dass zur Initiation der archaealen Transkription bestimmte Initiationsfaktoren benötigt werden (Hausner & Thomm, 1993, Qureshi *et al.*, 1997). Diese Transkriptionsfaktoren sind Homologe zu dem eukaryotischen TATA-Box Bindeprotein (*tata binding protein* = TBP) und den Transkriptionsfaktoren TFIIB und TFIIE *alpha*, welche entsprechend als TBP, TFB und TFE bezeichnet werden (Qureshi *et al.*, 1997). Eine Vielzahl von Archaeen wie *Pyrococcus horikoshi* (Reeve *et al.*, 1997), *Haloferax volcanii* (Thompson *et al.*, 1999) und *Halobacterium* sp. NRC-1 (Baliga *et al.*, 2000, Ng *et al.*, 2000) sowie *H. salinarum* R1 (Pfeiffer *et al.*, 2008) besitzen mehrere *tbp*- und *tfb*-Gene. Die Anzahl der *tbp*-Kopien entspricht dabei nicht zwangsläufig der der *tfb*-Kopien, was zur Annahme führte, dass sich unterschiedliche TBP-TFB-Komplexe bilden, welche die Transkription an verschiedenen Promotoren steuern könnten, ähnlich wie bakterielle Sigmafaktoren (Baliga *et al.*, 2000, Facciotti *et al.*, 2007).

Der minimale, *in vitro* noch funktionsfähige Transkriptionsapparat der Archaeen besteht aus den Proteinen TBP, TFB und der RNAP (Bell *et al.*, 1998, Hethke *et al.*, 1996, Qureshi *et al.*, 1997). Obwohl das TFE in Archaeen nicht essentiell für die *in vitro*-Transkription ist, kann dieses bei suboptimaler Promotorerkennung durch TBP als schwacher Stimulator wirken (Bell *et al.*, 2001, Hanzelka *et al.*, 2001). TFE verdrängt *in vivo* eventuell Chromatinproteine von der TATA-Box oder erleichtert bzw. stabilisiert die Wechselwirkungen zwischen TBP und der TATA-Box (Bell *et al.*, 2001). Mit Hilfe von funktionalen und strukturellen Studien konnte gezeigt werden, dass TBP und TFB zwei nebeneinander liegende Sequenzen im Promotor erkennen. TBP bindet die TATA-Box und TFB erkennt das Transkriptionsfaktor B-Erkennungselement (*transcription factor B recognition element* = BRE-Element) (Bell *et al.*, 1999, Hausner *et al.*, 1996, Qureshi & Jackson, 1998). Verschiedene Konsensussequenzen für

die TATA-Box und das BRE-Element wurden für verschiedene *Archaea* festgelegt. Die meisten archaealen Promotorbereiche besitzen eine AT-reiche TATA-Box 25–30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes mit der sechs Nukleotiden langen Konsensussequenz (T/C)TTA(T/A)A (Hain *et al.*, 1992, Reiter *et al.*, 1990, Thomm & Wich, 1988). Neuere Studien grenzen die sich um die Position -26/-27 stromaufwärts des Initiationselements (*site of transcription initiation* = INR) zentrierende TATA-Box in Halophilen auf vier Nukleotide mit dem Konsensus TTWT¹ ein (Brenneis *et al.*, 2007). Direkt stromaufwärts der TATA-Box liegt um die Position -34 das Purin-reiche BRE-Element mit der archaealen Konsensussequenz RNWAAWN³ (Bell *et al.*, 1999, Soppa, 2001) bzw. in Halophilen CGAAA (Brenneis *et al.*, 2007). Das BRE-Element bestimmt die Stärke eines Promotors und sorgt für einen unidirektionalen Transkriptionsverlauf (Bell & Jackson, 1998, Littlefield *et al.*, 1999, Bell *et al.*, 1998).

Ein kürzlich gefundenes weiteres Motiv im Promotor mit dem Konsensus WW¹ ist bei -10/-11 positioniert. An dieses Motiv könnten TFB und RNAP binden (Brenneis *et al.*, 2007). Das nur sehr schwach konservierte Initiationselement (INR) bildet die Transkriptionsstartstelle ± 1 und besteht bei Archaeen aus einem Purin/Pyrimidin-Dinukleotidpaar (Hain *et al.*, 1992, Thomm, 2000).

In Abb. 7 ist die Initiation, Elongation und Termination der Transkription schematisch dargestellt. Für eine spezifische Promotor-abhängige Initiation der Transkription *in vitro* benötigt die RNAP nur 2 Transkriptionsfaktoren: TBP und TFB. Als erstes erkennt das TBP die TATA-Box und bindet daran (Hausner *et al.*, 1996, Kosa *et al.*, 1997, Rowlands *et al.*, 1994). Diese Bindung wird durch TFE erleichtert. Daraufhin bindet TFB den TBP-DNA-Komplex N-terminal und bildet am C-Terminus einen sequenzspezifischen Kontakt mit BRE aus (Qureshi & Jackson, 1998). Dieser TBP–TFB–DNA-Komplex ist an der Rekrutierung der RNAP beteiligt und bildet den Präinitiationskomplex (PIC). Zuletzt findet eine Konformationsänderung der RNAP und der Promotor-DNA statt, was die Initiation der Transkription durch RNAP ermöglicht.

³ R = Purin (A oder G); W = A oder T; N = beliebige Base

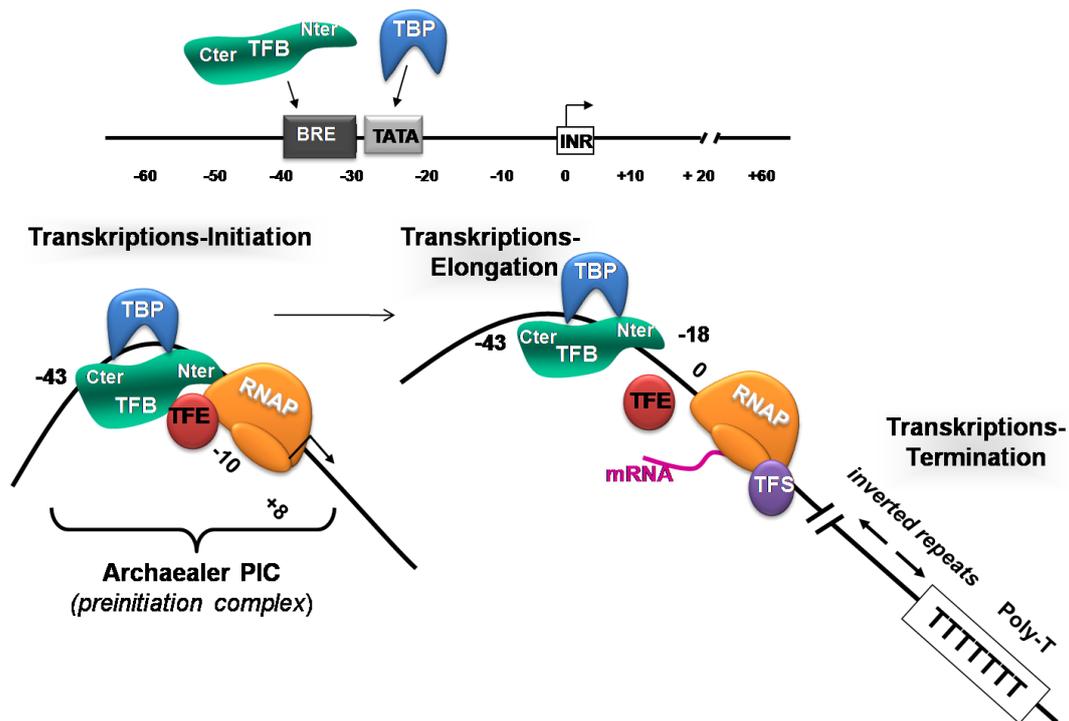


Abb. 7: Schematische Darstellung der basalen Transkription in Archaeen (modifiziert nach (Reeve, 2003).

BRE = Transkriptionsfaktor-B-Erkennungselement; INR = Initiationselement; TBP = TATA-Box Bindeprotein; TFB = Transkriptionsfaktor B; TFE = Transkriptionsfaktor E; TFS = Transkriptionsfaktor S; RNAP = RNA-Polymerase.

Im nächsten Schritt, der Elongation, wird die mRNA synthetisiert wobei der Transkriptionsfaktor S (TFS) eine Nukleaseaktivität in der RNAP induziert (Grunberg *et al.*, 2007, Hausner *et al.*, 2000). Weitere Eukaryoten-ähnliche Transkriptionsfaktoren konnten bisher nicht gefunden werden. Abschließend wird die Termination der Transkription durch *inverted repeat*-Motive und einen Poly-T-Abschnitt eingeleitet (Santangelo & Reeve, 2006, Thompson *et al.*, 1999). Die Mechanismen der archaealen Transkriptionstermination sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

1.5.2 Regulation archaealer Transkription

Während die basale archaeale Transkriptionsmaschinerie eine vereinfachte Version der eukaryotischen Elemente darstellt, scheint seine Aktivität hingegen häufiger von Bakterien-ähnlichen Faktoren kontrolliert zu werden (Bell *et al.*, 1999).

Die bakterielle Genregulation funktioniert wesentlich einfacher und ökonomischer als die eukaryotische. Als Beispiel sei das *lac*-Operon erwähnt, dessen Gene in einer einzigen Transkriptionseinheit organisiert sind und das von wenigen Aktivatoren und Repressoren reguliert wird. Dagegen werden eukaryotische Gene von einer großen Anzahl an Regulatoren mit vielen verschiedenen Regulationsmechanismen kontrolliert. Die regulatorischen Transkriptionsfaktoren der Eukaryoten besitzen meist verschiedene DNA-Bindedomänen wie Homeodomänen, Zinkfinger, basische *helix-loop-helix*-Proteine und basische *leucine-zipper*-Proteine. Bei den Bakterien tritt dagegen in der Regel nur das *helix-turn-helix*-Motiv auf (Pabo & Sauer, 1992).

Ein Beispiel eines archaealen Transkriptionsregulators ist MDR1 (*metal dependent repressor 1*) aus *Archaeoglobus fulgidus* (Bell *et al.*, 1999), der ein Homolog des bakteriellen Metall-abhängigen Transkriptionsrepressor DtxR (*diphtheria toxin repressor*) darstellt (Boyd *et al.*, 1990). MDR1 reprimiert die Transkription des *mdr*-Operons, welches neben dem eigenen Gen noch Gene für ein ABC-Transportsystem enthält. MDR1 bindet in Abhängigkeit von bestimmten Metallionen an das Initiationselement (INR), was die Rekrutierung der RNAP verhindert (Bell *et al.*, 1999). Die Bindung von MDR1 hat allerdings keinen Einfluss auf den TBP-TFB-DNA Komplex.

Weiter konnten mehrere archaeale Lrp-ähnliche Proteine charakterisiert werden. Sie sind Homologe des bakteriellen globalen Regulators Lrp (*leucine responsive regulatory protein*), der als Repressor wie auch als Aktivator fungieren kann (Brinkman *et al.*, 2003, Hickey *et al.*, 2002, Napoli *et al.*, 1999). Der autoregulatorische Repressor LrpA aus *Pyrococcus furiosus* inhibiert seine Transkription indem er wie MDR1 die Rekrutierung der RNAP verhindert (Brinkman *et al.*, 2000, Dahlke & Thomm, 2002). Weitere Lrp-ähnliche Proteine wurden in *Sulfolobus solfataricus* beschrieben. Zum einen der Aktivator LysM (Brinkman *et al.*, 2002) und zum anderen der negative Autoregulator Lrs14, der ein typisches *helix-turn-helix*-Motiv besitzt. Lrs14 bindet an den Promotor seines eigenen Gens und reprimiert dessen Transkription (Napoli *et al.*, 1999). Dies erreicht es im Gegensatz zu MDR1, indem es durch die Verdeckung der TATA-Box und des BRE-Elements die Bindung von TBP und TFB an den Promotor verhindert (Bell & Jackson, 2000).

Auch das Regulatorprotein TrmB (*transcription regulator of mal operon*) aus *Thermococcus litoralis* konkuriert mit TBP und/oder TFB um die TATA-Box und das BRE-Element eines Operons, welches für einen Trehalose/Maltose-ABC-Transporter kodiert. Der Transporter wird substratspezifisch gebildet, wobei durch die Bindung von Trehalose oder Maltose an TrmB dessen Interaktion mit dem Promotorbereich aufgehoben wird und die Transportergene exprimiert werden (Lee *et al.*, 2003).

Neben den bakterienähnlichen Transkriptionsregulatoren wurden in Archaeen auch einige Regulatoren des eukaryotischen Typs identifiziert. Das Aktivatorprotein Tfx in *Methanothermobacter thermautotrophicus* ist ein potentieller Regulator des *fmdECB*-Operons, vor dem direkt das *tfx*-Gen liegt (Hochheimer *et al.*, 1999). Das N-terminale HTH (*helix-turn-helix*)-Motiv des Aktivators Tfx bindet spezifisch eine Sequenz stromabwärts des Initiationselements (INR) des *fmdECB*-Promotors. Die Struktur des Regulators ähnelt einer Gruppe von eukaryotischen Transkriptionsregulatoren wie GAL4, p53 oder VP-16 (Nelson, 1995). Diese Struktur zeigen auch einige bakterielle Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise mehrere Antwortregulatoren aus regulatorischen Zweikomponentensystemen (Hakenbeck & Stock, 1996).

Weitere archaeale Transkriptionsaktivatoren sind zum einen das GvpE (Gasvesikelprotein E) aus *H. salinarum*, welches die Transkription von Gasvesikel-kodierenden Genen aktiviert. Das Protein weist strukturelle Ähnlichkeit mit eukaryotischen basischen *leucine-zipper*-Proteinen (*coiled-coil*) wie dem GCN4 in Hefe auf (Kruger *et al.*, 1998). Zum anderen bindet Bat (*bacterioopsin activator of transcription*), ein Redox-sensibler AraC-Typ-Aktivator mit C-terminalem HTH-Motiv aus *H. salinarum*, konservierte stromaufwärts der TATA-Box liegende Sequenzen (Aktivatorsequenz) der Gene des *bop* (*bacterioopsin*)-Clusters (Baliga *et al.*, 2001, Leong *et al.*, 1988). Bat aktiviert die Transkription des *bop*-Clusters, dessen Gene die Proteine der lichtgetriebenen Energiegewinnung über das Bakteriorhodopsin kodieren. *H. salinarum* ist in der Lage aus Lichtenergie einen Protonengradienten zu erzeugen, der von der ATP-Synthase zur ATP-Bildung genutzt wird (Michel & Oesterhelt, 1980). Erst kürzlich wurde in *H. salinarum* ein weiterer Regulator des *bop*-Gens identifiziert, das Brz, ein kleines Protein mit einem Zink-Finger-Motiv (Tarasov *et al.*, 2008). Mutationen des *brz*-Gens zeigten Einfluss auf die Transkription des *bop*-Gens, jedoch nicht auf die des *bat*-Gens.

Zum Schluss sei noch erwähnt, dass Archaeen Histone besitzen; diese Proteine haben bei Eukaryoten eine regulatorische Funktion (Reeve *et al.*, 1997).

1.5.3 Archaeale Transkripte und Mechanismen der Translationsinitiation

Transkripte (mRNAs), die nicht mit dem Startcodon beginnen, besitzen einen untranslatierten Abschnitt, der dem Startcodon vorgeschaltet ist, den 5'-UTR (*untranslated region*), der auch als *leader* bezeichnet wird. Eine wichtige Funktion dieses mRNA-Bereichs betrifft die Initiation der Translation.

Momentan sind vier verschiedene Mechanismen der Translationsinitiation aus Bakterien und Eukaryoten bekannt.

In Eukaryoten bindet der Präinitiationskomplex der Translationsinitiation, der sich aus der 40S ribosomalen Untereinheit, der Initiator-tRNA und verschiedenen Initiationsfaktoren zusammensetzt, die mRNA über die CAP-Struktur am 5'-Ende (Banerjee, 1980). Anschließend wird mit dem sogenannten *scanning*-Mechanismus das Startcodon gesucht. Dabei wandert das Ribosom auf der mRNA in 3'-Richtung entlang bis es das AUG gefunden hat (Kozak, 1978, Kozak, 1989). Momentan wird vermutet, dass 10 % der eukaryotischen Transkripte auch durch einen CAP-unabhängigen Mechanismus initiiert werden. Dabei könnte ein Mechanismus beteiligt sein, der durch Viren-RNA bekannt wurde. Die Ribosomen gelangen hier über Ribosomen-Eintrittstellen, sogenannte IRES (*internal ribosomal entry sites*), die sich in der 5'-UTR befinden an das Startcodon (Spriggs *et al.*, 2005, Spriggs *et al.*, 2008). Meist werden diese mRNAs sowohl auf CAP-abhängige als auch -unabhängige Weise translatiert.

Bei Bakterien, die keine CAP-Struktur am 5'-Ende der mRNA besitzen, erfolgt die Erkennung der mRNA durch die ribosomale 30S Untereinheit mit Hilfe einer mRNA-rRNA-Wechselwirkung. Dabei findet eine Basenpaarung des 3'-Endes der 16S-rRNA und einer komplementären purinreichen so genannten Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz 5-7 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) der mRNA statt (Gualerzi & Pon, 1990, Kozak, 1983, Shine & Dalgarno, 1974).

Der letzte bekannte Mechanismus der Translationsinitiation kommt sehr selten sowohl in Bakterien als auch in Eukaryoten vor: der Mechanismus für die Translationsinitiation bei *leader*-losen Transkripten, die keine 5'-UTR besitzen. Die Translation wird hier mit dem undissoziierten Ribosom, nicht der kleinen Untereinheit, eingeleitet indem eine Initiator-tRNA der mRNA hilft mit dem Ribosom einen Komplex zu bilden (O'Donnell & Janssen, 2002, Moll *et al.*, 2004, Andreev *et al.*, 2006).

Studien mit vier verschiedenen archaealen Organismen (*Pyrobaculum aerophilum*, *Sulfolobus solfataricus*, *Haloferax volcanii* und *Halobacterium salinarum*) zeigten, dass der Anteil sogenannter *leader*-loser Transkripte, die keine 5'-UTR besitzen, in Archaeen viel größer als

in Bakterien und Eukaryoten ist (Brenneis *et al.*, 2007, Sensen *et al.*, 1996, Slupska *et al.*, 2001, Tolstrup *et al.*, 2000). Daraus wird geschlossen, dass ein Mechanismus für die Translationsinitiation bei *leader*-losen Transkripten den größten Teil in Archaeen ausmacht.

Beispiele für *leader*-lose mRNAs aus Halobakterien sind die Transkripte des *bop*-Gens (Dassarma *et al.*, 1984), *fdx*-Gens (Pfeifer *et al.*, 1993) und die monocistronische *p-gvpO*-mRNA aus *H. salinarum* (Offner *et al.*, 1996).

Etwa zwei Drittel von 62 untersuchten halobakteriellen Transkripten waren *leader*-los, während ein Drittel eine durchschnittlich 20 Nukleotide lange *leader*-Sequenz besaßen (Brenneis *et al.*, 2007). Als *leader*-los wurden jene Transkripte bezeichnet, deren 5'-UTR entweder keine oder weniger als 10 Nukleotide aufwies. Die Analyse zeigte, dass nur wenige Transkripte mit mehr als 10 Nukleotiden in der 5'-UTR eine Shine-Dalgarno-Sequenz enthielten. Bei über 90 % der Transkripte mit 5'-UTR konnte keine SD-Sequenz identifiziert werden (Brenneis *et al.*, 2007). Wie die Translation von mRNAs ohne SD-Sequenz in der 5'-UTR initiiert wird, ist bisher nicht bekannt. Zumindest für Haloarchaeen konnte jedoch ein *scanning*-Mechanismus ähnlich dem in Eukaryoten ausgeschlossen werden (Hering *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass es in Archaeen einen noch nicht bekannten fünften Mechanismus der Translationsinitiation gibt.

Einige archaeale Transkripte besitzen stromaufwärts des Startcodons eine purinreiche Sequenz, die komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA ist. Diese ist mit der bakteriellen SD-Sequenz vergleichbar (Bell & Jackson, 1998, Dennis & Shimmin, 1997, Watanabe *et al.*, 1997). Bei *in vitro* Studien mit SD-Sequenzen von *S. solfataricus* führten bereits zwei Punktmutationen innerhalb der SD-Sequenz zum vollständigen Verlust der Translation (Condo *et al.*, 1999). Eine weitere *in vivo* Studie in *H. volcanii* zeigte, dass Mutationen im Bereich der SD-Sequenz zu einer verringerten, die Deletion der 5'-UTR jedoch zu einer 15-fach gesteigerten Translationseffizienz führten (Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004). Das könnte darauf hinweisen, dass die Initiation der Translation an *leader*-losen mRNAs und der SD-Sequenz-Mechanismus gleichzeitig stattfinden.

Es sei noch erwähnt, dass erste Ergebnisse aus *in vivo* Studien mit den 3'-UTRs von mRNAs zweier Gene von *H. volcanii* ergaben, dass eine funktionale Interaktion der 5'-UTR mit der 3'-UTR des Transkripts nötig wie auch ausreichend ist, um seine differentielle Translationsregulation in Gang zu halten (Brenneis & Soppa, 2009).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Genexpression und Funktion der phosphatabhängigen ABC-Transporter Pst1, Pst2 und Ugp aus *H. salinarum* näher untersucht und charakterisiert werden. Insbesondere waren dabei die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Genregulation und Funktion zwischen den beiden phosphatspezifischen Transportern Pst1 und Pst2 festzustellen.

Zunächst war das Ziel die Transkriptionseinheiten der Gencluster *pst1*, *pst2* und *ugp* mit Hilfe von RT-PCR zu definieren und die Transkriptionsstartstellen im jeweiligen Promotor mittels 5'-RACE zu identifizieren.

Für eine quantitative Analyse der Promotoraktivität sollte das Reportergen *bgaH* verwendet werden. Mit Hilfe dieses *bgaH*-Reportersystems waren detaillierte Promotoruntersuchungen durchzuführen. Dabei war sowohl die phosphatabhängige Promotoraktivität zu untersuchen als auch *cis*-aktive Elemente in den Promotoren zu finden und zu identifizieren.

Die Phosphataufnahme der ABC-Transporter Pst1 und Pst2 sollte mit Hilfe von Knockout-Mutanten in $^{32}\text{P}_1$ -Aufnahmeversuchen kinetisch charakterisiert werden. Dabei war das Ziel mögliche Unterschiede in Bezug auf kinetische Parameter der beiden Transporter Pst1 und Pst2 festzustellen.

Die Funktion des Glycerin-3-phosphat-spezifischen Transporters Ugp sollte mit Hilfe von Wachstumsversuchen bestätigt werden.

Eine mögliche Beteiligung der Pst-Systeme an der Phosphat-Taxis von *H. salinarum* sollte die Untersuchung des chemotaktischen Verhaltens hergestellter Deletions-Mutanten der Transporter Pst1 und Pst2 aufzeigen.

Die Untersuchung von Knockout- und Überexpressions-Mutanten hatte das Ziel mögliche Kandidaten eines Regulatorproteins des PHO-Stimulons in *H. salinarum* zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Stämme der verwendeten Organismen

Escherichia coli

Bezeichnung	Genotyp	Vertreiber
DH5 α	F- ₈₀ dlacZ_M15_(lacZY A – argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk +) phoA suppE44 _- thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TOP10	F- mcrA_(mrr – hsdRMS – mcrBC)_80lacZ_M15 _lacX74 recA1 ara_139_(ara – leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Halobacterium salinarum

Stammbezeichnung	Geno- oder Phänotyp	Referenz
R1	Wildtyp	DSM 671

Deletions-Stämme (H. salinarum R1):

KF100 (R1 Δ pst2)	Deletion des Genclusters <i>OE1679R-OE1674R</i> mit Hilfe des Plasmids pKF100	Diese Arbeit
KF101 (R1 Δ pst1)	Deletion des Genclusters <i>OE4485R-OE4471R</i> mit Hilfe des Plasmids pKF101	Diese Arbeit
KF102 (R1 Δ ugp)	Deletion des Genclusters <i>OE5170R-OE5166R</i> mit Hilfe des Plasmids pKF102	Diese Arbeit
R1 Δ aph	Deletion des Gens <i>OE5192R</i>	(Wende, 2006)
KF103 (R1 Δ aph Δ ugp)	Deletion des Genclusters <i>OE5170R-OE 5166R</i> mit Hilfe des Plasmids pKF102 in R1 Δ aph	Diese Arbeit
KF104 (R1 Δ phoU4)	Deletion des Gens <i>OE2128F</i> mit Hilfe des Plasmids pKF104	Diese Arbeit

Knockout-Stämme (H. salinarum R1):

KF105 (ko:pstC1-OE4471R)	Knockout der Gene <i>OE4483R-OE4471R</i> mit Hilfe des integrierten Plasmids pKF105	Diese Arbeit
KF106 (ko:pstC2-phoU ₂)	Knockout der Gene <i>OE1678R-OE1674R</i> mit Hilfe des integrierten Plasmids pKF106	Diese Arbeit

Überexpressions-Stämme (H. salinarum R1):

KF201 (<i>Pbop-phoU3</i>)	Überexpression des Gens <i>phoU₃</i> (<i>OE1681F</i>) mit Hilfe des integrierten Plasmids pKF201	Diese Arbeit
KF202 (<i>Pbop-trh3</i>)	Überexpression des Gens <i>trh3</i> (<i>OE3558F</i>) mit Hilfe des integrierten Plasmids pKF202	Diese Arbeit

Promotorfusions-Stämme (*H. salinarum* R1):

Stammbezeichnung	Geno- oder Phänotyp*	Referenz
KF1A <i>pst1</i> (-155)	Insertion des Vektors pKF1A durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF1B <i>pst1</i> (-101)	Insertion des Vektors pKF1B durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF1C <i>pst1</i> (-74)	Insertion des Vektors pKF1C durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF1D <i>pst1</i> (-52)	Insertion des Vektors pKF1D durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF1E <i>pst1</i> (-155 – -56)	Insertion des Vektors pKF1E durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF1A1mut1/mut2/mut3 (3 Stämme)	Insertion des Vektors pKF1A1mut1/mut2/mut3 durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF1A2mut1/mut2/mut3/mut4 (4 Stämme)	Insertion des Vektors pKF1A2mut1/mut2/mut3/mut4 durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF1B2mut1/mut2/mut3/mut4 (4 Stämme)	Insertion des Vektors pKF1B2mut1/mut2/mut3/mut4 durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF1A3mut1/mut2/mut3/mut4 (4 Stämme)	Insertion des Vektors pKF1A3mut1/mut2/mut3/mut4 durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF1A4mut1/mut2/mut3 (3 Stämme)	Insertion des Vektors pKF1A4mut1/mut2/mut3 durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF0A <i>pst2</i> (-227)	Insertion des Vektors pKF0A durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF0B <i>pst2</i> (-105)	Insertion des Vektors pKF0B durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF0C <i>pst2</i> (-85)	Insertion des Vektors pKF0C durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF0D <i>pst2</i> (-64)	Insertion des Vektors pKF0D durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF0E <i>pst2</i> (-43)	Insertion des Vektors pKF0E durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF0A1mut1/mut2 (2 Stämme)	Insertion des Vektors pKF0A1mut1/mut2 durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF0E1mut1/mut2/mut3/mut4/mut5 (5 Stämme)	Insertion des Vektors pKF0E1mut1/mut2/mut3/mut4/mut5 durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF0D3mut1/mut2/mut3 (3 Stämme)	Insertion des Vektors pKF0D3mut1/mut2/mut3 durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit
KF2A <i>ugp</i> (-181)	Insertion des Vektors pKF2A durch homologe Rekombination im Gen OE3349F	Diese Arbeit

*genaue Angaben zur integrierten Fragmentlänge und den teilweise mutierten Sequenzen sind in 2.1.2 aus der Tabelle der Vektorkonstrukte zu entnehmen

2.1.2 Vektoren

Die Karten der Ursprungsvektoren sind im Anhang in Abb. 51 und Abb. 52 gezeigt.

Vektoren für die Klonierung in *E. coli*

Name	Referenz
pUC19	(Yanisch-Perron, 1985)
pCR [®] 4-TOPO [®]	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Vektoren für die Herstellung von Mutanten in *H. salinarum*

Name	relevante Merkmale	Referenz
pVT	Nov ^R , <i>bgaH</i> , Amp ^R und <i>E.coli ori</i> (pUC19)	(Tarasov <i>et al.</i> , 2008)
pReport	Mev ^R , <i>bgaH</i> , Amp ^R und <i>E.coli ori</i> (bluescriptSK), <i>sod2</i> -Terminator, Integrationsstelle OE3349F (700 bp)	(Schwarz, unveröffentlicht)
pMKK100	Mev ^R , <i>bgaH</i> , Amp ^R und <i>E.coli ori</i> (bluescriptSK)	(Koch & Oesterhelt, 2005)
pKF10	Nov ^R , <i>bgaH</i> , Amp ^R und <i>E.coli ori</i> (pUC19), Terminator des <i>flgA</i> -Operons	Diese Arbeit (Ursprungsvektor pVT)
pKF20	Mev ^R , <i>bgaH</i> , Amp ^R und <i>E.coli ori</i> (bluescriptSK), <i>bop</i> -Promotor	Diese Arbeit (Ursprungsvektor pMKK100)

Vektorkonstrukte zur Herstellung von Mutanten in *H. salinarum*

Name	Inseriertes Fragment [Ursprungsvektor]	Insertionsgröße
pKF104 (Δ <i>phoU4</i>)	Region stromaufwärts (<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I) und stromabwärts (<i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III) von OE 2128F [pVT]	456 bp und 475 bp
pKF101 (Δ <i>pst1</i>)	Region stromaufwärts (<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I) von OE4485R und stromabwärts (<i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III) von OE4471R [pVT]	538 bp und 456 bp
pKF100 (Δ <i>pst2</i>)	Region stromaufwärts (<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I) von OE1679R und stromabwärts (<i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III) von OE1674R [pVT]	525 bp und 479 bp
pKF102 (Δ <i>ugp</i>)	Region stromaufwärts (<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I) von OE5170R und stromabwärts (<i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III) von OE5166R [pVT]	465 bp und 570 bp
pKF104 (ko: <i>pstC1</i> -OE4471R)	Hinterer Teil von <i>pstS1</i> (<i>Xba</i> I/ <i>Not</i> I) stromaufwärts von <i>pstC1</i> [pKF10]	600 bp
pKF105 (ko: <i>pstC2</i> - <i>phoU2</i>)	Hinterer Teil von <i>pstS2</i> (<i>Xba</i> I/ <i>Not</i> I) stromaufwärts von <i>pstC2</i> [pKF10]	625 bp
pKF201 (<i>Pbop-phoU3</i>)	Vorderer Teil des <i>phoU3</i> -Gens (<i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> HI) [pKF20]	547 bp
pKF202 (<i>Pbop-trh3</i>)	Vorderer Teil des <i>trh3</i> -Gens (<i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> HI) [pKF20]	407 bp

Vektorkonstrukte zur Herstellung von Promotorfusions-Transformanten für *bgaH*-Expressionsstudien in *H. salinarum*

Name	Inseriertes Fragment im Ursprungsvektor (<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I); verwendete Oligonukleotide	pReport*
pKF1A <i>pst1</i> (-155)	<i>pst1</i> -Promotorfusion (156 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst1_1</i> und <i>Ppst1_2</i>	OE4485R-
pKF1B <i>pst1</i> (-101)	<i>pst1</i> -Promotorfusion (102 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst1_7</i> und <i>Ppst1_2</i>	OE4485R-
pKF1C <i>pst1</i> (-74)	<i>pst1</i> -Promotorfusion (75 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst1_3</i> und <i>Ppst1_2</i>	OE4485R-
pKF1D <i>pst1</i> (-52)	<i>pst1</i> -Promotorfusion (53 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst1_5</i> und <i>Ppst1_2</i>	OE4485R-
pKF1E <i>pst1</i> (-155 – -56)	<i>pst1</i> -Promotorfusion (156 bis 57 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst1_1</i> und <i>Ppst1_17</i>	OE4485R-
pKF1A1mut1/mut2/mut3 _TATA-1 (3 Vektoren)	<i>pst1</i> -Promotorfusion (156 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst1_1</i> und <i>Ppst1_16</i>	OE4485R-
pKF1A2mut1/mut2/mut3/mut4 _TATA-2 (4 Vektoren)	<i>pst1</i> -Promotorfusion (156 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst1_1</i> und <i>Ppst1_11</i> mit <i>Ppst1_12</i> und <i>Ppst1_2</i> ⁺⁺	OE4485R-
pKF1B2mut1/mut2/mut3/mut4 _TATA-2 (4 Vektoren)	<i>pst1</i> -Promotorfusion (102 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst1_8</i> und <i>Ppst1_2</i>	OE4485R-
pKF1A3mut1/mut2/mut3/mut4 _P (4 Vektoren)	<i>pst1</i> -Promotorfusion (156 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst1_1</i> und <i>Ppst1_15</i>	OE4485R-
pKF1A4mut1/mut2/mut3_RY (3 Vektoren)	<i>pst1</i> -Promotorfusion (156 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst1_1</i> und <i>Ppst1_13</i> mit <i>Ppst1_14</i> und <i>Ppst1_2</i> ⁺⁺	OE4485R-
pKF0A <i>pst2</i> (-227)	<i>pst2</i> -Promotorfusion (228 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst2_1</i> und <i>Ppst2_2</i>	OE1679R-
pKF0B <i>pst2</i> (-105)	<i>pst2</i> -Promotorfusion (106 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst2_8</i> und <i>Ppst2_2</i>	OE1679R-
pKF0C <i>pst2</i> (-85)	<i>pst2</i> -Promotorfusion (86 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst2_3</i> und <i>Ppst2_2</i>	OE1679R-
pKF0D <i>pst2</i> (-64)	<i>pst2</i> -Promotorfusion (65 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst2_5</i> und <i>Ppst2_2</i>	OE1679R-
pKF0E <i>pst2</i> (-43)	<i>pst2</i> -Promotorfusion (44 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst2_7</i> und <i>Ppst2_2</i>	OE1679R-
pKF0A1mut1/mut2_TATA (2 Vektoren)	<i>pst2</i> -Promotorfusion (228 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst2_1</i> und <i>Ppst2_10</i>	OE1679R-
pKF0E1mut1/mut2/mut3/mut4/ mut5_TATA (5 Vektoren)	<i>pst2</i> -Promotorfusion (44 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst2_11</i> und <i>Ppst2_12</i> (ohne PCR ⁺⁺⁺)	OE1679R-
pKF0D3mut1/mut2/mut3_P (3 Vektoren)	<i>pst2</i> -Promotorfusion (65 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Ppst2_6</i> und <i>Ppst2_2</i>	OE1679R-
pKF2A <i>ugp</i> (-181)	<i>ugp</i> -Promotorfusion (182 bp stromaufwärts des Leserahmens); <i>Pugp_1</i> und <i>Pugp_2</i>	OE5166R-

* Die jeweilige Promotorregion ist in Kapitel 2.1.3 angegeben.

⁺⁺ Diese Konstrukte wurden durch rekombinante PCR (Lottspeich, 1998) hergestellt. Dabei wurden zwei getrennt amplifizierte PCR-Produkte mit komplementären Enden in einer weiteren PCR fusioniert.

⁺⁺⁺ Dieses Konstrukt konnte ohne PCR hergestellt werden. Beide Oligonukleotide wurden 1:1 gemischt, für 2 min bei 95 °C denaturiert und bei RT abgekühlt wobei die Primer hybridisieren. Die resultierende Duplex-DNA wurde *ad hoc* in den Vektor ligiert.

2.1.3 Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden mit wenigen Ausnahmen, die Bestandteil des Topoklonierungskits von Qiagen waren, von Metabion bezogen. Sie wurden auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/μl (PCR), 1 pmol/μl (Sequenzierung) und 0,5 pmol/μl (RT-qPCR) mit Reinstwasser (Milli-Q) eingestellt.

Oligonukleotide zur Herstellung der Deletionskonstrukte

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') ^{**+}	Spezifität
BamH_Tr1_for	TCGAGGGGATCCGAGAGGTCGGTGCCCTCCT	Stromaufwärts von <i>pst1</i> (OE4485R-4471R)
Pst_Tr1_rev	CCCCGTCCCTGCAGGTCTGAGTGCATCGCTTGG	
Pst_Tr1_for	GCGGACCTGCAGAACACCGAGTGATCAGAG	Stromabwärts von <i>pst1</i> (OE4485R-4471R)
Hind_Tr1_rev	GCGAAGGAAGCTTCCACGTCGTCATCGACG	
BamH_Tr2_for	GACTCGGGATCCAGGGCGAGCACGTCGAAG	Stromaufwärts von <i>pst2</i> (OE1679R-1674R)
Pst_Tr2_rev	ACGTGTCTGCAGTTCGGCGTCGTCGCTGCTGGC	
Pst_Tr2_for	AACGACCTGCAGCTGATCTACTAGCGACGG	Stromabwärts von <i>pst2</i> (OE1679R-1674R)
Hind_Tr2_rev	AGAGCAAAGCTTTCCTCGCTGCCCCCGA	
Bam_ugp_for	ACCTGCGGGATCCTCACAACGACTGCGGT	Stromaufwärts von <i>ugp</i> (OE5166F-OE5170F)
Pst_ugp_rev	GTGGTGGGCTGCAGCGGATAACGCAACTCG	
Pst_ugp_for	CCGTCACTGCAGCTCGTGCACCCACCGAAC	Stromabwärts von <i>ugp</i> (OE5166F-OE5170F)
Hind_ugp_rev	AGGGACTAAGCTTCGGCGGCAAGCGCAACT	
Bam_2128_for	CGCAGCGGGATCCGCGTCGTCGCTTACC CGCA	Stromaufwärts von <i>phoU4</i> (OE2128F)
Xba_2128_rev	CCGTGTTCTAGAGCCGTACGCAAGTTCGTGCG	
Xba_2128_for	CACACTCTCTAGACCGACACCCCCGGCCGCC	Stromabwärts von <i>phoU4</i> (OE2128F)
Hind_2128_rev	TCGATGTAAGCTTCCCTCCGATTTCTCCGCC	

Oligonukleotide zur Herstellung der knockout-Konstrukte

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') ^{**+}	Spezifität
Xba_outpstS1_for	CACGTCTCTAGAGTCGACGGGCAGCCGATC	Stromaufwärts von <i>pstC₁</i> (OE4483R)
NotI_outpstS1_rev	TGCCGGCGGCCGCGGTTTCAGTCTGGTAGTTC	
Xba_outpstS2_for	CATCGTTCTAGAGGACCTGGACATCGACAG	Stromaufwärts von <i>pstC₂</i> (OE1678R)
NotI_outpstS2_rev	CAGTCAGCGGCCGCGTATACAGTCTTTGCT	

Oligonukleotide zur Herstellung der Überexpressions-Konstrukte

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') ^{**+}	Spezifität
Pbop_for	AGTGGAAGCTTGCCTGCACGCATCGACTT	<i>bop</i> -Promotor (243 bp)
Pbop_rev	AACTCCTGCAGGCAACAGTACCTAACGAGGA	
phoU3_for	TACGTCTGCAGATGGAACGACGGAAAGTC	<i>phoU₃</i> -Gen (547 bp)
phoU3_rev	CAGTGGGATCCGGAAGATGCGTGACACGA	
trh3_for	ACAACACTGCAGATGGACGACATCGACCAG	<i>trh3</i> -Gen (407 bp)
trh3_rev	TCGACTGGATCCAGCTTCTCGTCGAGGATC	

Oligonukleotide zur Herstellung der Promotorfusionskonstrukte**Position 1-165 der verwendeten Promotorsequenz Ppst1 (5'-3')* :**

1 ATAGGTTCCG TTGGGGCGTC ACCTGGTTAA GTGTTTCAGCC GGCTGACTGG
 51 TGGTCTCACC AGTGATATAT AGCACACACA GTCCTATGGA GGGATGGCAG
 101 CCACCACGTA GCCATATTAT AAACGGGTTT ACTGGTTCCG GGTGCCATTC
 151 CAAGCGATGC ACTCA

Name	Sequenz (5'-3') ^{**+}	Position von 5'- Ende; (Position der Punktmutationen)
Ppst1_1 (for)	TTTTTTGGATCCATAGGTTTCGGTTGGGGCGTC	1
Ppst1_2 (rev)	TTTTTTCTGCAGTGAGTGCATCGCTTGAATGG	165
Ppst1_3 (for)	TTTTTTGGATCCTCCTATGGAGGGATGGCAGCC	82
Ppst1_5 (for)	TTTTTTGGATCCCCACGTAGCCATATTATAAACGGG	104
Ppst1_7 (for)	TTTTTTGGATCCGTGATATATAGCACACACAGTCC	62
Ppst1_8 (for)	TTTTTTGGATCCGTGATNNNNAGCACACACAGTCC	62; (67-70)
Ppst1_11 (rev)	TCCATAGGACTGTGTGTGCTNNNNATCACTGGTGAGACCACCAG	90; (67-70)
Ppst1_12 (for)	AGCACACACAGTCCATGGAGGGATGGCAG	71
Ppst1_13 (rev)	GCCATCCCTCCATAGGACTGNNNNTGCTATATATCACTGGTGAG	98 (75-78)
Ppst1_14 (for)	CAGTCCATGGAGGGATGGCAGCCACCACG	79
Ppst1_15 (rev)	TTTTTCTGCAGTGAGTGCATCGCTTGAATGGCACCCGGAACCA GTAAACCCGTTTNNNNTATGGCTA	165 ; (117-120)
Ppst1_16 (rev)	TTTTTCTGCAGTGAGTGCATCGCTTGAATGGCACCCGGAACCA GNNNNCCCGTTTAT	165 ; (138-141)
Ppst1_17 (rev)	TTTTTTCTGCAGTGCCATCCCTCCATAGGACT	99

Position 1-237 der verwendeten Promotorsequenz Ppst2 (5'-3')* :

1 ATGCGACCAC GTATCGATGC CTGTAATATA AATCCCGGTC ACGATACATA
 51 GTTACTACAC CAAACCACTG TAGAGGAGAA TAAAGCGCTT GCAGGCGCTC
 101 GGGTCGAAAT ATACATCGAC GACGAGCGTC GAATCGATTC GCGGACATGC
 151 GATGTGAACT GTTCCCTATG TACTGCTATA TATACGTAAT AGCAGAGTAC
 201 TTATTCGCAT CGCGGCGAGC ATACGACGAT GCCAGCA

Name	Sequenz (5'-3') ^{**+}	Position von 5'- Ende; (Position der Punktmutationen)
Ppst2_1 (for)	TTTTTTGGATCCATGCGACCACGTATCGATGCC	1
Ppst2_2 (rev)	TTTTTTCTGCAGTGCTGGCATCGTCGTATGCTC	237
Ppst2_3 (for)	TTTTTTGGATCCCGGACATGCGATGTGAACTG	142
Ppst2_5 (for)	TTTTTTGGATCCCTATGTACTGCTATATATACGT	165
Ppst2_6 (for)	TTTTTTGGATCCCTATGTACTGCTANNNTACGT	165; (179-182)
Ppst2_7 (for)	TTTTTTGGATCCCGTAATAGCAGAGTACTTATTCGC	185
Ppst2_8 (for)	TTTTTTGGATCCCGAGCGTCGAATCGATTCGC	133
Ppst2_10 (rev)	TTTTTTCTGCAGTGCTGGCATCGTCGTATGCTCGCCGCGAT GCGANNNTGTA CTCTGC	237; (201-204)
Ppst2_11 (for)	GATCCCGTAATAGCAGAGTACNNNNTCGCATCGCGGCGAGC ATACGACGATGCCAGCACTGCA	195; (201-204)
Ppst2_12 (rev)	GTGCTGGCATCGTCGTATGCTCGCCGCGATGCGANNNTGTA CTCTGC TATTACGG	237; (201-204)

2 Material und Methoden

Position 1-190 der verwendeten Promotorsequenz *Pugp* (5'-3')* :

```

1 GAATCCAACA GCCACCCACA CAACGACTGG TTCGATATTA AAAACCGGGG
51 TCAGTTCCTGG AACGTCGACG GTATTGCTGC GCGCCGCCCC ATGCACGGCT
101 CAATAGGTCT CCAGAACTGT CTGGACGGAT ATTTTCAACT CATATAAGCA
151 CTCATCCGAG GACCCCGAGT TGCATTATCC GATGGCGCCC

```

Name	Sequenz (5'-3') ^{**+}	Position von 5'-Ende
<i>Pugp</i> _1 (for)	TTTTTTGGATCCGAATCCAACAGCCACCCACAC	1
<i>Pugp</i> _2 (rev)	TTTTTTCTGCAGGGGCGCCATCGGATAACGCA	190

Oligonukleotide zur PCR-Kontrolle, für Southernblot und Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') ⁺	Spezifität
<i>pstS1_for</i>	GCGTCCGCCGCCGACGAGCTGCCGGACGCG	(Phosphatbindeprotein des ABC-Transporters Pst1)
<i>pstS1_rev</i>	GAACTCGCTCAACAGGAAGTTGATGAACGCG	
<i>4475_for</i>	GAAGGGCTGCAGTTTTCCGCGCGGCAGCCCTC	Gen <i>OE4475R</i>
<i>4475_rev</i>	GCCCCGTAAGCTTCGTCGATGACACACACGTC	
<i>pstS2_for</i>	GACGAGCTGCCGAGCATCTGGTCGGCCGAA	(Phosphatbindeprotein des ABC-Transporters Pst2)
<i>pstS2_rev</i>	CAGTCAGCGCGTCCAGTTGTTCTCGTTGGG	
<i>ugpB_for</i>	CTGGACTTCTGGCACGTTTTTCGGCGACGAACT	Substratbindeprotein des ABC-Transporters Ugp
<i>ugpB_rev</i>	CGGCCGTTGTCGTTGTTGACCAGGAGTTGG	
<i>2128_for</i>	GGGACGTGGCTCGCTGACTGTCACCC	Gen <i>phoU4 (OE2128F)</i>
<i>2128_rev</i>	CTTACACGGCCTCCCCGCGCATCGTCCG	
<i>RT_aph_3'</i>	GTCGCCTCGGTGCTGATGATGAG	Gen <i>aph (OE5192R)</i>
<i>RT_aph_5'</i>	CCACGGCGTCCCCGGCTGC	
<i>5192-front5'</i>	GCGCGGATCCACGTGCAACAGGGTCACGATCC	Stromaufwärts von <i>aph (OE5192R)</i>
<i>5192-front3'</i>	GCGCCGACGCGTACTCTGTGGTGTGCGGTG	
<i>check_Ppst1</i>	GATGAACCCGGTCGCTCCCG	Promotor des <i>pst1</i> -, <i>pst2</i> - und <i>ugp</i> -Operons
<i>check_Ppst2</i>	AGCCGCCGGTGACCTGGACT	
<i>check_Pugp</i>	CCGCCGAAACGATGCACACG	
<i>check_3349</i>	CCGTGTTCGAGGCCGGATCGCTGT	
<i>check_bgaH</i>	ATTTCGTCGCCACGCCAACTC	
<i>check_MevR</i>	CTTCATCGACGCCACACGCACCT	pReport-Vektor (zur Kontrolle der Promotor-fusions-Transformanten)
<i>T3_forward</i>	ATTAACCCCTCACTAAAGGGA	Oligonukleotide von Invitrogen zur Sequenzierung des Vektors pCR [®] 4-TOPO [®]
<i>T7_reverse</i>	TAATACGACTCACTATAGGG	
<i>M13_forward</i>	CAGGAAACAGCTATGAC	
<i>M13_reverse</i>	GTA AACGACGGCCAG	
<i>pVT_for</i>	TTTATCTCGGCCGGAGGTCTCTAC	Oligonukleotide zur Sequenzierung des Vektors pVT
<i>pVT_rev1/rev2</i>	GGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG/ GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA	
<i>seq_out pstS1_for</i>	AGTGGGCCAACGAGTACGACACGGA	Phosphatbindeprotein des ABC-Transporters Pst1
<i>seq_out pstS2_for</i>	TTCAACCCCAAATCCACCGGCACC	Phosphatbindeprotein des ABC-

2 Material und Methoden

		Transporters Pst2
Pbop_for	AGTGGAAGCTTGCGTGCACGCATCGACTT	<i>bop</i> -Promotor
check_phoU3_rev	CGCGACAAGCTTCAGGAGGTGGTTGCCGACGTA	Region stromabwärts des <i>phoU₃</i> -Gens
check_trh3_rev:	GATCACGTCTCGGTGGCGTTTTTCG	Region stromabwärts des <i>trh3</i> -Gens

Oligonukleotide für die reverse Transkription und anschließende PCR (RT-PCR)

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') ⁺	Spezifität
RT_pst1_1	TCAGCTTGAACCTCCTCCAGC	für cDNA-Synthese
RT_pst2_1	CGTTGTCGACCATGTACACC	für cDNA-Synthese
phoX1_for	GCGTCCGCCGCCGACGAGCTGCCGGACGCG	für PCR-Fragment <i>pst1_A</i> (560 bp)
phoX1_rev	GAACCTCGCTCAACAGGAAGTTGATGAACGCG	
phoX1_FOR	CTACGGGGAGAACCCTGGGCGCCGAGGAGTA	für PCR-Fragment <i>pst1_B</i> (510 bp)
pstC1_REV	CGGTGGCGGCCTGCTCGCTCGCCACCCCA	
pstC1_for	GCGCGCGAGTACCGCTCCCGGACCCGGTG	für PCR-Fragment <i>pst1_C</i> (1090 bp)
pstA1_REV	CGACTCCCCGGTGGCCAGTTGGGTCTTCGT	
pstC1_FOR	CGTGACCGTGATGGCGTTGAGCGTCGGGTC	für PCR-Fragment <i>pst1_D</i> (800 bp)
pstB1_REV	GGCTCCCGAACGGTCGTCGCTGCGTCGTG	
pstA1_FOR	CGGTCGGCATCGCCAGCCGTCGGTACTTCA	für PCR-Fragment <i>pst1_E</i> (880 bp)
pstB1_rev	GCGATACAGAGGCGCTGCTGTTGGCCCCCG	
pstB1_for	GTCAGCGTGTCCGACCTGGATACGTACTAC	für PCR-Fragment <i>pst1_F</i> (1730 bp)
4476_REV	ACCCCGGCAGCGACACCGGTACGTGC	
OE4476_for	TGCGGTGCGGCCATCGCTGC	für PCR-Fragment <i>pst1_G</i> (420 bp)
OE4471_rev	TGCCGCTGCCAGTGGGTGCC	
phoX2_for	GACGAGCTGCGGAGCATCTGGTTCGGCCGAA	für PCR-Fragment <i>pst2_A</i> (550 bp)
phoX2_rev	CAGTCAGCGCGTCCAGTTGTTCTCGTTGGG	
phoX2_for	GACGAGCTGCGGAGCATCTGGTTCGGCCGAA	für PCR-Fragment <i>pst2_B</i> (680 bp)
pstC2_rev	GATGGCGCGCGACAGCGCCAGGATGAAC	
pstC2_for	CGTTCTCTGCGCCGCTGGTTCGGCGTCGAC	für PCR-Fragment <i>pst2_C</i> (1300 bp)
pstA2_REV	GGGCCGGGCAGACCCGAACAGCGAGAGAT	
pstA2_for	CGACCGTGATCGTGGGTCGCTGGTTCGGTG	für PCR-Fragment <i>pst2_D</i> (1250 bp)
pstB2_REV	CGCCCTCGACGTCTGGATTTCGAGGCCGT	
pstB2_FOR	AGCACCAGCGCGTCGAAGAGTATATCACTG	für PCR-Fragment <i>pst2_E</i> (580 bp)
phoU_rev	GGCGGCGTCGATCTCGGTCTCGATCAGATC	

Oligonukleotide für 5'-RACE

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') ⁺	Spezifität
GSP1_pst1	TCGTCACGAACCTCTCCTGG	für cDNA-Synthese
GSP2_pst1	CTCGATCCCTCGTTGGTGATCGGGAACACCG	für PCR mit AAP
GSP1_pst2	TCGATGGCCTCAGTCAGCGC	für cDNA-Synthese
GSP2_pst2	GTGCAGAAGTGGTTGGCGAACCCG	für PCR mit AAP
GSP1_ugp	TGTTGTAGAGCATGATGGTG	für cDNA-Synthese
GSP2_ugp	TCTCGAAGAGTTGGACGATCCCCGG	für PCR mit AAP
GSP1_bgaH	GTCGTTTGCTTCGCGGATGA	für cDNA-Synthese
GSP2_bgaH	TGAGTTGAAACAGGTGAACCGACGG	für PCR mit AAP (oder AUAP)
AAP	GGCCACGCGTCGACTACGGGIIGGGIIGGGIIG (Sequenzangabe von Invitrogen)	für PCR mit GSP2

2 Material und Methoden

AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC (Sequenzangabe von Invitrogen)	für PCR mit GSP2
------	--	------------------

Oligonukleotide für RT-qPCR

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') ⁺	Spezifität
phoX1_qRT_for	CAGCCGTGAGATCGTTGACA	Gen <i>pstS</i> ₁ (<i>pst1</i> -Operon)
phoX1_qRT_rev	CCGACCAGTTCGTGATCTCC	
pstC1_qRT_for	AAGGCGGTGACGTTTCTGAT	Gen <i>pstC</i> ₁ (<i>pst1</i> -Operon)
pstC1_qRT_rev	CGCACGAGTAAGAACGCAAC	
phoX2_qRT_for	GAACAGTGGTCCGACGTGAA	Gen <i>pstS</i> ₂ (<i>pst2</i> -Operon)
phoX1_qRT_rev	GTAGTCGTAGGTGCCCGAGG	
pstC2_qRT_for	GGGCATCGTGGAGTTCCTTA	Gen <i>pstC</i> ₂ (<i>pst2</i> -Operon)
pstC2_qRT_rev	GATCATCACCATCAGCGTCG	
ugpA_qRT_for	CCTCTACTATCCGGGCCTCG	Gen <i>ugpA</i> (<i>ugp</i> -Operon)
ugpA_qRT_rev	TTGAGGTCAGCAGCTGAACG	
ugpB_qRT_for	TCACTCGTGGATGCAGATCG	Gen <i>ugpB</i> (<i>ugp</i> -Operon)
ugpB_qRT_rev	AAGTTAGTCTCCGTGGGTCCG	
aph_qRT_for	TGTTTCAGCCAGGAGAGCCAC	Gen <i>aph</i>
aph_qRT_rev	AGGTTGGGTTGTGTGTTCTCG	
phoU3_qRT_for	GCGGCTCCCTCCTGTTGACCCCCATCG	Gen <i>phoU3</i>
phoU3_qRT_rev	CTTCGAGCATGGAGACCGCGATGAGGTGC	
trh3_qRT_for	GAACGTCAAGGCGATGATCG	Gen <i>trh3</i>
trh3_qRT_rev	CTGCCACACGAAGTCGACGG	
fdx_qRT_for	GAGTACATCCTCGAAGCCGC	Gen <i>fdx</i> (interner Standard)
fdx_qRT_rev	TGAGGATCTGCTGCATGTCC	

* Startcodon ist unterstrichen und durch Fettdruck hervorgehoben

** Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen, eingeführte Punktmutationen sind mit N dargestellt. Die Identität des mutierten Nukleotids der jeweiligen Transformante ist im Ergebnisteil in Kapitel 3.1.4.5 angegeben.

⁺Die Schmelztemperatur T_M wurde für Primer mit einer Länge von 14 – 49 Basen näherungsweise folgendermaßen berechnet:

$$T_M = 100.5 + (41 * (yG+zC)/(wA+xT+yG+zC)) - (820/(wA+xT+yG+zC)) + 16.6 * \log_{10}([Na^+])$$

2.1.4 Enzyme und Proteine

Restriktionsenzyme

Im Folgenden sind die verwendeten Restriktionsendonukleasen und die Sequenzen ihrer Erkennungsstellen aufgeführt. Die Restriktionsenzyme für den analytischen und präparativen Verdau plasmidischer und chromosomaler DNA wurden sämtlich von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen, außer *BoxI* und *BclII*, die von Fermentas stammen. Die Restriktion wurde in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt.

Restriktionsenzym	spezifische Aktivität [U/ml]	Erkennungssequenz
<i>BamHI</i>	20000	GGATCC
<i>BglII</i>	10000	GCCNNNNNGGC
<i>HindIII</i>	20000	AAGCTT
<i>NotI</i>	10000	GCGGCCGC
<i>PstI</i>	20000	CTGCAG
<i>KasI</i>	4000	GGCGCC
<i>BclII</i>	10000	TGATCA
<i>BoxI</i>	10000	GACNNNGTC

DNA-Polymerasen, weitere Enzyme und Proteine

Name	Vertreiber
Hot-Star Taq [®] DNA-Polymerase	Qiagen
Phusion [™] DNA-Polymerase	Finnzymes
Restriktionsendonukleasen	NEB
Superscript III [™] Reverse Transcriptase	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Invitrogen
Taq [®] DNA-Polymerase	Fermentas
Vent [®] DNA-Polymerase	New England Biolabs

2.1.5 Reaktionssysteme und Kits

Name	Hersteller
5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends	Invitrogen
ABI PRISM [®] BigDye [®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	Applied Biosystems
BCA Protein Assay Kit	Novagen
DNAfree [™] und TURBO DNAfree [™]	Ambion
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick [®] Gelextraction Kit	Qiagen
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen
RNA 6000 Nano LabChip Kit	Agilent
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen
SYBR [®] GREEN PCR Master Mix	Applied Biosystems
TOPO TA Cloning Kit [®] for Sequencing	Invitrogen

2.1.6 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden in der höchstmöglichen Reinheitsstufe von Merck, Sigma oder ICN, Agar von Difco, DNA-modifizierende Enzyme von Roche oder Amersham, organische Lösemittel von Riedel de Haen bezogen. Für Puffer und Lösungen wurde zweimal destilliertes Wasser (H_2O_{bidest}) oder steril filtriertes Reinstwasser (Milli-Q) verwendet.

Chemikalien und Material	Hersteller
1-Methylimidazol	Fluka
32-Phosphat ($^{32}P_1$)	Hartmann Analytic
Aceton	Riedel-de Haen
Agarose	Biomol
Ameisensäure	Merck
Ammoniumbicarbonat	Fluka
Bacto [®] Agar	Difco
Bacto [®] Trypton	Difco Laboratories
Betain	Merck
BigDye-Mix V 3.1	Applied Biosystems
Blocking Reagent for nucleic acid hybridisation and detection	Roche
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
Chemilumineszenz-Substrat (CSPD)	Roche
Desoxyadenosintri-phosphat	Fermentas
Desoxycytosintri-phosphat	Fermentas
Desoxyguanintri-phosphat	Fermentas
Desoxythymintri-phosphat	Fermentas
DIG-11- Desoxyuridintri-phosphat	Roche
Dimethylformamid	Merck
Dimethylsulfoxid	Finnzymes
Dithiothreitol	Merck
DNA Molecular-Weight Marker II , DIG-labeled	Roche Diagnostics
Essigsäure	Merck
Ethanol	Sigma
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck
Ethylenglykol	Merck
Filterpapier	Whatman
Formaldehyd	Roth
Formamid	Merck
GeneRuler [™] DNA Ladders (Mix/1kb/Low Range/Ultra Low Range)	Fermentas
Hybond-N	GE Healthcare
Iodacetamid	Fluka
IPTG	Gerbu
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumnitrat	Roth
Magnesiumchlorid	Merck

Magnesiumsulfat	Merck
Maleinsäure	Sigma
Mangansulfat	Sigma
Methanol	Merck
Millex-GS (0,22µm)	Millipore
MultiScreen 96 PCR	Millipore
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdodecylsulfat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
Parafilm	Brand
peqGOLD RNAPure™	Peqlab
Pipettenspitzen	Gilsen
Plastik-Küvetten	Greiner bio-one
Polyethylenglykol 600	Sigma
RNA 6000 Ladder	Ambion
RNA Molecular Weight Marker I, DIG-labeled	Roche Diagnostics
RNaseZap	Ambion
Rotiphenol®	Roth
Saccharose	Merck
Safelock Tubes 0,5ml , 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Salzsäure	Merck
TEMED	Biorad
Trichloressigsäure	Sigma
Triton X-100	Roth
Trizma	Sigma
Tween 20	Sigma
X-Gal	Fermentas
Zellulose-Nitratfilter (0,45µm)	Sartorius
Zentrifugenröhrchen 50ml, 15 ml	TPP

2.1.7 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden mit bidestilliertem H₂O (H₂O_{bidest}) angesetzt, 20 min autoklaviert (121 °C und 2 bar) und bei Raumtemperatur gelagert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden sowohl für LB- als auch Halo-Medium vor dem Autoklavieren 0,015% Bacto®-Agar (w/v) von Difco zum Nährmedium zugesetzt. Das heiße Agar-Medium wurde unter Rühren langsam abgekühlt und in sterile Petrischalen gegossen. Für Antibiotika-Platten wurde das Antibiotikum nach dem Abkühlen der Agarlösung auf ca. 60 °C zugegeben. Alle Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert.

2.1.7.1 Nährmedien für *Escherichia coli*

Für die Herstellung von LB- und SOB-Medium wurde mit NaOH auf pH 7,0-7,2 eingestellt und dann autoklaviert.

Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium nach (Sambrook, 1989)

Bacto [®] Trypton	10 g
Bacto [®] Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1 l

SOB-Flüssigmedium

Bacto [®] Trypton	20 g
Bacto [®] Hefeextrakt	5 g
NaCl	600 mg
KCl	200 mg
H ₂ O _{bidest}	ad 990 ml

Nach dem Autoklavieren wurden jeweils 5 ml einer sterilen Lösung mit 2 M MgCl₂ und 2 M MgSO₄ zugegeben.

2.1.7.2 Nährmedien für *Halobacterium salinarum*

Halo-Medium (HM) nach (Oesterhelt & Krippahl, 1983)

Die Anzucht von *H. salinarum* erfolgte in komplexem Medium, das sogenannte Halo-Medium (HM). Für die Medien von *H. salinarum* wurde das Siedespeisesalz Salta von Südsalz eingesetzt. Das neutralisierte Fleischpepton stammte von Oxoid.

NaCl	250 g
MgSO ₄	20 g
KCl	2 g
Na ₃ Citrat·2 H ₂ O	3 g
Pepton	10 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1 l

Synthetisches Medium (SM)

Die Anzucht von *H. salinarum* erfolgte für bestimmte Versuche in synthetischem Medium (SM). Für Versuche in denen keine Phosphatquelle erwünscht war, wurden die Zellen in synthetischem Medium ohne Phosphat (SMOP) inkubiert, wofür Lösung 2 weggelassen wurde.

Lösung 1:

NaCl	235 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	20 g
KCl	2 g
KNO ₃	0,1 g
Na ₃ Citrat·2 H ₂ O	0,5 g
Glycerol (50%)	20 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 800 ml

Lösung 2:

KH ₂ PO ₄	2,86 g
K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O	6,62 g
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

Lösung 3:

CuSO ₄ ·5 H ₂ O	5 mg
FeCl ₂ ·4 H ₂ O	230 mg
MnSO ₄ ·7 H ₂ O	30 mg
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	44 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	24 mg
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	24 mg
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

Lösung 4:

Glycin	0,38 g
L-Arginin	2 g
L-Alanin	1,11 g
L-Asparagin	2 g
L-Glutamin	6,62 g
L-Isoleucin	2,2 g
L-Leucin	4 g
L-Lysin·H ₂ O	1,12 g
L-Methionin	1 g
L-Phenylalanin	0,5 g
L-Prolin	0,52 g
L-Serin	3,05 g
L-Threonin	2,5 g

L-Valin	1,25 g
H ₂ O _{bidest}	ad 500 ml

Lösung 4 wurde auf pH 7,0 eingestellt und durch einen 0,22 µm Sterilfilter filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Lösung 5:

L-Tyrosin	0,2 g
-----------	-------

Die Aminosäure wurde in 20 ml 1 M HCl gelöst und auf 50 ml mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Lösung 6:

Thiamin	100 mg
Folsäure	100 mg
Biotin	10 mg
H ₂ O _{bidest}	ad 10 ml

Mit 1 M NaOH-Lösung wurde auf pH 7,0 eingestellt, wodurch die Lösung klar wird. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Für die Herstellung des synthetischen Mediums wurden folgende Mengen verwendet:

Lösung 1	800 ml
(Lösung 2)	2 ml
Lösung 3	1 ml
Lösung 4	100 ml
Lösung 5	50 ml
<hr/>	
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Die Lösung wurde auf pH 7,2 eingestellt, steril filtriert (0,45 µm) und bei 4 °C gelagert. Vor jeder Verwendung wurden 0,5 ml Lösung 6 zugegeben. Für die meisten Versuche wurde mit SMOP gearbeitet und nur für einige Versuche Phosphat (Lösung 2) zugegeben.

2.1.8 Antibiotika

Für die Einstellung der Antibiotika-Stammlösungskonzentrationen wurde Reinstwasser (Milli-Q) eingesetzt. Die Mevinolin-Stocklösung wurde aus 5 Mevinacor[®]-Tabletten (je 20 mg) erhalten. Dazu wurden sie im Mörser zerkleinert und in 10 ml EtOH resuspendiert.

Name	Stammlösungskonzentration	Arbeitskonzentration	Organismus
Ampicillin	100 mg/ml	100/300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	<i>E. coli</i>
Kanamycin	30 mg/ml	30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	<i>E. coli</i>
Novobiocin	5 mg/ml	0,15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	<i>H. salinarum</i>
Mevinolin	10 mg/ml	10,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (25 μM)	<i>H. salinarum</i>

2.1.9 Antikörper

Zur Detektion von immobilisierten DNA- bzw. RNA-Fragmenten durch Southern- bzw. Northernblot (siehe 2.3.13 bzw.2.3.16) wurden Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments von Roche Diagnostics verwendet.

2.1.10 Geräte und Zubehör

Geräte	Typ (Hersteller)
Autoklaven	Varioklav 500 EP-Z (H+T Labortechnik) Autoklav 23 (Melag)
Durchlichtscanner	Scanner Expression 1680 Pro (Epson)
Elektrophorese-Netzgerät	Netzgerät (Biometra) E835 (Consort) EPS 200 (Pharmacia Biotech)
Gelsysteme	Agarosegel-Elektrophoresekammern (Werkstatt, MPIBC) Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent) Agagel Mini (Biometra)
Inkubatoren	Brutschränke BK5060E (Heraeus) und (Mettler) Labshaker (Kühner) Schüttler Unimax 2010 (Heidolph) Vibrax VXR (Ika-Works, Inc.) Shaker 3033 (GFL) Wasserbad Thermomix 1419 B. (Braun) Hybridisierungsofen OV5 (Biometra) Heizblock (Störktronic) Thermostat plus (Eppendorf)
Kolbenhubpipetten	Gilson 1 – 10 μl /50-200 μl /200-1000 μl (Abimed) Research 0,1 - 2,5 μl /10 - 100 μl (Eppendorf)
Photometer	Ultrospec 3000 (Amersham Biosciences) NanoDrop [®] ND-1000 (Peqlab)
Rührer/Schüttler	Vortexer Vibriofix VF1 (Ika-Works, Inc.) Schüttler (Eppendorf) Wipptisch WT16 (Biometra)

2 Material und Methoden

Sonstige Geräte	Magnetrührer Combimag RCH (Ika-Works, Inc.) FIREBOY plus (INTEGRA Biosciences) Mikrowelle Dimension 4 (Panasonic) MultiScreen Vakuum Manifold (Millipore) Reinstwasseranlage MilliQPLUS (Millipore) Vakuumblot-Anlage (Werkstatt vom MPI für Biochemie) Vakuumpumpe Laboport (KNF Neubauer) Sterilbank HA 2448 GS (Heraeus) pH-Meter Microprocessor pH 211 (Hanna Instruments) Durchlichtscanner SnapScan 600 (Agfa) Tiefkühlschrank – 70 °C UF80-4503 (Colora) handelsübliche Kühl- und Gefrierschränke (Bosch) und (AEG) Scanner GenePix 4000B (Axon) ChipWriter Pro (Virtek)
Thermocycler	UV-Crosslinker UV-Stratalinker 2400 (Stratagene) GeneAmp PCR-System 9700 (Perkin Elmer) iQ5 Real-Time PCR Detection System (BioRad®) Thermocycler T3 (Biometra)
Videodokumentation	Bio-Print Photodoc mit BIO-CAPT V.97 (Vilber Lourmat) Video Copy Processor (Mitsubishi)
Waagen	Analysenwaage HL52 (Mettler-Toledo) Laborwaage PB3002-SDR (Mettler-Toledo) Präzisionswaage PI 403 (Denver-Instruments)
Zentrifugen	Tischzentrifuge Centrifuge 5417 (Eppendorf) Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5417R (Eppendorf) Rotixa 120R (Hettich) Rotanta/RP (Hettich) Vakuumbzentrifuge Speedvac Concentrator (Savant)

2.1.11 Software-Programme und Datenbanken

Adobe Acrobat 6.0 Professional
Bio Edit 7.0.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)
BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
Clone Manager 7 (Science and Educational Software Cary, USA)
Corel Graphics Suite 11 (Corel)
EndNote X2.0.1 (Thompson Reuters)
Epson Scan
GenePix Pro 6 (Axon Instruments)
GraphPad Prism5
HaloLex (<https://edman.rzg.mpg.de>); externe Version (<http://www.halolex.mpg.de>)
MIGenAS (www.migenas.mpg.de)
MS Office 2007 (Microsoft)
Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>; (Finn *et al.*, 2006, Finn *et al.*, 2008)
Primer Express 2.0 (Applied Biosystems)
Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)
RNAstructure Version 4.11 (Mathews *et al.*, 2004)
SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>; (Schultz *et al.*, 1998)
SplitsTree Version 4.10
TotalLab v1.11
Vector NTI Version 10.3 (Invitrogen)

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

E. coli-Zellen wurden bei 37 °C in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (Ampicillin oder Kanamycin) in sterilen 15 ml-Zentrifugenröhrchen oder 100 ml-Erlenmeyerkolben (30 ml Medium) unter Schütteln (250 rpm) kultiviert. Plattenkulturen wurden ebenfalls bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Lagerung wurden die *E.coli*-Stämme bei 4 °C für ca. 2 Wochen gelagert und zur Stammhaltung als Glycerinkultur (20% Glycerin) bei -80 °C dauerhaft gelagert.

2.2.2 Kultivierung, Überführung und Stammhaltung von *H. salinarum*

H. salinarum-Zellen wurden bei 42 °C in 100 ml-Erlenmeyerkolben (35 ml Medium) mit 100 rpm geschüttelt. Die Kulturen wurden aus der Stammkultur im Verhältnis 1:3500 angeimpft und danach zweimal aus der Vorkultur mit 1:20 bis 1:100 umgeimpft. Die Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation bei 9.000 x g für 20 min geerntet. Der Zellschlag wurde in dem gewünschten Medium, in der Regel in phosphatfreiem synthetischem Medium (SMOP) resuspendiert (siehe 2.1.7.2). Die Zellen wurden für alle Versuche in denen unter -Pi-Bedingungen gearbeitet wurde für 48 h in phosphatlimitiertem Medium inkubiert. Für die Stammsammlung wurden frische Kulturen auch in geeigneter Verdünnung (10^{-4} – 10^{-5}) auf Agar-Platten plattiert oder die Zellen in Komplexmedium (HM) nach mehrtägiger Inkubation bei 42 °C luftdicht bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.3 Messung von Wachstumskurven

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurden 35 ml-Kulturen von *H. salinarum* in 100 ml-Erlenmeyerkolben kultiviert und in bestimmten Zeitabständen die Lichtstreuung in einem Photometer bei 600 nm bestimmt, indem 1 ml der Flüssigkultur in einer 1 cm-Küvette gegen eine Referenz des verwendeten Mediums vermessen wurde. Analog dazu wurden *E. coli*-Zellen gegen eine Referenz von frischem LB-Medium gemessen.

2.2.4 „Chemical in plug“ (CIP)-Test

Mit Hilfe des CIP-Tests kann das chemotaktische Verhalten von *H. salinarum*-Zellen beobachtet werden. Der CIP-Test wurde im Wesentlichen nach (Storch *et al.*, 1999) und (Wende *et al.*, 2009) durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen entweder in SM mit 2 mM P_i oder 48 h in SMOP angezogen. Danach wurden die Zellen in HEPES-gepuffertem Basalsalz (BSH) mit 0,25 % Agar in Petrischalen gegossen. In die Petrischalen wurden zuvor drei kleine Pfropfen (*plugs*) platziert, die jeweils 10 mM Leucin, 10 mM P_i oder nur BSH in

2 %igem (w/v) Agar enthielten. Die Zellsuspension setzt sich aus folgenden Teilen zusammen: 12,5 ml BSH mit 0,5 % (w/v) Agar (vorgewärmt bei 60 °C) und 12,5 ml BSH mit Zellen der Dichte $OD_{600} = 1,5 - 2$. Dazu wurde ein entsprechendes Volumen *H. salinarum*-Kultur bei 5000 x g für 25 min abzentrifugiert und in 12,5 ml BSH resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 40 °C vorgewärmt. Die vorgewärmte Zellsuspension wurde mit der Agar-BSH-Lösung bei etwa 40 °C vermischt und in eine Petrischale gegossen. Nach dem Aushärten der Plattenfüllung bei Raumtemperatur wurden die Platten in einer luftbefeuchteten Acrylbox auf einem Lichtkasten inkubiert. Im Abstand von ca. 24 h wurden die Platten gescannt (16-bit Graustufe, 300 dpi, Durchlicht). Das Bild wurde mit dem Programm Corel PhotoPaint v11 bearbeitet (Helligkeit: -100; Kontrast: +100; Intensität: +75).

Hepes-gepuffertes Basalsalz	25 % (w/v) NaCl; 250 g 2% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 20 g 0,3 % (w/v) $Na_3Citrat \cdot 2H_2O$; 3g 0,2 % (w/v) KCl; 2 g 20 mM Hepes; 20 ml 1M Hepes (pH 7,0) ad 1 l H_2O_{bidest}
--------------------------------	--

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)

2.3.1.1 Schnelle Isolierung genomischer DNA aus *H. salinarum*

Bei der als „Schnelle-Lyse“ bezeichneten Methode wurde 1 ml einer frisch gewachsenen Kultur in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorfgefäß) überführt und bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und der Zelleniederschlag in 250 μ l H_2O_{bidest} resuspendiert, was zur Lyse der Zellen führt. Um störende DNA-bindende Proteine und vorhandene Nukleasen zu inaktivieren, wurde der Ansatz auf dem Thermoblock bei 70 °C für 10 min erhitzt. Die DNA wurde bei -20 °C für einige Monate gelagert.

2.3.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *H. salinarum*

6 ml einer frisch gewachsenen Kultur mit einer OD_{600} von 0,6-0,8 wurden nacheinander in je 2 ml-Portionen in einem 2 ml-Reaktionsgefäß bei 13.000 rpm für jeweils 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zelleniederschlag mit 400 μ l H_2O lysiert. Mit einer Pipette wurde die Zellsuspension homogenisiert und anschließend mit gleichem Volumen (400 μ l) Phenol (Rotiphenol, Roth) überschichtet und die beiden Phasen durch Schütteln am Vortexer gut gemischt. Danach wurde bei 13.000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit je Halbem Volumen Phenol (200 μ l) und Chloroform (200 μ l) versetzt und durch kräftiges Schütteln am Vortexer vermischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 3 min. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und gleiches Volumen (300 μ l) Chloroform zupipettiert. Die beiden Phasen wurden durch kräftiges Schütteln am Vortexer vermischt und rezentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert.

Danach wurde die DNA-Lösung mit 3 x Volumen (900 µl) 100 %igem Ethanol versetzt und für 10 min bei -20 °C gefällt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C, 10.000 rpm für 5 min. Dann wurde die gefällte DNA mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und für 1 min rezentrifugiert. Der Niederschlag wurde bei 37 °C getrocknet und mit 50 µl Reinstwasser gelöst. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.1.3 Isolierung von Vektor-DNA aus *E. coli*

Einzelkolonien wurden von einer LB-Platte mit Ampicillin mit sterilen Zahnstochern gepickt und 3 – 4 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium in einem sterilen Reagenzglas angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C mit 250 rpm über Nacht geschüttelt. Davon wurden 2 ml bei 10.000 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Isolierung der Vektor-DNA erfolgte mit dem MiniPrep-Kit-System (Qiagen). Das System beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen. Es wurde nach den jeweiligen Anweisungen des Herstellers verfahren. Die isolierte DNA wurde in 50 µl Wasser (H₂O_{bidest}) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.3.1.4 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Gelextraction-Kit-Systems (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in 50 µl Wasser (H₂O_{bidest}) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.3.1.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus *H. salinarum*

Die Isolierung halobakterieller Gesamt-RNA wurde mit Hilfe eines Phenol-Guanidiniumisothiocyanat-Gemisches (peqGOLD RNApure™, peqLab) durchgeführt. 6-10 ml einer frischen Kultur von *H. salinarum*-Zellen wurden in 15 ml-Zentrifugationsgefäßen bei 4000 g für 30 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 3 ml peqGOLD-Lösung versetzt und durch Pipettieren und Schütteln gemischt, bis eine homogene Lösung entstand. Diese Proben wurden in der Regel bei -70 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Danach wurden 600 µl (0,2 Volumen) Chloroform zugegeben und kräftig am Vortexer geschüttelt und 10 in bei RT inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 5 min. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit etwa 800 µl (0,5 Volumen) Isopropanol vermischt. Nach einer Inkubation bei -20 °C für 15 min wurde bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Isopropanol wurde vorsichtig abpipettiert und der Niederschlag zweimal mit 500 µl 75 %igem ETOH_{DEPC} gewaschen und danach jeweils für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach dem zweiten Ethanol-Waschschritt folgte eine Lufttrocknung des RNA-Niederschlags für etwa 10 min. Der glasige Niederschlag wurde in 50 µl H₂O_{DEPC} resuspendiert und die RNA bei -70 °C gelagert.

2.3.2 DNase-Behandlung der Gesamt-RNA

Mit Ausnahme des Northernblots war es wichtig die Gesamt-RNA für weitere Behandlungen von restlichen DNA-Kontaminationen zu befreien, was unter Verwendung der DNaseI (DNA free, Ambion) erfolgte. Alle Arbeitsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend folgte die Qualitätskontrolle der RNA mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyser und des RNA6000-Nano-LabChip- Kits (Agilent) entsprechend den Herstellervorgaben. Die Bestimmung der Konzentration wurde sowohl mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers als auch des NanoDrop[®]-Spektrophotometers durchgeführt. Durch eine Kontroll-PCR wurde überprüft, ob sich noch eine DNA-Kontamination in den RNA-Proben feststellen lässt. Das Programm des Thermocyclers wurde mit mindestens 35 - 40 Zyklen gefahren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei -70 °C gelagert.

2.3.3 Spezifische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Je nach Konzentration wurden 1 - 7 µl Vektor-DNA oder 10 - 20 µl von genomischer DNA mit je 1 µl der Enzymlösung und $\frac{1}{10}$ des Endvolumens an Enzympuffer (10 x-Puffer von New England Biolabs) auf ein Endvolumen von 20 µl (ein Enzym) oder 30 µl (zwei Enzyme) mit Reinstwasser verdünnt und 1 - 3 h bei 37 °C bzw. bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

2.3.3.1 Analytischer Restriktionsverdau

Die Restriktionsanalyse dient zur Überprüfung einer DNA-Sequenz indem die theoretischen Fragmentgrößen nach einem Verdau mit einem spezifischen Restriktionsenzym untersucht werden. Eine Übereinstimmung mit den tatsächlichen Fragmentgrößen ist ein Indiz für die richtige DNA-Sequenz. Der Restriktionsansatz, der sich aus meist 7 µl Vektor-DNA, 2 µl enzymabhängigem und herstellerspezifischem Puffer, 1µl Restriktionsenzym-Lösung sowie 10 µl Reinstwasser (Milli-Q) zusammensetzte, wurde bei 37 °C für mindestens 1 h inkubiert. Für die Auswertung wurden die entstandenen DNA-Fragmente über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht photographisch dokumentiert.

2.3.3.2 Präparativer Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in beiden Strängen einer DNA-Doppelhelix innerhalb spezifischer Basensequenzen Phosphodiesterbindungen spalten können.

2.3.3.2.1 Verdau von Vektor-DNA

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Der Ansatz enthielt 15-30 µl Vektor-DNA (ca. 100-200 ng/µl), 6 µl Enzym-Puffer (10 x), 2 µl je Restriktionsenzym und wurde mit Reinstwasser auf ein

Gesamtvolumen von 60 µl gebracht. Das Gemisch wurde für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Banden des geschnittenen Vektors wurden unter UV-Licht mit Hilfe des passenden DNA-Markers (GeneRuler™, Fermentas) identifiziert und mit dem Skalpell ausgeschnitten.

2.3.3.2 Verdau genomischer DNA

Beim Verdau genomischer DNA für den Einsatz im Southernblot (Kapitel 2.3.13) wurde das Restriktionsenzym (siehe Tab. 4) so gewählt, dass Fragmente, die das Gen bzw. Operon und die flankierende (stromaufwärts bzw. stromabwärts liegende) Sequenz des Operons enthielten, erhalten wurden. Für den Ansatz wurden 25 µl des Zelllysats putativer Deletions-Mutanten mit 3 µl Restriktionsenzym, 7,5 µl herstellerepezifischem Enzympuffer und 39,5 µl Milli-Q-Wasser gemischt. Der Verdau wurde 4-5 Stunden bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 10 Minuten bei 70 °C hitzeinaktiviert.

2.3.4 Ligation

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer im gleichen Strang eines doppelsträngigen DNA-Moleküls gegenüberliegenden freien 3'-Hydroxyl-Gruppe. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Ligation diente zur Einfügung eines durch eine PCR amplifizierten DNA-Fragments in einen Vektor oder zur Fusion zweier DNA-Fragmente. Die DNA wurde durch einen Restriktionsverdau vorbereitet und anschließend mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase an den komplementären Enden verknüpft. Um die Ausbildung von Vektor-Konkatameren zu minimieren bzw. zu vermeiden, wurde das Fragment im Überschuss zum Ligationsansatz gegeben (Verhältnis von Fragment zu Vektor 3:1), wobei 10 bis 50 ng Vektor-DNA eingesetzt wurden. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurden 7 µl des Ansatzes in *E.coli*-Zellen transformiert (2.3.10.2).

2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.3.5.1 Amplifikation von DNA

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungs-, Mutagenese- oder Analysezwecke diente die Polymerasekettenreaktion (PCR). DNA-Fragmente können *in vitro* durch thermostabile DNA-Polymerasen vervielfältigt werden (Saiki *et al.*, 1988). Für die Amplifikationen wurden verschiedene Polymerasen benutzt. Alle PCRs, bei denen eine möglichst geringe Fehlerrate wichtig war, wurden mit Polymerasen mit einer „Proofreading“-Aktivität durchgeführt wie Phusion™ oder Vent®. Handelte es sich lediglich um Kontroll-PCRs, z.B. zur Überprüfung von RNA auf DNA-Kontaminationen, so wurde die

Polymerase HotStar-Taq[®] oder Taq[®] benutzt. Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer, 0,5 µM Primern, je 0,1 mM dATP, dTTP, dCTP bzw. dGTP und der empfohlenen Menge Enzym durchgeführt. Für eine PCR wurden 1 µl Vektor-DNA bzw. 1 µl einer Lösung von genomischer DNA eingesetzt. Teilweise wurde den Reaktionsansätzen in Einzelfällen noch 3-4% (v/v) DMSO zugesetzt, was bei hohem GC-Gehalt der amplifizierten DNA die Bildung von stabilen Sekundärstrukturen in bestimmten Bereichen unterdrücken und somit die Synthese begünstigen sollte. Ein PCR-Protokoll enthielt folgende Einstellungen:

Temperaturprogramm für eine PCR:

Vorgang	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenanzahl
Denaturierung	93-98 °C	1 - 15 min	1
	93-98 °C	15 - 30 sec	30-40 x
Hybridisierung (T _H)	55-72 °C	15 - 30 sec	
Polymerisation	72 °C	30 sec - 1 min /1 kb	
	72 °C	3 - 5 min	1
Kühlung	4 °C	∞	1

Beim Hybridisierungs-Schritt wurde die primerspezifische Schmelztemperatur T_M anhand der Basenzusammensetzung nach der unter Kapitel 2.1.3 erwähnten Regel errechnet. Die Hybridisierungstemperatur T_H lag in der Regel 4–6 °C unterhalb von T_M. Die Verlängerungszeit wird je nach DNA-Polymerase mit 30 sec – 1 min pro 1 kb des amplifizierten Fragments angesetzt.

2.3.5.2 Amplifikation von RNA

Zur Amplifikation von RNA-Fragmenten ist es notwendig, die RNA zunächst in DNA umzuschreiben, da die Ausgangs-RNA nicht direkt als Matrize von der Taq-Polymerase genutzt werden kann. Mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RTase) kann eine komplementäre DNA (cDNA) gebildet werden. Die Synthese von cDNA wurde sowohl für die qualitative PCR sowie die quantitative PCR (qPCR) als auch für die Amplifikation von cDNA-Enden (5'-RACE) durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Methoden beschrieben.

2.3.5.2.1 Synthese von cDNA und qualitative PCR (RT-PCR)

Die Synthese erfolgte unter Verwendung der Reversen Transkriptase SuperScriptIII (Invitrogen). Pro Ansatz wurde eine Negativkontrolle, die alle Komponenten außer der RTase enthielt, mitgeführt. Als Vorlage dienten 3 µg Gesamt-RNA, welche mit einem spezifischen Primer (siehe 2.1.3) und dNTPs gemischt wurde. Der Ansatz wurde auf dem Thermoblock für 5 min bei 70 °C erhitzt und auf Eis für 5 min gekühlt. Danach erst wurden die restlichen Komponenten zugefügt und alles 5 min bei RT inkubiert. Bei 56 °C wurde dann für 50 min in cDNA umgeschrieben und 15 min bei 70 °C inaktiviert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Ansatz für eine cDNA-Synthese der RT-PCR:

3 µg RNA in 8,5 µl 2 µl spezifischer Primer (10 µM) 1,5 µl dNTPs (10 µM)
4 µl Puffer (5 x) 2 µl DTT 2 µl SuperScript III (Negativkontrolle: 2µl H ₂ O)
20 µl

Nach der cDNA-Synthese wurde eine PCR mit der Polymerase HotStar-Taq[®] wie in 2.3.5.1 beschrieben durchgeführt. Als Ausgangsmatrizen dienten genomische DNA (Positivkontrolle), Gesamt-RNA (Negativkontrolle) und cDNA.

2.3.5.2.2 Synthese von cDNA und quantitative PCR (RT-qPCR)

Für die Synthese wurde wie unter 2.3.5.2.1 vorgegangen, jedoch wurden 2 µg Gesamt-RNA und 500 ng Random Hexamer-Primer verwendet. Die cDNA-Synthese fand bei 50 °C für 50 min statt.

Der Ansatz für eine cDNA-Synthese der RT-qPCR:

2 µg RNA in 10,5 µl 1 µl Random Hexamer Primer (Promega) 1,5 µl dNTPs (10 µM)
4 µl Puffer (5 x) 2 µl DTT 1 µl SuperScript III
20 µl

Danach wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Diese Methode dient der Quantifizierung von RNA-Mengen in Zellproben. Die Reaktionen wurden mit Hilfe des SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) in einem iQ5 Real-Time PCR Detection System (BioRad[®]) durchgeführt. Sowohl Reaktionsansatz als auch Temperaturprofil entsprachen den Herstellerangaben. Die einzelnen Quantifizierungsreaktionen erfolgten als 3-fache Replikate in jeweils 25 µl Reaktionsansatz. Die Endkonzentration der Primer betrug 0,2 µM. Als Vorlage für die PCR dienten 0,5 – 1 µl der cDNA-Synthese bzw. der Negativkontrolle. Die PCR-Primer wurden mit dem Programm Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) nach den Standardvorgaben für eine RT-qPCR konstruiert.

2.3.5.2.3 Synthese und Amplifikation von cDNA-Enden (5'-RACE)

Die Synthese und Amplifikation eines unbekanntes 5'-cDNA-Endes wurde mit Hilfe der 5'-RACE-Technik unter Verwendung des 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) durchgeführt.

Die Durchführung dieser Methode geschah in Anlehnung an die Herstellerangaben. Die cDNA-Synthese begann mit einem internen in Gegensinn-Richtung (*antisense*) gerichteten

Primer (GSP1, 2.1.3). Mit diesem synthetisierte die Reverse Transkriptase den cDNA-Gegenstrang zur mRNA bis zum 5'-Ende der mRNA. Danach wurde die mRNA durch RNase H degradiert und das Reaktionsgemisch über eine Säule gereinigt. Daraufhin wurde mit einer terminalen Nukleotidyltransferase (TdT) und dCTP ein poly(C)-Ende angehängt.

Der letzte Schritt, die Amplifikation des unbekanntes 5'-cDNA-Endes, wurde nach Zugabe von jeweils 20 pmol eines Ankerprimers (AAP), der sich an den gebildeten cDNA-poly(dC)-Schwanz anlagert, und eines genspezifischen *antisense*-Oligonukleotids (GSP2, 2.1.3) in einer PCR unter Verwendung der Taq-Polymerase durchgeführt.

Anschließend wurde das amplifizierte PCR-Fragment zur Sequenzierung in *E.coli* TOP10 (Invitrogen) transformiert (Kapitel 2.3.9). Es wurden anschließend etwa 20 Klone von der Platte gepickt. Das Verhältnis der Klone im Fall eines unterschiedlichen Sequenzierungs-Ergebnisses spiegelte die Häufigkeit der Nutzung verschiedener Transkriptionstarts wider (Klonverhältnis).

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Die basengenaue Überprüfung von Nukleotidsequenzen erfolgte durch eine Sequenzierung nach der Methode von (Sanger *et al.*, 1977). Die Grundlage der eingesetzten Methode ist der statistische Kettenabbruch der Polymerasereaktion mittels Fluorophor-markierter Didesoxynukleotide. Dafür kam das ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) zum Einsatz. Im fertigen Reaktionsmix befinden sich dNTPs, mit 4 verschiedenen Fluorophoren markierte didesoxy-NTPs, AmpliTaq[®] DNA Polymerase und MgCl₂ in Tris/HCl Puffer bei pH 9,0. Die zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.1.3 aufgeführt.

Ansatz pro Sequenzierungsreaktion:

1,5-9,5 µl DNA
1,5 µl Primer (10 µM)
3 µl BigDye –Mix (vs. 3.1)
0-8 µl H ₂ O
14 µl

Temperaturprogramm für die DNA-Sequenzierung:

Temperatur	Zeitdauer	Zyklusanzahl
96 °C	30 sec	30 x
48 °C	15 sec	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	1

Danach wurde der Sequenzierungsansatz mit einer SDS-Lösung (Endkonzentration 0,2 %) auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Die Sequenzierungsreaktion und die Kapillarelektrophorese wurden vom Sequenzierservice (MPI) durchgeführt. Für die Auswertung der Sequenzierungs-Ergebnisse gegen die Referenzsequenzen wurden das

Computerprogramm BioEdit sowie die Blast-Funktionen der HaloLex-Datenbank (<https://edman.rzg.mpg.de>) verwendet.

2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

2.3.7.1 Auftrennung von DNA

DNA wandert in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung vom Minus- zum Pluspol. DNA-Fragmentgemische können deshalb durch Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt werden, was die Analyse ihrer Größe anhand des aufgetragenen Größenmarker (GeneRuler®, Fermentas) möglich macht. Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten einer Größe von 0,1 bis 10 kb Länge wurden Agarose-Flachbettgele (z.B. Agagel mini, Biometra) mit einer Agarosekonzentration von 0,85 – 2 % eingesetzt. Die Agarosegel-Lösung wurde mit einer Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Hochprozentige Agarosegele trennen besser kleine, niederprozentige Gele eignen sich besser für die Auftrennung von größeren Fragmenten. Als Gel- und Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Vor der Gelelektrophorese wurden die die DNA-Proben mit DNA-Ladepuffer (10 x) versetzt. Bei analytischen Gelen betrug die angelegte Spannung 120 V und bei präparativen Gelen 60 V. Zur Detektion und Aufnahme der DNA-Fragmente wurde das Gel unter UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) belichtet und mit einer Kamera fotografiert. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht, wodurch die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden können.

10 x DNA-Ladepuffer :	30 % Glycerin; 10x TAE; 2,5 mg/ml Orange G (Acid Orange)
10 x TAE:	1 mM EDTA, 40 mM Tris-Acetat, pH 8,5
Ethidiumbromidstock:	c = 10 mg·ml ⁻¹

2.3.7.2 Auftrennung von RNA

Die Elektrophorese von RNA verläuft nach demselben Prinzip wie bei der DNA-Elektrophorese, aber da RNA-Moleküle starke Sekundärstrukturen ausbilden, wurde ein denaturierendes Gelsystem verwendet. Die RNA wurde mit dem 6 x RNA-Ladepuffer vermischt, bei 75 °C 5 min denaturiert und bei 100 V für 90 min im RNA-Gel aufgetrennt.

6 x RNA-Ladepuffer:	0,25 % Bromophenolblau,;0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin; 1,2 % SDS; 60 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6,8
RNA-Laufpuffer (10 x TBE):	2 mM EDTA; 89 mM Borsäure; 89 mM Tris-Acetat, pH 8,0 ad H ₂ O _{DEPC}
50 ml RNA-Gel:	0,85 % Agarose; 1 ml 1 M Guanidiniumthiocyanat; 2µl Ethidiumbromid (10 mg·ml ⁻¹)

2.3.8 Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA (dsDNA) und RNA

Ein Aliquot der dsDNA- bzw. RNA-Lösung wurde mit H₂O verdünnt und die Konzentration mit dem NanoDrop[®]-Spektrophotometer bestimmt. Mit 1 µl Reinstwasser (Milli-Q) wurde ein Nullabgleich durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Extinktionsmessung bei 230, 260 und 280 nm. In proteinfreien Proben sollte das Verhältnis OD_{260/280} ca. 2,0 (dsDNA) bzw. 1,8 (RNA) betragen. Der OD_{230/260} - Quotient sollte unter 0,6 liegen und liefert Auskunft über die Verunreinigung mit Polysacchariden. Die Konzentration der Ausgangslösung berechnet sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz mit folgender Formel:

$$\begin{aligned} c(\text{dsDNA}) &= 50 * \text{OD}_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g/ml}] \\ c(\text{RNA}) &= 40 * \text{OD}_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g/ml}] \end{aligned}$$

2.3.9 Topoklonierung

Für die Sequenzierung bestimmter DNA-Fragmente nach der 5'-RACE (Kapitel 2.3.5.2.3) wurden diese in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor eingebaut. Dieser Vorgang wird als Topoklonierung bezeichnet und durch Topoisomerasen ermöglicht. Im ersten Schritt wurde das Fragment mit Hilfe der Taq[®]-Polymerase in einer PCR vervielfältigt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde durch ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Dazu wurde die Bande mit der richtigen Fragmentgröße unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit von Qiagen die DNA aus dem Agarosegel isoliert. Die Einschleusung des Gens in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor erfolgte mittels folgendem Ansatz:

$$\begin{array}{r} 1 \mu\text{l pCR}^{\text{®}}4\text{-TOPO}^{\text{®}}\text{-Vektor} \\ 4 \mu\text{l PCR Produkt} \\ 1 \mu\text{l Salzlösung} \\ \hline 6 \mu\text{l} \end{array}$$

Nach einer 20 minütigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur konnte dieser Eingangsvektor zur Amplifizierung nach Angaben des Herstellers in *E. coli* TOP10 (Invitrogen) transformiert werden. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Platten mit Kanamycin (30 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden einige Einzelkolonien in 3 ml LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

Das Plasmid wurde mit Hilfe des Plasmidpräparationskits von Qiagen isoliert (siehe 2.3.1.3) und durch einen analytischen Verdau überprüft. Eine basengenaue Kontrolle der erhaltenen Plasmide erfolgte durch eine Sequenzierung (siehe 2.3.6). Es wurden zwei Oligonukleotide gewählt, die im pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor stromaufwärts (M13 forward oder T7) und stromabwärts des inserierten PCR-Fragments (M13 reverse oder T3) ansetzen.

2.3.10 Transformation in *E. coli*

2.3.10.1 Herstellung RbCl-kompetenter *E. coli*-Zellen

Diese Methode stellt eine leichte Abwandlung der Standardmethode nach (Cohen *et al.*, 1972) dar. Vom *E. coli* DH5 α -Stamm wurde eine 3 ml Übernachtskultur erstellt. Mit 1 ml dieser Übernachtskultur wurden 50 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,8 bei 37 °C geschüttelt (ca. 3 h). Nach der anschließenden 15-minütigen Inkubation auf Eis folgte eine 10-minütige Zentrifugation der Zellen bei 3500 rpm und 4 °C. Der Niederschlag wurde in 16 ml RF1-Lösung resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert und dann erneut 10 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag in 4 ml RF2-Lösung aufgenommen. Diese Suspension wurde für 15 min auf Eis gestellt, in 50 μ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert.

RF1-Lösung: RbCl 1,2 g; MnCl₂·4 H₂O 0,99 g; K₂Acetat 3ml einer 1M Lösung; CaCl₂·2 H₂O 0,15 g; Glycerin 15 g; ad 100 ml H₂O_{bidest}; mit 0,2 M Essigsäure pH 5,8 einstellen und steril filtrieren

RF2-Lösung: 2 ml einer 0,5 M MOPS-Lösung; RbCl 0,12 g; CaCl₂·2 H₂O 1,1 g; Glycerin 15 g; ad 100 ml H₂O_{bidest}; mit NaOH pH 6,8 einstellen und steril filtrieren

2.3.10.2 Transformation in RbCl-kompetente *E. coli*-Zellen

Plasmidvektoren wurden amplifiziert, indem sie in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α mittels Hitzeschock transformiert wurden (Cohen *et al.*, 1972). Die Selektion der Transformanten mit gewünschtem Plasmid erfolgte durch Ausplattieren auf Nähragar (plus Antibiotikum). Von Ligationsansätzen wurden 7 μ l, von einem Topoklonierungsansatz 3 μ l und von isolierten Plasmiden 2 μ l zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot *Escherichia coli* DH5 α (50 μ l) gegeben. Die Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert, einem 45 Sekunden langen Hitzeschock von 42 °C im temperierten Wasserbad ausgesetzt und nochmals für 1 min auf Eis gekühlt. Danach wurden 800 μ l SOB-Medium zu den Zellen gegeben und die Zellsuspension für 1 h bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. In diesem Zeitraum wurden vom Plasmid vermittelt Enzyme exprimiert, die im Nährmedium enthaltenes Kanamycin oder Ampicillin metabolisieren. Entstandene Transformanten waren dadurch in der Lage auf Agarplatten mit einem dieser Antibiotika zu wachsen. 100 – 200 μ l der Zellen wurde abhängig vom Plasmid auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin oder 30 μ g/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.11 Transformation in *H. salinarum*

Die Transformation von *H. salinarum* wurde mit einer modifizierten Methode nach (Cline *et al.*, 1989) durchgeführt. Die transformierten Plasmide trugen als Selektionsmarker eine der üblicherweise bei Halobakterien verwendeten Antibiotikum-Resistenzen. Dies war zum einen eine Resistenz gegen Mevinolin (*hmg*) (Lam & Doolittle, 1992) einem Inhibitor für die

HMG-CoA Reduktase oder zum anderen Novobiocin, welches in Halobakterien die Gyrase inhibiert (*gyrB*) (Holmes & Dyll-Smith, 1990).

Von einer frischen Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 wurden Aliquots von 1,5 ml in Reaktionsgefäße abgefüllt und bei 10.000 x g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Zelleniederschlag in 150 µl Spheroblasting Solution (SpS) resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl einer Mischung aus 15 µl Spheroblasting Solution und 15 µl EDTA pH 8,2 wurde der Ansatz bei RT für 10 min inkubiert. Daran schloss sich die Zugabe einer 1:1 Mischung von 5 µl DNA mit 5 µl Spheroblasting Solution an. Nach einer Inkubationsphase von 5 min bei RT, in der sich die DNA an die Zellmembran anlagert, wurden 190 µl einer 60 %-igen PEG₆₀₀-Lösung in SpS hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde sofort 3 - 4mal heftig invertiert, um eine lokale Überkonzentration an der Phasengrenzfläche zu vermeiden. Polyethylenglykol macht die Zellmembran für Plasmid-DNA durchlässig. Die Zellen wurden für 25 min inkubiert und mit 1 ml Growth-Medium gewaschen. Nach der Nährmediumzugabe und einem zweiminütigen Zentrifugationsschritt bei 10.000 x g wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und der Zelleniederschlag in 1 ml Growth-Medium vorsichtig resuspendiert. Über Nacht wurde der Ansatz bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Während dieses Zeitraums kam es zur Aktivierung von Antibiotika-Resistenzgenen. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g für 4 min wurde der Niederschlag in 150 µl des Überstandes resuspendiert. Auf Halo-Agarplatten mit Novobiocin (0,15 µg/ml Medium) oder Mevinolin (10 µg/ml Medium) wurden 50 µl X-Gal ausgestrichen und für 30 min im Brutschrank bei 37 °C erwärmt, um das Dimethylformamid abzdampfen. Nach dem Ausplattieren der Zellsuspension wurden die Platten bei 40 °C inkubiert.

Spheroblasting Solution (SpS):	2 M NaCl; 27 mM KCl; 50 mM Tris/HCl, pH 8,75; 15 % Saccharose (w/v); erst nach dem Autoklavieren zugegeben; ad 100 ml mit H ₂ O _{bidest}
Growth Medium (GM):	250 g NaCl; 20 g MgSO ₄ ; 4 g Na ₃ Citrat·2 H ₂ O; 2 g KCl; 6 g Bacto [®] Trypton; 2 g Bacto [®] Hefeextrakt; 150 g Saccharose; erst nach dem Autoklavieren zugegeben; ad 1 l mit H ₂ O _{bidest}
EDTA-SpS-Lösung:	1:1 Mischung von 0,5 M EDTA pH 8,3 und SpS; immer frisch zubereitet
60 % PEG ₆₀₀ in SpS:	600 µl PEG ₆₀₀ mit 400 µl SpS; wurde immer frisch zubereitet
X-Gal:	4% (w/v) in Dimethylformamid

2.3.12 Herstellung von Deletions-Stämmen

Im Folgenden wird die Herstellung der Deletions-Stämme R1Δ*pst1*, R1Δ*pst2*, R1Δ*ugp*, R1Δ*aphΔugp* und R1Δ*phoU4* in *H. salinarum* R1 beschrieben (siehe 2.1.1).

Um ein bestimmtes Gen zu entfernen wurde mit Hilfe eines dafür hergestellten Vektors gearbeitet. Die Strategie ist in Abb. 8 skizziert. Das sogenannte Deletionsplasmid enthält zwei zum halobakteriellen Genom homologe Sequenzen, die das zu deletierende Gen flankieren. Diese 400-600 bp großen Sequenzen, die stromaufwärts bzw. stromabwärts zum entsprechenden Gen liegen, wurden mit verschiedenen Schnittstellen versehen und in einer PCR amplifiziert. Die beiden PCR-Fragmente wurden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (siehe Tab. 1) geschnitten und danach ligiert.

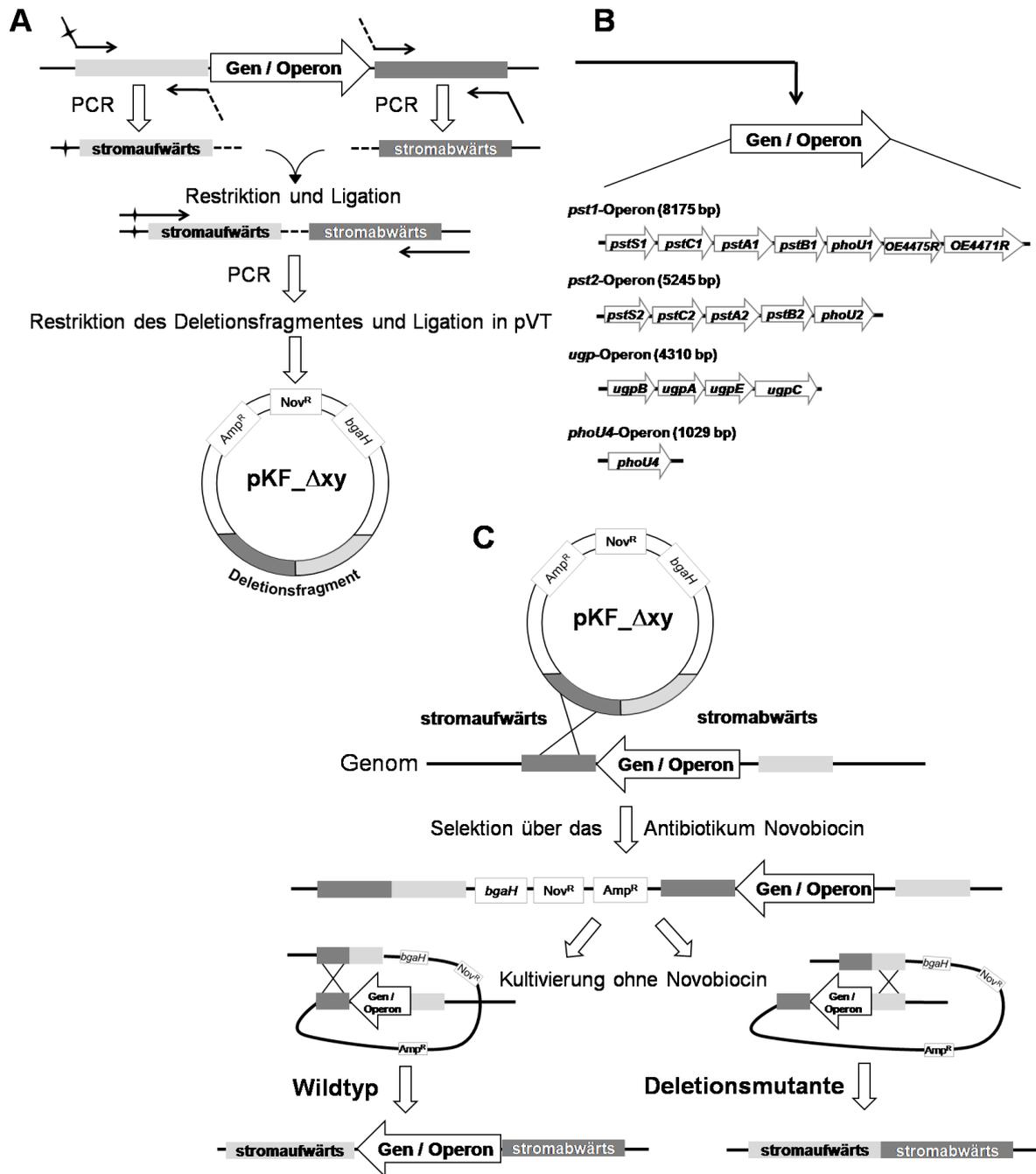


Abb. 8: Herstellung der Deletionsplasmide pKF_Δxy (A) zur *in-frame* Deletion durch homologe Rekombination (C) von bestimmten Genen bzw. Operons (B) in *H. salinarum*.

In zwei getrennten PCRs werden die flankierenden Bereiche des entsprechenden Gens bzw. Operons mit Primern, welche eine bestimmte Restriktionsschnittstelle aufweisen, amplifiziert. Es erfolgt eine Restriktion und Ligation der beiden PCR-Produkte. In einer dritten PCR wird das Ligationsprodukt mit den äußeren Primern der Sequenzen amplifiziert. Danach wird das Produkt restrigiert und in den pVT-Vektor ligiert um den entsprechenden Deletionsvektor pKF_Δxy zu erhalten. Durch Integration des Deletionsvektors in das halobakterielle Genom mittels homologer Rekombination und anschließender Desintegration des Deletionsvektors (C) wurden sowohl polycitronische Operons (z.B. *pst1* mit 8175 bp) als auch nur ein Gen (*phoU4* mit 1029 bp) deletiert (B). xy = bestimmtes zu deletierendes Gen oder Operon

In einer erneuten PCR wurde das nun ca. 1000 bp lange Fragment amplifiziert und dann mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten. Als Ausgangsvektor für die Konstruktion der Deletionsplasmide diente der Vektor pVT (siehe 2.1.2). Bei diesem Vektor handelt es sich um einen sogenannten "shuttle"-Vektor, der einen Replikationsursprung und einen Selektionsmarker für *E. coli* und einen Selektionsmarker für *H. salinarum* aufweist und damit in beiden Organismen verwendet werden kann. Der Vektor pVT wurde ebenfalls mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut, mit dem geschnittenen Deletionsfragment ligiert und dann in *E. coli* transformiert. Die ungefähr 1000 bp flankierenden Sequenzen auf dem Vektor stellen die homologen Sequenzen dar, an denen die Rekombinationsereignisse (*crossing overs*) stattfinden und der Vektor ins halobakterielle Genom integriert wird. Neben einem Ampicillin-Resistenzgen enthält der Vektor zusätzlich noch ein Gen, welches Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Novobiocin verleiht. Die Kultivierung von *H. salinarum* in Anwesenheit von Novobiocin erlaubt die Selektion der Zellen in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat.

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme zur Herstellung der Deletionsfragmente für verschiedene zu deletierende Operons.

Deletions-Stamm Restriktionsenzym	<i>Δpst1, Δpst2, Δugp</i>	<i>ΔphoU4</i>
Stromaufwärts 5'-Ende	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI
Stromaufwärts 3'-Ende	<i>Pst</i> I	<i>Xba</i> I
Stromabwärts 5'-Ende	<i>Pst</i> I	<i>Xba</i> I
Stromabwärts 3'-Ende	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III

Das Deletionsplasmid enthält das *bgaH*-Gen, welches für eine β -Galaktosidase kodiert. Ein Klon, der das Plasmid integriert hat erscheint in Anwesenheit von X-Gal blau. Ein blauer Klon wurde in einen 100 ml Kolben mit 35 ml Halo-Medium ohne Zusatz von Antibiotikum angeimpft. Daraus wurde nach einigen Tagen Inkubation (Schüttler: 42 °C; 100 rpm) wieder eine 35 ml Kultur angeimpft. Dieser Vorgang wurde 3mal wiederholt. Danach wurden aus der Kultur ca. 600 Zellen auf Halo-Platten mit 50 μ l X-Gal ausgestrichen.

Dazu wurde die OD₆₀₀ der Kultur bestimmt und eine entsprechende Verdünnung in Halo-Medium durchgeführt. Die angenommene Zellzahl/ml Kultur betrug 1×10^9 für eine OD₆₀₀ = 1,0. Das DMF wurde vor dem Ausstreichen der Zellen im Brutschrank bei 37 °C für 30 min abgedampft. Im Brutschrank wurden die Platten für ca. 10 Tage bei 40 °C inkubiert. Die Desintegration eines Deletionsplasmids aus dem halobakteriellen Genom kann entweder zurück zum Wildtyp (Revertante) führen oder die Deletion eines Genomabschnitts zur Folge haben. Zur Desintegration kommt es, wenn eine Transformantenkultur ohne Antibiotikum, d.h. ohne Selektionsdruck kultiviert wird. Kolonien, die das Plasmid verloren haben, erschienen rot. Diese roten Kolonien wurden gepickt und in 35 ml Halo-Medium angezogen. Zur Kontrolle, ob es sich um eine Revertante oder die gewünschte Deletions-Mutante handelt, wurde eine Kontroll-PCR (Primer siehe 2.1.3) und ein Southernblot (nächste Kapitel) durchgeführt.

2.3.13 Herstellung von *knockout*- und Überexpressions-Stämmen

Die Strategie der Herstellung der *knockout*- und Überexpressions-Stämme in *H. salinarum* R1 (siehe Kapitel 2.1.1) wird im Ergebnisteil in Kapitel 3.3.2 (*knockout*) und 3.6.2.1 (Überexpression) beschrieben. Die verwendeten Primer sind dem Kapitel 2.1.3, die Plasmide sind dem Kapitel 2.1.2 zu entnehmen. Um den integrierten *knockout*-Vektor in den *knockout*-Stämmen zu erhalten wurde dem Medium Novobiocin zugegeben. Die Überexpressions-Stämme dagegen wurden mit Mevinolin kultiviert.

2.3.14 Herstellung von Promotorfusions-Stämmen

Die Strategie der Herstellung der Promotorfusions-Stämme in *H. salinarum* R1 (siehe Kapitel 2.1.1) wird im Ergebnisteil in Kapitel 3.1.4.2 beschrieben. Die verwendeten Primerpaare zur Herstellung der einzelnen Plasmide werden in Kapitel 2.1.2 und 2.1.3 beschrieben. Für die verschiedenen Punktmutationen wurden Primer verwendet, die an bestimmter Stelle zufällig eingebaute Nukleotide enthielten. Siehe dazu in Kapitel 2.1.3 die Primer mit der Sequenz NNNN (Fettdruck). Über diesen zufälligen Einbau von Nukleotiden wurden diverse Punktmutationen hergestellt und durch eine Sequenzierung identifiziert. Zum Erhalt des integrierten Promotorfusions-Vektors in den Transformanten wurden die Stämme mit Mevinolin kultiviert.

2.3.15 Southernblot

Der Southernblot nach (Southern, 1975) ermöglicht den Nachweis einer Gensequenz in einem DNA-Gesamtgemisch eines Genoms. Die Fragmente, die eine gesuchte Sequenz enthalten, können innerhalb kurzer Zeit identifiziert werden. Der Southernblot wurde in Anlehnung an (Maniatis, 1982) durchgeführt. Zunächst wurden DIG-markierte DNA-Sonden hergestellt. In einer PCR wurden eine Sonde für die flankierende Sequenz und eine für das Gen bzw. Operon hergestellt, die mit DIG-11-dUTP (Roche) markiert wurden. Die Sonden-PCR wurde folgendermaßen angesetzt:

1 µl genomische DNA von <i>H. salinarum</i>
5 µl vorwärts-Primer (10µM)
5 µl rückwärts-Primer (10µM)
5 µl Vent-Polymerasenpuffer (5 x)
0,5 µl Vent-Polymerase
2 µl DIG-11-dUTP + 3 µl dNTP-Gemisch (10 mM) /
[5µl dNTP-Gemisch (10 mM) im Kontrollansatz]
28,5 µl Reinstwasser (Milli-Q)
50 µl

Die Herstellung der Sonden erfolgte im Thermocycler unter dem für die Vent[®]-Polymerase geeignetem Programm nach Herstellerangaben. Die Sonden-Aufreinigung erfolgte über ein

präparatives Agarosegel, die Gel-Banden wurden Verwendung des Gelextraction-Kit-Systems (Qiagen) extrahiert (2.3.1.4).

Die Auftrennung der verdauten DNA (Verdau siehe 2.3.3.2.2) erfolgte in einem 0,9 %igen Agarosegel (Lauf: 4 h bei 65 V). Als Größenstandard diente der DNA Molecular-Weight Marker II, DIG-labeled (Roche). Nach dem Lauf wurde das Gel für 5 min mit HCl-Waschpuffer inkubiert, um dabei die DNA zu depurinieren. Diesem Schritt schloss sich ein 30-minütiges Denaturieren der DNA mit NaOH-Waschpuffer an und danach weitere 30 min Neutralisierung im Neutralisierungspuffer. Anschließend wurde das Gel in eine Vakuumbloßanlage auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham Bioscience) übertragen. 10 x SSC-Puffer diente als Transferpuffer. Die DNA wurde durch eine UV-Fixierung auf der Blotting-Membran kovalent gebunden. Dazu wurde die Membran in einem UV-Crosslinker (UV-Stratalinker 2400) einer UV-Strahlung mit einer Leistung von 120.000 µJ /cm² exponiert.

Die Sondenhybridisierung erfolgte in einer Hybridisierungsflasche im Hybridisierungs-Rollofen 68 °C. Die Vorhybridisierung erfolgte für 60 min bei 68 °C. Die DIG-markierte Sonde wurde im Verhältnis 1:2 mit Formamid gemischt und bei 97 °C für 10 min denaturiert. Das Gemisch wurde in Hybridisierungslösung aufgenommen und in die Hybridisierungsflasche überführt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C im Rollofen.

Am nächsten Tag wurde zuerst zweimal für 20 min bei 25 °C mit Hybridisierungswaschpuffer I gewaschen und dann bei 68 °C für zwei weitere 30 min-Wasch-Schritte mit Hybridisierungswaschpuffer II gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 5 min mit Waschpuffer und 30 min mit Puffer 2 bei RT inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem DIG Luminescent Detection Kit nach den Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics). Das Alkalische Phosphatase-Fab Fragment (in Puffer 2) wurde für 30 Minuten bei RT mit der Membran inkubiert. Es folgten zwei Waschschrirte mit Waschpuffer und ein weiterer mit Puffer 3 (10 min, RT). Die Membranen wurden in Plastiktüten mit 1 ml CSPD[®]-Lösung beträufelt und eingeschweißt. Die Chemolumineszenz-Reaktion wurde mit einem Film detektiert und mittels Filmentwickler (Kodak) sichtbar gemacht.

HCl-Waschpuffer	0,25 M HCl in H ₂ O _{bidest}
NaOH-Waschpuffer	0,5 M NaOH, 1 M NaCl in H ₂ O _{bidest}
Neutralisierungswaschpuffer (4 °C)	0,5 M Tris/HCl pH 7,5 3 M NaCl
SSC (20 x)	3 M NaCl
Puffer 1	0,3 M Na ₃ Citrat 0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt
Blocking Solution	10 % (w/v) Blocking Reagent (Roche) in Puffer 1;autoklaviert
Stocklösung A	0,5 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2
Stocklösung B	14 % (w/v) SDS
Vorhybridisierungspuffer	1:1-Mischung aus Stocklösung A und B
Hybridisierungswaschpuffer I	0,1 % (v/v) SDS in SSC (2x)
Hybridisierungswaschpuffer II	0,1 % (v/v) SDS in SSC (0,1x)

2 Material und Methoden

Waschpuffer	0,3 % (v/v) Tween 20 in Puffer 1; frisch hergestellt
Puffer 2	10 % (v/v) Blocking Solution in Puffer 1; frisch hergestellt
Puffer 2 mit APh-Fab-Fragment	1:10.000 Anti-DIG-APh-Fab-Fragment in Puffer 2
Puffer 3	0,1 M Tris/HCl 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O auf pH 9,5 eingestellt
CSPD [®] -Lösung	1% (v/v) CSPD [®] in Puffer 3

2.3.16 Northernblot

Für die Northern-Analyse wurden 6 µg Gesamt-RNA aus *H. salinarum* in einem denaturierenden, 0,85 %igen Agarosegel mit Guanidiniumthiocyanat elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert ((Tarasov *et al.*, 2008) und www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/). Bevor die RNA mit der Sonde hybridisiert wurde, war darauf zu achten, nur autoklavierte und RNase-lose Reagenzien und Lösungen zu verwenden. Für die Northernblot-Analyse wurden nach der Sondenhybridisierung die gleichen Lösungen wie für die Southernblot-Analyse verwendet. Als Transferpuffer wurde 1 x TBE eingesetzt. Die auf die Nylonmembran transferierte RNA wurde im UV-Crosslinker (UV-Stratalinker 2400) fixiert. Um die Qualität und Quantität der RNA anhand der Bandenschärfe zu beurteilen, wurde sowohl das Gel als auch die Membran unter UV-Licht fotografiert. Die Detektion der RNA-Fragmente wurde mit spezifischen Digoxigenin-markierten Sonden durchgeführt, die analog zu den Sonden für den Southernblot hergestellt wurden. Die Vorhybridisierung erfolgte für 60 min bei 68 °C. 10 µl der DIG-markierten Sonde wurde in Hybridisierungslösung aufgenommen und zunächst 10 min 20 µl Formamid bei 97 °C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C. Die Membran wurde analog zur Prozedur, die im vorherigen Kapitel für den Southernblot beschrieben wurde, weiter behandelt. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem DIG Luminescent Detection Kit nach den Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics).

10 x TBE:	2 mM EDTA; 89 mM Borsäure; 89 mM Tris-Acetat, pH 8,0 ad H ₂ O _{DEPC}
RNA-Stocklösung A	0,5 M Na ₂ HPO ₄ (pH 7,2) _{DEPC}
RNA-Stocklösung B	14 % (w/v) SDS _{DEPC}
RNA-Vorhybridisierungspuffer	1:1-Mischung aus Stocklösung A und B

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität

Die Regulation der halobakteriellen Genexpression kann mit Hilfe des Reportergens *bgaH*, das für ein halobakterielles Protein mit β -Galaktosidase-Aktivität aus dem halophilen Archaeon *Haloferax lucentensis* (früher *Haloferax alicantei*) kodiert, studiert werden (Holmes *et al.*, 1997). Das Enzym stammt aus einer durch UV-Mutagenese gewonnenen Überproduktions-Mutante, wurde kloniert (Holmes & Dyll-Smith, 2000) und als Reportergen für Promotorstudien bereits erfolgreich bei *H. salinarum* (Patenge *et al.*, 2000) und *Haloferax volcanii* (Gregor & Pfeifer, 2001) eingesetzt.

Die BgaH katalysiert analog zu dem Enzym β -Galaktosidase aus *Escherichia coli*, das von dem bekanntesten Reportergen *lacZ* kodiert wird, die Hydrolyse von β -glykosidischen Bindungen. Die β -Galaktosidase kann auch β -glykosidische Bindungen unnatürlicher Substraten wie ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) oder X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- β -D-Galaktosid) hydrolysieren. Die Hydrolyseprodukte von ONPG bzw. X-Gal sind Galaktose und ONP (Ortho-Nitrophenolat) bzw. 5-Bromo-4-chloro-indigo. Beim Reportergensystem wird der Leserahmen des *bgaH*-Gens hinter den zu untersuchenden Promotor fusioniert. Auf Agarplatten, die zuvor mit X-Gal bestrichen wurden, erscheinen die Transformanten in verschiedenen Blautönen, die auf das Hydrolyseprodukt 5-Bromo-4-chloro-indigo zurückzuführen sind. Die β -Galaktosidaseaktivität wird dann im Lysat der entsprechenden Transformanten gemessen. Das Hydrolyseprodukt ONP färbt sich gelb und kann photometrisch gemessen werden, da es Licht mit einer Wellenlänge von 405 nm absorbiert. Die spezifische Aktivität eines Promotors kann gemessen werden in β -Galaktosidase-Einheiten (=Units) über die Absorption pro Zeiteinheit.

2.4.1.1 X-Gal-Test

Die β -Galaktosidase-Aktivität in *Halobacterium salinarum* pReport-Transformanten (mit Promotorfusionskonstrukt), die auf Agarplatten ausgestrichen waren, konnte mit X-Gal (5-Bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galaktosid) sichtbar gemacht werden. Die Platten wurden dazu zusätzlich mit X-Gal (10 mg/ml in Dimethylformamid) ausgestrichen. Kolonien, welche sich blau färbten hatten β -Galaktosidase-Aktivität, die ohne nachweisbare Enzymaktivität blieben rot.

2.4.1.2 ONPG-Enzymtest

Die β -Galaktosidase-Aktivität in *H. salinarum*-Zellysaten von pReport-Transformanten-Stämmen wurde mit dem ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid)-Test nach Angaben von (Holmes *et al.*, 1997) untersucht. Hierzu wurden 500 bis 3000 μ l (je nach β -Galaktosidase-Aktivität) der jeweiligen Transformanten-Kultur entnommen und für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 100 μ l Basalsalz (HM ohne Pepton, siehe 2.1.7.2) resuspendiert. Zur Lyse wurden 100 μ l 2% Triton X-100 und 700 μ l (800 μ l für die Negativkontrolle) ONPG-Testpuffer zugegeben und kräftig am Vortexer vermischt. Nach Zugabe von 100 μ l ONPG-Lösung zu den Proben, erneutem Mischen und einer Inkubation von 5 min bei RT, wurde die enzymatische Reaktion als Absorptionsänderung pro Zeiteinheit ($\Delta A/\Delta t$) photometrisch bei 405 nm verfolgt. Der Wert der Negativkontrolle wurde von den Probenwerten abgezogen. Ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz (siehe unten) kann die Volumenaktivität als Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit ($\Delta c/\Delta t$) in 1 ml berechnet werden.

$$\text{Lambert-Beersche Gesetz: } \frac{\Delta A}{\Delta t} = \varepsilon * d * \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

A = Absorption

ε = molarer Absorptionskoeffizient [$l * cm^{-1} * mol^{-1}$]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

c = Konzentration [$mol * l^{-1}$]

Der molare Extinktionskoeffizient ε für ONP bei 405 nm beträgt $3,3 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ und die Schichtdicke d der Küvette beträgt 1 cm. Eine Einheit (1 U) der β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die die Hydrolyse von 1 μ mol ONPG pro Minute katalysiert. Durch Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt (siehe 2.4.3) kann die spezifische Aktivität in Units pro mg Gesamtprotein [U/mg] berechnet werden.

2% Triton X-100:	1ml Triton X-100 in 49 ml H ₂ O
ONPG-Testpuffer:	2,5 M NaCl 10 μ M MnCl ₂ 0,1% β -Mercaptoethanol (frisch zugegeben) 50 mM Tris/HCl, pH 7,2
ONPG-Lösung:	8 mg/ml ONPG in ONPG-Testpuffer

2.4.2 Herstellung von Rohextrakten zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Es wurden zu jeder Messung der β -Galaktosidase-Aktivität von pReport-Stämmen 0,5 ml Kultur abgenommen und für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Zellniederschläge wurden in 200 μ l TED-Puffer resuspendiert, für 30 min bei RT inkubiert und 50 μ l im BCA-Assays eingesetzt, mit Hilfe dessen die Proteinkonzentration bestimmt werden konnte.

TED-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH8
1 mM EDTA
1 µg/ml DNase

2.4.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels BCA-Assay

Die Konzentration von Proteingemischen in halobakteriellen Rohextrakten wurde mit der Bicinchonsäure(BCA)-Methode bestimmt. Hierzu wurde der BCA Protein Assay Kit (Novagen) eingesetzt. Nachdem 50 µl der Proteinlysate in ein Eppendorfgesäß gegeben wurden, folgte die Zugabe von 1 ml BCA-Testreagenz. Die Lösungen wurden sorgfältig gemischt und 30 min auf dem Thermoblock bei 37 °C inkubiert. Danach folgte die photometrische Bestimmung bei 562 nm. Als Eichreihe diente Rinderserumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 1000/500/250/125/25 und 0 µg/ml. Die Durchführung folgte den Angaben des Herstellers.

2.4.4 Aktivitätsmessungen der Alkalischen Phosphatase

Die Phosphatase-Aktivitäten von Proben wurden durch Spaltung von para-Nitrophenylphosphat (pNpp) bei pH 10 gemessen, was dem Aktivitätsoptimum der Alkalischen Phosphatase aus *H. salinarum* entspricht (Wende, 2006). Die Reaktion setzt den gelben Farbstoff p-Nitrophenolat frei, dessen Konzentration durch Absorptionsmessung bei 405 nm bestimmt werden kann. Es wurden pro Ansatz 100 µl Probe mit 500 µl Messpuffer gemischt und 10 min bzw. bis zu einer sichtbaren Gelbfärbung bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl Stopplösung abgebrochen, die Zeit notiert und die Absorption des Gemisches nach Zentrifugation (1,5 min bei 12.000 rpm) bei 405 nm gemessen.

Berechnung der Enzymaktivität:

$$\text{Aktivität [U/min]} = \frac{A_{405} \cdot \text{Messvolumen [ml]} \cdot 1000}{\text{Inkubationszeit[min]} \cdot 18,5 \cdot \text{Probenvolumen [ml]}}$$

Stopplösung: 0,5M NaOH; ad 100ml H₂O_{bidest}; steril
filtriert
Messpuffer: 0,1M Glycin; 0,1M NaCl; 5mM pNpp; ad
200ml H₂O_{bidest}; NaOH, pH 10; steril
filtriert; Lagerung: 4 °C

2.4.5 Phosphat-Aufnahme-Test mit Na₂HPO₄

Zellen von *H. salinarum* wurden aus Halomedium in synthetisches Medium ohne Phosphat (SMOP) überführt und für 48 h bei 42 °C und 100 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 wurde P_i (0 μM, 5 μM und 1 mM Na₂HPO₄) zur Zellkultur gegeben. In bestimmten Zeitintervallen (5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 210 min, 240 min und 360 min) wurde die intrazelluläre Phosphatkonzentration gemessen (siehe 2.4.6). Der Versuch wurde in Triplikaten angesetzt und für drei biologische Replika wiederholt.

2.4.6 Messung intrazellulärer Phosphatkonzentrationen

Die intrazellulären Phosphatkonzentrationen von *H. salinarum*-Zellen wurden komplexometrisch bestimmt basierend auf der Methode von (Baginski *et al.*, 1967) in Anlehnung an (Wende, 2006). Man nutzt dazu die Eigenschaft von Molybdänionen aus, im Sauren unter reduzierenden Bedingungen mit Phosphationen einen intensiv blauen Komplex zu bilden. Die Zellen (0,5 - 1 ml) wurden zunächst zentrifugiert und der Niederschlag mit 0,5 ml Basalsalz (Halomedium ohne Pepton, siehe 2.1.7.2) gewaschen und abschließend in 0,25 ml Basalsalz resuspendiert. Diese Suspension wurde in eine Mischung aus 0,5 ml kaltem Stopmix + 0,25 ml Basalsalz gegeben und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 0,5 ml in 0,25 ml Messlösung gegeben und gemischt. Nach 10 min Inkubation bei RT erfolgte die Messung der Absorption bei 691 nm. Zuvor wurde eine Standardkurve mit bekannten Phosphatkonzentrationen erstellt und anhand dieser die Phosphatkonzentration der gemessenen Gesamtlösung bestimmt. Da Zelldichte (OD₆₀₀) und eingesetztes Volumen bekannt waren, ließ sich daraus die Phosphatmenge pro Zellvolumen bestimmen.

Die Berechnung des Zellvolumens erfolgte nach (Koch & Oesterhelt, 2005).

$$\text{Zell-Phosphat [mM]} = \frac{\text{Phosphat in Gesamtlösung [mM]} \cdot 6 \cdot 250\mu\text{l}}{\text{Zellvolumen } [\mu\text{l}]}$$

$$\text{Zellvolumen } [\mu\text{l}] = \text{OD}_{600} \cdot \text{Probenmenge [ml]} \cdot 1,4$$

Stopmix:	15% Trichloressigsäure; 5% Ascorbinsäure; ad 100ml H ₂ O _{bidest} ; steril filtriert; Lagerung: 4 °C
Messlösung:	1% Ammoniummolybdat; ad 100ml H ₂ O _{bidest} ; steril filtriert

2.4.7 Phosphat-Aufnahme-Test mit $^{32}\text{P}_i$

Die Durchführung des $^{32}\text{P}_i$ -Aufnahmeversuchs stellt eine Modifizierung der Prozedur, die in *E. coli* und *B. subtilis* verwendet wurde, dar (Cox *et al.*, 1981, Qi *et al.*, 1997, Steed & Wanner, 1993, Willsky & Malamy, 1980a).

H. salinarum-Zellen wurden aus Halomedium in synthetisches Medium ohne Phosphat (SMOP) überführt und für 48 h bei 42 °C und 100 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 wurden die Zellen geerntet und für den Phosphataufnahme-Versuch verwendet. Dieser Versuch wurde mit Hilfe einer Vakuumfilter-Trommel (Sampling Manifold, Millipore) durchgeführt. Die P32-Phosphorsäure ($^{32}\text{P}_i$) wurde von Hartmann Analytic bezogen.

Verschiedene $^{32}\text{P}_i$ -Konzentrationen (0,05 bis 10 µM) wurden zu je einer 5 ml-Kultur gegeben. Anschließend wurden in mehreren 30 sec-Zeitintervallen (0 bis 3 min) 250 µl Zellen auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm Porengröße; Sartorius) überführt und mit 5 ml einer 1 mM P_i -Basalsalz-Lösung in der Vakuumfilter-Trommel gewaschen. Die Membranen wurden für 48 Stunden in 10 ml RotiScint-Lösung (Roth) aufgelöst und anschließend in einem β -Zähler (*Tri-Carb 2100TR liquid scintillation analyzer*) die Radioaktivität [cpm] gemessen.

Proben mit bekannter Phosphatmenge wurden als Standard für die Berechnung der P_i -Konzentration eingesetzt. Die Konzentration wurde in Zell- P_i [nM] umgerechnet. Die Enddaten stellten das arithmetische Mittel dreier Messungen aus drei unabhängigen Experimenten dar.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es zunächst drei phosphatabhängig regulierte Operons *pst1*, *pst2* und *ugp* durch die Definition ihrer Transkriptionseinheit und die eingehendere Untersuchung ihrer Promotorbereiche zu charakterisieren. Im Folgenden wurde die Translationseffizienz der *pst1*-mRNA mit bzw. ohne *leader*-Sequenz in Abhängigkeit von Phosphat verglichen. Die Konstruktion verschiedener Knockout-Mutanten ermöglichte sowohl die kinetische Charakterisierung der ABC-Transporter Pst1 und Pst2 sowie eine Bestätigung der vermuteten Funktion des ABC-Transporters Ugp. Zudem wurde das phosphatgerichtete chemotaktische Verhalten der Deletions-Mutanten des Pst1- und Pst2-Transporters untersucht. Darüber hinaus wurde ein regulatorisches Protein gesucht, welches an der Regulation der phosphatabhängig regulierten Gene, der Gene des Phosphat-Stimulons (PHO), beteiligt ist.

3.1 Charakterisierung der Operons *pst1*, *pst2* und *ugp* in *Halobacterium salinarum*

Archaeale Gene können sowohl in mono- als auch in polycistronischen Operons vorliegen. Eine *in silico* Analyse ließ vermuten, dass die jeweils ersten vier Gene der Gencluster *pst1*, *pst2* und *ugp* die einzelnen Komponenten der phosphatabhängigen ABC-Transportsysteme Pst1, Pst2 und Ugp kodieren. Da diese Gencluster aus mindestens vier nahe beieinander liegenden Leserahmen bestehen, lag die Vermutung nahe, dass es sich um polycistronische Operons handelt.

Der erste Teil der Arbeit behandelt die Bestimmung der Transkriptionseinheiten der Gencluster *pst1*, *pst2* und *ugp*. Darauf aufbauend wurden die Transkriptionsstarts in deren Promotorbereichen identifiziert und diese Promotoren mit Hilfe des *bgaH*-Reportersystems eingehender untersucht.

3.1.1 *In silico* Analyse der Gencluster *pst1*, *pst2* und *ugp*

Zu Beginn wurde eine *in silico* Untersuchung der ABC-Transporter Pst1, Pst2 und Ugp von *H. salinarum* durchgeführt, um die Genorganisation im halobakteriellen Genom und die vorausgesagte Lokalisation der Proteine in der Zelle zu analysieren. Ausgehend davon konnte eine Versuchsstrategie zur Charakterisierung der Gencluster und zur Vorgehensweise bei der *in-frame* Deletion der Operons entwickelt werden.

Durch Sequenzierung und Annotation des Genoms von *Halobacterium salinarum* R1 (Pfeiffer *et al.*, 2008) (www.halolex.mpg.de) wurden zwei Genkopien eines *pst*-Operons (*pst1* und *pst2*) bzw. eine Genkopie eines *ugp*-Operons gefunden, die für Proteine kodieren, die zu den aus Bakterien bekannten ABC-Transportsystemen Pst und Ugp homolog sind.

Die Definitionen der verwendeten Begriffe Gencluster, Gen, Operon und Transkriptionseinheit sind in der Einleitung (1.4) zu finden.

Die Leserahmen der Gene der Gencluster *pst1*, *pst2* und *ugp* von *H. salinarum*, die in Tab. 2 gelistet werden, liegen in dieselbe Richtung orientiert nebeneinander oder überlappen sich. Sie stellen dadurch mögliche polycistronische Operons dar. Tab. 2 fasst neben den verschiedenen Genen bzw. Proteinen, die zu den Genclustern *pst1*, *pst2* und *ugp* gehören, auch Informationen über deren Lage im Genom, deren Lokalisation in der Zelle und massenspektrometrische (MS) Analysen zusammen. Letztere geben Auskunft über den momentanen Status der Identifikation des entsprechenden Genprodukts bei den durchgeführten MS-Analysen des halobakteriellen Proteoms in der Abteilung von Prof. Oesterhelt (MPI für Biochemie).

Das *pst1*-Gencluster in *H. salinarum* umfasst sieben nahe beieinander liegende Gene (*pstS₁C₁A₁B₁-phoU₁-OE4475R-OE4471R*), das *pst2*-Gencluster fünf Gene (*pstS₂C₂A₂B₂-phoU₂*) (siehe Tab. 2 und Abb. 9B).

Die vermutete Topologie der ABC-Transporter Pst1 und Pst2 wird in Abb. 9A gezeigt und ist analog zum System aus *E. coli* (Einleitung, Abb. 5) aus jeweils 4 Komponenten zusammengesetzt. Es enthält ein periplasmatisches P_i-Bindeprotein (PstS), zwei integrale innere Membranproteine (PstA und PstC) und ein ATP-Bindeprotein (PstB). Darüber hinaus besitzt sowohl das System Pst1 als auch Pst2, analog zu *E. coli* (Steed & Wanner, 1993), *Pseudomonas aeruginosa* (Nikata *et al.*, 1996), *Clostridium acetobutylicum* (Fischer *et al.*, 2006) oder *Sinorhizobium meliloti* (Yuan *et al.*, 2006), ein PhoU-Protein.

Tab. 2: Liste der Gene der Gencluster *pst1*, *pst2* und *ugp* in *H. salinarum*.

Chr = Chromosom; MS = Ergebnisse der Peptide Mass Fingerprint Analyse.

Code*	Gen-Name*	Proteinname*	Region*	Lokalisation*	MS-Status*
OE1674R	<i>phoU2</i>	Transkriptionsregulator (homolog zu Phosphataufnahme-Regulator)	338644-339333/R (Chr)	Cytoplasmatisch	gesichert
OE1675R	<i>pstB2</i>	ABC-Typ-Transportsystem ATP-Bindeprotein	339330-340175/R (Chr)	Cytoplasmatisch	gesichert
OE1676R	<i>pstA2</i>	ABC-Typ-Transportsystem Permeaseprotein	340182-341882/R (Chr)	Transmembran	gesichert
OE1678R	<i>pstC2</i>	ABC-Typ-Transportsystem Permeaseprotein	341884-342843/R (Chr)	Transmembran	gesichert
OE1679R	<i>pstS2</i>	ABC-Typ-Transportsystem periplasmatisches Substrat-Bindeprotein (Substrat vermutlich Phosphat)	342899-343933/R (Chr)	Lipidanker, N-terminal	gesichert
OE4471R	-	Protein mit Helikasedomäne	1841696-1843489/R (Chr)	Cytoplasmatisch	fraglich
OE4475R	-	Konserviertes hypothetisches Protein	1843521-1843721/R (Chr)	Cytoplasmatisch	gesichert
OE4476R	<i>phoU1</i>	Transkriptionsregulator (homolog zu Phosphataufnahme-Regulator)	1843764-1844882/R (Chr)	Cytoplasmatisch	fraglich
OE4479R	<i>pstB1</i>	ABC-Typ-Transportsystem ATP-Bindeprotein	1844968-1846005/R (Chr)	Cytoplasmatisch	gesichert
OE4480R	<i>pstA1</i>	ABC-Typ-Transportsystem Permeaseprotein	1845998-1847602/R (Chr)	Transmembran	unge-sichert
OE4483R	<i>pstC1</i>	ABC-Typ-Transportsystem Permeaseprotein	1847602-1848717/R (Chr)	Transmembran	gesichert
OE4485R	<i>pstS1</i>	ABC-Typ-Transportsystem periplasmatisches Substrat-Bindeprotein (Substrat vermutlich Phosphat)	1848761-1849900/R (Chr)	Lipidanker, N-terminal	gesichert
OE5166F	<i>ugpB</i>	ABC-Typ-Transportsystem periplasmatisches Substrat-Bindeprotein (Substrat vermutlich Glycerin-3-phosphat)	96574-97965/F (Plasmid 3)	Lipidanker, N-terminal	gesichert
OE5168F	<i>ugpA</i>	ABC-Typ-Transportsystem Permeaseprotein	97977-98870/F (Plasmid 3)	Transmembran	-
OE5169F	<i>ugpE</i>	ABC-Typ-Transportsystem Permeaseprotein	98860-99738/F (Plasmid 3)	Transmembran	-
OE5170F	<i>ugpC</i>	ABC-Typ-Transportsystem ATP-Bindeprotein	99744-100883/F (Plasmid 3)	Cytoplasmatisch	-

*Quelle: www.halolex.mpg.de

Sowohl das *pst1*- als auch *pst2*-Gencluster enthalten nicht-kodierende Bereiche zwischen den Genen, die lang genug sind, um eine Promotorsequenz enthalten zu können. Beim *pst1*-Gencluster werden die Leserahmen der einzelnen Gene von vier nicht-kodierenden Bereichen unterbrochen: zwischen *pstS₁* und *pstC₁* liegen 43 bp, zwischen *pstB₁* und *phoU₁* sind es 85 bp, zwischen *phoU₁* und *OE4475R* sind 42 bp und zwischen *OE4475R* und *OE4471R* liegen 27 bp.

Es konnte keine Konsensussequenz des TATA-Box Motivs in diesen Bereichen gefunden werden, was dafür sprechen könnte, dass der Promotor der Transkriptionseinheit stromaufwärts des *pstS*₁ liegt, wo sich ein solches Motiv befindet.

Anders verhält es sich beim *pst2*-Gencluster. Hier ist ein einziger 55 bp-langer nicht-kodierender Bereich, der ein putatives TATA-Box-Motiv enthält, vorhanden, und somit könnte das Gencluster zwei Transkripte beinhalten. Auf die Promotorbereiche der Gencluster *pst1* und *pst2* wird in Kapitel 3.1.4.1 näher eingegangen.

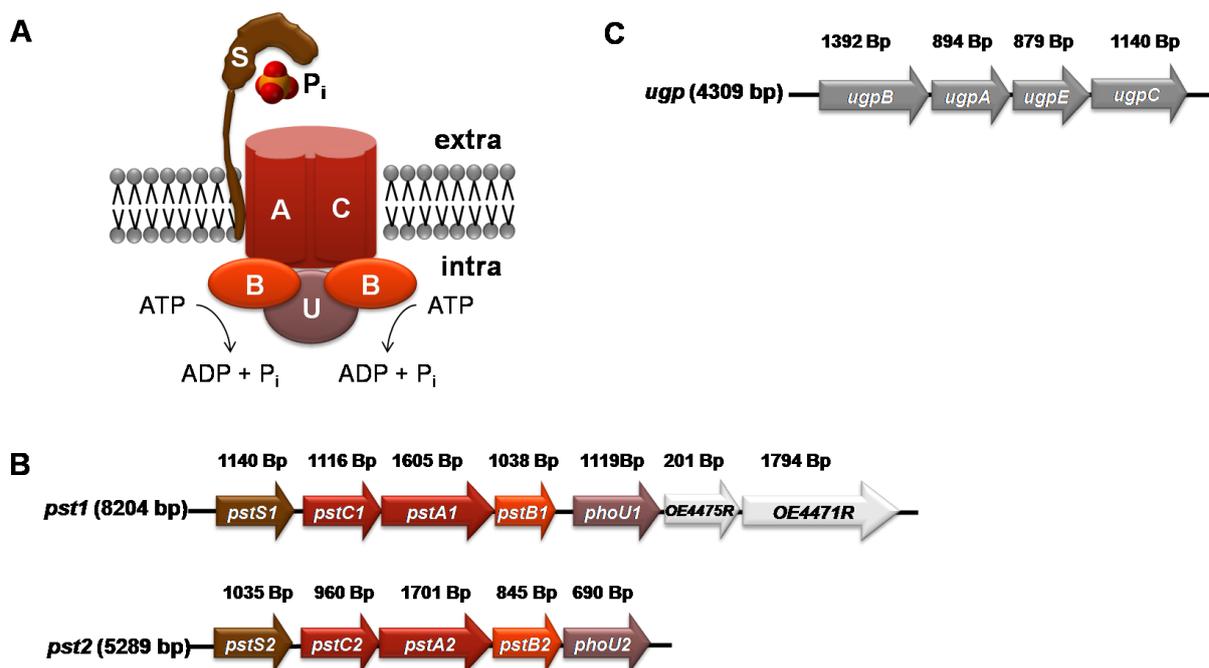


Abb. 9: Vermutete Topologie des ABC-Transporters Pst1 oder Pst2 (A), genetische Karte des *pst1*-, *pst2*- (B) und *ugp*-Genclusters (C).

Die Gene *pstS1* und analog dazu *pstS2* (= S, braun) kodieren für das extrazelluläre Phosphat (P_i)-Bindeprotein, *pstC1* und *pstC2* (= C, rot), sowie *pstA1* und *pstA2* (= A, rot) für die in der Membran verankerte Permease-Domäne und *pstB1* und *pstB2* (= B, orange) für das cytoplasmatische ATP-Bindeprotein. *phoU1* und *phoU2* (= U, violett) kodieren für ein dem *phoU* aus *E. coli* homologes Protein. *OE4475R* und *OE4471R* kodieren für Proteine mit bisher unbekannter Funktion. Das Gen *ugpB* kodiert für das extrazelluläre Glycerin-3-Phosphatbindeprotein, *ugpA* und *ugpE* für die in der Membran verankerte Permease-Domäne und *ugpC* für das cytoplasmatische ATP-Bindeprotein. Die jeweiligen Gene sind als Blockpfeile dargestellt und darüber ist ihre jeweilige Länge angegeben (B + C). Das anorganische Phosphat (P_i) ist als Molekül dargestellt.

Das *ugp*-Gencluster (*ugpBAEC*) von *H. salinarum* besteht aus 4 Genen (siehe Abb. 9C).

Die nicht-kodierenden Regionen des *ugp*-Genclusters beschränken sich auf einen 11 bp kurzen Bereich zwischen *ugpB* und *ugpA* und einen 5 bp kurzen zwischen *ugpE* und *ugpC*.

Da ein Promotor mit basalen *cis*-aktiven Regulationssequenzen (TATA-Box und BRE-Element) etwa 40 bp lang ist (1.5.1), sind die zwischen den Leserahmen der Gene

liegenden Bereiche zu kurz um eine Promotorsequenz zu enthalten. Dies ist ein Indiz dafür, dass es sich bei dem *ugp*-Gencluster um ein polycistronisches Operon handelt und der Promotor stromaufwärts des *ugpB*-Gens liegt (siehe Abb. 9C). In dieser Promotorregion konnte ein TATA-Box-Motiv vorhergesagt werden (siehe Kapitel 3.1.4.1).

Die *in silico* Analyse ergab, dass es sich beim *ugp*-Gencluster um ein polycistronisches Operon handeln muss, wohingegen die in Tab. 2 aufgeführten Gene der Gencluster *pst1* und *pst2* in mehrere Transkripte aufgeteilt sein könnten. Die experimentelle Bestimmung der Transkriptionseinheiten stellte die Grundlage für weitere Versuche dar, wie der Charakterisierung der Promotoren und der Deletion der definierten Operons.

3.1.2 Bestimmung der Transkriptionseinheiten *pst1* und *pst2* mittels RT-PCR

Entsprechend dem *pst*-Operon aus *E. coli* (Aguena *et al.*, 2002) und dem aus *B. subtilis* (Qi *et al.*, 1997) könnte es sich auch bei den Genclustern *pst1* und *pst2* aus *H. salinarum* um polycistronische Operons handeln. Diese These sollte durch die Bestimmung der Transkriptionseinheiten mit Hilfe der Methode der reversen Transkription und anschließender Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) überprüft werden.

Diese Methode (siehe 2.3.5.2.1) wurde bereits zur Bestimmung transkriptioneller Einheiten wie z.B. der des *fla*-Genclusters verwendet, für das eine Transkriptlänge von ca. 7830 bp für das *fla*-Operon bestimmt wurde (Patenge *et al.*, 2001)

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus *H. salinarum* R1 Wildtyp-Zellen, die sowohl unter phosphatgesättigten (phosphathaltiges Medium HM; +P_i) als auch phosphatlimitierten (phosphatfreies Medium SMOP; -P_i) Bedingungen kultiviert wurden, isoliert (siehe 2.2.2 und 2.3.1.5). Es folgte eine reverse Transkription mit jeweils einem für das *pst1*- bzw. *pst2*-Gencluster spezifischen Oligonukleotid das in Abb. 10 jeweils als kleiner Pfeil dargestellt ist. Das jeweilige Oligonukleotid setzt im Leserahmen des letzten Gens des Genclusters (*OE4471R* bzw. *phoU₂*) in Gegensinn-Richtung (*antisense*) an. Die synthetisierte cDNA ist in Abb. 10 als unterbrochene Linie dargestellt. Der Anfang des 3'-Endes ist noch nicht bekannt und wird daher offen (\\) gezeigt.

Die Amplifikation aller gendurchspannenden PCR-Fragmente, in denen die nicht-kodierenden Bereiche enthalten sind, wäre ein Indiz dafür, dass es sich um ein einziges Transkript handelt. Neben der oben beschriebenen cDNA als Matrize für die PCR, wurden hierfür

Oligonukleotide so konstruiert, dass sie jeweils im Leserahmen eines Gens ansetzen und im Leserahmen des stromabwärts gelegenen aufhören (Abb. 10A: PCR-Produkte II-VII; B: PCR-Produkte II-V). Die erwarteten PCR-Produkte enthalten den nicht-kodierenden Bereich zwischen zwei Leserahmen des Genclusters in etwa der Mitte. Die relative Lage der PCR-Produkte I-VII (*pst1*) bzw. I-V (*pst2*) im jeweiligen Gencluster ist in Abb. 10A bzw. Abb. 10B durch graue Striche angezeigt.

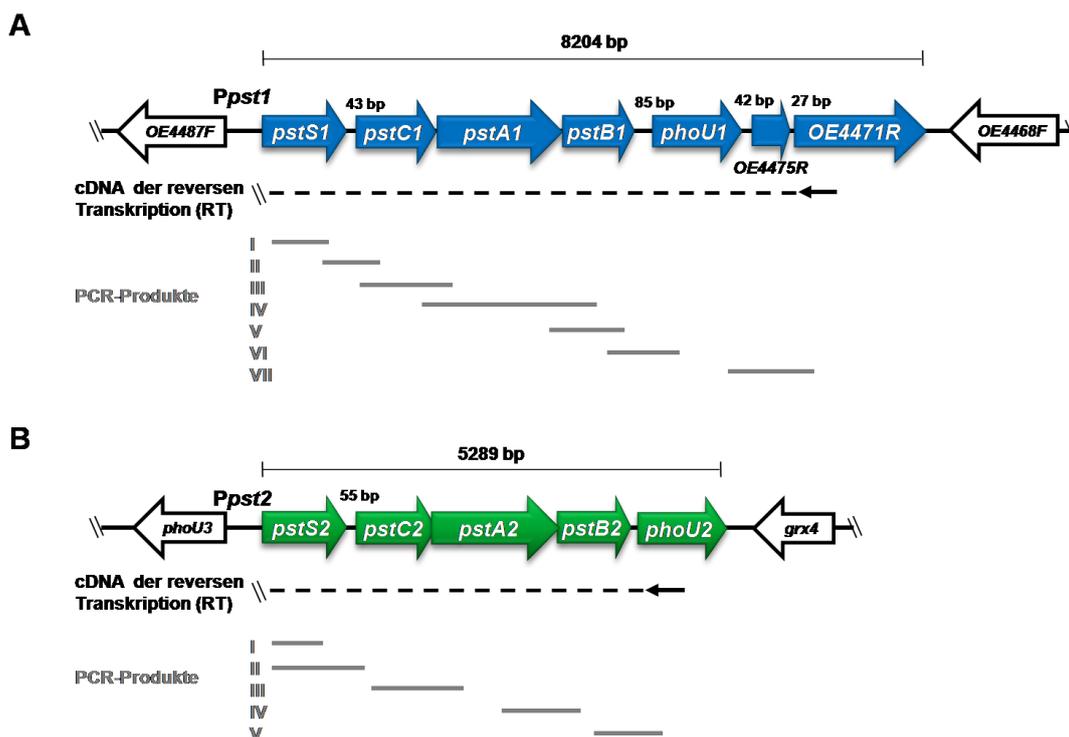


Abb. 10: RT-PCR-Analyse der Gencluster *pst1* (A) und *pst2* (B).

Die isolierte Gesamt-RNA aus *H. salinarum* wurde mit spezifischen Oligonukleotiden (als kleine Pfeile dargestellt) einer reversen Transkription (RT) unterzogen. Die daraus gewonnenen cDNAs (gezeigt als unterbrochene Linien mit unbekanntem 3'-Ende) wurden als Ausgangsmatrizen für PCR-Reaktionen verwendet. Es konnten alle gendurchspannenden Fragmente des *pst1*- und *pst2*-Genclusters aus der jeweiligen cDNA amplifiziert werden. Die relativen Positionen und Längen der PCR-Produkte I-VII für *pst1* (A) und I-V für *pst2* (B) sind als graue Linien dargestellt. Das *pst1*-Gencluster enthält 7 Gene (*pstS₁C₁A₁B₁-phoU₁-OE4475R-OE4471R*), das *pst2*-Gencluster 5 Gene (*pstS₂C₂A₂B₂-phoU₂*). Die Gene des *pst1*-Genclusters sind als blaue Blockpfeile, die des *pst2*-Genclusters als grüne Blockpfeile gezeigt. Die Länge der nicht-kodierenden Bereiche zwischen den Leserahmen der Gene ist in bp angegeben. Der mögliche Promotorbereich des polycistronischen *pst1*- bzw. *pst2*-Operons ist als *Ppst1* (A) bzw. *Ppst2* (B) angezeigt. Die flankierenden Gene (als offene Blockpfeile dargestellt) des *pst1*-Genclusters sind *OE4468F* und *OE4487F*, des *pst2*-Genclusters *grx4* und *phoU3*. Die Größe der Gencluster ist über dem Abstandsbalken angegeben.

Abb. 11 zeigt die Gelbilder der amplifizierten PCR-Fragmente für das *pst1*- und *pst2*-Gencluster basierend auf der +P_i-cDNA. Es konnten alle gendurchspannenden Fragmente in erwarteter Fragmentgröße amplifiziert werden. Unter Verwendung der

-P_i-cDNA wurde dasselbe Ergebnis erzielt (Gelbilder werden nicht dargestellt). Als Ausgangsmatrizen der Amplikons wurde genomische DNA (Positivkontrolle), Gesamt-RNA (Negativkontrolle) und cDNA verwendet. Die erwarteten Fragmentlängen sind in Abb. 11 in der Legende aufgelistet. Die Sequenzidentität der PCR-Produkte wurde nach Gelextraktion durch Sequenzierung bestätigt.

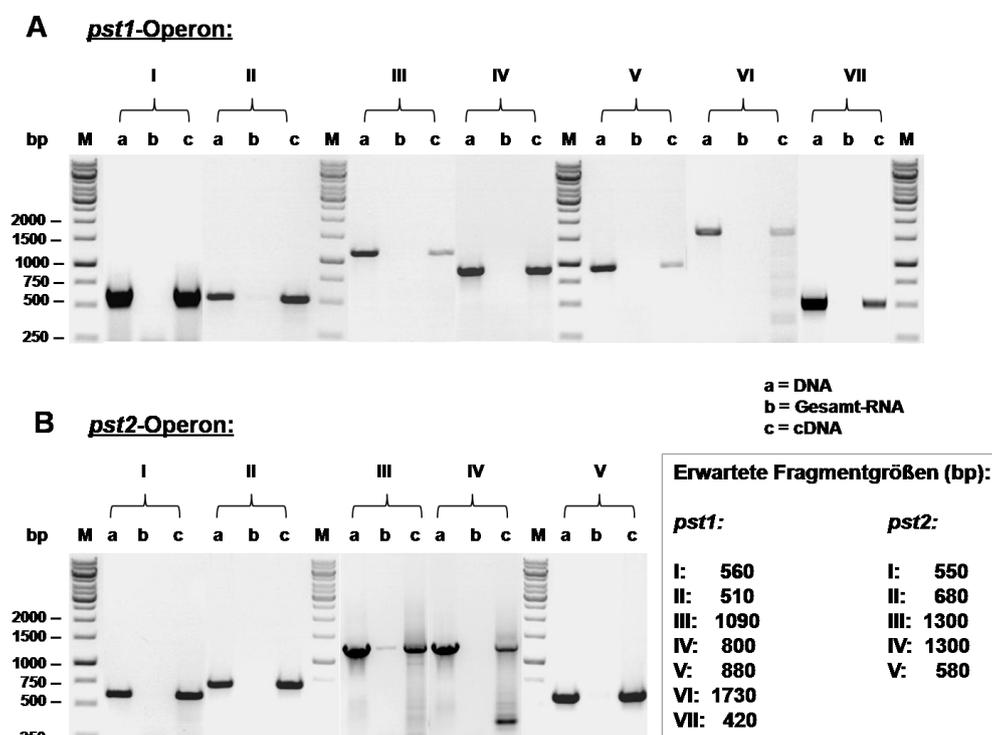


Abb. 11: Analyse der PCR-Produkte für das *pst1*- (A) und *pst2*-Gencluster (B) durch Agarosegel-Elektrophorese.

Die schematische Darstellung der PCR-Produkte wurde bereits (unter Verwendung des gleichen Buchstabencodes) in Abb. 10 gezeigt. Als Ausgangsmatrizen für die PCR-Produkte wurden genomische DNA (Positivkontrolle) (a), Gesamt-RNA (Negativkontrolle) (b) und cDNA (c) verwendet. Gezeigt werden die PCR-Produkte mit cDNAs (+P_i). Die erwarteten Fragmentlängen (siehe Kasten) der PCR-Produkte I-VII für *pst1* (A) und I-V für *pst2* (B) sind in bp angegeben. Die Identität der PCR-Produkte wurde durch Gelextraktion und Sequenzierung bestätigt. Als Längenmarker (M) wurde GeneRuler 1 kb DNA Ladder verwendet.

Resultierend aus einer DNA-Kontamination, die durch den unvollständigen DNA-Abbau mit DNase entsteht, sind zwei Banden mit niedriger Intensität in der Negativkontrolle (b) der PCR-Fragmente II (*pst1*; Abb. 11A) und III (*pst2*; Abb. 11B) zu sehen. Da die Bandenintensität in beiden Fällen wesentlich niedriger ausfällt, als die des auf cDNA (c) basierenden PCR-Produkts, hat dies keine Auswirkung auf das Ergebnis.

Zusammenfassend wurde mit der Methode der RT-PCR gezeigt, dass die beiden Gencluster *pst1* (*pstS₁-OE4471R*) und *pst2* (*pstS₂-phoU₂*) in ein polycistronisches Transkript (mRNA)

umgeschrieben werden. Die ermittelten Transkriptlängen der Operons betragen für *pst1* mindestens 8204 bp und für *pst2* mindestens 5289 bp (siehe Abb. 10). Bei der RT-PCR-Methode lässt sich die Einheit des längsten vorhandenen Transkripts bestimmen, jedoch kann keine Aussage über die Koexistenz von kürzeren Transkripten getroffen werden. Es wird folglich nicht ausgeschlossen, dass kürzere Transkripte des *pst1*- und *pst2*-Operons in der Zelle synthetisiert werden.

3.1.3 Transkriptionsstartbestimmung der Transkriptionseinheiten *pst1*, *pst2* und *ugp* mittels 5'-RACE

Ziel war es die Stelle der Transkriptionsinitiation zu bestimmen, um anschließend die Lage *cis*-aktiver Elemente, wie beispielsweise der TATA-Box, im Promotor festlegen zu können. Die Promotorregion der im vorhergehenden Kapitel bestimmten polycistronischen Transkriptionseinheiten *pst1* und *pst2* liegt stromaufwärts der Gene *pstS₁* bzw. *pstS₂*. Wie in Kapitel 3.1.1 detailliert dargestellt wurde, ist das *ugp*-Gencluster mit hoher Wahrscheinlichkeit auch ein polycistronisches Operon, wobei sich die Promotorregion stromaufwärts von *ugpB* befindet. Aus diesem Grund fand eine experimentelle Bestimmung der *ugp*-Transkriptionseinheit nicht statt und es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den Genen *ugpB-ugpC* um ein polycistronisches Transkript handelt.

Eine gängige Methode zur Festlegung eines Transkriptionsstarts ist das sogenannte 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)-Verfahren mit dem sich die Sequenz eines Transkripts (mRNA) mit unbekanntem 5'-Ende ermitteln lässt.

Diese auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Methode (siehe 2.3.5.2.3) wurde bereits erfolgreich für die Bestimmung des Transkriptionsstarts des *brz*-Gens verwendet (Tarasov *et al.*, 2008).

Abb. 12 skizziert den Verlauf der Methode, in der zunächst aus Gesamt-RNA aus *H. salinarum*-Zellen, die sowohl unter phosphatgesättigten, als auch phosphatlimitierten Bedingungen kultiviert wurden, die cDNA synthetisiert wurde (siehe 2.3.5.2.3). Ein internes genspezifisches (*pstS₁*, *pstS₂* bzw. *ugpB*) Oligonukleotid GSP1, das in Gegensinn-Richtung (*antisense*) orientiert ist, diente als Startpunkt für die reverse Transkriptase in der Synthese des cDNA-Gegenstrangs. Die Synthese verläuft bis zum 5'-Ende der mRNA. Das GSP1 setzte 1000 bp (GSP1_pst1, GSP1_pst2) bzw. 500 bp (GSP1_ugp) stromabwärts des Startcodons der Gene *pstS₁*, *pstS₂* bzw. *ugpB* an und ist in Abb. 12A als blauer Pfeil

dargestellt. Mit Hilfe der Terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) wurde ein Poly-C-Ende angehängt. An diesen cDNA-poly-C-Schwanz wurde ein Anker-Oligonucleotid (AAP, als roter Pfeil dargestellt) angelagert.

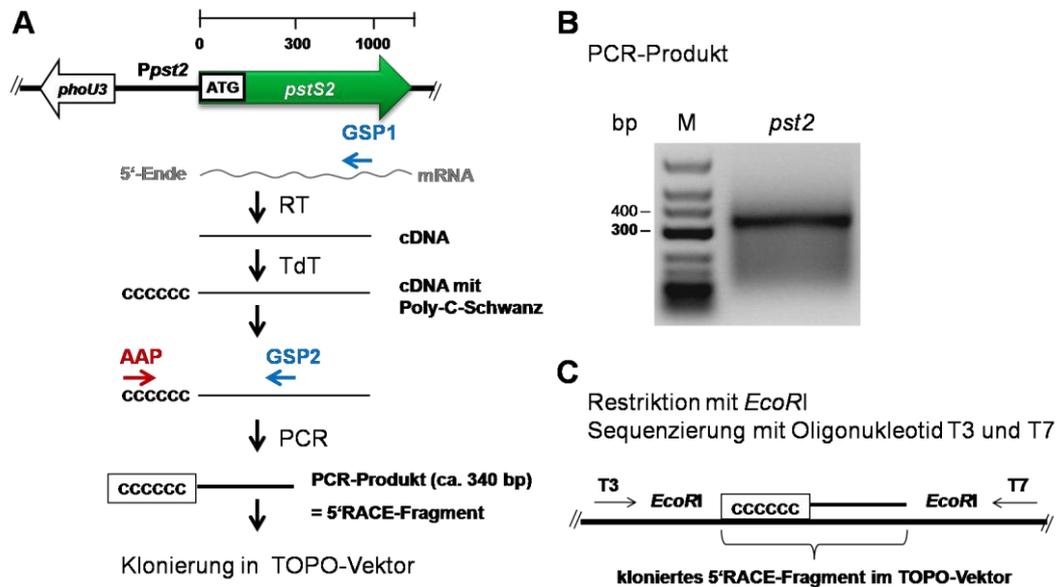


Abb. 12: Schematische Darstellung der TOPO-Klon-Herstellung für das *pst2*-Operon (A) mit Gelbild des PCR-Produkts (5'-RACE-Fragment) (B) und dessen Lage im TOPO-Vektor (C).

Die repräsentative Strategie wurde analog dazu auch für die *pst1*- und *ugp*-Operons verwendet. Die mRNA wurde mit dem genspezifischen Oligonucleotid GSP1, das in blau dargestellt ist, 1000 bp stromabwärts des Startcodons des Gens *pst2* (grün) revers transkribiert. Mit Hilfe der Terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) wurde ein Poly-C-Schwanz (durch sechs C angedeutet) an das 3'-Ende der cDNA angehängt. In einer PCR wurde, unter Verwendung des Anker-Oligonucleotids AAP (in rot gezeigt) und des genspezifischen Oligonucleotids GSP2 (blau), das 5'-RACE-Fragment (ca. 340 bp) amplifiziert. Das GSP2-Oligonucleotid setzt 300 bp stromabwärts des Startcodons an. Das 5'-RACE-Fragment wurde in den TOPO-Vektor kloniert. Das PCR-Produkt mit einer Länge von ca. 340 bp wurde durch Agarosegel-Elektrophorese analysiert (B). M = Längenmarker (O'GeneRuler DNA-Ladder, Low Range); *pst2* = 5'-RACE-Fragment des *pst2*-Operons. Die schematische Lage des klonierten 5'-RACE-Fragments im TOPO-Vektor wird mit den beiden Restriktionsschnittstellen für *EcoRI*, die das klonierte 5'-RACE-Fragment flankieren, gezeigt (C). Durch eine Restriktionsspaltung mit diesem Enzym wurden positive Klone, bei denen das Fragment im Vektor integriert ist, selektioniert. Zur Kartierung des Transkriptionsstarts wurden die 5'-RACE-Fragmente der positiven Klone mit den Oligonucleotiden T3 und T7 sequenziert. Die Orientierung und Ansatzstellen der Oligonucleotide T3 und T7 sind durch Pfeile markiert.

Mit einem weiteren genspezifischen *antisense*-Oligonucleotid GSP2 (GSP2_ *pst1*, GSP2_ *pst2* bzw. GSP2_ *ugp*), das 300 – 400 bp stromabwärts des Startcodons der Gene *pstS1*, *pstS2* bzw. *ugp* ansetzte, wurde daraufhin zusammen mit dem AAP-Primer eine PCR durchgeführt.

Abb. 12B zeigt das Gelbild des ca. 340 bp langen PCR-Produkts von *pst2*, das im Folgenden als 5'-RACE-Fragment bezeichnet wird.

Zur Kartierung des Transkriptionsstarts wurde das jeweilige 5'-RACE-Fragment in den TOPO-Vektor kloniert (siehe 2.3.9). Die erfolgreiche Herstellung der TOPO-Klone des *pst1*- und *ugp*-Operons erfolgte analog zu der in Abb. 12 gezeigten Strategie für das *pst2*-Operon.

Für die Selektion positiver Klone, in denen das klonierte 5'-RACE-Fragment im TOPO-Vektor integriert ist, wurde die isolierte Plasmid-DNA einer Restriktionsspaltung mit dem Enzym *EcoRI* unterzogen. Die als positiv identifizierten Klone wurden daraufhin mit den Oligonukleotiden T3 und T7 sequenziert. Zwei *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen sowie die T3- und T7-Ansatzstellen flankieren im TOPO-Vektor das integrierte 5'-RACE-Fragment (siehe Abb. 12C).

Um eine von DNA statt von cDNA ausgehende mögliche Amplifikation auszuschließen, wurde für *pst1* und *pst2* jeweils eine PCR-Reaktion mit DNA statt cDNA mit den Oligonukleotiden GSP2 und AAP durchgeführt. In beiden Fällen wurde ein ca. 400 bp großes PCR-Produkt amplifiziert, welches in den TOPO-Vektor kloniert und anschließend sequenziert wurde. In beiden Fällen handelte es sich jedoch um eine unspezifische Sequenz.

In Abb. 13 sind die Promotorregionen der Operons *pst1* (Abb. 13A), *pst2* (Abb. 13B) und *ugp* (Abb. 13C), mit den unter phosphatgesättigten (+P_i) bzw. phosphatlimitierten (-P_i) Bedingungen identifizierten Transkriptionsstart-Stellen (durch ein rotes G gekennzeichnet), dargestellt.

Für das *pst1*-Operon wurden 5'-RACE-Fragmente mit zwei verschiedenen Fragmentlängen identifiziert.

Es zeigte sich, wie in Abb. 13A schematisch dargestellt, dass das *pst1*-Operon unter +P_i-Bedingungen 3 mal häufiger vom Transkriptionsstart TSS-2 (60 bp stromaufwärts des Startcodons) als vom TSS-1 (1 bp stromaufwärts des Startcodons) transkribiert wird. Dieses Verhältnis ergab sich aus dem Klonverhältnis (siehe dazu 2.3.5.2.3). Das bevorzugte Transkript besitzt folglich einen 60 nt-langen untranslatierten Bereich (5'-UTR), der als *leader*-Sequenz bezeichnet wird.

Unter -P_i-Bedingungen hingegen, wird ausschließlich der Transkriptionsstart TSS-1 verwendet, wobei das resultierende Transkript keine alternative *leader*-Sequenz hat.

Für die beiden Operons *pst2* und *ugp* wurden 5'-RACE-Fragmente aus Zellen, welche unter +P_i- oder -P_i-Bedingungen wuchsen, jeweils mit nur einer Fragmentlänge identifiziert.

Die Stelle der Transkriptionsinitiation des *pst2*- bzw. *ugp*-Operons (siehe Abb. 13B bzw. Abb. 13C) liegt bei beiden 1 bp stromaufwärts des Startcodons und beide Transkripte besitzen keine *leader*-Sequenz.

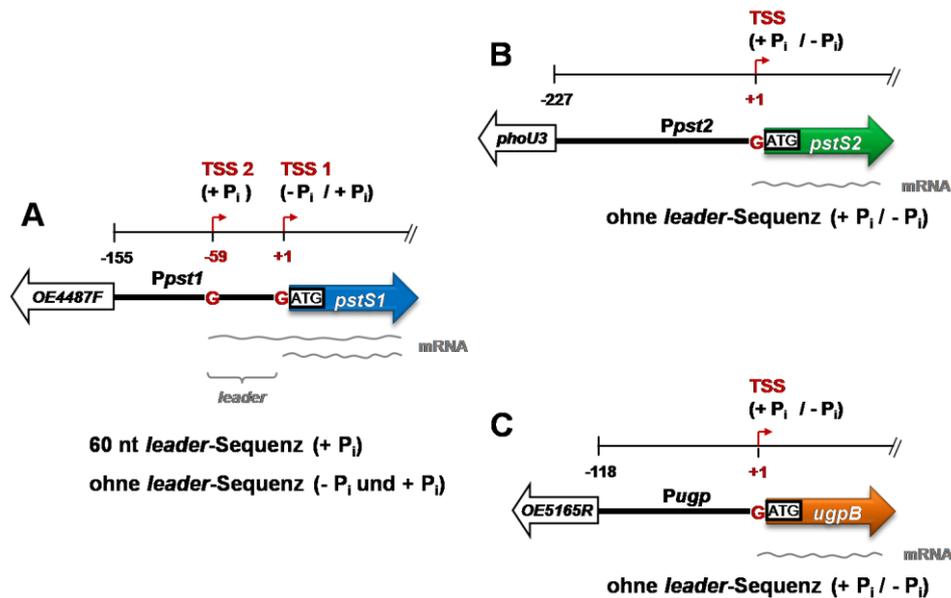


Abb. 13: Schematische Darstellung der Transkriptionsstarts der *pst1*- (A), *pst2*- (B) und *ugp*-Operons (C).

Die Gene *pstS*₁ (blau), *pstS*₂ (grün) und *ugpB* (orange) sind als Blockpfeile dargestellt, die jeweils flankierenden Gene am 5'-Ende als offene Blockpfeile. Der Promotorbereich, der dazwischen liegt, wird jeweils als *Ppst1*, *Ppst2* und *Pugp* bezeichnet. Das *pst1*-Operons (A) besitzt zwei Transkriptionsstarts. Unter P_i-gesättigten Bedingungen wird das Guanin (gezeigt als rotes G), welches 60 bp stromaufwärts (-59) des Translationsstartcodons ATG (als weißer Kasten dargestellt) liegt und als Transkriptionsstart dreimal häufiger verwendet wird als ein zweites Guanin, welches 1 bp stromaufwärts (+1) liegt. Unter P_i-gesättigten Bedingungen besitzt das bevorzugte *pst1*-Transkript eine 60 nt lange *leader*-Sequenz. Unter P_i-limitierten Bedingungen wird dagegen nur das Guanin 1 bp stromaufwärts (+1) des ATG als Transkriptionsstart benutzt. Unter P_i-limitierten Bedingungen besitzt das *pst1*-Transkript keine *leader*-Sequenz. Die beiden Transkriptionsstarts des *pst1*-Operons wurden TSS-1 (bei +1) und TSS-2 (bei -59) genannt. Die Transkriptionsstarts (TSS) der *pst2*- (B) und *ugp*-Operons (C) beginnen sowohl unter P_i-gesättigten, als auch P_i-limitierten Bedingungen ebenfalls bei einem Guanin 1 bp stromaufwärts (+1) des ATG und beide Transkripte haben keine *leader*-Sequenz.

3.1.4 Untersuchung der *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Promotoren durch *bgaH*-Reporter-gen-Fusion

Die im vorherigen Kapitel beschriebene Bestimmung der Startstelle der Transkription für die Operons *pst1*, *pst2* und *ugp* war die Voraussetzung für die Bestimmung der Lage *cis*-aktiver Elemente im Promotorbereich. An diese Elemente binden entweder allgemeine Regulatorproteine, wie das TATA-Box-Bindeprotein TBP oder spezifische Regulatorproteine, die eine phosphatabhängige Regulation der Operons steuern.

Die Promotoren *pst1*, *pst2* und *ugp* wurden in einer *in silico* Analyse (Kapitel 3.1.4.1) auf solche offensichtlichen *cis*-aktiven Elemente hin untersucht.

Der Promotorbereich, der stromaufwärts des jeweiligen Operons liegt, erstreckt sich in seiner Gesamt-Länge über die nicht-kodierende Region zwischen dem ersten Gen des Operons (*pstS₁*, *pstS₂* bzw. *ugpB*) und dem davon stromaufwärts gelegenen Gen (*OE4487F*, *phoU3* bzw. *OE5165R*). Die Promotorbereiche sind in Abb. 13 als *Ppst1*, *Ppst2* und *Pugp* veranschaulicht.

Je effizienter die RNA-Polymerase die Synthese eines Transkripts (mRNA) durchführen kann, desto höher liegt die Promotoraktivität. Um Aussagen über die Promotoraktivität treffen zu können, wurde der Promotor an ein Reporter-gen fusioniert. Die Aktivität des Promotors kann über die Transkriptmenge und / oder die Proteinexpression des Reporter-gens gemessen werden.

Das wohl bekannteste Reporter-gen ist das *lacZ*-Gen aus *Escherichia coli*, das für eine β -Galaktosidase kodiert. Da sie bei hohen Salzkonzentrationen nicht aktiv ist, eignet sie sich nicht für Promotorstudien in Halobakterien. Verwendet wurde daher das Gen *bgaH*, welches für das Protein BgaH, eine β -Galaktosidase aus dem halophilen Archaeon *Haloferax lucentensis*, kodiert (Holmes & Dyll-Smith, 2000, Holmes *et al.*, 1997). Das Enzym stellt ein Homolog zur β -Galaktosidase aus *E. coli* dar und katalysiert wie diese die Hydrolyse von β -glykosidischen Bindungen. Auch synthetische Verbindungen wie ONPG (Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) und X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- β -D-Galaktosid) werden als Substrat erkannt. Das Reporter-gen *bgaH* wurde für Promotorstudien bereits erfolgreich in *H. salinarum* (Patenge *et al.*, 2000) und *Haloferax volcanii* (Gregor & Pfeifer, 2001, Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004) eingesetzt.

Die in den Expressionsvektor pReport klonierten Promotorfusionskonstrukte wurden in *H. salinarum* R1 transformiert. Das pReport-Plasmid enthält 750 bp des Gens *OE3349F* aus *H. salinarum*, welches für das Plasmid die Integrationsstelle ins Genom darstellt (Schwarz, unveröffentlicht). Sämtliche Transformanten wurden auf X-Gal-haltigen +P_i-Agarplatten kultiviert, wodurch die β -Galaktosidaseaktivität der BgaH bereits durch eine Blaufärbung der Klone detektiert werden konnte. Die Integration des pReport-Plasmids an der richtigen Stelle im Genom selektierter Transformanten wurde unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide mittels PCR und Sequenzierung verifiziert (siehe Methodenteil). Anschließend wurde die β -Galaktosidaseaktivität der positiven Transformanten durch das

Umsetzen von ONPG im ONPG-Enzymtest quantifiziert (siehe 2.4.1.2). Die Aktivität der β -Galaktosidase BgaH reflektiert die Aktivität des jeweils untersuchten Promotors bzw. die Expression des Operons. Die Transformanten wurden für alle Versuche sowohl unter phosphatgesättigten, als auch phosphatlimitierten Bedingungen kultiviert.

Mit Hilfe der *bgaH*-Reporterengenfusion sollte die Lage *cis*-aktiver Elemente in der *pst1*- und *pst2*- Promotorregion experimentell identifiziert werden.

Da das *pst2*-Operon sowohl unter phosphatgesättigten als auch unter phosphatlimitierten Bedingungen nur einen Transkriptionsstart hat, der zu einem Transkript ohne *leader* führt, kann die Aktivität des *pst2*-Promotors allein über die Aktivität der BgaH im ONPG-Enzymtest wiedergespiegelt werden.

Das *pst1*-Operon jedoch besitzt zwei verschiedene Promotoren, die je nach Phosphatgehalt im Medium unterschiedlich verwendet werden. Unter $-P_i$ -Bedingungen wird das *pst1*-Operon von einem TSS transkribiert und synthetisiert ein Transkript ohne *leader*-Sequenz. Die Aktivität dieses *pst1*-Promotors kann durch die BgaH-Aktivität wiedergegeben werden. Durch Deletionen des Promotors und Mutationen in bestimmten Bereichen ist es möglich *cis*-aktive Elemente im Promotor zu identifizieren.

Unter $+P_i$ -Bedingungen besitzt das *pst1*-Operon jedoch zwei Transkripte, wobei bevorzugt ausgehend von TSS-2 transkribiert wird. Deletionen oder Mutationen im *pst1*-Promotor können beide Promotoren beeinflussen und das Transkript-Verhältnis ändern. Daher müssen hier neben den Ergebnissen des ONPG-Enzymtests auch die der Northernblot-Analyse und der Transkriptionsstartbestimmung herangezogen werden.

Genexpression stellt den Prozess dar, bei dem die genetische Information genutzt wird, um daraus ein funktionales Genprodukt zu synthetisieren. Die Expression des *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Operons sollte mit Hilfe der *bgaH*-Reporterengenfusion untersucht werden. Hierbei wurde die Induktion der phosphatabhängigen Genexpression verfolgt und für die drei verschiedenen Operons verglichen.

In weitergehenden Untersuchungen wurden die Transkriptionsstarts des *pst1*-Promotors in zwei Transformanten (analog zu Kapitel 3.1.3) bestimmt und mit den Ergebnissen des Wildtyps verglichen. Um unter anderem die Korrelation zwischen Transkript und Translationsprodukt zu untersuchen wurde für einige Transformanten auch die *bgaH*-Transkriptmenge mittels Northernblot analysiert und dem Ergebnis der BgaH-Aktivität aus dem ONPG-Enzymtest gegenübergestellt. Diese Untersuchung ist Bestandteil des Kapitels 3.2.

3.1.4.1 *In silico* Analyse der Promotorsequenzen *pst1*, *pst2* und *ugp*

Die gesamte Promotorregion der Operons *pst1*, *pst2* und *ugp* erstreckt sich über den nicht-kodierenden Bereich zwischen den Leserahmen der Gene *pstS1*, *pstS2* bzw. *ugpB* und den Leserahmen der stromaufwärts davon liegenden Gene, welche in allen drei Fällen in die entgegengesetzte Richtung orientiert sind. Diese Bereiche haben eine Länge von 155 bp, 227 bp bzw. 180 bp (siehe Abb. 13). Die Sequenzen des gesamten Promotorbereichs *pst1*, *pst2* und *ugp* können im Anhang in Abb. 53 eingesehen werden.

Die Analyse der genannten Promotorbereiche ist in Abb. 14 gezeigt und umfasst *cis*-aktive Elemente mit Konsensussequenzen die in (Brenneis *et al.*, 2007) beschrieben wurden.

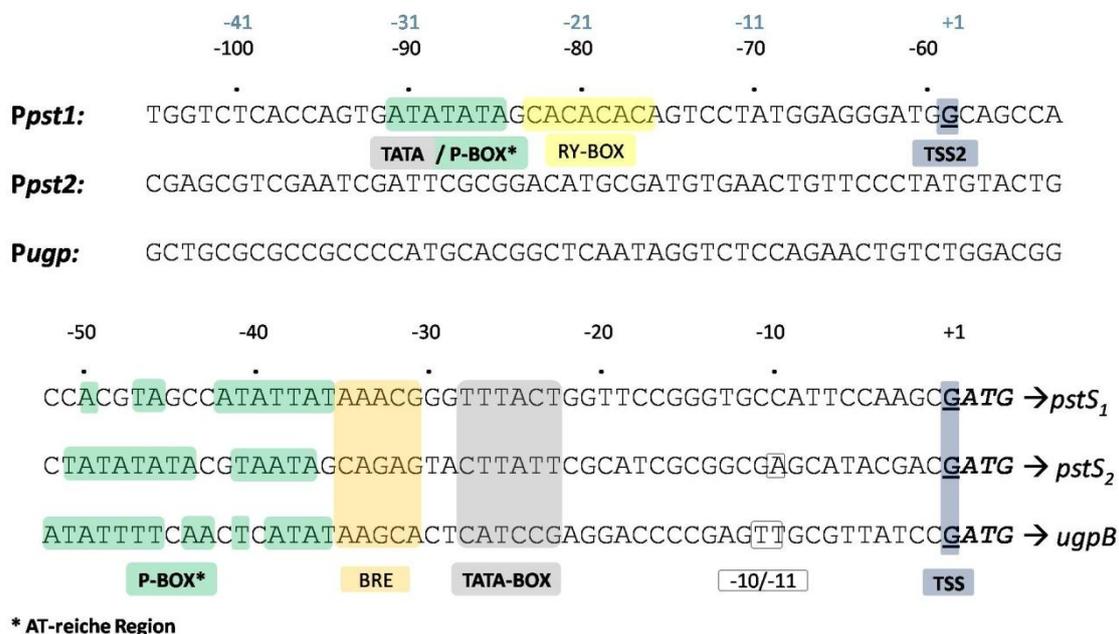


Abb. 14: Putative *cis*-aktive Elemente der Promotoren des *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Operons: *Ppst1*, *Ppst2* und *Pugp*.

Die gezeigte Länge aller Promotorsequenzen beträgt 105 bp. Farbige Kästen zeigen putative Sequenzen der *cis*-aktiven Elemente: -10/-11-Region ist weiß, TATA-Box ist grau, BRE ist orange, AT-reiche Regionen (P-Boxen) grün und eine CA-reiche Region (RY-Box) gelb hinterlegt. Die bestimmten Transkriptionsstarts (TSS) sind blau hinterlegt und die Startcodons kursiv dargestellt.

Die TATA-Box oder das BRE-Element sind basale Promotorelemente, die vom TATA-Box-Bindeprotein (TBP) oder dem Transkriptionsfaktor B (TFB) gebunden bzw. erkannt werden. Der Konsensus für die TATA-Box ist TTWT⁴ mit dem Zentrum bei -27/-28, für das stromaufwärts davon liegende BRE-Element ist er CGAAA. Zwei frühere Studien

⁴ W = A oder T

beschränken sich für das BRE-Element auf den Konsensus AA (Slupska *et al.*, 2001, Soppa, 1999). Ein neu entdecktes Element mit dem Konsensus WW¹ befindet sich bei -10/-11.

Der Transkriptionsstart aller drei Operons befindet sich 1 bp stromaufwärts des Startcodons ATG (siehe 3.1.3).

Nur der *ugp*-Promotor zeigt ein -10/-11-Element, das dem Konsensus folgt.

Ein mögliches TATA-Box Motiv liegt etwa 23-28 bp stromaufwärts des jeweiligen Transkriptionsstarts (TSS). Für das *pst1*-Operon könnte das Kernmotiv der TATA-Box TTTA, für das *pst2*-Operon TTAT und für das *ugp*-Operon TCAT sein. Das *ugp*-Operon besitzt in der Region -20 bis -30 nur vier Basen, die auf ein mögliches TATA-Box Motiv hinweisen. Ein bekanntes Beispiel für ein schlechtes TATA-Box Motiv in *H. salinarum* stellt beispielsweise die TATA-Box des *bop*-Promotors dar (Baliga & DasSarma, 2000). Ein besseres TATA-Box Motiv wäre beim *ugp*-Promotor zwischen 34 - 39 bp zu finden.

Ein weiterer in dieser Arbeit bestimmter Transkriptionsstart (TSS-2) des *pst1*-Operons befindet sich 60 bp stromaufwärts des Startcodons. Die dazugehörige putative TATA-Box liegt 26 - 32 bp stromaufwärts des TSS-2.

Das Motiv gleicht zudem einer alternierenden AT-reichen Region, die beim selben Promotor bei 36 - 42 bp, beim *pst2*-Promotor bei 44 - 50 bp und beim *ugp*-Promotor bei 46 - 52 bp stromaufwärts des TSS liegt. Bei allen drei Promotoren ist ein AT-reicher Bereich zwischen etwa 36 - 52 bp zu beobachten. AT-reiche Sequenzbereiche können beispielsweise Bindestellen für Proteine mit einer Homeodomäne darstellen. Diese Domäne ist in vielen Transkriptionsfaktoren zu finden und wird auch als *helix-turn-helix* (HTH) bezeichnet. Der Basen-spezifische Kontakt findet in der großen Furche der DNA statt. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* bindet Pho2p, ein Transkriptionsfaktor des PHO-Regulons mit einer Homeodomäne, an AT-reiche Sequenzen (Barbaric *et al.*, 1996, Magbanua *et al.*, 1997a). Diese befinden sich neben UAS (*upstream activator sequence*), die von anderen Transkriptionsfaktoren zusammen mit Pho2p gebunden werden (Magbanua *et al.*, 1997a, Magbanua *et al.*, 1997b). Die AT-reiche Region in *H. salinarum* könnte analog zu der von *S. cerevisiae* an eine UAS angrenzen oder selbst eine UAS darstellen.

Die Promotorbereiche der Gene des PHO-Regulon in Bakterien, wie beispielsweise *E. coli* oder *B. subtilis*, zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine oder mehrere sogenannte PHO-Boxen besitzen. In der Einleitung wurde bereits näher auf diese PHO-Boxen eingegangen. Die PHO-Box aus *E. coli* besteht aus zwei 7 bp langen direkten

Wiederholungen (*direct repeats*) des Konsensus CTGTHAY⁵, die durch 4 Basen (AWAW²) voneinander getrennt sind. Vor einigen Genen oder Operons, z.B. dem *pst*-Operon, von *E. coli* liegt der 18 bp lange Bereich in weiteren Kopien vor (Makino *et al.*, 1994). Im Promotorbereich des *pst2*-Operons von *H. salinarum* konnte eine Struktur gefunden werden, die der Konsensussequenz der PHO-Box aus *E. coli* gleicht (siehe Tab. 3).

Tab. 3: Vergleich der PHO-Box ähnlichen Struktur in der Promotorregion des *pst2*-Operons von *H. salinarum* und der PHO-Box des *pst*-Operons in *E. coli*.

Identische Basen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

	7 bp	4 bp	7 bp
Konsensus ^{*2}	CTGTCAT	AWAW	CTGTWAY
<i>E. coli</i> (<i>pst</i> -Operon, PHO-Box1)	CTGTCAT	AAAA	CTGTCAT
<i>E. coli</i> (<i>pst</i> -Operon, PHO-Box2)	CTTACAT	ATAA	CTGTCAC
<i>H. salinarum</i> (<i>pst2</i> -Operon)	CTGCTAT	ATAT	ACGTAAT

*Konsensus nach Wanner (1993)

Weder im Promotorbereich des *pst1*- noch des *ugp*-Operons konnte ein dem PHO-Box-Konsensus ähnlicher Bereich identifiziert werden. Die in Tab. 3 gezeigte Sequenz des *pst2*-Promotors liegt innerhalb der AT-reichen Region (-55 bis -37). Die einzige Homologie zu dem *pst1*- und *ugp*-Promotor in diesem Bereich zeichnet sich durch die AT-reiche Struktur aus.

In dieser Arbeit wurde für die AT-reiche Region der Begriff P-Box eingeführt, der sich speziell auf die AT-reiche Struktur in *H. salinarum* bezieht. Der alternative Begriff PHO-Box wird verwendet, da außer im *pst2*-Promotor keine Homologie zu PHO-Boxen anderer Organismen gefunden werden konnte. Außerdem ist die Regulation des PHO-Stimulons durch ein Zweikomponentensystem in *H. salinarum* ungewiss, der Regulationsmechanismus somit noch unbekannt. Die PHO-Box wird in Bakterien von einem Antwortregulator erkannt und gebunden. Aus einer vorangegangenen Arbeit ging hervor, dass für *H. salinarum* ein klassisches Zweikomponentensystem ausgeschlossen werden kann (Wende *et al.*, 2009). Daraus folgt, dass auch keine klassische PHO-Box in der Promotorregion vorliegt. Auf essentielle *cis*-aktive Elemente in *H. salinarum* wird in Kapitel 4.3 noch ausführlicher eingegangen.

⁵ H = A, C oder T; Y = C oder T; W = A oder T

Ein Homologievergleich der Promotorregionen stromaufwärts der ersten Gene der *pst*-Gencluster von vier verschiedenen archaealen halophilen Organismen (*Halobacterium salinarum*, *Haloquadratum walsbyi*, *Natronomonas pharaonis* und *Haloarcula marismortui*) zeigt, dass sowohl die TATA-Box als auch die AT-reichen Regionen konserviert sind (siehe Abb. 15).

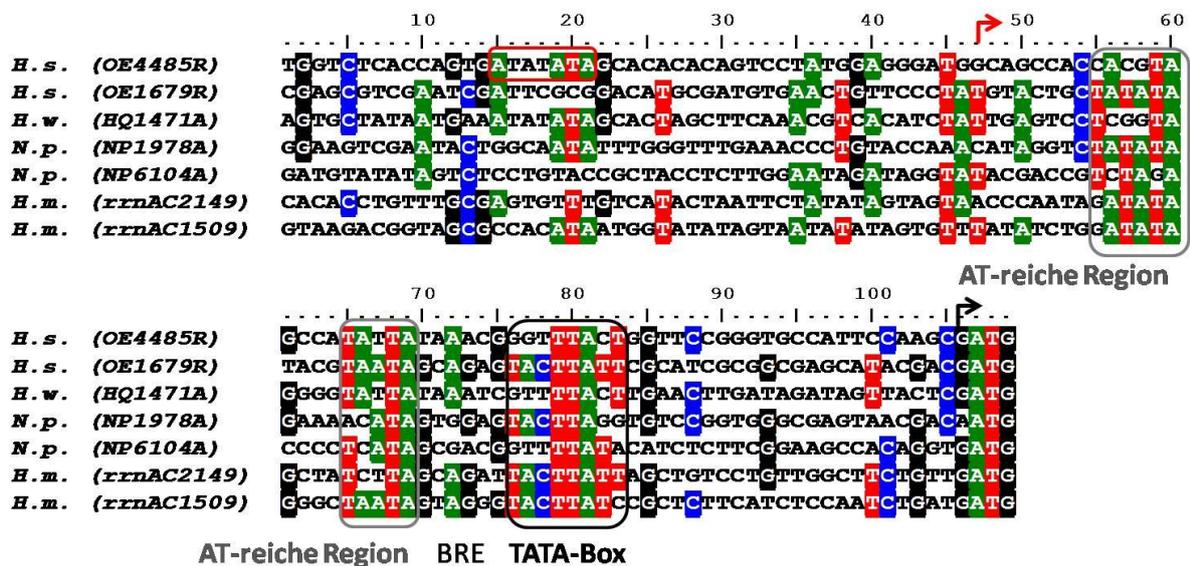


Abb. 15: Homologievergleich der Promotorregion des ersten Gens der *pst*-Gencluster von *Halobacterium salinarum* (*H.s.*), *Haloquadratum walsbyi* (*H.w.*), *Natronomonas pharaonis* (*N.p.*) und *Haloarcula marismortui* (*H.m.*).

Die verschiedenen Promotoren zeigen eine hohe Homologie im Bereich der TATA-Box, die etwa 25 bp stromaufwärts des Startcodons liegt. Alle Promotoren zeigen zudem AT-reiche Regionen stromaufwärts der TATA-Box, die in dieser Arbeit auch als P-Boxen bezeichnet werden. Die entsprechenden Gene der Promotoren sind in Klammern angegeben. Der Transkriptionsstart des *pst1*- und *pst2*-Operons (*pstS*₁ = OE4485R und *pstS*₂ = OE1679R) aus *H. salinarum* ist mit einem schwarzen Pfeil markiert, der TSS-2 des *pst1*-Operons bei 47 mit einem roten Pfeil. Die TATA-2-Box des *pst1*-Operons ist rot umrahmt.

Das BRE-Element, welches stromaufwärts der TATA-Box liegt, weicht von dem vorgegebenen Konsensus CGAAA ab und nur beim *pst1*- und *ugp*-Promotor kann der Konsensus AA gefunden werden (Abb. 14).

Bei 76 - 83 bp stromaufwärts des TSS weist der *pst1*-Promotor einen alternierenden RY⁶-Sequenzbereich (CACACACA) auf, der als RY-Box bezeichnet wird. Diese wurde auch im *bop*-Promotor im selben Abstand zum Transkriptionsstart wie beim *pst1*-Promotor beschrieben. Es wurde vermutet, dass diese Sequenz, die zur Supercoil-Konformation neigt, an der Regulation der Transkription beteiligt sein könnte indem sie eine Z-DNA-Struktur bildet (Baliga & DasSarma, 2000, Yang *et al.*, 1996).

⁶ R = Purin; Y = Pyrimidin

Um die Rolle der *cis*-aktiven Elemente für die Aktivität der Promotoren bestätigen zu können, wurden die Sequenzen offensichtlicher Motive im Folgenden durch Punktmutation verändert und die BgaH-Aktivität mit der der nativen Sequenz verglichen (siehe dazu Kapitel 3.1.4.5).

3.1.4.2 Herstellung verschiedener *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Promotorfusions-Konstrukte

Ziel war es, verschiedene Fusionskonstrukte der *pst1*-, *pst2*- bzw. *ugp*-Promotoren mit dem Reporter gen *bgaH* herzustellen. Relativ zur Wildtyp-Sequenz wurden die Promotorsequenzen durch schrittweise Deletion in ihrer Länge variiert oder durch Punktmutation bestimmte Nukleotide verändert. Anschließend sollte untersucht werden, inwieweit dadurch die Expression beeinflusst wird.

Bei (Gregor & Pfeifer, 2001) wurde eine gestörte Translation der *bgaH*-mRNA beobachtet, wenn der *gvpA*-Promotor am Startcodon des *gvpA*-Leserahmens direkt mit dem Startcodon des *bgaH*-Leserahmens fusioniert wurde. In diesem Fall wurde das fusionierte Konstrukt zwar transkribiert, jedoch nicht translatiert. Um in der vorliegenden Arbeit diese Tatsache bei der Herstellung der verschiedenen Promotorfusions-Konstrukte zu berücksichtigen, wurden die *pst1*-, *pst2*- bzw. *ugp*-Promotorkonstrukte nicht direkt am *pstS1*-, *pstS2*- bzw. *ugpB*-Startcodon mit dem Leserahmen des *bgaH*-Gens fusioniert, sondern erst nach den ersten neun Nukleotiden des jeweiligen Leserahmens und weiteren neun Nukleotiden aus zwei eingebrachten Restriktionsschnittstellen *PstI* und *NdeI* (siehe Abb. 16). Das ATG in der Palindromsequenz der *NdeI*-Schnittstelle (CATATG) bildet das Startcodon des *bgaH*-Gens (siehe Abb. 16).

Bei der Translation des Proteins BgaH in den Transformanten werden demnach am N-Terminus zusätzlich sechs Aminosäuren eingebaut, wobei sich drei aus der Sequenz des jeweiligen Gens und drei aus der Sequenz der für die Fusion verwendeten Restriktionsschnittstelle *PstI* und *NdeI* ableiten. Die zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus, die bei der Translation des BgaH-Proteins eingebaut werden, sind in *pst1*-Transformanten MHSLQH⁷, in *pst2*-Transformanten MPALQH⁶ und in der *ugp*-Transformante MAPLQH⁶.

⁷ Aminosäuren: M (Methionin); H (Histidin); S (Serin); L (Leucin); Q (Glutamin); P (Prolin); A (Alanin)

Im *pst1*-Promotor wurden jeweils 4 Nukleotide in den putativen Sequenzen der beiden TATA-Boxen, der P-Boxen und der RY-Box durch Punktmutation ausgetauscht. Der 155 bp lange Promotor wurde auf Längen von 101 bp, 74 und 52 bp vom 5'-Ende ausgehend verkürzt. Eine Deletion am 3'-Ende verkürzte den Promotor auf den Bereich von 155 bp bis 56 bp stromaufwärts des TSS-1.

Der *pst2*-Promotor wurde in der vermeintlichen TATA- und P-Box in je 4 Basen verändert. Die 5'-Deletionen verkürzten den 227 bp langen Promotor auf eine Länge von 105 bp, 85 bp, 64 bp und 43 bp.

Nach der Klonierung der Promotorfusionskonstrukte in den Expressionsvektor pReport und der erfolgreichen Transformation in *H. salinarum* R1, sollte die phosphatabhängige Expression (Kapitel 3.1.4.4) der Operons untersucht werden und die Lokalisation *cis*-aktiver Elemente (Kapitel 3.1.4.5) im Promotorbereich erfolgen.

3.1.4.3 Transkriptionsstartbestimmung der *pst1*-Promotorfusionskonstrukt-Transformante KF1A mittels 5'-RACE

In Wildtypzellen des *H. salinarum* R1-Stamms konnten für das *pst1*-Operon zwei Transkriptionsinitiationsstellen in Abhängigkeit des Phosphatgehalts des Mediums identifiziert werden (Kapitel 3.1.3). Bei Phosphatsättigung werden zwei verschiedene Transkripte synthetisiert, wobei das bevorzugte Transkript einen 60 Nukleotide (nt) langen untranslatierten Bereich besitzt, der 5'-UTR (*untranslated region*) oder auch *leader* genannt wird. Dieses Transkript wurde dreimal häufiger vorgefunden als das Alternativtranskript ohne *leader*-Sequenz.

Analog zur Transkriptionsstartbestimmung für das *pst1*-Operon in *H. salinarum* Wildtypzellen, sollte festgestellt werden, ob die Transformante KF1A⁸, die das *pst1*-Promotorkonstrukt mit Gesamt-Länge trägt, bei Phosphatsättigung ebenfalls zwei Transkriptionsstarts für das fusionierte *bgaH*-Gen verwendet.

In Anlehnung an Kapitel 3.1.3, wurde dazu die 5'-RACE-Methode sowohl mit Zellen, die unter phosphatgesättigten als auch phosphatlimitierten Bedingungen kultiviert wurden, angewandt.

Die Transkriptionsstart-Analyse ergab ein identisches Ergebnis beim *pst1*-Promotor in der Transformante (Abb. 18) und dem *pst1*-Promotor aus Wildtypzellen (Abb. 13A).

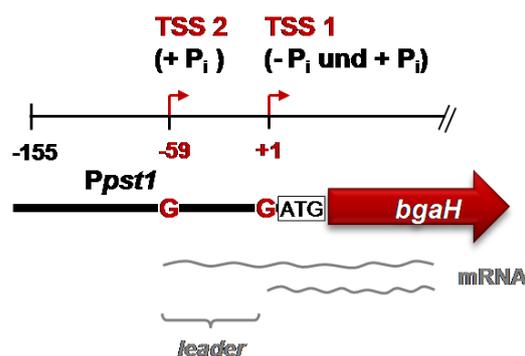
⁸ Transformante KF1A enthält das *pst1*(-155)-Promotorkonstrukt

Die Promotorregion des *pstI*-Operons liegt in der Transformante KF1A dem Reportergen *bgaH* vorgeschaltet vor. Unter $+P_i$ -Bedingungen konnten analog zum Wildtyp zwei 5'-RACE-Fragmente identifiziert werden. Aus der Analyse der Fragmente konnte gefolgert werden, dass in der Transformante (Abb. 18) unter $+P_i$ -Bedingungen bevorzugt der Transkriptionsstart TSS-2 statt TSS-1 verwendet wird. Das Mengen-Verhältnis der Transkripte mit und ohne *leader*-Sequenz betrug 4:1, das der im Wildtyp betrug 3:1 (siehe Klonverhältnis in 2.3.5.2.3).

Unter $-P_i$ -Bedingungen hingegen, wurde wie im Wildtyp ausschließlich der Transkriptionsstart TSS-1 für das daraus resultierende *leader*-lose Transkript verwendet.

Abb. 18: Schematische Darstellung der beiden Transkriptionsstarts des Reportergens *bgaH* in der Transformante KF1A, die das Promotorkonstrukt *pst1(-155)* enthält.

Das Gen *bgaH* ist als roter Blockpfeil dargestellt. Der *pst1*-Promotorbereich des *pst1(-155)*-Konstrukts der Transformante KF1A wird als *Ppst1* bezeichnet. Analog zum *pst1*-Operon (Abb. 13A) besitzt auch das Reportergen *bgaH* zwei Transkriptionsstarts. Unter P_i -gesättigten Bedingungen wird das 60 bp stromaufwärts (-59) des Startcodons ATG (weißer Kasten) liegende Guanin (rotes G), viermal häufiger als Transkriptionsstart verwendet als ein zweites Guanin, welches 1 bp stromaufwärts davon (+1) liegt. Unter P_i -gesättigten Bedingungen besitzt das bevorzugte Transkript eine 60 nt lange *leader*-Sequenz. Dagegen wird unter P_i -limitierten Bedingungen nur das Guanin 1 bp stromaufwärts (+1) des ATG als Transkriptionsstart benutzt und das Transkript besitzt keine *leader*-Sequenz. Die beiden Transkriptionsstarts werden analog zum *pst1*-Operon TSS-1 (+1) und TSS-2 (-59) genannt.



60 nt *leader*-Sequenz (+ P_i)

ohne *leader*-Sequenz (- P_i und + P_i)

Zusammenfassend konnte in der Transformante KF1A bestätigt werden, dass die Transkriptionsinitiation am *pstI*-Promotor unter analogen Bedingungen an den gleichen Transkriptionsstarts wie im Wildtyp stattfindet.

3.1.4.4 Kinetik der phosphatabhängigen *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Expression

Die Expression eines Operons wird nicht nur von *cis*-aktiven Kontrollelementen im Promotor und daran bindenden *trans*-aktiven Faktoren (genspezifische Regulatorproteine) beeinflusst. In den meisten Fällen spielt auch ein spezifischer Umweltreiz eine Rolle, wie in diesem Fall anorganisches Phosphat (P_i).

Die Stärke der *pst1*-, *pst2*- bzw. *ugp*-Expression sollte mit Hilfe des oben beschriebenen *bgaH*-Reportersystems quantitativ in Abhängigkeit vom Phosphatgehalt des Mediums untersucht werden. Für die Untersuchung wurden die Transformanten KF1A, KF0A und KF2A, welche das Promotorkonstrukt des jeweils gesamten *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Promotorbereichs enthielten (Promotorkonstrukt *pst1*(-155), *pst2*(-227) und *ugp*(-181)), verwendet.

Um die Kinetik der phosphatabhängigen Induktion der β -Galaktosidaseaktivität verfolgen zu können, mussten die Zellen aus $+P_i$ - in $-P_i$ -Bedingungen gebracht werden. Dazu wurden die Zellen zunächst in $+P_i$ -Medium angezogen, abzentrifugiert und in $-P_i$ -Medium (SMOP) resuspendiert. Die Kultur wurde unter den in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Standard-Bedingungen weiter kultiviert.

Die BgaH-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) wurde mit Hilfe des ONPG-Enzymtests ausgehend vom Transfer-Zeitpunkt in festen Zeit-Intervallen gemessen. Die festgelegten Messpunkte lagen bei 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Es wurden drei unabhängige Versuche mit je drei Messreihen durchgeführt und daraus die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Abb. 19 zeigt die Graphen der durch Phosphatlimitierung induzierten β -Galaktosidaseaktivität, welche die phosphatinduzierte Genexpression reflektiert. Gemessen wurde vom Zeitpunkt der Phosphat-Limitierung (0 h) bis zu 96 Stunden. Die β -Galaktosidase-Aktivität der Stämme KF1A (*pst1*), KF0A (*pst2*) und KF2A (*ugp*) stieg stetig an und für *pst1* und *pst2* zeigte sich ein apparenter Höhepunkt bei 48 h. Angemerkt sei hier, dass die Standardabweichung für *pst2* bei 72 h nur 0,01 U/mg betrug, was zu einem schlecht sichtbaren Fehlerbalken führt. Bei *ugp* erreichte die β -Galaktosidase-Aktivität ein Plateau zwischen 48h bis 96 h. Die höchste β -Galaktosidase-Aktivität konnte in der KF1A (*pst1*)-Transformante, die niedrigste in der KF2A (*ugp*)-Transformante detektiert werden. Die Werte der KF0A (*pst2*)-Transformante lagen dazwischen.

3 Ergebnisse

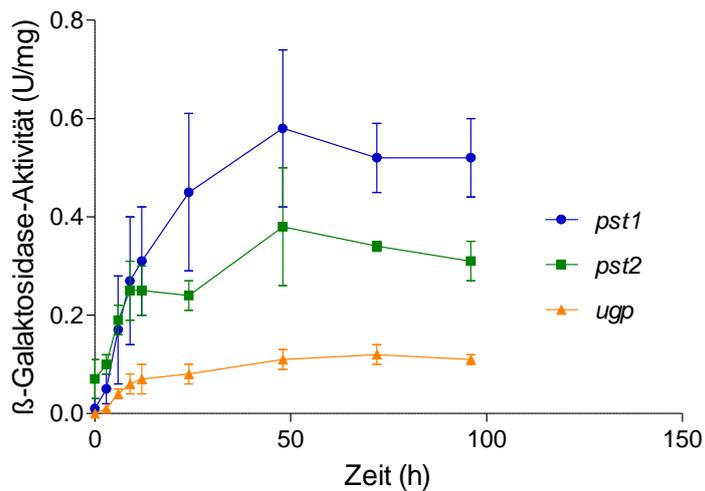


Abb. 19: Darstellung des kinetischen Verlaufs der phosphatabhängigen *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Expression mit Hilfe der β -Galaktosidase-Aktivität im *bgaH*-Reportersystem.

Die β -Galaktosidase-Aktivität unter P_i -gesättigten Bedingungen beim Zeitpunkt 0 h steigt mit zunehmender Zeit unter P_i -limitierten Bedingungen an. Die Zellen der Stämme KF1A (*pst1*), KF0A (*pst2*) und KF2A (*ugp*) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h) geerntet und ihre β -Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessen. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert der β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) aus drei unabhängigen Versuchen mit je drei Messproben. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Damit wurde gezeigt, dass die phosphatabhängige Genexpression bei *pst1*, *pst2* und *ugp* nach 48 h unter phosphatlimitierten Bedingungen ihr Maximum erreicht. Dieser Zeitpunkt (48 h) wurde daraufhin in allen folgenden Versuchen als Standard für Messungen unter $-P_i$ -Bedingungen gewählt.

Der Vergleich der Genexpression unter $+P_i$ -Bedingungen mit der durch Phosphatlimitierung induzierten Genexpression, die in dieser Arbeit als phosphatabhängige Genexpression bezeichnet wird, wird in Abb. 20 durch die β -Galaktosidaseaktivität in den Transformanten KF1A (*pst1*), KF0A (*pst2*) und KF2A (*ugp*) wiedergegeben. Die BgaH-Aktivität bei *pst2* (0,065 U/mg Gesamtprotein) unter $+P_i$ -Bedingungen war deutlich höher als die bei *pst1* (0,0068 U/mg Gesamtprotein) und *ugp* (0,0006 U/mg Gesamtprotein), welche eine sehr niedrige β -Galaktosidaseaktivität zeigten. Die P_i -abhängige BgaH-Aktivität bei *pst1* (0,78 U/mg Gesamtprotein) war mindestens dreimal so hoch wie die bei *pst2* (0,28 U/mg Gesamtprotein) und *ugp* (0,18 U/mg Gesamtprotein).

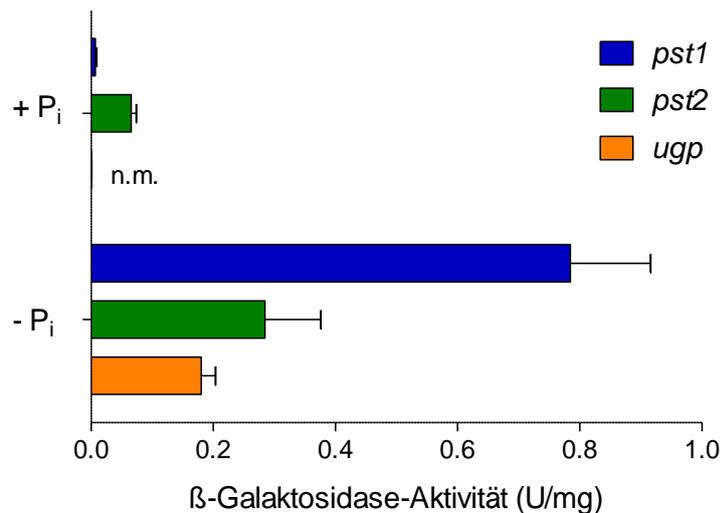


Abb. 20: Darstellung der *pst1*-, *pst2*- und *ugp*- Genexpression unter P_i-gesättigten und P_i-limitierten Bedingungen mit Hilfe der β -Galaktosidase-Aktivität im *bgaH*-Reportersystem.

Die basale Genexpression unter phosphatgesättigten Bedingungen (+P_i) wird durch die drei oberen Balken, die phosphatabhängige Genexpression unter phosphatlimitierten Bedingungen (-P_i) wird durch die drei unteren Balken dargestellt, wobei *pst1* blau, *pst2* grün und *ugp* orange gefärbt sind. Jeder Balken zeigt den Mittelwert der β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Messproben. Der eingezeichnete Fehlerbalken stellt die berechnete Standardabweichung dar; n.m. = nicht messbar.

Dieses niedrige *ugp*-Expressions-Niveau stimmt nicht mit dem Ergebnis aus einer vorherigen Transkriptomanalyse (Wende *et al.*, 2009) überein, in der die Gene *ugpA* und *ugpB* nach einer Phosphatlimitierung bis 24 h stetig induziert wurden und eine höhere Induktion als die Gene *pstS₁* und *pstC₁* aufwiesen. Die abweichenden Ergebnisse könnten in einer niedrigen Translationseffizienz der BgaH in der KF2A-Transformante begründet sein (siehe Kapitel 4.3). Da die *ugp*-Expression einerseits verhältnismäßig sehr schwach war und andererseits nicht mit früheren Daten übereinstimmte (siehe Diskussion, Kapitel 4.3), wurden weitere Experimente mit dieser Transformante eingestellt. Im Weiteren konzentrierte sich die Arbeit auf die Charakterisierung des *pst1*- und *pst2*-Promotors.

Aus der Analyse der in Kapitel 3.2 gezeigten Northernblots ging hervor, dass die Menge der *bgaH*-mRNA mit oder ohne *leader*-Sequenz unter beiden Phosphatbedingungen vergleichbare Werte erreichten. Die hohe Induktion der BgaH-Aktivität unter Phosphatlimitierung ist das Ergebnis der hohen Translationseffizienz des *bgaH*-Transkripts, welches keinen *leader* besitzt im Vergleich zu der mRNA mit *leader* unter P_i-gesättigten Bedingungen (siehe Kapitel 3.2). Daten aus vorherigen Microarray- und RT-qPCR-Experimenten zeigten eine hohe Induktion der Gene des *pst1*-Operons unter Phosphatmangel (Wende *et al.*, 2009). Da das

bgaH-Transkript nicht so stark induziert wird wie das *pst1*-Transkript, wird die Ursache im *bgaH*-Konstrukt vermutet. Zusätzliche *cis*-aktive Elemente in der Umgebung des *pst1*-Operons, welche nicht im verwendeten *pst1*-Promotor enthalten waren, könnten eine Rolle in der phosphatabhängigen Induktion der *pst1*-Transkription spielen.

Da es sich beim *pst2*-Operon nur um einen Transkriptionsstart handelt, der unter beiden Phosphatbedingungen auch nur zu einem Transkript ohne *leader* führt, wird die Aktivität des *pst2*-Promotors von der BgaH-Aktivität im ONPG-Enzymtest reflektiert.

Die Ergebnisse zeigen verschiedene Regulationsmechanismen der Induktion unter Phosphatlimitierung für das *pst1*- und *pst2*-Operon. Während die Induktion des *pst2*-Operons auf Transkriptionsebene reguliert wird, wird das *pst1*-Operon darüber hinaus auch posttranskriptionell reguliert.

Die Untersuchung zeigt, dass die Expression des *pst2*-Operons unter +P_i-Bedingungen zehnfach stärker ist als die des *pst1*-Operons, wohingegen die P_i-abhängige Expression des *pst1*-Operons 2,8 mal so stark ist wie die des *pst2*-Operons und 115 mal stärker als seine Expression unter +P_i-Bedingungen.

3.1.4.5 Bestimmung von *cis*-aktiven Elementen in den *pst1*- und *pst2*-Promotoren

Die *cis*-aktiven Kontrollelemente im Promotor werden von genspezifischen Regulatorproteinen (*trans*-aktiven Faktoren) gebunden und aktivieren (Aktivator) oder hemmen (Repressor) dadurch die Transkription des Operons. Die TATA-Box ist ein allgemeines *cis*-aktives Promotorelement, das vom TATA-Box-Bindeprotein TBP gebunden wird. Phosphatabhängige Regulatorelemente, die zu den genspezifischen *cis*-aktiven Elementen zählen, sind in Archaeen nicht beschrieben, jedoch als sogenannte PHO-Boxen aus Bakterien bekannt (Liu & Hulett, 1998, Makino *et al.*, 1994).

Das Ziel war *cis*-aktive Elemente im *pst1*- bzw. *pst2*- Promotor mit Hilfe des *bgaH*-Reportersystems zu bestimmen. Hierzu wurden Promotorfusions-Transformanten hergestellt, die verschiedene Variationen des *pst1*- bzw. *pst2*-Promotors enthalten. Diese Varianten stellten verschieden lange Deletionen des jeweiligen Promotorbereichs oder Punktmutationen in bestimmten Sequenzbereichen dar. Die BgaH-Aktivität aller Transformanten wurde sowohl unter phosphatgesättigten als auch unter phosphatlimitierten Bedingungen mit Hilfe des ONPG-Enzymtests (siehe 2.4.1.2) untersucht. Die Promotoraktivität unter phosphatgesättigten Bedingungen wird als basale, die unter

phosphatlimitierten als phosphatabhängige Promotoraktivität bezeichnet. Die Ergebnisse aus der Untersuchung der *cis*-aktiven Elementen in den *pst1*- und *pst2*-Promotoren werden anschließend in Kapitel 3.1.4.5.5 zusammengefasst. In Tab. 16 im Anhang sind alle β -Galaktosidase-Aktivitäten der folgenden Abbildungen aufgelistet. Weiterführend wurden die Transkriptmengen einiger *pst1*-Transformanten mittels Northernblot überprüft und die Transkriptionsstarts zweier *pst1*-Transformanten bestimmt.

3.1.4.5.1 Schritt-für-Schritt-Deletionen der Promotorregion

Die schrittweise Deletion von Promotorbereichen ist ein effektives Verfahren um sich an essentielle Regionen für die Promotoraktivität heranzutasten.

Dazu wurden fünf verschieden lange Promotorkonstrukte der *pst1*- (Abb. 22) und *pst2*-Promotorregion (Abb. 23) hergestellt und wie in Kapitel 3.1.4.1 beschrieben mit *bgaH* fusioniert.

Eine Ausnahme bildete die Konstruktion des *pst1*(-155 – -56)-Promotorfusionskonstrukts, die in Abb. 21 schematisch dargestellt ist. Dieses Promotorkonstrukt wurde am 3'-Ende deletiert. Dem resultierenden Promotor fehlt der stromabwärts gelegene Bereich des in Kapitel 3.1.3 gefundenen Transkriptionsstarts TSS-2.

Ziel dieser 56 nt langen Deletion am 3'-Ende des *pst1*-Promotors war es, zu untersuchen, ob ein *pst1*(-155 – -56)-Transkript vom TSS-2 synthetisiert wird und sich eine Änderung in der BgaH-Aktivität durch das Fehlen der *leader*-Sequenz in diesem Transkript zeigt.

Die Fusion des deletierten *pst1*-Promotors und des Reportergens *bgaH* erfolgte, im Gegensatz zu den in Kapitel 3.1.4.1 beschriebenen Konstrukten, unter Verwendung nur eines ATG-Startcodons für die Synthese der *bgaH*-mRNA (siehe Abb. 21). Diesem Startcodon, welches aus der *NdeI*-Erkennungssequenz (blau) stammt, wurden noch zusätzlich 12 nt vorgeschaltet. Die ersten 3 nt stammen aus der *pst1*-Promotorsequenz (*leader*), die stromabwärts TSS-2 (durch ein rotes G dargestellt) folgt und weitere 9 nt stammen aus der für die Fusion verwendeten Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen für *PstI* (grün) und *NdeI* (blau).

Beim *pst1*(-155 – -56)-Konstrukt können keine zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus des β -Galaktosidase-Proteins eingebaut werden. Die Translation beginnt am ATG-Startcodon aus der *NdeI*-Erkennungssequenz. Da das *bgaH*-Transkript hier keine zusätzlichen Nukleotide enthält, könnte es zu der in (Gregor & Pfeifer, 2001) beschriebenen Komplikation bei der Translation kommen. Dieses Konstrukt kann auf Grund der unterschiedlichen Konstruktion

nicht direkt mit den anderen Konstrukten verglichen werden, es konnte jedoch überprüft werden, ob das fusionierte Konstrukt transkribiert und translatiert wird.

Abb. 21: Schematische Darstellung des *pst1*(-155 – -56)-Promotor-*bgaH*-Fusionskonstrukts im Expressionsvektor pReport.

Nach dem Transkriptionsstart TSS-2 (-59, durch ein rotes G dargestellt) folgen 3 nt aus der *leader*-Sequenz und 9 nt aus der Erkennungssequenz der beiden Restriktionsenzyme *Pst*I (grün) und *Nde*I (blau). Das ATG-Startcodon für die Translation der *bgaH*-mRNA aus der *Nde*I-Schnittstelle ist kursiv, unterstrichen und in blau dargestellt. Es kommt zu einer 56 nt-langen Deletion des Promotors am 3'-Ende. Der *bgaH*-Leserahmen ist durch einen roten Blockpfeil dargestellt. Der Transkriptionsstart TSS-1 (+1) und das stromabwärts liegende Startcodon des *pstS*₁-Leserahmens sind durch ein eingerahmtes schwarzes G bzw. ATG dargestellt.

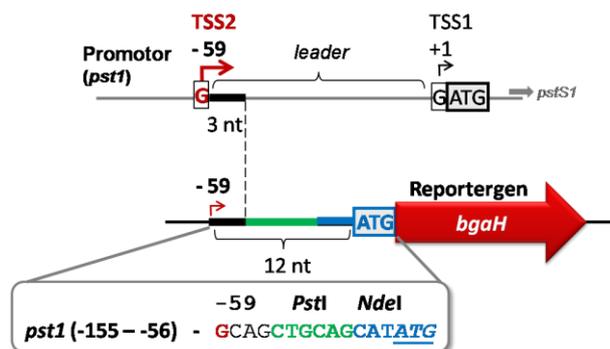


Abb. 22A zeigt die schematische Darstellung des gesamten *pstI*-Promotorkonstrukts *pstI*(-155) und der drei am 5'-Ende deletierten Promotorkonstrukte *pstI*(-101), *pstI*(-74) bzw. *pstI*(-52). Die Promotorregion in den Konstrukten ist jeweils 155 bp, 101 bp, 74 bp bzw. 52 bp lang. Das am 3'-Ende deletierte Promotorkonstrukt *pstI*(-155 – -56) enthält die 155 bp bis 56 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts TSS-1 gelegene Promotorregion (siehe Abb. 17).

Abb. 22B zeigt die mit Hilfe des ONPG-Enzymtests bestimmte β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) der *pstI*-Transformanten. Die einzelnen Werte sind in Tab. 16 im Anhang aufgelistet. Die *pstI*-Transformanten⁹ tragen das in Abb. 22A jeweilig links abgebildete Promotorkonstrukt im Expressionsvektor pReport und wurden sowohl unter P_i-gesättigten (dunkelgraue Balken), als auch P_i-limitierten (hellgraue Balken) Bedingungen untersucht.

⁹ *pstI*-Transformanten KF1A, KF1B, KF1C, KF1D und KF1E enthalten jeweils das Promotorkonstrukt *pstI*(-155), *pstI*(-101), *pstI*(-74), *pstI*(-52) und *pstI*(-155 – -56) in Abb. 22

3 Ergebnisse

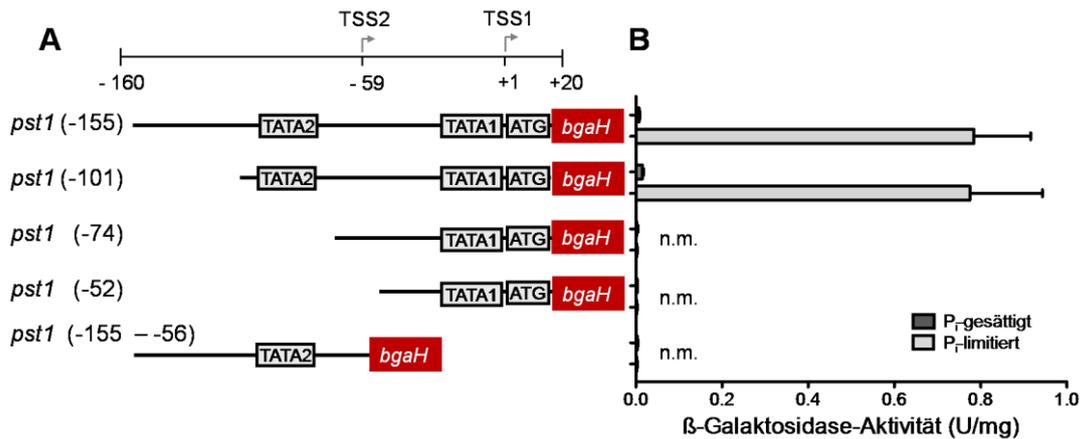


Abb. 22: Graphische Darstellung der *pst1*-Promotor-Deletionskonstrukte (A) und der β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den dazugehörigen Promotorfusions-Transformanten (B).

Der Promotor in Gesamt-Länge (155 bp) besitzt zwei putative TATA-Box Motive (TATA-1- und TATA-2-Kasten). Drei 5'-Deletionen von 101 bp, 74 bp, 52 bp und eine 3'-Deletion von 99 bp (-155 bis -56 bp) Länge sind graphisch gezeigt (A). Das Startcodon (ATG-Kasten) des *pstS_I*-Leserahmens ist stromaufwärts des Leserahmens des *bgaH*-Gens (roter Kasten) fusioniert, außer bei *pst1*(-155 – 56 bp), das nur das Startcodon des *bgaH*-Leserahmens (blauer Kasten) enthält. Die relative Lage der beiden Transkriptionsstarts TSS-1 (+1) und TSS-2 (-59) wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den jeweiligen Promotorfusions-Transformanten wurde mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessen (B). Die angegebenen Werte sind Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replikaten. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Die basale Promotoraktivität unter P_i -gesättigten Bedingungen wird durch dunkelgraue Balken, die P_i -induzierte Promotoraktivität unter P_i -limitierten Bedingungen wird durch hellgraue Balken dargestellt. Nicht messbare bzw. zu niedrige β -Galaktosidase-Aktivität = n.m.

Die durch die BgaH-Aktivität wiedergegebene *pstI*-Promotoraktivität unter + P_i -Bedingungen war, wie schon in Abb. 20 gezeigt wurde, sehr niedrig (0,007 U/mg Gesamtprotein), während die phosphatabhängige Promotoraktivität einen sehr hohen Wert erreichte (0,78 U/mg Gesamtprotein).

Die sehr niedrige Promotoraktivität unter + P_i -Bedingungen stieg beim Promotorkonstrukt *pstI*(-101) um das Doppelte an (0,015 U/mg Gesamtprotein), wohingegen bei den Promotorkonstrukten *pstI*(-74), *pstI*(-52) eine Abnahme (0,002 U/mg Gesamtprotein) zu verzeichnen war, die sich nahe dem messbaren Grenzbereich befand. Da das *pstI*-Transkript unter + P_i -Bedingungen bevorzugt vom Transkriptionsstart TSS-2 synthetisiert wird (Kapitel 3.1.3), und sowohl dem *pstI*(-74)- als auch dem *pstI*(-52)-Promotorkonstrukt die dafür nötigen Promotorelemente fehlen, konnte bei diesen Konstrukten keine Promotoraktivität gemessen werden. Die Promotoraktivität beim Konstrukt *pstI*(-155 – -56) war zwar über die Hälfte reduziert (0,003 U/mg Gesamtprotein), jedoch noch vorhanden. Die geringe Promotoraktivität zeugt von einem translatierten Produkt des Promotorfusionskonstruktes.

Die mittels Northernblot untersuchte *bgaH*-Transkriptmenge in der KF1E-Transformante, die dieses Konstrukt enthält wird in Kapitel 3.2 gezeigt.

Die phosphatabhängige Promotoraktivität unter phosphatlimitierten Bedingungen erreicht für die Promotorkonstrukte *pst1(-155)* und *pst1(-101)* vergleichbare Werte. Demgegenüber konnte bei den Promotorkonstrukten *pst1(-74)*, *pst1(-52)* und *pst1(-155 – -56)* nur eine geringe bis fast keine Promotoraktivität mehr detektiert werden.

Dies lässt den Schluss zu, dass der Promotorbereich zwischen 101 und 74 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts TSS-1 für die phosphatabhängige *pst1*-Promotoraktivität wichtige Elemente enthält.

Abb. 23A zeigt die schematische Darstellung des gesamten *pst2*-Promotorkonstrukts *pst2(-227)*, welches 227 bp lang ist. Vier am 5'-Ende deletierte Promotorkonstrukte *pst2(-105)*, *pst2(-85)*, *pst2(-64)*. bzw. *pst2(-43)* besitzen je eine Promotorlänge von 105 bp, 85 bp, 64 bp und 43 bp (siehe Abb. 17).

Die β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) der *pst2*-Transformanten¹⁰ ist in Abb. 23B analog zu den *pst1*-Transformanten aus Abb. 22B gezeigt (Werte siehe Tab. 16 im Anhang).

Wie bereits in Kapitel 3.1.4.3 gezeigt wurde, war die verhältnismäßig hohe basale *pst2*-Promotoraktivität unter +P_i-Bedingungen etwa 4mal niedriger als die phosphatabhängige Promotoraktivität (0,28 U/mg Gesamtprotein).

Vor allem die basale, aber auch die phosphatabhängige Promotoraktivität stieg durch die Deletion des Promotors am 5'-Ende im Promotorkonstrukt *pst2(-105)* zunächst an, um in den beiden weiteren 5'-Deletions-Konstrukten *pst2(-85)* und *pst2(-64)* wieder abzunehmen. Die basale Promotoraktivität war jedoch immer noch höher als im Promotorkonstrukt mit Gesamtlänge. Eine offensichtliche Reduktion der Promotoraktivität war bei dem Promotorkonstrukt *pst2(-43)* zu beobachten, woraus geschlossen werden kann, dass die für die Promotoraktivität wichtigen Elemente in der Promotorregion zwischen 43 und 64 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts TSS liegen.

¹⁰ *pst2*-Transformanten KF0A, KF0B, KF0C, KF0D und KF0E enthalten jeweils das Promotorkonstrukt *pst2(-227)*, *pst2(-105)*, *pst2(-85)*, *pst2(-64)* und *pst2(-43)* in Abb. 23

3 Ergebnisse

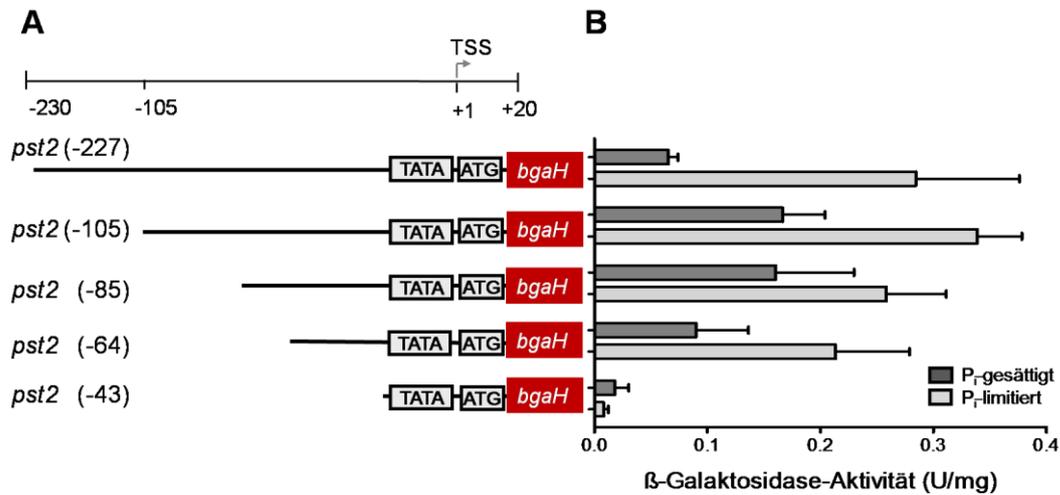


Abb. 23: Graphische Darstellung der 5'-Deletionskonstrukte des *pst2*-Promotors (A) und der β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den dazugehörigen Promotorfusions-Transformanten (B).

Der Promotor in Gesamt-Länge (227 bp) besitzt ein putatives TATA-Box Motiv (TATA-Kasten). Vier 5'-Deletionen von 105 bp, 85 bp, 64 bp und 43 bp Länge sind graphisch gezeigt (A). Das Startcodon (ATG-Kasten) des *pst2*-Leserahmens ist stromaufwärts des Leserahmens des *bgaH*-Gens (roter Kasten) fusioniert. Die Lage des Transkriptionsstarts TSS wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den jeweiligen Promotorfusions-Transformanten wurde mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessen (B). Die angegebenen Werte sind Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Wiederholungen. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Die basale Promotoraktivität unter P_i -gesättigten Bedingungen wird durch dunkelgraue Balken, die P_i -induzierte Promotoraktivität unter P_i -limitierten Bedingungen wird durch hellgraue Balken dargestellt.

Die Ergebnisse der schrittweisen Deletion verdeutlichen, dass sowohl die Regionen zwischen -101 bis -74 bp beim *pst1*-Promotor, als auch -64 bis -43 bp beim *pst2*-Promotor für die Promotoraktivität essentiell sind. Einzelne Nukleotide in diesen beiden Regionen, sowie in putativen TATA-Boxen, wurden in den folgenden Kapiteln durch Punktmutationen verändert und die resultierende Promotoraktivität untersucht.

3.1.4.5.2 Bestimmung der TATA-Box

In putativen TATA-Box-Motiven der Promotoren *pst1* und *pst2* wurden Punktmutationen an 4 Stellen (Nukleotiden) eingeführt, um zu untersuchen, wieweit dadurch die Promotoraktivität beeinflusst wird.

Mit Hilfe von zufällig eingebauten Nukleotiden an der gewünschten Stelle konnten verschiedene Punktmutations-Varianten hergestellt werden (siehe 2.3.14).

Ziel war es die Kern-Sequenzen der TATA-Box mit Hilfe der Punktmutationen zu finden.

Die Promotoraktivität des jeweils durch Punktmutation veränderten Promotors wurde über die im ONPG-Enzymtests bestimmte β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) der jeweiligen Transformante untersucht. Es sollten Punktmutationen gefunden werden, bei denen keine Aktivität mehr messbar ist. Alle Werte sind in Tab. 16 im Anhang aufgelistet.

In der *pst1*-Promotorregion wurde ein putatives TATA-Box-Motiv der sogenannten TATA-1-Box untersucht, welches sich ca. 26 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts TSS-1 befindet (siehe 3.1.4.1).

In Abb. 24A wird das Promotorkonstrukt *pst1*(-155) mit der nativen Sequenz (TTTA) der putativen TATA-1-Box und drei verschiedene Punktmutations-Variationen dieser Sequenz, mut1 (CGCG), mut2 (TCGA) und mut3 (CCCA), gezeigt. Die entsprechende Aktivität der Transformanten¹¹ ist jeweils in Abb. 24B dargestellt. Im Vergleich zum nativen Promotorkonstrukt, konnte bei den drei Punktmutations-Konstrukten (mut1, mut2 und mut3) keine Aktivität gemessen werden. Sowohl die basale als auch die phosphatabhängige Promotoraktivität des nativen *pst1*-Promotors fehlte bei allen drei Mutationen.

Daraus wird gefolgert, dass es sich bei der mutierten Sequenz um den Kernbereich der TATA-Box handelt, die an der Transkriptions-Initiation von der Transkriptionsstartstelle TSS-1 beteiligt ist. Diese findet vor allem unter phosphatlimitierten Bedingungen statt (siehe Kapitel 3.1.3).

Der *pst1*-Promotor bevorzugt für seine basale Promotoraktivität einen weiteren Transkriptionsstart TSS-2 bei -59 bp (Kapitel 3.1.3). Für diesen wurde das Motiv einer weiteren putativen TATA-2-Box untersucht, die ca. 28 bp stromaufwärts des TSS-2 liegt und ihre Funktion als TBP-Bindestelle in Anwesenheit von Phosphat im Medium erfüllt (Kapitel

¹¹ *pst1*-Transformanten KF1A, KF1A1mut1, KF1A1mut2 und KF1A1mut3 enthalten jeweils das Promotorkonstrukt *pst1*(-155), *pst1*(-155) mit Mutation1, Mutation2 und Mutation3 in der TATA-1-Box (Abb. 24)

3.1.4.1). Unter phosphatlimitierten Bedingungen sollte diese Funktion ausschließlich von der TATA-1-Box übernommen werden.

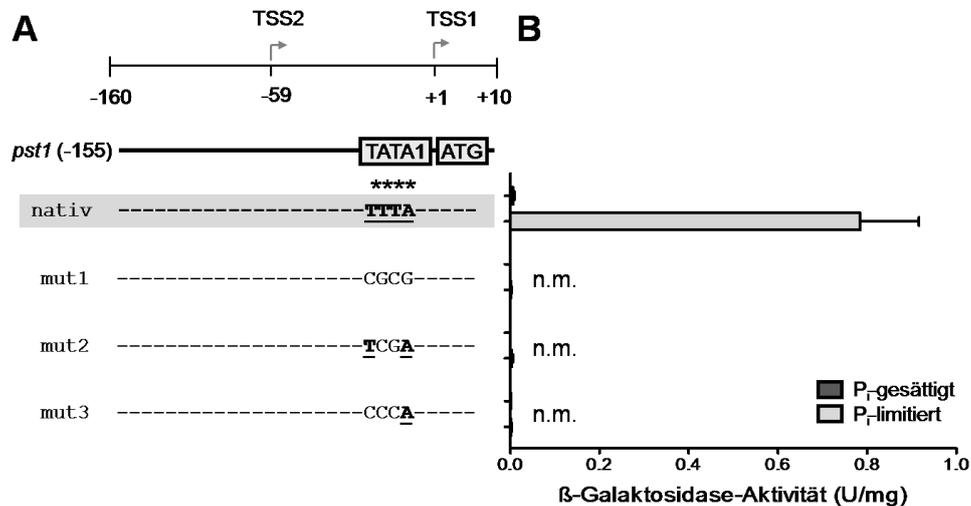


Abb. 24: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-1-Box im *pst1*(-155 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).

Untersucht wurde die native Sequenz der putativen TATA-1-Box (TTTA) und 3 Punktmutationen (mut1-3) in dieser Sequenz. Die relative Lage der beiden Transkriptionsstarts TSS-1 (+1) und TSS-2 (-59) wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den jeweiligen Promotorfusions-Transformanten wurde mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replikaten. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Untersucht wurde die phosphatinduzierte Promotoraktivität unter P_i-limitierten Bedingungen. Nicht messbare bzw. sehr niedrige β -Galaktosidase-Aktivität = n.m. Die native Sequenz ist jeweils durch Fettdruck angezeigt und unterstrichen. Die Stern-Symbole weisen auf eine Mutation im angezeigten Bereich hin.

Es stellte sich die Frage, ob eine Punktmutation der TATA-2-Box dazu führt, dass die Transkriptionsinitiation unter Phosphatsättigung von TSS-2 soweit gestört wird, dass kein Transkript mit *leader*-Sequenz mehr entsteht. Die Transkription erfolgt dann nur von TSS-1 und es werden nur *leader*-lose Transkripte synthetisiert.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine Transkriptionsstartbestimmung der Transformante KF1A2mut3 (siehe Abb. 25) unter phosphatgesättigten Bedingungen mittels 5'-RACE durchgeführt. Es wurde analog zu der in Kapitel 3.1.4.3 beschriebenen Strategie vorgegangen. In der Transformante KF1A2mut3 ist das *pst1*(-155)-Promotorkonstrukt in vier Nukleotiden der putativen TATA-2-Box mutiert (siehe Abb. 25). Es stellte sich heraus, dass diese Mutation ausreicht um den Transkriptionsstart TSS-2 komplett auszuschalten. Es konnten keine 5'-RACE-Fragmente identifiziert werden, aus deren Analyse folgt, dass in der Transformante unter +P_i-Bedingungen der Transkriptionsstart TSS-2 verwendet wurde (siehe

dazu Abb. 18). Es wurde nur der Transkriptionsstart TSS-1 benutzt und somit werden in dieser Transformante nur Transkripte ohne *leader*-Sequenz synthetisiert. Dies beweist, dass die TATA-2-Box die TATA-Box des TSS-2 ist. Es wurden zudem mehrere Klone identifiziert, die 5'-RACE-Fragmente trugen, deren 5'-Ende innerhalb der Gensequenz stromabwärts des TSS-1 lag. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Transkriptionsinitiation in den TATA-2-Box-Mutanten auch ausgehend von anderen Transkriptionsstartstellen erfolgt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtung nur aufgrund von Degradationen am 5'-Ende der mRNA entstanden ist.

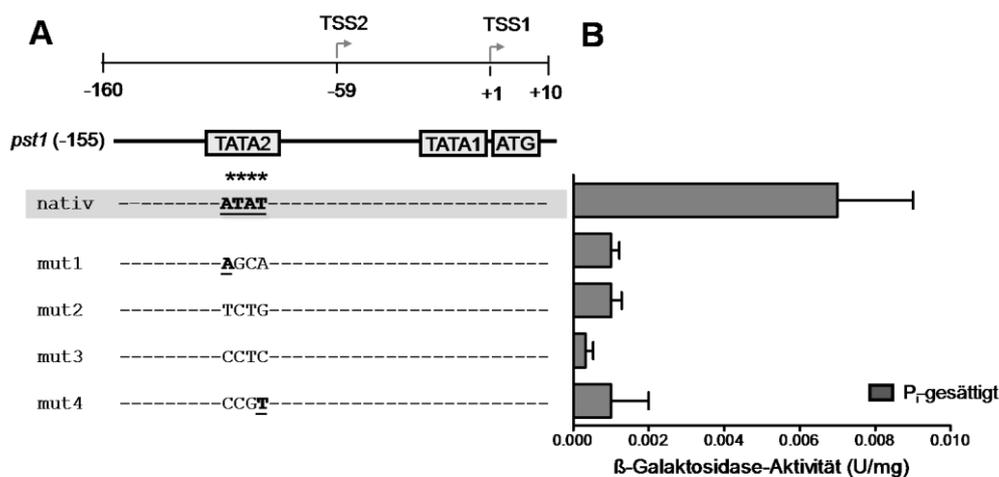


Abb. 25: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-2-Box im *pst1*(-155 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).

Der Promotor besitzt zwei putative TATA-Box Motive (TATA-1- und TATA-2-Kasten). Untersucht wurde die native Sequenz der putativen TATA-2-Box (ATAT) und 4 Punktmutationen (mut1-4) in dieser Sequenz. Die relative Lage der beiden Transkriptionsstarts TSS-1 (+1) und TSS-2 (-59) wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den jeweiligen Promotorfusions-Transformanten wurde mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replikaten. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Es wurde die basale Promotoraktivität unter P_i -gesättigten Bedingungen untersucht. Die native Sequenz ist jeweils durch Fettdruck angezeigt und unterstrichen. Die Stern-Symbole weisen auf eine Mutation im angezeigten Bereich hin.

Für die Untersuchung der TATA-2-Box wurde die Promotoraktivität von je vier verschiedenen Punktmutations-Varianten in den Promotorkonstrukten *pst1*(-155) und *pst1*(-101) verglichen. Abb. 25A zeigt das *pst1*(-155)-Promotorkonstrukt mit der gesamten Länge des *pst1*-Promotors, Abb. 26A zeigt das am 5'-Ende deletierte 101 bp lange *pst1*(-101)-Promotorkonstrukt. Die basale *pst1*-Promotoraktivität war beim 101 bp langen Promotor doppelt so hoch wie bei dem mit gesamter Promotorlänge, daher war es interessant beide Promotorkonstrukte zu untersuchen.

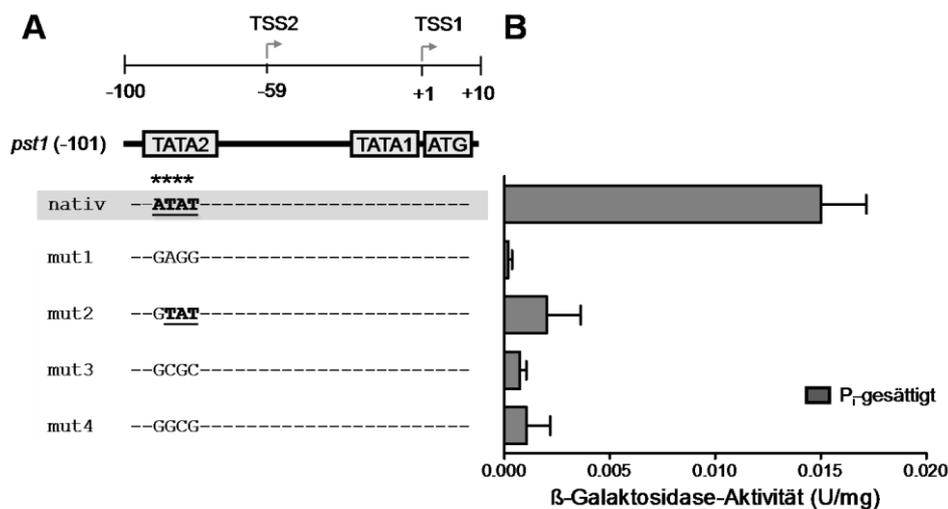


Abb. 26: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-2-Box im *pst1*(-101 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).

Die 101 bp-Teillänge des *pst1*-Promotors besitzt zwei putative TATA-Box Motive (TATA-1- und TATA-2-Kasten). Untersucht wurde die native Sequenz der putativen TATA-2-Box (ATAT) und 4 Punktmutationen (mut1-4) in dieser Sequenz. Die relative Lage der beiden Transkriptionsstarts TSS-1 (+1) und TSS-2 (-59) wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den jeweiligen Promotorfusions-Transformanten wurde mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replikaten. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Es wurde die basale Promotoraktivität unter P_i -gesättigten Bedingungen untersucht. Die native Sequenz ist jeweils durch Fettdruck angezeigt und unterstrichen. Die Stern-Symbole weisen auf eine Mutation im angezeigten Bereich hin.

Die Promotoraktivität mit der nativen Sequenz (ATAT) der putativen TATA-2-Box wurde für beide Konstrukte mit je vier Punktmutations-Variationen dieser Sequenz verglichen. Die Transformanten¹² mit den Punktmutationen im *pst1*(-155)-Promotorkonstrukt mut1 (AGCA), mut2 (TCTG), mut3 (CCTC) und mut4 (CCGT) bewirkten jeweils einen Verlust der basalen Promotoraktivität (Abb. 25B). Die gleiche Aktivitätsminderung wurde in Transformanten¹³ mit Punktmutationen im *pst1*(-101)-Promotorkonstrukt mut1 (GAGG), mut2 (GTAT), mut3 (GCGC) und mut4 (GGCG) beobachtet (Abb. 26B).

Der Ausfall der basalen Promotoraktivität durch die Punktmutationen lässt schlussfolgern, dass es sich um die Kernsequenz der TATA-2-Box, die von *H. salinarum* unter $+P_i$ -Bedingungen verwendet wird, handelt.

¹² *pst1*-Transformanten KF1A, KF1A2mut1, KF1A2mut2, KF1A2mut3 und KF1A2mut4 enthalten jeweils das Promotorkonstrukt *pst1*(-155), *pst1*(-155) mit Mutation1, Mutation2, Mutation3 und Mutation4 in der TATA-2-Box (Abb. 25)

¹³ *pst1*-Transformanten KF1B, KF1B2mut1, KF1B2mut2, KF1B2mut3 und KF1B2mut4 enthalten jeweils das Promotorkonstrukt *pst1*(-101), *pst1*(-101) mit Mutation1, Mutation2, Mutation3 und Mutation4 in der TATA-2-Box (Abb. 26)

Der Verlust der Promotoraktivität, der durch die Mutationen in der Kernsequenz beider putativer TATA-Boxen des *pst1*-Promotors (TATA-1 und TATA-2) verursacht wird, bezeugt die Wichtigkeit dieser beiden Elemente.

Ein putatives TATA-Box Motiv, 26 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts in der *pst2*-Promotorregion, wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Punktmutations-Varianten im Promotorkonstrukt *pst2*(-227) bzw. fünf verschiedener Variationen im Promotorkonstrukt *pst2*(-43) untersucht. Die zugehörige Aktivität der *pst2*(-227)-Transformanten¹⁴ bzw. *pst2*(-43)-Transformanten¹⁵ wird in Abb. 27 bzw. Abb. 28 gezeigt.

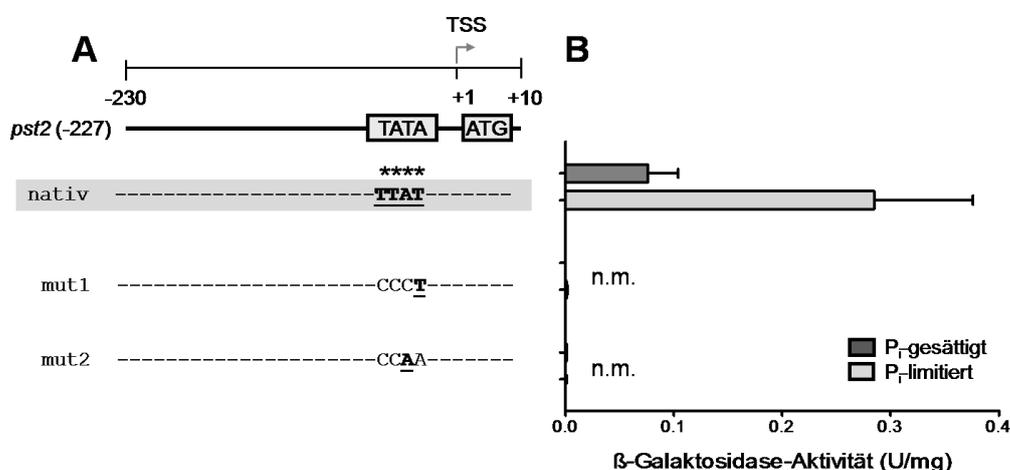


Abb. 27: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-Box im *pst2*-(227 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).

Untersucht wurde die native Sequenz der putativen TATA-Box (TTAT) und 2 Punktmutationsvarianten (mut1+2) in dieser Sequenz. Die Lage des Transkriptionsstarts TSS wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die basale Promotoraktivität unter P_i-gesättigten Bedingungen wird durch graue Balken, die P_i-induzierte Promotoraktivität unter P_i-limitierten Bedingungen wird durch schwarze Balken dargestellt. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) ist der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Wiederholungen (B). Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Nicht messbare bzw. sehr niedrige β -Galaktosidase-Aktivität = n.m. Die native Sequenz ist jeweils durch Fettdruck angezeigt und unterstrichen. Die Stern-Symbole weisen auf eine Mutation im angezeigten Bereich hin.

¹⁴ *pst2*-Transformanten KF0A, KF0A1mut1 und KF0A1mut2 enthalten jeweils das Promotorkonstrukt *pst2*(-227), *pst2*(-227) mit Mutation1 und Mutation2 in der TATA-Box (Abb. 27)

¹⁵ *pst2*-Transformanten KF0E, KF0E1mut1, KF0E1mut2, KF0E1mut3, KF0E1mut4 und KF0E1mut5 enthalten jeweils das Promotorkonstrukt *pst2*(-43), *pst2*(-43) mit Mutation1, Mutation2, Mutation3, Mutation4 und Mutation5 in der TATA-Box (Abb. 28)

Sowohl die basale als auch die phosphatinduzierte *pst2*-Promotoraktivität waren beim 43 bp-langen Konstrukt (Abb. 28A) noch messbar, obwohl sie im Vergleich zum Konstrukt mit Gesamtlänge bereits 3,6-fach bzw. 35-fach erniedrigt waren. Ziel war es die Promotoraktivität durch Mutationen in diesem kurzen Konstrukt vollkommen auszuschalten. Die Promotoraktivität des Konstrukts der nativen Sequenz (ATAT) der putativen TATA-2-Box wurde mit zwei Punktmutations-Konstrukten in dieser Sequenz verglichen. Die Punktmutationen mut1 (CCCT) und mut2 (CCAA) bewirkten jeweils einen Ausfall sowohl der basalen als auch phosphatinduzierten Promotoraktivität (Abb. 27B). Analog dazu konnte im 43 bp-langen Fragment ebenfalls keine Promotoraktivität mehr bei allen fünf Punktmutationen mut1 (CTTC), mut2 (CTGT), mut3 (GTCA), mut4 (AAAA) und mut5 (CATT) gemessen werden (Abb. 28B).

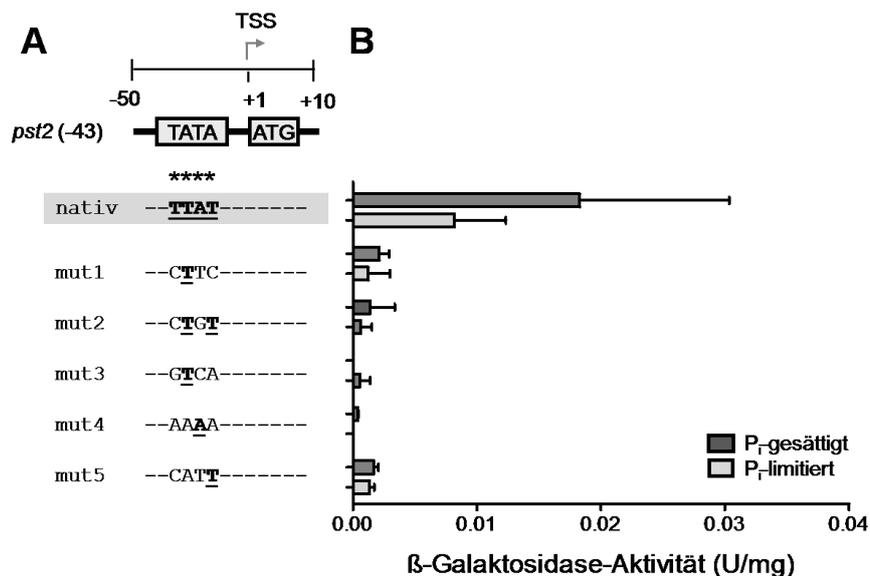


Abb. 28: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-Box im *pst2*- (43 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).

In der 43 bp-kurzen Teillänge des *pst2*-Promotors wurde die native Sequenz der putativen TATA-2-Box (TTAT) und 5 Punktmutationsvarianten (mut1-5) in dieser Sequenz untersucht. Die Lage des Transkriptionsstarts TSS wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die basale Promotoraktivität unter P_i -gesättigten Bedingungen wird durch graue Balken, die P_i -induzierte Promotoraktivität unter P_i -limitierten Bedingungen wird durch schwarze Balken dargestellt. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) ist der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Wiederholungen (B). Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Nicht messbare bzw. sehr niedrige β -Galaktosidase-Aktivität = n.m. Die native Sequenz ist jeweils durch Fettdruck angezeigt und unterstrichen. Die Stern-Symbole weisen auf eine Mutation im angezeigten Bereich hin.

Die Mutation der putativen Kernsequenz der TATA-Box im *pst2*-Promotor führte zu einem Ausfall der basalen und phosphatinduzierten Promotoraktivität. Dies bestätigt die Notwendigkeit dieser Sequenz für die Promotoraktivität und lässt vermuten, dass es sich um die Kernsequenz der TATA-Box des *pst2*-Promotors handelt.

Zusammenfassend konnten durch die Mutation der Kernsequenzen der TATA-Boxen (TATA-1 und TATA-2 im *pst1*-Promotor und TATA-Box im *pst2*-Promotor) diese als für die Promotoraktivität wichtige Elemente identifiziert werden.

3.1.4.5.3 Bestimmung eines AT-reichen P-Box Motivs

Die *in silico* Analyse der beiden Promotorbereiche in Kapitel 3.1.4.1 ergab, dass sowohl der *pst1*-, als auch *pst2*- Promotorbereich neben dem TATA-Box-Motiv noch weitere AT-reiche Sequenzen enthält.

Durch die partielle Deletion der Promotoren, beschrieben in Abb. 22 und Abb. 23, konnte bei *pst1* die Region zwischen -101 bis -74 bp und bei *pst2* die Region zwischen -64 bis -43 bp als die für die Promotoraktivität entscheidenden Bereiche ermittelt werden.

Diese beiden Bereiche enthalten je eine AT-reiche Region, wobei es sich beim *pst1*-Promotor um die Region der TATA-2-Box handelt. Der *pst1*-Promotor enthält noch eine weitere AT-reiche Region, die ca. 40 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts TSS-1 liegt. Diese AT-reichen Sequenzen werden in dieser Arbeit als P-Box bezeichnet. Der Grund für diese Namensgebung wurde in Kapitel 3.1.4.1 erklärt.

Ziel war es an 4 Stellen (Nukleotiden) Punktmutationen in die AT-reichen Sequenzen der Promotoren *pst1* und *pst2* einzubringen und zu untersuchen, wieweit dadurch die Promotoraktivität beeinflusst wird. Wie bereits für die Untersuchung der TATA-Boxen, wurden verschiedene Punktmutations-Konstrukte mit Hilfe der Methode der zufällig eingebauten Nukleotide (siehe 2.3.14) an der gewünschten Stelle hergestellt und die von der nativen Sequenz am stärksten abweichenden Mutationen untersucht.

Die P-Box der *pst1*-Promotorregion, 40 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts TSS-1, wurde, wie in Abb. 29 gezeigt wird, in dem *pst1*(-155)-Promotorkonstrukt mit vier Punktmutations-Varianten untersucht. Die BgaH-Aktivität der Transformanten¹⁶, die das Konstrukt mit nativer P-Box-Sequenz (TTAT) tragen, verschwand durch die Mutationen in

¹⁶ *pst1*-Transformanten KF1A, KF1A3mut1, KF1A3mut2, KF1A3mut3 und KF1A3mut4 enthalten jeweils das Promotorkonstrukt *pst1*(-155), *pst1*(-155) mit Mutation1, Mutation2, Mutation3 und Mutation4 in der P-Box (Abb. 29)

den Konstrukten mut1 (TTTA), mut2 (TGGA) und mut3 (GACA) vollständig (siehe Tab. 16). Lediglich in der Transformante mit dem Konstrukt mut4 (ATAG) konnte noch eine 5,8-fach geringere phosphatabhängige Promotoraktivität gemessen werden. Die basale Promotoraktivität blieb in dieser Mutante unverändert. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der 4-nt-Substitution dieser Mutante, in der nur die beiden äußeren Nukleotide verändert, jedoch die beiden inneren erhalten blieben (TTAT wird zu ATAG).

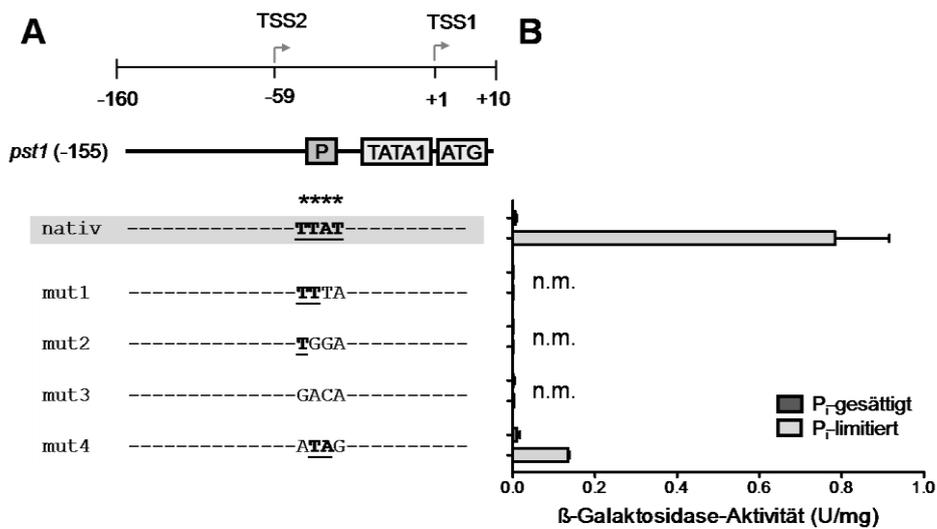


Abb. 29: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen P-Box im *pst1*-(-155 bp)-Promotor (A) und der β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den dazugehörigen Promotorfusions-Transformanten (B).

In der Gesamt-Länge des *pst2*-Promotors wurde die native Sequenz der putativen P-Box (TTAT) und 4 Varianten einer Punktmutation (mut1-4) in dieser Sequenz untersucht. Der Promotor besitzt eine AT-reiche putative P-Box (P-Kasten). Die TATA-1-Box ist als Kasten dargestellt und die relative Lage der beiden Transkriptionsstarts TSS-1 (+1) und TSS-2 (-59) wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den jeweiligen Promotorfusions-Transformanten wurde mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replikaten. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Die basale Promotoraktivität unter P_i-gesättigten Bedingungen wird durch dunkelgraue Balken, die P_i-induzierte Promotoraktivität unter P_i-limitierten Bedingungen wird durch hellgraue Balken dargestellt. Nicht messbare bzw. sehr niedrige β -Galaktosidase-Aktivität = n.m. Die native Sequenz ist jeweils durch Fettdruck angezeigt und unterstrichen. Die Stern-Symbole weisen auf eine Mutation im angezeigten Bereich hin.

Eine weitere AT-reiche Region im *pst1*-Promotor ist das Motiv der TATA-2-Box, die bereits im vorherigen Kapitel unter phosphatgesättigten Bedingungen als TATA-Box für basale Promotoraktivität untersucht wurde. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Region unter phosphatlimitierten Bedingungen eine andere Funktion ausübt, sollte diese durch Punktmutation veränderte P-Box-ähnliche Region auch bei P_i-Limitierung untersucht werden.

Dazu wurden dieselben Promotorkonstrukte verwendet wie die aus dem vorherigen Kapitel in Abb. 25 und Abb. 26 unter $+P_i$ -Bedingungen untersuchten Konstrukte. Die Aktivitäten der Transformanten dieser beiden *pstI*(-155)- und *pstI*(-101)-Promotorkonstrukte mit je vier Punktmutationskonstrukten wurden auch unter phosphatlimitierten Bedingungen gemessen und sind in Abb. 30B und Abb. 31B gezeigt. Die genauen Werte sind Tab. 16 im Anhang zu entnehmen.

Durch die Mutationen im *pstI*(-155)-Konstrukt mut1 (AGCA), mut2 (TCTG) und mut4 (CCGT) fiel die phosphatabhängige Promotoraktivität verglichen mit der nativen Sequenz (ATAT) 2,2- bis 5,1-fach ab. Die mut3 (CCTC) hatte den größten Einfluss auf die Aktivität und verringerte diese um das 36,2-fache (Abb. 30).

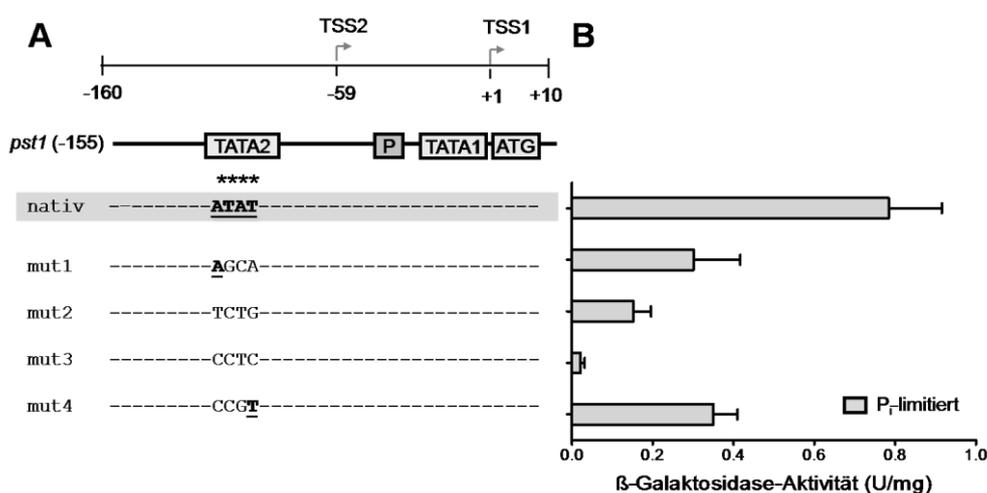


Abb. 30: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-2-Box im *pstI*(-155 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).

Der Promotor besitzt zwei putative TATA-Box Motive (TATA-1- und TATA-2-Kasten). Untersucht wurde die native Sequenz der putativen TATA-2-Box (ATAT) und 4 Punktmutationen (mut1-4) in dieser Sequenz. Die relative Lage der beiden Transkriptionsstarts TSS-1 (+1) und TSS-2 (-59) wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den jeweiligen Promotorfusions-Transformanten wurde mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Wiederholungen. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Die basale Promotoraktivität unter P_i -gesättigten Bedingungen wird durch dunkelgraue Balken, die P_i -induzierte Promotoraktivität unter P_i -limitierten Bedingungen wird durch hellgraue Balken dargestellt. Nicht messbare bzw. sehr niedrige β -Galaktosidase-Aktivität = n.m. Die native Sequenz ist jeweils durch Fettdruck angezeigt und unterstrichen. Die Stern-Symbole weisen auf eine Mutation im angezeigten Bereich hin.

Bei den Mutationen im *pstI*(-101)-Promotorkonstrukt mut1 (GAGG), mut3 (GCGC) und mut4 (GGCG) war keine β -Galaktosidase-Aktivität mehr messbar und nur die mut2 (GTAT),

bei der nur das erste Nukleotid verändert wurde, zeigte noch eine leichte Aktivität (0,058 U/mg Gesamtprotein) (Abb. 31).

Die Mutationen im kürzeren *pstI*-Promotorkonstrukt beeinflussten die Aktivität deutlich.

Die Analyse zeigte, dass das Motiv der TATA-2-Box auch eine P-Box sein kann, da sich die phosphatabhängige Promotoraktivität sichtlich durch eine Mutation in dieser Region veränderte.

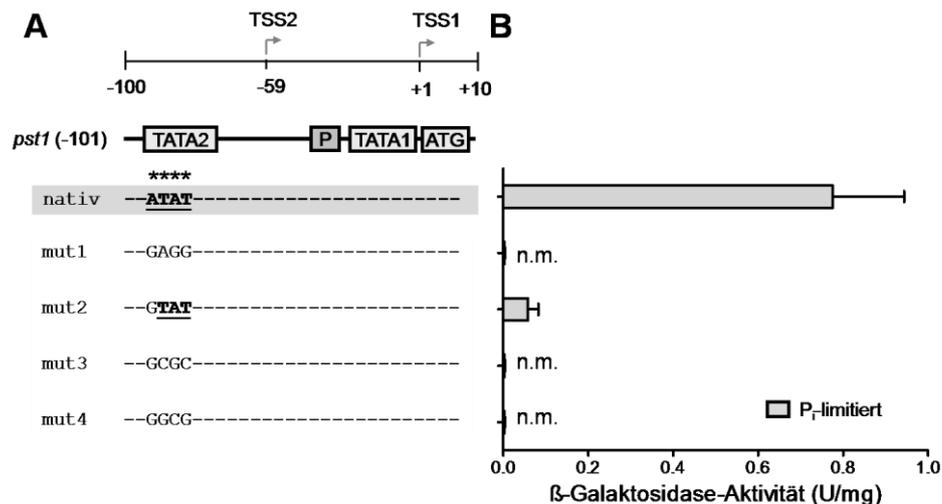


Abb. 31: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen TATA-2-Box im *pstI*(-101 bp)-Promotor (A) und der jeweils gemessenen β-Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).

Der Promotor besitzt zwei putative TATA-Box Motive (TATA-1- und TATA-2-Kasten). Untersucht wurde die native Sequenz der putativen TATA-2-Box (ATAT) und 4 Varianten einer Punktmutation (mut1-4) in dieser Sequenz. Die relative Lage der beiden Transkriptionsstarts TSS-1 (+1) und TSS-2 (-59) wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die angegebene β-Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den jeweiligen Promotorfusions-Transformanten wurde mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replikaten. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Die basale Promotoraktivität unter P_i-gesättigten Bedingungen wird durch dunkelgraue Balken, die P_i-induzierte Promotoraktivität unter P_i-limitierten Bedingungen wird durch hellgraue Balken dargestellt. Nicht messbare bzw. sehr niedrige β-Galaktosidase-Aktivität = n.m. Die native Sequenz ist jeweils durch Fettdruck angezeigt und unterstrichen. Die Stern-Symbole weisen auf eine Mutation im angezeigten Bereich hin.

Zusammenfassend enthält der *pstI*-Promotor zwei in dieser Arbeit als P-Box bezeichnete Regionen, die für die phosphatabhängige Promotoraktivität essentiell sind. Da die Transkription am *pstI*-Promotor unter -P_i-Bedingungen nur vom TSS-1 initiiert wird, kann die TATA-2-Box nicht als TATA-Box verwendet werden sondern, wie aus Übereinstimmung der Sequenzen geschlossen wird, als zusätzliche P-Box. Es ist nicht ausgeschlossen, dass bei Phosphatlimitierung ein regulatorisches Protein an beide P-Box-Motive bindet.

Stromaufwärts der TATA-2-Box ist keine weitere P-Box vorhanden (siehe Abb. 14/Abb. 53), weil das -100-Promotorkonstrukt Wildtyp-Aktivität zeigt.

Im *pst2*-Promotor befindet sich ein AT-reiches P-Box-Motiv etwa 48 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts (siehe auch *in silico* Analyse, Kapitel 3.1.4.1). Untersucht wurde diese Region mit Hilfe des *pst2*(-64)-Promotorkonstrukts, dessen native Sequenz (TATA) mit drei Punktmutationsvariationen mut1 (AGGG), mut2 (AGTG) und mut3 (GGGA) verändert wurde (siehe Abb. 32).

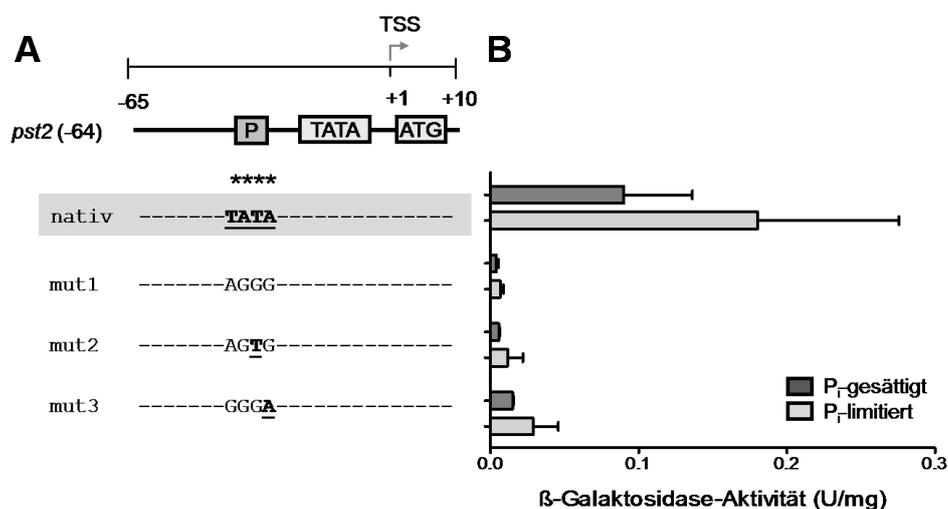


Abb. 32: Graphische Darstellung von nativer und mutierter Sequenz der putativen P-Box im *pst2*(-64 bp)-Promotor (A) und der β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den dazugehörigen Promotorfusions-Transformanten (B).

Im 64 bp-langen *pst2*-Promotor wurde die native Sequenz der putativen P-Box (TATA) und 3 Varianten einer Punktmutation (mut1-3) in dieser Sequenz untersucht. Der Promotor besitzt eine AT-reiche putative P-Box (P-Kasten). Die TATA-Box ist als Kasten dargestellt und die relative Lage des Transkriptionsstarts TSS wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den jeweiligen Promotorfusions-Transformanten wurde mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replikaten. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Die basale Promotoraktivität unter P_i-gesättigten Bedingungen wird durch dunkelgraue Balken, die P_i-induzierte Promotoraktivität unter P_i-limitierten Bedingungen wird durch hellgraue Balken dargestellt. Nicht messbare bzw. sehr niedrige β -Galaktosidase-Aktivität = n.m. Die native Sequenz ist jeweils durch Fettdruck angezeigt und unterstrichen. Die Stern-Symbole weisen auf eine Mutation im angezeigten Bereich hin.

Die BgaH-Aktivität in Transformanten¹⁷, die je eines dieser vier Konstrukte tragen, war durch die Mutationen stark gesunken (bis zu 0,007 U/mg Gesamtprotein; 27,5-fach). Daraus wird

¹⁷ *pst2*-Transformanten KF0D, KF0D3mut1, KF0D3mut2 und KF0D3mut3 enthalten jeweils das Promotorkonstrukt *pst2*(-64), *pst2*(-64) mit Mutation1, Mutation2 und Mutation3 in der P-Box (Abb. 32)

gefolgert, dass Mutationen in der Region der P-Box sowohl auf die basale, als auch auf die phosphatabhängige Promotoraktivität einwirken und diese Region bedeutend für die Aktivität des Promotors ist.

Zusammenfassend wurden sowohl im *pst1*-Promotor, als auch im *pst2*-Promotor AT-reiche Regionen entdeckt, die in dieser Arbeit als P-Boxen bezeichnet werden. Durch Punktmutationen im Bereich dieser P-Boxen konnte bestätigt werden, dass diese Sequenzen für die basale und phosphatabhängige Promotoraktivität essentiell sind.

3.1.4.5.4 Untersuchung einer RY-Box in der *pst1*-Promotorregion

Ein weiterer interessanter Bereich in der *pst1*-Promotorregion, ist ein alternierender RY¹⁸-Sequenzbereich stromabwärts der TATA-2-Box (siehe *in silico* Analyse in Kapitel 3.1.4.1). Die Sequenz zeichnet sich durch die Nukleotide CACACACA aus. Diese sogenannte RY-Box ist auch im *bop*-Promotor zu finden und liegt dort im selben Abstand zum Transkriptionsstart wie beim *pst1*-Promotor. Von dieser RY-Box wurde beim *bop*-Promotor vermutet sie sei eine zur Supercoil-Konformation neigende Sequenz, die eine Z-DNA-Struktur annimmt und so an der Regulation der Transkription beteiligt sein könnte. (Baliga & DasSarma, 2000, Yang *et al.*, 1996). Die Mutationsanalyse der RY-Box veranlasste die Autoren zu der Annahme, dass diese Sequenz für die Aktivierung der Bop-Expression benötigt wird.

Es sollte deshalb überprüft werden, ob sich die Mutation dieses Sequenzbereichs im *pst1*-Promotor auf die Promotoraktivität auswirkt.

Das native *pst1*(-155)-Promotorkonstrukt mit nativer Sequenz der RY-Box wurde mit drei verschiedenen Punktmutationen mut1 (CGAC), mut2 (ATAC) und mut3 (CCCC) im Zentrum dieses Bereichs (CACA) verändert (siehe Abb. 17 und Abb. 33A). Die BgaH-Aktivität der Transformanten¹⁹, die diese Konstrukte tragen, ist in Abb. 33B gezeigt. Die genauen Werte sind in Tab. 16 aufgelistet.

Bei allen drei Mutanten war keine Änderung der Aktivität zu beobachten, woraus geschlussfolgert wird, dass die RY-reiche Region keinen Einfluss auf die Promotoraktivität des *pst1*-Promotors nimmt.

¹⁸ R = Purin; Y = Pyrimidin

¹⁹ *pst1*-Transformanten KF1A, KF1A4mut1, KF1A4mut2 und KF1A4mut3 enthalten jeweils das Promotorkonstrukt *pst1*(-155), *pst1*(-155) mit Mutation1, Mutation2 und Mutation3 in der RY-Box (Abb. 33)

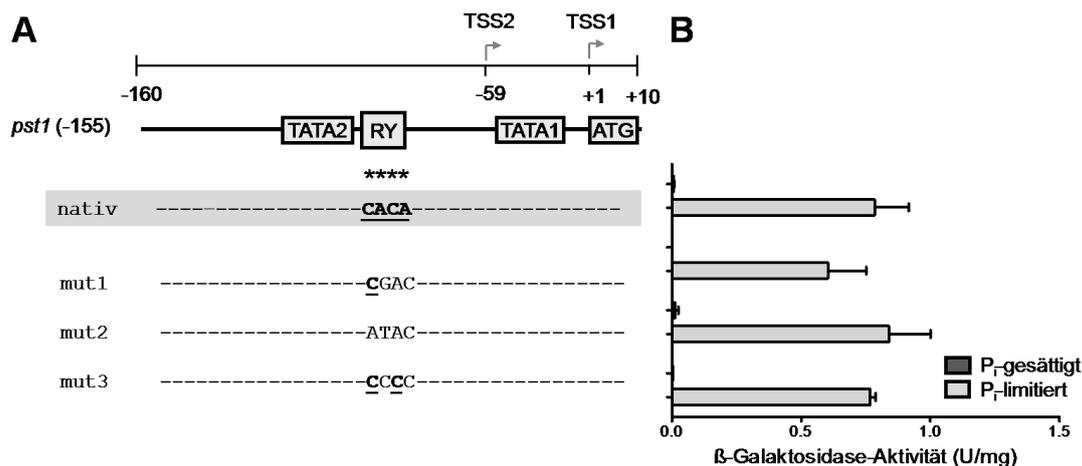


Abb. 33: Graphische Darstellung der Gesamt-Länge (155 bp) des *pst1*-Promotors mit nativer Sequenz in der putativen RY-Box (CACA) und 3 Varianten einer Punktmutation (mut1-3) in dieser Sequenz (A) und der jeweils gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den entsprechenden Promotorfusions-Transformanten (B).

Der Promotor besitzt eine RY-reiche Region (RY-Kasten) und zwei TATA-Box Motive (TATA-1- und TATA-2-Kasten). Die relative Lage der beiden Transkriptionsstarts TSS-1 (+1) und TSS-2 (-59) wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) in den jeweiligen Promotorfusions-Transformanten wurde mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replikaten. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Die basale Promotoraktivität unter P_i -gesättigten Bedingungen wird durch dunkelgraue Balken, die P_i -induzierte Promotoraktivität unter P_i -limitierten Bedingungen wird durch hellgraue Balken dargestellt. Nicht messbare bzw. sehr niedrige β -Galaktosidase-Aktivität = n.m.

3.1.4.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung von *cis*-aktiven Elementen in den *pst1*- und *pst2*-Promotoren

Mit Hilfe des *bgaH*-Reportersystems konnten zwei *cis*-aktive Elemente jeweils im *pst1*- und *pst2*- Promotor bestimmt werden. Die Analyse der Ergebnisse aus den ONPG-Enzymtests mit Transformanten, welche verschiedene mutierte Sequenzbereiche des *pst1*- bzw. *pst2*-Promotors tragen, gab Auskunft über die Rolle der mutierten Sequenzen.

Die Transkriptionsstartbestimmung des *pst1*-Promotors bestätigte denselben phosphatabhängigen Wechsel der beiden Transkriptionsstarts TSS-1 und TSS-2 für das *bgaH*-Gen und das *pst1*-Operon des Wildtyps. Mit Hilfe des *bgaH*-Reportersystems konnte für diese beiden Transkriptionsstarts im *pst1*-Promotor jeweils eine TATA-Box identifiziert werden (TATA-1- und TATA-2-Box). Bei Mutation der TATA-Boxen wurde der Promotor stillgelegt. Dies wurde unter $+P_i$ -Bedingungen durch eine Mutation der TATA-1- wie auch

der TATA-2-Box beobachtet und zudem unter $-P_i$ -Bedingungen durch die Mutation der TATA-1-Box.

Die Transkriptionsstartbestimmung einer TATA-2-Box-Mutante (KF1A2mut3) zeigte, dass nur noch der Transkriptionsstart TSS-1 verwendet wird. Dies ist eine Bestätigung dafür, dass die TATA-2-Box im *pst1*-Promotor die zugehörige TATA-Box des Transkriptionsstarts TSS-2 ist.

Die Mutation der TATA-2-Box unter $-P_i$ -Bedingungen, d.h. nur der Nutzung von TSS-1, führte zu einem Abstieg der phosphatinduzierten Promotoraktivität und legt die Funktion einer zweiten P-Box für TATA-2 unter diesen Bedingungen nahe (Abb. 14; Abb. 17). Die Mutation der weiteren P-Box, welche etwa 40 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts TSS-1 liegt, führt zur totalen Abnahme der phosphatinduzierten Promotoraktivität unter $-P_i$ -Bedingungen. Es handelt sich bei dieser offenbar ebenfalls P-Box um eine funktionell wichtige Sequenz.

Mutationen in der RY-Box, welche sich stromabwärts der TATA-2-Box befindet, nehmen keinen Einfluss auf die phosphatinduzierte Promotoraktivität.

Im *pst2*-Promotor wurden durch Mutationen jeweils eine TATA-Box und eine P-Box identifiziert. Im Fall der TATA-Box zeigten Transformanten mit mutierter Sequenz ein Verschwinden sowohl der basalen als auch der phosphatinduzierten Promotoraktivität. Bei der Mutation der P-Box findet ein Abfall der phosphatinduzierten und der basalen Promotoraktivität statt.

Insgesamt wurden im *pst1*-Promotor zwei TATA-Boxen und zwei P-Boxen, im *pst2*-Promotor eine TATA-Box und eine P-Box identifiziert, die die Aktivitäten der jeweiligen Promotoren regulieren.

3.2 Phosphatabhängige Unterschiede auf Transkriptionsebene und in der Translationseffizienz des *pstI*-Operons

Wie aus Kapitel 3.1.4.3 hervorgeht, decken sich die Transkriptionsstarts am *pstI*-Promotor des *bgaH*-Gens in der KF1A-Transformante mit den Starts des *pstI*-Operons im Wildtyp.

Die Transkriptionsinitiation am *pstI*-Promotor zeigt die Benutzung von alternativen Transkriptionsstartstellen in Abhängigkeit von Phosphat (siehe 3.1.2). Der unter phosphatlimitierten Bedingungen ausschließlich verwendete TSS-1 führt zur Synthese eines *leader*-losen Transkripts. Unter Phosphatsättigung wird dieses Transkript ebenfalls synthetisiert, jedoch vier Mal seltener als das durch den bevorzugten TSS-2 synthetisierte Transkript mit einer 60 nt langen *leader*-Sequenz (5'-UTR).

Dies bedeutet, dass *H. salinarum* je nach Phosphatgehalt des umgebenden Mediums zwischen zwei verschiedenen Transkriptionsstartstellen schalten kann, die zu unterschiedlich langen Transkripten führen.

Um Rückschlüsse auf den möglichen Einfluss der *leader*-Sequenz auf die Translationseffizienz des *pstI*-Transkripts zu ziehen, wurde sowohl die *bgaH*-Transkriptmenge als auch die BgaH-Aktivität unter den verschiedenen Phosphat-Bedingungen und dadurch unterschiedlicher Transkriptionsstart-Nutzung verglichen. Der Vergleich wurde mit Hilfe der *pstI*-Promotorkonstrukt-Transformanten angestellt. Die mit Hilfe des ONPG-Enzymtest ermittelte BgaH-Aktivität lässt auf die Translationseffizienz des Transkripts schließen und wurde in Relation zur *bgaH*-Transkriptmenge gesetzt. Ziel war es die Korrelation zwischen Transkriptmenge, Transkriptlänge und Enzymaktivität zu untersuchen.

Zur Bestimmung der Transkriptmenge wurde eine Northernblot-Analyse durchgeführt. Untersucht wurden die *pstI*-Transformanten KF1A, KF1A1mut1, KF1A2mut1, KF1A1mut3, KF1A2mut4, KF1D und KF1E. Diese enthalten jeweils verschiedene Konstrukte des *pstI*-Promotors, die in Abb. 34A in einer Tabelle zusammengefasst sind.

Zunächst wurde die Gesamt-RNA der Transformanten, die sowohl unter +P_i- als auch -P_i-Bedingungen kultiviert wurden, isoliert (siehe 2.3.1.5). Zur Auftrennung der Gesamt-RNA wurden jeweils 6 µg auf ein Guanidiniumthiocyanat-haltiges Agarosegel aufgetragen. Abb. 34C zeigt, dass die Proben in etwa gleiche Mengen rRNA von guter Qualität enthalten. Es werden zwei unabhängige Experimente gezeigt, daher erscheinen die rRNA-Mengen der Transformanten 3a und 3b etwas schwächer. Zur Detektion der *bgaH*-mRNA wurde eine

spezifische *bgaH*-Sonde verwendet. Das erwartete *bgaH*-Transkript ist 2 kb lang. Wie schon in anderen Arbeiten beobachtet wurde, kommt es zu Abbauprodukten des *bgaH*-Transkripts mit denen die Sonde ebenfalls hybridisiert (Gregor & Pfeifer, 2001, Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004).

Die entsprechende mittels ONPG-Enzymtest ermittelte BgaH-Aktivität, die im vorherigen Kapitel bereits besprochen wurde, ist in Abb. 34D graphisch dargestellt.

In Abb. 34B werden die relativen prozentualen *bgaH*-Transkriptmengen aus drei Northernblots in tabellarischer Form aufgeführt. Die Werte wurden mit dem Programm TotalLab berechnet und bezogen sich auf die Transkriptintensität der 2 kb-Bande. Die Werte wurden auf die 23S rRNA normiert. Zudem werden in der Tabelle ebenfalls die mit Hilfe des ONPG-Enzymtests ermittelten prozentualen BgaH-Aktivitäten der entsprechenden Transformanten angegeben.

Im Folgenden wird der Vergleich zwischen *bgaH*-Transkriptmenge und BgaH-Aktivität besprochen, der die Daten aus der Northernblot-Analyse und dem ONPG-Enzymtest in Abb. 34B, C und D zusammenfasst.

Die Northernblot-Analyse zeigte, dass die *bgaH*-Transkriptmenge der Transformante 1, die die Gesamt-Länge des *pstI*-Promotorkonstrukts trägt, unter phosphatlimitierten im Vergleich zu phosphatgesättigten Bedingungen nur leicht anstieg. Unter +P₁-Bedingungen besteht die *bgaH*-mRNA bei 2 kb aus Transkripten mit und ohne *leader*. Der leichte Anstieg (etwa 1,1-fach) könnte verursacht werden durch den Abbau der mRNA, wobei die *leader*-Sequenz einen Einfluss auf die Stabilität der *bgaH*-mRNA haben könnte.

Die BgaH-Aktivität der Transformante 1, die mittels ONPG-Enzymtest untersucht wurde, stieg unter phosphatlimitierten Bedingungen um das etwa 115-fache im Vergleich zur Aktivität unter phosphatgesättigten Bedingungen an. Die annähernd gleiche Transkriptmenge unter beiden Phosphatbedingungen führte bei dem Transkript mit *leader*-Sequenz zu einer geringen BgaH-Aktivität, dagegen bei Transkript ohne *leader*-Sequenz zu einer sehr hohen BgaH-Aktivität. Aus diesem Ergebnis wird geschlossen, dass die Effizienz der Translation des Transkripts ohne *leader*-Sequenz wesentlich höher ist als die des Transkripts mit *leader*-Sequenz.

Wie auch bei (Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004) für das *gvpH*-Gen beobachtet wurde, steigt die Translationseffizienz des Transkripts ohne 5'-UTR (*leader*) im Vergleich zu demselben Transkript mit *leader*-Sequenz sehr steil an.

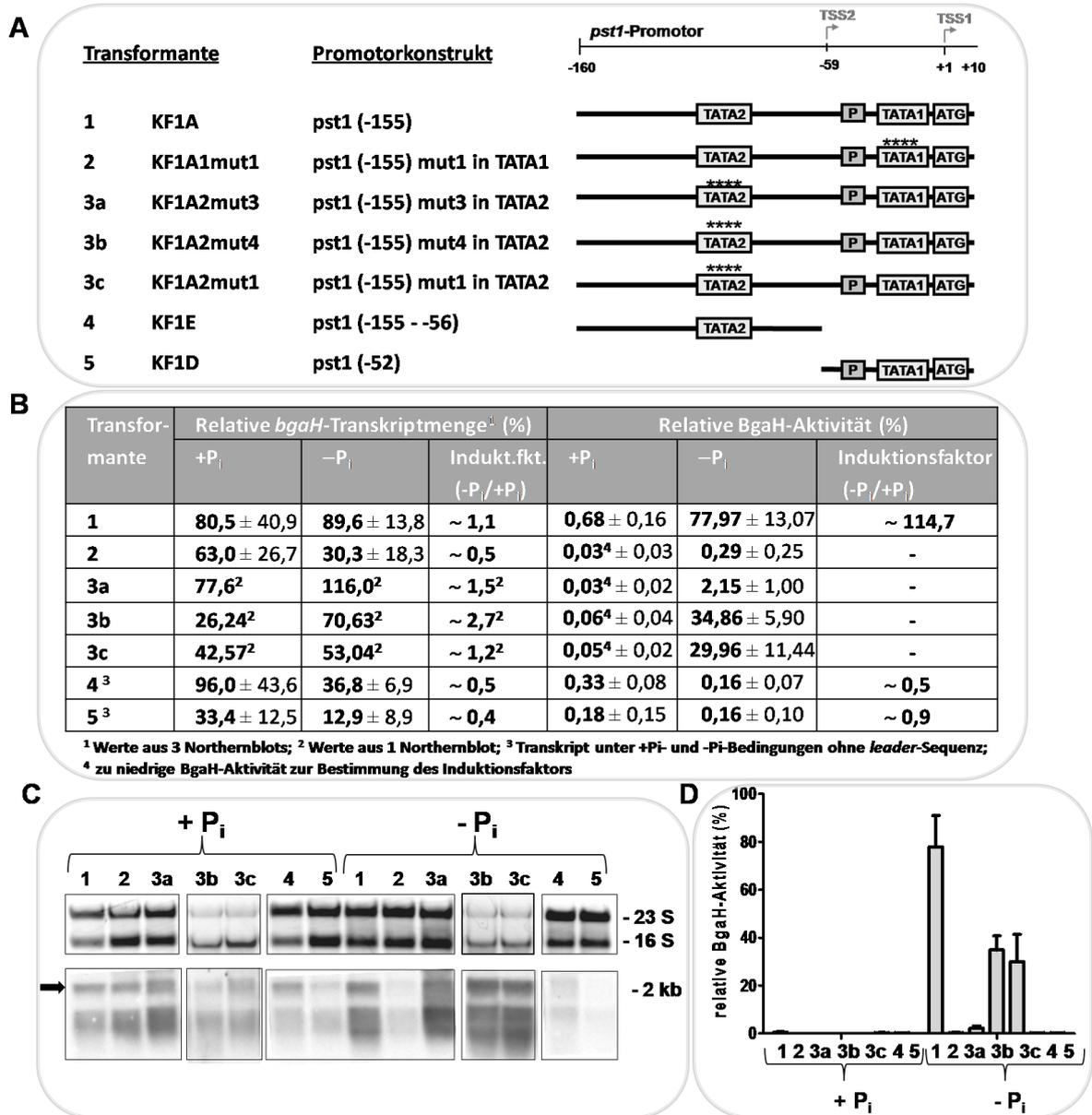


Abb. 34: Vergleich der Northernblot-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA mit mittels ONPG-Enzymtest gemessener BgaH-Aktivität in verschiedenen *pst1*-Transformanten.

Die untersuchten Transformanten sind in tabellarischer Form aufgelistet und links davon das jeweilige Promotorkonstrukt in einer graphischen Darstellung gezeigt (A). Die ungefähre Länge des *pst1*-Promotors wird durch den Abstandsbalken repräsentiert. Vier Sterne weisen auf eine Mutation in der jeweiligen Region hin. Die relative Lage der beiden Transkriptionsstarts (TSS-1 und TSS-2) wird über dem Abstandsbalken angezeigt. Die Tabelle (B) gibt die relativen prozentualen *bgaH*-Transkriptmengen aus drei Northernblot-Analysen, die auf die 23S rRNA normiert wurden an. Daneben sind die entsprechenden relativen BgaH-Aktivitäten gezeigt, welche den prozentualen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Testreihen mit jeweils drei Replikaten darstellen. Für beide Experimente ist auch der jeweilige Induktionsfaktor (-P_i/+P_i) angegeben. Bei zu niedriger BgaH-Aktivität konnte kein aussagekräftiger Induktionsfaktor angegeben werden. Für die Northernblot-Analyse (C) wurden jeweils 6 µg Gesamt-RNA aus Zellen aufgetragen, die unter +P_i- und -P_i-Bedingungen kultiviert wurden. Zur Kontrolle der Quantität und Qualität der Gesamt-RNA ist das Bild des Ethidiumbromid-gefärbten 0,85%igen Guanidiniumthiocyanat-haltigen Agarosegels mit 23S und 16S rRNA oberhalb des Northernblots gezeigt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Die Größe der erwarteten *bgaH*-mRNA beträgt etwa 2 kb und ist mit einem Pfeil markiert. Die mit Hilfe des ONPG-Enzymtest ermittelte BgaH-Aktivität (%) der entsprechenden Transformante ist ebenfalls graphisch dargestellt (D).

In Abb. 34B+C ist zu sehen, dass die Mutation der TATA-1-Box unter $+P_i$ -Bedingungen eine geringe Auswirkung auf die Transkriptmenge hat. Unter Phosphatmangel ist in der Transformante 2 in etwa die halbe Transkriptmenge wie unter Phosphatsättigung vorhanden. Die Transkriptmenge verringert sich etwa um zwei Drittel verglichen mit der in Transformante 1. Die Mutation der TATA-1-Box wirkt sich hauptsächlich nur unter phosphatlimitierten Bedingungen auf die Transkriptmenge aus. Die BgaH-Aktivität (Abb. 34B+D) hingegen nimmt unter beiden Phosphatbedingungen stark ab, ist jedoch unter Phosphatmangel höher. Dies könnte mit der Translationseffizienz der Transkripte begründet werden. Das *leader*-lose Transkript wird effizienter translatiert, ist in der Zelle unter Phosphatsättigung jedoch viermal seltener vorhanden als das Transkript mit der *leader*-Sequenz. Die Mutation der TATA-1-Box wirkt sich daher drastischer auf die Synthese der *leader*-losen Transkripte aus als unter Phosphatmangel, wo in der Zelle ausschließlich *leader*-loses Transkript vorhanden ist. Die Mutation der TATA-1-Box bewirkt hier zwar die gleiche Reduktion der *leader*-losen Transkripte, da jedoch eine größere Ausgangsmenge vorhanden ist, macht sich die Mutation weniger stark bemerkbar und resultiert in einer höheren BgaH-Aktivität.

Die Auswirkungen der mutierten TATA-2-Box wurde mit Hilfe von drei verschiedenen *pst1(-155)*-Promotorkonstrukt-Transformanten, die jeweils drei verschiedene Punktmutationen [mut1 (AGCA), mut3 (CCTC) und mut4 (CCGT)] in der TATA-2-Box enthalten, untersucht.

Die Mutationen der TATA-2-Box haben unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Menge an *bgaH*-mRNA. Unter $+P_i$ -Bedingungen verringerten sich die Transkriptmengen bei Transformante 3a, 3b und 3c je nach Mutation stärker oder schwächer. Transformante 3b (KF1A2mut4) wies die geringste rRNA-Menge auf, die Mutation scheint hier am effektivsten zu sein.

Unter $+P_i$ -Bedingungen initiiert die Transkription bei Transkriptionsstart TSS-2. Eine Transkriptionsstartbestimmung der Transformante KF1A2mut3 (Kapitel 3.1.4.5.2) ergab, dass die Transkription in dieser Transformante nicht bei TSS-2 sondern nur bei TSS-1 beginnt. Daraus folgt, dass nur ein *leader*-loses Transkript synthetisiert wird. Die Transkriptmenge bleibt jedoch annähernd gleich. Die BgaH-Aktivität ist in allen drei Transformanten niedrig, somit scheint die Translationseffizienz dieses *leader*-losen Transkripts auch niedriger zu sein als in der nativen Transformante 1.

Unter $-P_i$ -Bedingungen wurden die *bgaH*-Transkriptmengen der drei Transformanten (3a, 3b und 3c) durch den Phosphatmangel leicht induziert und waren je nach Mutation höher oder

niedriger. Die BgaH-Aktivitäten in diesen Transformanten waren sehr unterschiedlich. Die Mutation der TATA-2-Box der Transformante 3a hatte die größte Auswirkung auf die Translationseffizienz der Transkripte. Die BgaH-Aktivität war hier in etwa 36-fach verringert. Bei den beiden anderen Transformanten (3b, 3c) war die BgaH-Aktivität etwa um die Hälfte verringert. Je größer der Einfluss der Punktmutation in der TATA-2-Box auf die Transkription ist, desto mehr Transkripte scheinen in der Mutante synthetisiert zu werden, die nicht translatiert werden. Unter $-P_i$ -Bedingungen, könnte die TATA-2-Box als P-Box verwendet werden und die Transkription ausgehend von TSS-1 beeinflussen.

Die *bgaH*-mRNA in der Transformante 4, welche das Promotorkonstrukt *pstI*(-155 – -56) ohne *leader* enthält, lag unter $+P_i$ -Bedingungen in gleicher bis etwas größerer Menge als in der Transformante 1, welche das Promotorkonstrukt *pstI*(-155) mit *leader* enthält, vor. Unter $-P_i$ -Bedingungen verringerte sich die Transkriptmenge in der Transformante ohne *leader* um annähernd zwei Drittel. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Transkription unter Phosphatlimitierung ausschließlich vom Transkriptionsstart TSS-1 erfolgt, dieser jedoch in diesem Konstrukt durch die Deletion entfernt wurde. Auch die BgaH-Aktivität war unter $-P_i$ -Bedingungen geringer als unter Phosphatsättigung (Induktionsfaktor etwa 0,5). Wie bereits in Kapitel 3.1.4.5.1 beschrieben wurde, unterschied sich die Konstruktion des Promotorkonstrukts *pstI*(-155 – -56) von allen anderen Konstrukten und kann daher nicht direkt mit ihnen verglichen werden. Wie aus dem Northernblot (Abb. 34B+C) hervorgeht wird das Promotorkonstrukt *pstI*(-155 – -56) transkribiert. Es war jedoch unklar, ob das Promotorfusionskonstrukt translatiert werden kann. Aus der vorhandenen BgaH-Aktivität unter $+P_i$ -Bedingungen wurde geschlossen, dass das Konstrukt auch translatiert wird. Durch die Deletion besitzt das im nativen Zustand mit *leader*-Sequenz vorliegende *bgaH*-Transkript in der Transformante 4 keinen *leader* mehr. Dies führt in diesem Fall jedoch nicht zu einer erhöhten Translationseffizienz. Unter Phosphatmangel wird die Menge an Translationsprodukten durch eine geringere Transkriptmenge eingeschränkt, was sich in einer sehr geringen BgaH-Aktivität spiegelt.

Die Transformante 5, die ein 52 bp kurzes Promotorkonstrukt enthält, bildete unter $-P_i$ -Bedingungen annähernd kein *bgaH*-Transkript mehr, bei Phosphatsättigung nur eine geringe Menge. Dies deutet darauf hin, dass die basale Transkription im verkürzten Promotor noch eingeschränkt verlaufen kann, die phosphatabhängige Transkription jedoch nicht mehr stattfindet. Die Elemente, die für eine phosphatabhängige Promotoraktivität benötigt werden, scheinen in diesem Promotorkonstrukt zu fehlen. Die schrittweise Deletion des Promotors (Abb. 22) ergab, dass diese Elemente zwischen 74 und 101 bp stromaufwärts des Startcodons

liegen müssen. Es wird vermutet, dass die TATA-2- bzw. P-Box die Transkription ausgehend von TSS-1 beeinflusst. Da in der Transformante 5 bereits die Transkription des Konstrukts eingeschränkt ist, war auch nur eine geringe BgaH-Aktivität zu beobachten. Da das Konstrukt sowohl unter $+P_i$ - als auch unter $-P_i$ -Bedingungen keinen *leader* enthält, konnte hiermit gezeigt werden, dass alleine der *leader*, und kein anderer Faktor, für die induzierte BgaH-Aktivität verantwortlich ist.

Das Verhältnis der relativen *bgaH*-Transkriptmenge zu der entsprechenden relativen BgaH-Aktivität stimmte bei mutierten und deletierten Promotorkonstrukten im Großen und Ganzen überein. Die Transformante KF1A, welche den nativen und gesamten *pst1*-Promotor enthält, zeigte jedoch einen wesentlich größeren Unterschied (etwa 115-fach) zwischen der BgaH-Aktivität unter phosphatgesättigten und phosphatlimitierten Bedingungen als der Unterschied (etwa 1,1-fach) zwischen der *bgaH*-Transkriptmenge unter denselben Bedingungen. Auch die Transformanten mit mutierter TATA-2-Box zeigten hier einen wesentlich höheren Unterschied und die Korrelation zwischen Transkriptmenge und Enzymaktivität war nicht gegeben. Die wesentlich höhere Enzymaktivität unter $-P_i$ -Bedingungen kann mit einer effizienteren Translation der *leader*-losen mRNA erklärt werden. Der Unterschied der Translationseffizienz von mRNAs, die mit oder ohne eine *leader*-Sequenz vorliegen, wurde in *H. salinarum* auch für ein anderes Gen bereits beschrieben (Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004). Die 5'-UTR des *pst1*-Promotors könnte eine Haarnadelstruktur bilden, die in Abb. 49 in der Diskussion abgebildet ist. Diese Haarnadelstruktur könnte einerseits die Stabilität der mRNA als auch andererseits die Effizienz der Translation beeinflussen. Die biologische Relevanz der beiden alternativen *pst1*-Transkripte von *H. salinarum* wird in der Diskussion (Kapitel 4.2) behandelt.

3.3 Konstruktion verschiedener Knockout-Stämme in *H. salinarum* R1

Ziel der Experimente, die in diesem Kapitel beschrieben werden, war es einzelne Gene oder polycistronische Operons aus dem Genom von *H. salinarum* zu deletieren oder auszuschalten. Anschließend sollten die so konstruierten Stämme analysiert und Rückschlüsse auf die Funktion dieser Proteine gezogen werden.

Um zwischen dem Pst1- und Pst2-Transporter unterscheiden zu können, wurde jeweils einer der beiden Phosphattransporter (Pst1 bzw. Pst2) deletiert. Die Deletion hatte zum Ziel den Unterschied im Phosphattransport der entsprechenden Deletions-Stämme zu untersuchen und die unterschiedlichen Substrataffinitäten der Phosphatbindeproteine zu ermitteln. Um die mögliche Interaktion der Bindeproteine mit dem jeweils anderen Pst-Transporter zu untersuchen, wurden weitere Mutanten hergestellt, die jeweils beide Bindeproteine, jedoch nur einen von beiden Transportern enthielten. In Kapitel 3.4 werden die Phosphataufnahmen der Deletions-Mutanten $\Delta pst1$ und $\Delta pst2$ beschrieben und dem Wildtyp gegenübergestellt.

Mit der Untersuchung des Deletions-Stamms, dem das *phoU4*-Gen fehlt, konnten Rückschlüsse auf dessen potentielle Rolle in der Regulation des PHO-Stimulons in *H. salinarum* gezogen werden. Die durchgeführten Untersuchungen sind in Kapitel 3.6.1 beschrieben.

Die Deletion des Glycerin-3-Phosphattransporters Ugp und die Doppeldeletion von Ugp und Aph konnte mit Hilfe von Wachstumstests der Deletions-Stämme Δugp und $\Delta aph\Delta ugp$ auf die Funktion des Transporters schließen lassen (Kapitel 3.4.3).

In vorliegender Arbeit wird der Überbegriff „Knockout“ verwendet, um entweder die Deletion eines Gens bzw. Operons oder nur die Deaktivierung bestimmter Gene eines Operons mit Hilfe eines Insertionsplasmids zu bezeichnen. Es wurden zwei verschiedene Strategien für den Knockout verwendet. Zum einen erfolgte die Deletion der Gene durch die Integration eines Deletionsvektors in das halobakterielle Genom mittels homologer Rekombination und anschließender Desintegration des Deletionsvektors (Koch & Oesterhelt, 2005). Die resultierenden Stämme denen ein bestimmtes Gen bzw. Operon fehlt werden als Deletions-Mutanten bezeichnet. Zum anderen wurden sogenannte „knockout“-Mutanten hergestellt, bei denen durch die Integration eines *knockout*-Vektors ohne anschließende Desintegration mit Hilfe der homologen Rekombination bestimmte Gene eines Operons

inaktiviert wurden. Diese Strategie stellt eine Modifikation der in (Tarasov *et al.*, 2000) beschriebenen Vorgehensweise dar.

Die drei Operons *pst1*, *pst2* und *ugp* sowie das Gen *phoU4* (*OE2128F*) wurden durch Deletion (entspricht „ Δ “) aus dem Genom von *H. salinarum* entfernt.

Durch die Integration eines *knockout*-Vektors konnten zum einen die Gene *pstC1-OE4471R* und zum anderen die Gene *pstC2-phoU₂* ausgeschaltet werden (entspricht „ko“).

Der Versuch eine Doppeldeletions-Mutante der beiden *pst*-Operons oder eine Deletion des Gens *phoU3* (*OE1681F*) in *H. salinarum* R1 herzustellen, blieb erfolglos. Dieses Vorhaben wurde sowohl mit der in (Koch & Oesterhelt, 2005) beschriebenen Methode als auch für die Doppeldeletion mit einer in (Gebhard *et al.*, 2006) beschriebenen Methode versucht (in dieser Arbeit nicht gezeigt). In Letzterer wird das zu deletierende Gen (*pst2*-Operon) durch eine Antibiotika-Kassette (Mevinolin) ausgetauscht, es handelt sich hier also um eine Deletions-Insertion. Die Antibiotika-Kassette ermöglicht eine positive Selektion der Klone nach dem zweiten Rekombinationsereignis (*crossing over*) und erleichtert somit die Selektion positiver Transformanten.

Da sich weder das Gen *phoU3* im Wildtyp, noch das *pst2*-Operon in der *pst1*-Deletions-Mutante deletieren ließen, wird vermutet, dass der Verlust dieser Gene für *H. salinarum* letal ist.

Da *H. salinarum* folglich auf das Vorhandensein eines der beiden Pst-Transporter angewiesen ist, wird vermutet, dass keine weiteren funktionsfähigen P₁-Transporter in der Zelle vorhanden sind (siehe Diskussion, Kapitel 4.1).

3.3.1 Konstruktion der Deletions-Stämme KF101 (R1 Δ *pst1*), KF100 (R1 Δ *pst2*), KF102 (R1 Δ *ugp*), KF103 (R1 Δ *aph* Δ *ugp*) und KF104 (R1 Δ *phoU4*)

Auf die Konstruktion und Klonierung der Deletionsplasmide zur Herstellung der *in-frame* Deletions-Stämme wird im Methodenteil detailliert eingegangen (Kapitel 2.3.12). Die Doppeldeletions-Mutante R1 Δ *aph* Δ *ugp* wurde im Deletions-Stamm R1 Δ *aph* hergestellt, alle anderen Deletions-Mutanten im Wildtyp-Stamm *H. salinarum* R1.

Die Verifizierung der Deletions-Mutanten KF101 (R1 Δ *pst1*), KF100 (R1 Δ *pst2*), KF102 (R1 Δ *ugp*), KF103 (R1 Δ *aph* Δ *ugp*) und KF104 (R1 Δ *phoU4*) sollte zunächst durch PCR und anschließend mittels Southernblot erfolgen.

Für die Verifizierung der Deletions-Mutanten mittels PCR wurden Oligonukleotide eingesetzt, die jeweils in den stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Regionen des zu deletierenden Bereichs ansetzten. Die amplifizierten Fragmente der Deletions-Mutanten waren kürzer als die im Wildtyp-Stamm (*H. salinarum* R1). Der jeweilige Größenunterschied entsprach genau der erwarteten Deletionsgröße. Die PCR-Produkte wurden nach einer Gelextraktion sequenziert und ihre Identität mit der Zielsequenz bestätigt.

Im Weiteren sollten die Deletions-Mutanten durch einen Southernblot verifiziert werden. Diese Methode ermöglichte es die Gensequenz im Hintergrund des gesamten halobakteriellen Genoms nachzuweisen. Zunächst wurde genomische DNA aus Wildtyp und Mutanten mit bestimmten Restriktionsenzymen (siehe Tab. 4) verdaut, um dann über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt zu werden. Die DNA-Fragmente wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit DIG-11-dUTP markierten spezifischen Gensonden (siehe Tab. 4), die mittels PCR hergestellt wurden, hybridisiert und detektiert. Für die Herstellung der Sonden wurden spezifische Primer verwendet (siehe 2.1.3). Die jeweiligen amplifizierten Sequenzbereiche sind in Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 4: Verwendete Restriktionsenzyme und DIG-markierte Gensonden zur Detektion mittels Southernblot.

Gen bzw. Operon	<i>pst1</i> -Operon	<i>pst2</i> -Operon	<i>phoU4</i>	<i>ugp</i> -Operon	<i>aph</i>
Restriktionsenzym	<i>BclI</i>	<i>PstI</i>	<i>KasI</i>	<i>BoxI</i>	<i>BoxI</i>
Gensonde	<i>OE4475R</i>	<i>pstS2</i>	<i>phoU4</i>	<i>ugpB</i>	<i>aph</i>
Flankierende Sonde	stromaufwärts	stromaufwärts	stromabwärts	stromabwärts	stromaufwärts

Die Sonden richteten sich jeweils gegen eine flankierende Sequenz des zu deletierenden Bereichs und gegen die gewünschte Deletionsregion selbst. Die Detektion der genomischen DNA im Bereich der deletierten Operons *pst1*, *pst2* und *ugp* sowie der deletierten Gene *aph* und *phoU4* im Gesamt-Genom erfolgte durch ein Signal bei erwarteter Fragmentgröße (siehe Tab. 5). Durch den Vergleich der Ergebnisse aus Wildtyp und Deletions-Mutante konnte die Deletion des gewünschten Bereichs bestätigt werden.

Tab. 5: Erwartete Fragmentgrößen chromosomaler DNA (Wildtyp und Deletions-Mutanten) im Southernblot. Ein positives Signal im Southernblot bei erwarteter Fragmentgröße lässt auf die erfolgreiche Deletion des Operons schließen.

Deletiertes Gen bzw. Operon (Größe) Erwartetes Signal in Fragmentgröße	<i>pst1</i> (8175 bp)	<i>pst2</i> (5245 bp)	<i>phoU4</i> (1029 bp)	<i>ugp</i> (4310 bp)	<i>aph</i> (1422 bp)
Wildtyp	8861 bp	10392 bp	5782 bp	6070 bp	3876 bp
Deletions-Mutante	686 bp	2750 bp	4753 bp	1760 bp	2454 bp

Die Southernblots in Abb. 35A/C/E zeigen jeweils die Hybridisierungen von DNA-Fragmenten des Wildtyps und vier Klonen der Deletions-Mutante $\Delta pst1$, fünf der Deletions-Mutante $\Delta pst2$ und zwei der Deletions-Mutante $\Delta phoU4$ mit den entsprechenden Sonden für die flankierenden Regionen des *pst1*- und *pst2*-Operons bzw. des Gens *phoU4* (siehe Tab. 4). Wie erwartet liegen die Wildtyp-Fragmente (Spur wt), die das zu deletierende Gen oder Operon enthalten, höher als die verkürzten Fragmente der Klone der Deletions-Mutanten $\Delta pst1$ (Spuren 1-4), $\Delta pst2$ (Spuren 1-5) und $\Delta phoU4$ (Spuren 1-2).

Die Southernblots in Abb. 35B/D/F zeigen Hybridisierungen der DNA der gleichen Stämme mit den jeweiligen Gensonden *OE4475R*, *pstS₂* und *phoU4* (siehe Tab. 4).

Die Wildtyp-Fragmente (Spur wt) mit untersuchtem Operon bzw. Gen sind gut zu erkennen. Bei den entsprechenden Klonen der Deletions-Mutanten $\Delta pst1$ (Spuren 1-4), $\Delta pst2$ (Spuren 1-5) und $\Delta phoU4$ (Spuren 1-2) erscheint die Bande nicht, d.h. es handelt sich um eine erfolgreiche Deletion.

Die Fragmentgröße für die Deletions-Mutante KF100 ($\Delta pst2$) fällt mit 2750 bp kleiner aus als rechnerisch mit etwa 5150 bp zu erwarten wäre. Der Grund ist, dass für die Restriktion der genomischen DNA im Southernblot das Restriktionsenzym *PstI* eingesetzt wurde, für welches auch zwischen den stromauf- und stromabwärts liegenden Deletionskonstrukten eine Schnittstelle vorhanden ist. Bei der Integration des Vektors pKF100 in das halobakterielle Genom und der anschließenden Desintegration, wird diese *PstI*-Schnittstelle an genannter Stelle in das Genom eingebracht. Im vorliegenden Southernblot wird durch die Restriktion mit *PstI* ein Fragment mit 2750 bp Länge erzeugt, welches Teil der stromaufwärts liegenden Region ist und somit mit der DIG-markierten Sonde hybridisieren kann. Ein weiteres 2400 bp langes Fragment enthält wiederum den stromabwärts liegenden Bereich und kann daher auf dem Blot nicht detektiert werden. Im Falle eines Verbleibs des Deletionsplasmids im Genom,

d.h. keine Desintegration durch das 2. *crossing over*, wäre noch ein weiteres Signal bei 17380 bp bzw. ein einzelnes Signal bei 17730 bp vorhanden.

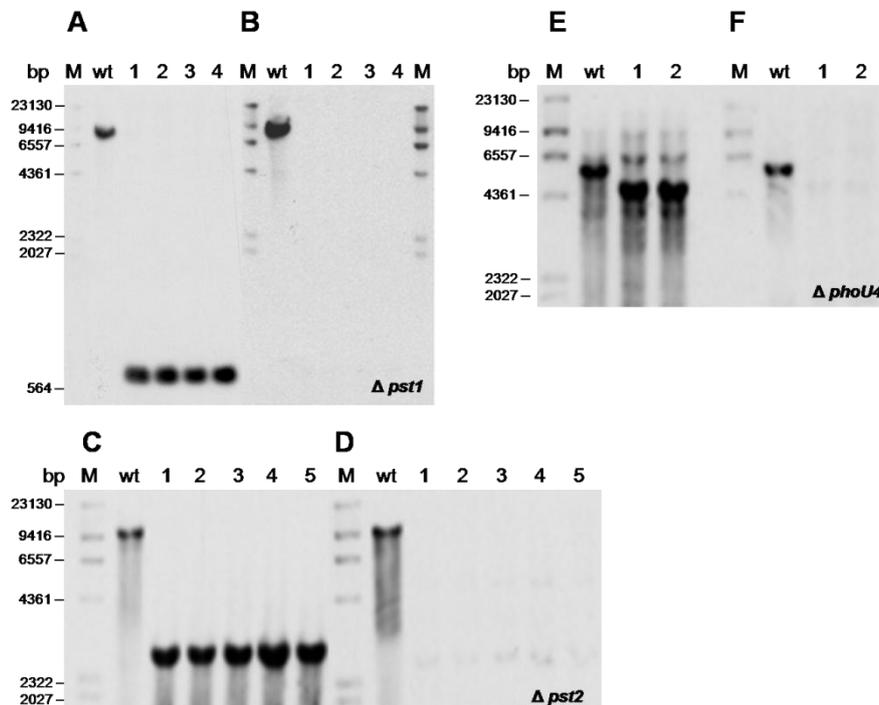


Abb. 35: Southernblot-Analyse zur Detektion der *pst1* (A+B)-, *pst2* (C+D)- und *phoU4* (E+F)-Deletions-Mutanten.

Genomische DNA aus *H. salinarum* R1 wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit Sonden, welche gegen eine flankierende Sequenz des Operons (A/C/E) und gegen ein Gen innerhalb des Operons (B/D/F) gerichtet waren. Siehe hierzu Tab. 4. M: DNA molecular weight marker II, DIG-markiert; wt: Ausgangs-Stamm R1 für die Deletion als Positivkontrolle; 1-4: genomische DNA aus verschiedenen *pst1*-Deletionsklonen (A+B); 1-5: genomische DNA aus verschiedenen *pst2*-Deletionsklonen (B+C) und 1-2: genomische DNA aus zwei *phoU4*-Deletionsklonen (E+F).

Die in Abb. 36A/C gezeigten Southernblots stellen jeweils die Hybridisierungen von DNA-Fragmenten des Wildtyps und vier Klonen der Deletions-Mutante Δugp und zwei der Deletions-Mutante $\Delta aph\Delta ugp$ mit den Sonden für die flankierenden Regionen des *ugp*-Operons bzw. des *aph*-Gens dar (siehe Tab. 4). Die Wildtyp-Fragmente (Spur wt) enthalten noch den zu deletierenden Sequenzbereich und liegen daher höher als die entsprechend verkürzten Fragmente der Klone der Deletions-Mutanten Δugp (Spuren 1-4) und $\Delta aph\Delta ugp$ (Spuren 1*-2* und 1-2).

Beide Southernblots in Abb. 36B/D zeigen die Hybridisierung der entsprechenden Gensonden mit DNA-Fragmenten des Wildtyps und vier Klonen der Deletions-Mutante Δugp sowie zwei der Deletions-Mutante $\Delta aph\Delta ugp$. Die Wildtyp-Fragmente (Spur wt), welche das

entsprechende Operon bzw. Gen enthalten, sind gut zu erkennen. Für die jeweiligen Klone der Deletions-Mutanten Δugp (Spuren 1-4) und $\Delta aph\Delta ugp$ (Spuren 1*-2* und 1-2) kann keine Bande detektiert werden, d.h. es handelt sich um die erfolgreiche Deletion. Die in Abb. 36D höher laufenden drei Banden (Spuren wt, 1 und 2) sind auf eine unspezifische Bindung der *aph*-Sonde zurückzuführen.

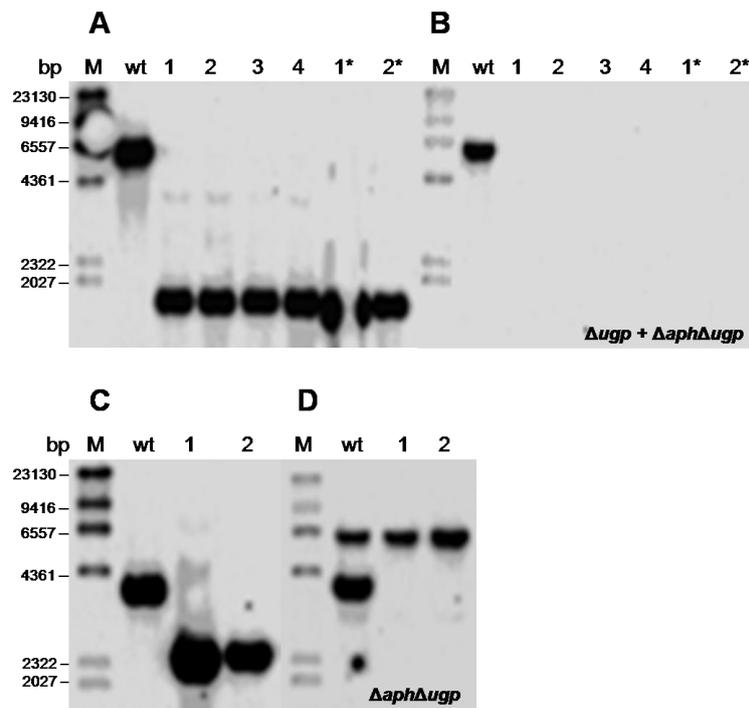


Abb. 36: Southernblot-Analyse zur Detektion der *ugp*-Deletions-Mutante und *aph-ugp*-Doppeldelentions-Mutante.

Genomische DNA aus *H. salinarum* R1 wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit Sonden, welche gegen eine flankierende Sequenz des Operons (A+C) und gegen ein Gen innerhalb des Operons (B+D) gerichtet waren. Siehe hierzu auch Tab. 4. M: DNA molecular weight marker II, DIG-markiert; wt: Ausgangs-Stamm R1 für die Deletion als Positivkontrolle; 1-4: genomische DNA aus verschiedenen *ugp*-Deletionsklonen (A+B); 1*-2* (A+B) und 1-2 (C+D): genomische DNA aus zwei *aph-ugp*-Doppeldelentionsklonen mit Sonden für *ugp* (A+B) bzw. *aph* (C+D).

Die Deletion der Operons *pst1*, *pst2*, *ugp* sowie des Gens *phoU4* wurde damit erfolgreich durchgeführt und alle Deletions-Mutanten wurden mit Hilfe des Southernblots verifiziert. Eine starke Repression der Gene des *pst1*- bzw. *pst2*-Operons in der entsprechenden Deletions-Mutante war eine zusätzliche Bestätigung der erfolgreichen Deletion (siehe qPCR in Kapitel 3.6.1).

3.3.2 Konstruktion der *knockout*-Stämme KF105 (ko:*pstC₁-OE4471R*) und KF106 (ko:*pstC₂-phoU₂*)

Ziel der Herstellung der *knockout*-Stämme war es, die Gene der Phosphattransporter Pst1 (*pstC₁-OE4471R*) bzw. Pst2 (*pstC₂-phoU₂*) auszuschalten und dabei das Gen des Phosphatbindeproteins *pstS₁* bzw. *pstS₂* funktionsfähig zu erhalten. Die *knockout*-Stämme besitzen somit wie die Deletions-Mutanten jeweils nur einen voll funktionsfähigen phosphatspezifischen ABC-Transporter (Pst1 oder Pst2), aber zusätzlich noch das zweite Phosphatbindeprotein (PstS₁ oder PstS₂) des jeweils ausgeschalteten Transporters. In folgenden Untersuchungen sollte die Phosphataufnahme beider resultierender *knockout*-Stämme analysiert werden.

Die Strategie der Konstruktion des jeweiligen *knockout*-Vektors für die Gene *pstC₁-OE4471R* und *pstC₂-phoU₂* wird in der repräsentativen Darstellung in Abb. 37 anhand des Knockouts des *pst2*-Operons gezeigt. Analog dazu wurde der Knockout des *pst1*-Operons durchgeführt.

Die *knockout*-Vektoren pKF105 (für das *pst1*-Operon) und pKF106 (für das *pst2*-Operon) enthalten die letzten 600 bp des 1140 bp langen *pstS₁*-Gens bzw. 625 bp des 1035 bp langen *pstS₂*-Gens (schwarzer Blockpfeil in Abb. 37). Stromabwärts davon wurde jeweils eine Terminatorsequenz eingebaut (grauer Kasten). Es handelt sich hier um den Terminator des *flgA*-Operons. Die Vektoren enthalten auch einen Selektionsmarker (Novobiocinresistenz = Nov^R), der die Selektion der positiven Mutanten auf Agarplatten mit Novobiocin ermöglicht. Nach der Integration des Vektors in das Genom über homologe Rekombination am *pstS₁*- bzw. *pstS₂*-Gen, bleibt die Synthese des *pstS₁*- bzw. *pstS₂*-Transkripts in den *knockout*-Mutanten erhalten und endet am stromabwärts gelegenen Terminatorbereich. Die Transkription des restlichen *pst1*- bzw. *pst2*-Operons (offene Blockpfeile in Abb. 37) wird durch ein Fehlen des Promotors verhindert, was einen *knockout* der Gene *pstC₁*, *pstA₁*, *pstB₁*, *phoU₁*, *OE4475R*, *OE4471R* bzw. *pstC₂*, *pstA₂*, *pstB₂*, *phoU₂* in der jeweiligen *knockout*-Mutante zur Folge hat.

Die Verifizierung der positiven *knockout*-Mutanten erfolgte mit Hilfe einer PCR. Eine anschließende RT-qPCR sollte zusätzlich bestätigen, dass in der jeweiligen *knockout*-Mutante die Transkription des Gens *pstC₁* bzw. *pstC₂* reprimiert bis ausgeschaltet wurde, das Gen *pstS₁* bzw. *pstS₂* jedoch noch auf gleichem Niveau transkribiert wird. Die Verifizierung mittels RT-qPCR ist in Kapitel 3.6.1 zu finden.

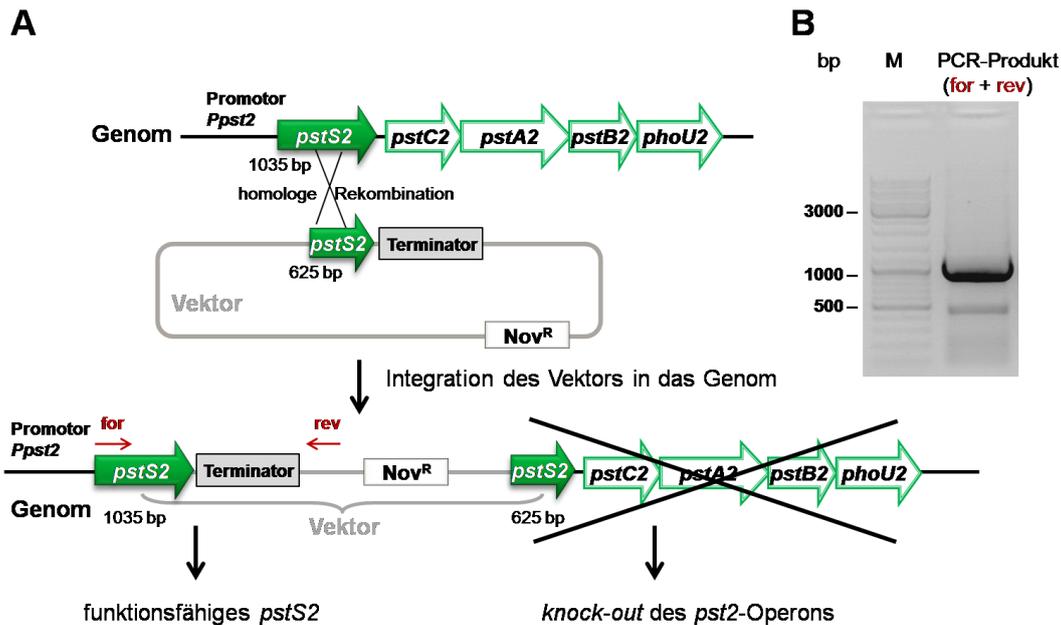


Abb. 37: Schematische Darstellung des Knockouts des *pst2*-Operons über die Integration des *knockout*-Vektors in das Genom von *H. salinarum* (A) und Gelbild des PCR-Produkts für die Mutanten-Verifizierung (B).

Die Vorgehensweise, die hier dargestellt wird, wurde analog hierzu für den Knockout des *pst1*-Operons verwendet. Der *knockout*-Vektor enthält die letzten 625 bp des 1035 bp langen *pstS₂*-Gens (schwarzer Blockpfeil) und eine stromabwärts davon eingebrachte Terminatorsequenz (grauer Kasten). Der Vektor verfügt zusätzlich über einen Selektionsmarker (*Nov^R*). Nach der Integration des Vektors in das Genom über homologe Rekombination am *pstS₂*-Gen, bleibt die Synthese des *pstS₂*-Transkripts in den *knockout*-Mutanten erhalten und endet am stromabwärts liegenden Terminator. Die Transkription des restlichen *pst2*-Operons (als offene Blockpfeile dargestellt) ist durch ein Fehlen des Promotors gestört, was einen *knockout* der Gene *pstC₂*, *pstA₂*, *pstB₂*, *phoU₂* in den *knockout*-Mutanten zur Folge hat. Die Verifizierung der positiven Mutanten erfolgte mit Hilfe einer PCR unter Verwendung von zwei Oligonukleotiden, von welchen eines im *pstS₂*-Gen (als roter Pfeil und „for“ gezeigt) und eines im Vektor (als roter Pfeil und „rev“ dargestellt) ansetzt. Das PCR-Produkt kann nur in der Mutante amplifiziert werden, welche den Vektor integriert hat. Das PCR-Produkt, mit einer erwarteten Länge von 1080 bp, wurde durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht (B). M = Längenmarker (GeneRuler DNA-Ladder Mix). Die Identität der PCR-Produktsequenz wurde durch Gelextraktion und Sequenzierung bestätigt.

Die PCR wurde unter Verwendung von zwei Oligonukleotiden durchgeführt, von denen eines im Leserahmen des *pstS₁*- bzw. *pstS₂*-Gens (roter Pfeil „for“ in Abb. 37) ansetzte. Es wurde eine Sequenz im *pstS₁*- bzw. *pstS₂*-Gen gewählt, die stromaufwärts des Gens im halobakteriellen Genom liegt und somit nicht im Vektor enthalten ist. Das andere Oligonukleotid (roter Pfeil „rev“ in Abb. 37) setzte im Vektor stromabwärts des Terminators an. Die PCR-Produkte für beide *knockout*-Mutanten können nur in der Mutante amplifiziert werden, welche den jeweiligen Vektor im Genom integriert hat. Im Wildtyp kann kein PCR-Produkt amplifiziert werden. Die PCR-Produkte, mit einer erwarteten Länge von 1100 bp (*pst1*) bzw. 1080 bp (*pst2*), wurden durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht (Gelbild für *pst2* in Abb. 37B). Nach der Gelextraktion wurde die Sequenzidentität der PCR-Produkte durch eine Sequenzierung bestätigt.

Die beiden Knockouts der Gene *pstC₁*, *pstA₁*, *pstB₁*, *phoU₁*, *OE4475R*, *OE4471R* bzw. *pstC₂*, *pstA₂*, *pstB₂*, *phoU₂* konnten erfolgreich durchgeführt werden. Alle Mutanten wurden mit Hilfe der PCR verifiziert. Das Ergebnis der qPCR zeigte, dass die Transkription der Gene *pstC₁* und *pstC₂* in der jeweiligen *knockout*-Mutante reprimiert war, während die der Gene *pstS₁* und *pstS₂* ungefähr auf gleichem Niveau blieb (siehe dazu Kapitel 3.6.1). Somit war der gewünschte Effekt durch die Entfernung des Promotors eingetreten und die Stämme konnten weiter verwendet werden.

3.3.3 Wachstumsverhalten der verschiedenen Knockout-Stämme

Zu Beginn wurde das Wachstumsverhalten der hergestellten Stämme untersucht. Die Auswirkung eines Knockouts des entsprechenden Gens auf das Wachstum der Zellen wurde durch den Vergleich der Wachstumskurven der Mutanten und des Wildtyps festgestellt.

Zunächst wurden jeweils 5 µl aller Stämme in einen 100 ml-Kolben mit 35 ml Komplexmedium (HM) angeimpft und anschließend im Dunkeln unter aeroben Bedingungen kultiviert. Da die Stämme KF101 (R1Δ*pst1*), KF100 (R1Δ*pst2*), KF105 (ko:*pstC1-OE4471R*) und KF106 (ko:*pstC2-phoU2*) alle nur jeweils einen funktionierenden Phosphattransporter besitzen, sollte untersucht werden, ob sich durch den eingeschränkten Phosphattransport das Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp verändert.

In Abb. 38A ist zu sehen, dass die Wachstumskurven der beiden Deletions-Mutanten KF101 und KF100 fast identisch mit der des Wildtyps sind. Die Wachstumskurven der beiden *knockout*-Mutanten KF105 und KF106 sind in Abb. 38B gezeigt. Die Messpunkte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen dar. Da dem Medium beider Mutanten zum Erhalt des integrierten *knockout*-Vektors Novobiocin zugegeben wurde, zeigen beide ein etwas langsames Wachstum als der Wildtyp. Da durch die Deletions-Mutanten KF100 und KF101 bereits bestätigt werden konnte, dass die Zellen ein uneingeschränktes Wachstum mit nur einem funktionierenden Phosphattransporter zeigen, wird das langsamere Wachstum nicht auf den eingeschränkten Phosphattransport zurückgeführt.

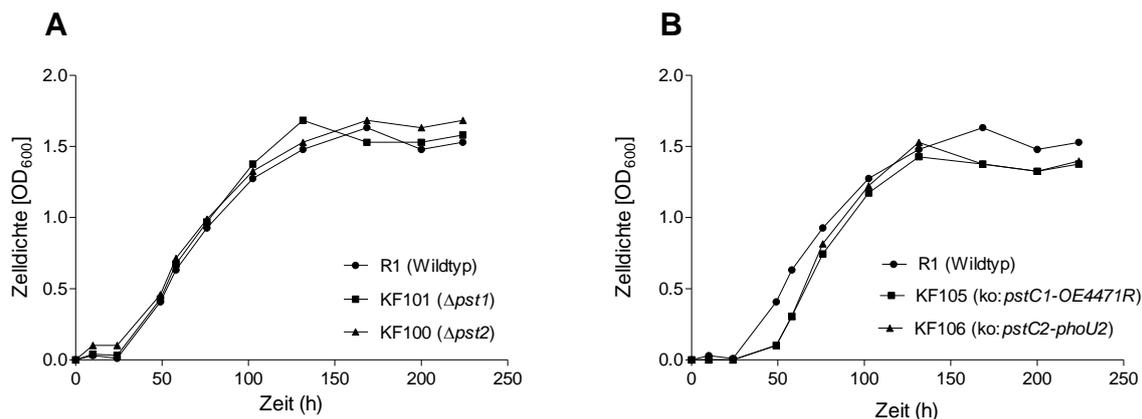


Abb. 38: Wachstumskurven der Deletions-Mutanten KF101 ($\Delta pst1$) und KF100 ($\Delta pst2$) (A) sowie der *knockout*-Mutanten KF105 (ko:pstC1-OE4471R) und KF106 (ko:pstC2-phoU2) (B) verglichen mit dem Wildtyp R1.

Alle vier Stämme wurden in Komplexmedium (HM) im Dunkeln unter aeroben Bedingungen kultiviert. Die optische Zelldichte wurde durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm ermittelt. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen.

Der Vergleich des Wachstumsverhaltens der Deletions-Stämme KF102 ($R1\Delta ugp$) und KF103 ($R1\Delta aph\Delta ugp$) mit dem des Wildtyps ist in Abb. 39A gezeigt. Die Messpunkte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen dar. Die beiden Deletions-Stämme sind nicht mehr in der Lage Glycerin-3-phosphat aufzunehmen und die Doppeldeletions-Mutante kann zusätzlich kein anorganisches Phosphat aus der Hydrolyse von Monophosphorsäureestern gewinnen. Aus Abb. 39A geht hervor, dass beide Stämme dennoch keine Abweichungen zum Wachstumsverhalten des Wildtyps zeigen. Erst in der stationären Phase macht sich ein Unterschied bei der Doppeldeletions-Mutante KF103 ($R1\Delta aph\Delta ugp$) bemerkbar, die im Vergleich zum Wildtyp eine niedrigere Zelldichte erreicht. Vermutlich wird hier durch die fehlende alkalische Phosphatase Aph der Phosphatbedarf der Zelle nicht ausreichend gedeckt. Auch das Wachstumsverhalten der Deletions-Mutante KF104 ($R1\Delta phoU4$) zeigt nur eine minimale Abweichung zum Wildtyp (siehe Abb. 39B). Der einzige Unterschied war, dass der *phoU4*-Deletions-Stamm in der stationären Phase eine höhere Zelldichte als der Wildtyp erreichte. Der Wildtyp hatte jedoch eine niedrigere Zelldichte als in anderen Messungen wie beispielsweise in Abb. 39A.

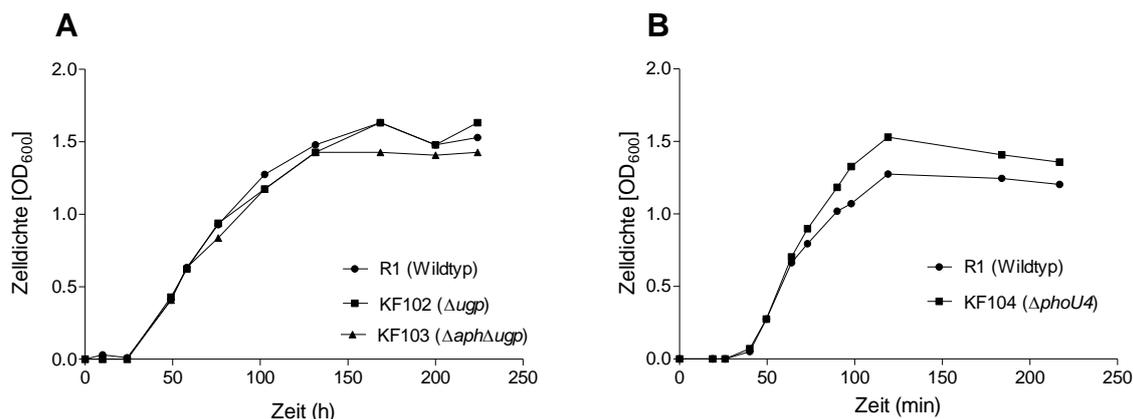


Abb. 39: Wachstumskurven der Deletions-Mutanten KF102 (Δugp) und KF103($\Delta aph\Delta ugp$) (A), sowie ($\Delta phoU4$) (B) im Vergleich zum Wildtyp R1.

Alle vier Stämme wurden in Komplexmedium (HM) im Dunkeln unter aeroben Bedingungen kultiviert. Die optische Zelldichte wurde durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm ermittelt. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen.

Keine der ausgeführten Gen-Deletionen hatte eine offensichtliche Auswirkung auf das Wachstumsverhalten der Zellen in Komplexmedium. Daraus wird gefolgert, dass es sich bei den deletierten Genen nicht um essentiellen Gene für *H. salinarum* handelt.

3.4 Die phosphatabhängigen ABC-Transporter Pst1, Pst2 und Ugp

Sowohl das *pst1- als auch das pst2*-Operon kodieren für die Untereinheiten primärer Phosphattransporter, das *ugp*-Operon für die Untereinheiten des primären Glycerin-3-Phosphattransporters. Diese Transportsysteme werden der Superfamilie der ABC-Transporter zugeordnet und befördern Substanzen spezifisch und aktiv unter ATP-Verbrauch in die Zelle. Die Gene der *pst1- pst2*- und *ugp*-Operons werden durch Phosphatmangel induziert, somit sind alle drei Transporter phosphatabhängig reguliert und gehören zum halobakteriellen PHO-Stimulon (Wende *et al.*, 2009).

Der Homologievergleich der Phosphatbindeproteine von *H. salinarum* mit denen von anderen Organismen, zeigte, dass die beiden Phosphattransporter Pst1 und Pst2 zwar eine Homologie zueinander aufweisen, jedoch verwandtschaftlich weiter entfernt sind als mit Pst-Transportern aus anderen archaealen Organismen. Die unterschiedliche Identität der beiden Phosphatbindeproteine PstS₁ und PstS₂, bekräftigte die Vermutung, dass beide

unterschiedliche Affinitäten zu anorganischem Phosphat (P_i) besitzen und sich somit der Phosphattransport von Pst1 und Pst2 voneinander unterscheiden könnte.

Folglich sollte der Unterschied zwischen beiden Transportern untersucht werden. In Folge wurde sowohl die Funktion der Proteinkomplexe Pst1, Pst2 und Ugp bestätigt, als auch die Transporter Pst1 und Pst2 kinetisch charakterisiert. Um zwischen dem Transport der Transporter unterscheiden zu können, wurden die Untersuchungen mit Hilfe von Deletions-Mutanten durchgeführt, denen jeweils ein Transporter fehlte. Durch das untersuchte Transport- und Wachstumsverhalten der jeweiligen Stämme konnten einerseits Rückschlüsse auf die Funktion des deletierten Transporters gezogen werden. Andererseits konnten durch die Deletion eines der beiden Pst-Transporter die kinetischen Parameter des jeweils anderen Pst-Transporters bestimmt werden. Die Deletions-Stämme wurden immer in Relation zum Wildtyp gesetzt.

3.4.1 Homologievergleiche der Proteine der ABC-Transporter Pst1, Pst2 und Ugp

Durch *in silico* Homologievergleiche der durch die Operons *pst1*, *pst2* und *ugp* kodierten Proteine mit Proteinen aus anderen Mikroorganismen, wurden Rückschlüsse auf die Funktion und Struktur der Transporter in *H. salinarum* gezogen.

Alle Untersuchungen wurden mit Hilfe der Gen- und Proteinanalyse-Plattform MIGenAS (www.migenas.mpg.de) durchgeführt. Die Sequenzhomologie-Suche der zu untersuchenden Proteine erfolgte mit dem Such-Algorithmus BLASTP. Die Suche wurde mit Proteinsequenzen, die der Datenbank HaloLex (www.halolex.mpg.de) entnommen sind, im Protein-Protein-BLAST gegen die NCBI-Proteindatenbank von 55 Archaeen durchgeführt.

Homologe des Phosphatbindepoteins PstS wurden ausgewählt und mit ihnen mit Hilfe des Programms ClustalW ein multiples Sequenz-Alignment erstellt. Auf Grundlage dieser Alignmentdaten wurde daraufhin eine Distanzmatrix erstellt. Anhand dieser wurde der phylogenetische ungewurzelte Stammbaum unter Verwendung des *Neighbour-Joining*-Algorithmus (Saitou & Nei, 1987) im Programm SplitsTree berechnet. Dadurch konnten die evolutionären Beziehungen der homologen PstS-Proteine untereinander dargestellt werden.

Die hypothetische Topologie der ABC-Transporter Pst1 und Pst2 wurde in Abb. 9A bereits gezeigt und ist analog zum gezeigten System aus *E. coli* (Abb. 5) aus jeweils 4 Bausteinen zusammengesetzt. Es umfasst ein periplasmatisches P_i-Bindeprotein (PstS), zwei integrale Membranproteine (PstA und PstC) und ein ATP-Bindeprotein (PstB), das wahrscheinlich ein Dimer bildet (Chan & Torriani, 1996). Darüber hinaus enthält sowohl das *pst1*- als auch *pst2*-Operon ein *phoU*-Homolog. Das PhoU von *E. coli* ist für den Phosphattransport nicht essentiell, stellt aber ein Mediatorprotein dar, das an der Regulation des PHO-Regulons beteiligt ist (Steed & Wanner, 1993).

Das *pst*-Operon von *E. coli* setzt sich, wie das *pst2*-Operon in *H. salinarum*, aus den 5 Genen *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* und *phoU* zusammen. Homologievergleiche zeigten, dass die kodierenden Sequenzen der Gene des *pst1*- und *pst2*-Genclusters von *H. salinarum* homolog zu den Genen des *pstSCAB-phoU*-Operons aus *E. coli* sind. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Proteine dieser Operons von *H. salinarum* und *E. coli* zeigt, dass das PhoU2 29 % Identität aufweist, während PhoU1 keine signifikante Homologie zeigt (Tab. 6).

Tab. 6: Vergleich der durch das *pst*-Operon kodierten Aminosäuresequenzen aus *E. coli* mit der durch das *pst1*- und *pst2*-Operon kodierten Aminosäuresequenzen aus *H. salinarum*.

Die homologen Aminosäuresequenzen der *pst*-Operons in *H. salinarum* wurden auch verglichen. Prozentuale Angaben der Identitäten der Peptidsequenzen der jeweiligen Proteine. *n.s. = nicht signifikant

Vergleich	Identität (%)				
<i>H. salinarum</i> mit <i>E. coli</i>	PstS1 n.s.*	PstC1 30 %	PstA1 37 %	PstB1 48 %	PhoU1 n.s.*
	PstS2 n.s.*	PstC2 29 %	PstA2 32 %	PstB2 53 %	PhoU2 29 %
<i>H. salinarum</i> (Pst1 mit Pst2)	PstS 26 %	PstC 29 %	PstA 39 %	PstB 65 %	PhoU n.s.*

Die höchste Ähnlichkeit zu *E. coli* hatten die ATP-Bindeproteine PstB1 und PstB2 (48 % bzw. 53 % identische Aminosäuresequenz). Die niedrigste Homologie zeigten die Phosphatbindeproteine PstS1 und PstS2, sowie das PhoU1. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Proteine der beiden *pst*-Operone von *H. salinarum* untereinander zeigt, dass die Proteine PhoU nicht signifikant homolog zueinander sind. Die Proteine PstS weisen mit 26 % eine geringe Homologie auf. PstB zeigt die höchste Identität mit 65 %, PstA und PstC sind zu 39 % bzw. 29 % identisch.

Die hypothetische Struktur der Transporter beider *pst*-Operone ist in Abb. 9 dargestellt.

Das Ugp-System in *H. salinarum* ist analog zu Pst aus *E. coli* aus 4 Bausteinen zusammengesetzt und umfasst ein periplasmatisches Bindeprotein für Glycerin-3-phosphat (G3P) und Glycerinphosphodiester (UgpB), zwei integrale innere Membranproteine (UgpA und UgpE) und ein ATP-Bindeprotein (UgpC).

In *E. coli* besteht das *ugp*-Operon (*ugpBAECQ*) aus 5 Genen (siehe Abb. 5B), in *H. salinarum* das homologe *ugp*-Gencluster (*ugpBAEC*) aus 4 Genen (siehe Abb. 9C). Das *ugpQ*-Gen in *H. salinarum* ist jedoch nicht wie bei *E. coli* im *ugp*-Operon lokalisiert, sondern bildet an einer anderer Stelle mit einem anderen Gen (*moaD*) ein Gencluster.

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Proteine der Operons von *H. salinarum* und *E. coli* zeigt, dass die beiden Permeasen UgpA und UgpE 38 % Identität aufweisen (Tab. 7). Die höchste Ähnlichkeit ist, wie schon beim Pst-Transporter, in dem ATP-Bindeprotein UgpC (46 % Identität) zu finden. Den größten Unterschied zeigt das Phosphatbindeprotein UgpB, das eine 29 % identische Aminosäuresequenz zu UgpB aus *E. coli* hat.

Tab. 7: Vergleich der durch das *ugp*-Operon kodierten Aminosäuresequenzen aus *E. coli* mit der aus *H. salinarum*.

Prozentuale Angaben der Identitäten der Peptidsequenzen der jeweiligen Proteine.

Vergleich	Identität (%)			
<i>H. salinarum</i> mit <i>E. coli</i>	UgpB 29 %	UgpA 38 %	UgpE 38 %	UgpC 46 %

Eine Verwandtschaftsanalyse der Gencluster *pst1*, *pst2* und *ugp* mit anderen halophilen Archaeen ergab im Vergleich zu *E. coli* eine deutlich höhere Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz (siehe Tab. 8).

Der Vergleich wurde mit drei halophilen Archaeen *Haloarcula marismortui*, *Haloquadratum walsbyi* und *Natronomonas pharaonis* angestellt.

Die stärkste Homologie wurde, analog zum Vergleich mit *E. coli*, in den ATP-Bindeproteinen PstB₁ und PstB₂ (59 – 79 %) und eine hohe in UgpC (38 - 49 %) gefunden.

Die Substratbindeproteine PstS₁, PstS₂ und UgpB waren deutlich am niedrigsten homolog zueinander. Die höchste Sequenzidentität wies das PstS₁ von *H. salinarum* zum Phosphatbindeprotein YqgG aus *H. marismortui* mit 51 % auf.

Tab. 8: Vergleich der durch das *pst1*, *pst2*- und *ugp*-Operon kodierten Aminosäuresequenzen aus *H. salinarum* mit den Aminosäuresequenzen, die durch die verschiedenen *pst*-Operons aus *Haloarcula marismortui*, *Haloquadratum walsbyi* und *Natronomonas pharaonis* kodiert werden.

Gezeigt werden die prozentualen Angaben der Identitäten der Peptidsequenzen der jeweiligen Proteine. Die Anzahl der Pst- und Ugp-Transporter sowie der PhoU-Proteine in dem jeweiligen halophilen archaealen Organismus ist angezeigt. *n.s. = nicht signifikant; † = höchste Identität mit einem der jeweiligen PhoU-Proteine

<i>Halophiler Organismus</i>	<i>H. salinarum</i>					
	Pst1	Identität (%)	Pst2	Identität (%)	Ugp	Identität (%)
<i>Haloarcula marismortui</i> 2 Pst-Transporter 2 PhoU-Proteine 1 Ugp-Transporter	PstS ₁ PstC ₁ PstA ₁ PstB ₁ PhoU ₁	51 %; 29 % 40 %; 29 % 59 %; 31 % 69 %; 65 % 57 %†	PstS ₂ PstC ₂ PstA ₂ PstB ₂ PhoU ₂	49 %; n.s.* 55 %; 34 % 49 %; 32 % 79 %; 64 % 67 %†	UgpB UgpA UgpE UgpC	40 % 50 % 39 % 49 %
<i>Haloquadratum walsbyi</i> 1 Pst-Transporter 5 PhoU Proteine 1 PhoU-Homolog 1 Ugp-Transporter	PstS ₁ PstC ₁ PstA ₁ PstB ₁ PhoU ₁	42 % 44 % 62 % 69 % 60 %†	PstS ₂ PstC ₂ PstA ₂ PstB ₂ PhoU ₂	26 % 30 % 33 % 65 % 59 % †	UgpB UgpA UgpE UgpC	n.s.* 22 % 24 % 38 %
<i>Natronomonas pharaonis</i> 2 Pst-Transporter 5 PhoU-Proteine	PstS ₁ PstC ₁ PstA ₁ PstB ₁ PhoU ₁	26 %; n.s.* 28 %; 27 % 44 %; 34 %; 59 %; 59 % 51 %†	PstS ₂ PstC ₂ PstA ₂ PstB ₂ PhoU ₂	37 %; 33 % 52 %; 46 % 42 %; 41 % 76 %; 74 % 61 %†		

Die Phosphatbindeproteine PstS₁ und PstS₂ zeigten zwar, wie erwartet (Albers *et al.*, 2004), die deutlich schwächste Homologie zu Phosphatbindeproteinen anderer Organismen, stellten aber die interessantesten Kandidaten der Verwandtschaftsanalyse dar. Der Unterschied in der Aminosäuresequenz und die damit verbundene unterschiedliche Struktur dieser Proteine können auf eine unterschiedliche Affinität der Proteine zu ihrem Substrat, dem anorganischen Phosphat (P_i) hinweisen. Beide Proteine besitzen sowohl eine N-terminale Tat (*twin arginine translocation*)- Signalsequenz (RR) als auch ein Lipobox-Motiv (LAGC) (Falb *et al.*, 2005, Pohlschroder *et al.*, 2004). Beide Proteine werden in gefaltetem Zustand über das Tat-System aus der Zelle transportiert und sind durch einen N-terminalen Lipidanker in der Membran befestigt. Die an der Zellaußenseite platzierten Proteine sind in ihrer Struktur dem die Zelle umgebenden Medium angepasst. Aufgrund der halophilen Natur der Proteine PstS₁ und PstS₂ ist die Homologie mit Proteinen anderer halophiler Archaeen erwartungsgemäß größer als mit Proteinen aus mesophilen *E. coli* oder *B. subtilis*. Anhand der Aminosäuresequenzen wurde ein phylogenetischer Baum (Abb. 40) erstellt, der die Verwandtschaft der PstS-Proteine aus *Haloarcula marismortui*, *Haloquadratum walsbyi*, *Natronomonas pharaonis*, *E. coli* und

B. subtilis zusammenfasst. Mit Hilfe des Baums wurde die größere Homologie der Proteine PstS₁ (OE4485R) und PstS₂ (OE1679R) zu ihren halophilen Verwandten bestätigt.

Dabei kann man deutlich erkennen, dass die Proteine PstS₁ und PstS₂ näher verwandt sind mit entsprechenden Proteinen aus anderen halophilen Archaeen als untereinander.

Die beiden PstS-Proteine in *H. salinarum* sind paralog zueinander mit einer höheren Orthologie zu dem entsprechenden Pst-Protein aus anderen halophilen Archaeen. Dies kann auf eine frühe evolutionäre Trennung der beiden Genkopien hindeuten.

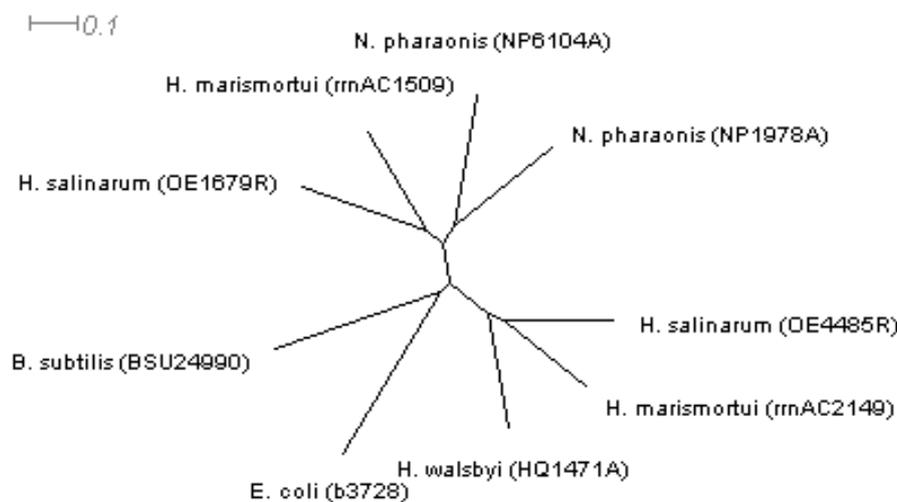


Abb. 40: Verwandtschaftsanalyse der Phosphatbindeproteine PstS.

Der Phylogenetische Baum wurde mit den Aminosäuresequenzen der PstS-Proteine aus *Haloarcula marismortui*, *Haloquadratum walsbyi*, *Natronomonas pharaonis*, *E. coli* und *B. subtilis* erstellt. Der jeweilige Gencode ist in Klammern angegeben. Mit Hilfe des Programms ClustalW, das in der Gen- und Proteinanalyse-Plattform MIGenAS (Max-Planck Integrated Gene Analysis System) zur Verfügung steht, wurde ein multiples Sequenz-Alignment erstellt. Auf Grundlage des multiplen Alignments wurde eine Distanzmatrix erstellt. Anhand dieser wurde der phylogenetische ungewurzelte Stammbaum unter Verwendung des *Neighbour-Joining*-Algorithmus (Saitou & Nei, 1987) im Programm SplitsTree berechnet.

Auch die restlichen Pst1-Transporterproteine sind ähnlich paralog zu dem Pst2-Transportsystem von *H. salinarum* (siehe Tab. 6 und Tab. 8). Beide Phosphatbindeproteine von *H. salinarum* zeigen einen nahen Verwandtschaftsgrad zu je einem entsprechenden Phosphatbindeprotein aus *H. marismortui*. PstS₁ steht in näherer Verwandtschaft mit dem PstS aus *H. walsbyi*, PstS₂ dagegen ist näher mit den beiden Phosphatbindeproteinen aus *N. pharaonis* verwandt. Die Proteine aus *E. coli* und *B. subtilis* liegen in einer eigenen Verwandtschaftsgruppe und liegen zu beiden PstS aus *H. salinarum* verwandtschaftlich am weitesten entfernt.

In Tab. 9 sind die ersten sieben Kandidaten aus dem Protein-Protein-BLAST gegen die NCBI-Protein-Datenbank von 55 Archaeen aufgelistet.

PstS₁ bzw. PstS₂ aus *H. salinarum* zeigen die höchste Ähnlichkeit mit YqgG bzw. PhoX aus *H. marismortui*. Beide Organismen besitzen somit die verwandtschaftlich am nächsten liegenden Phosphatbindeproteine. Bemerkenswerter Weise ist eine hohe Homologie von PstS₂ zu PhoX aus *Archaeoglobus fulgidus*, einem hyperthermopilen Archaeobakterium, zu finden. Neben den Phosphatbindeproteinen aus *Haloarcula marismortui*, *Haloquadratum walsbyi* und *Natronomonas pharaonis* zeigen PstS₁ und PstS₂ eine hohe Ähnlichkeit zu Phosphatbindeproteinen aus drei Methanomicrobia.

Tab. 9: Kandidaten mit den höchsten E-Werten aus dem Protein-Protein-BLAST der Phosphatbindeproteine PstS₁ und PstS₂ aus *H. salinarum* gegen die NCBI-Proteindatenbank von 55 Archaeen.

<i>Protein (H. salinarum)</i>	<i>Gen-Name des Phosphatbindeproteins</i>	<i>Organismus</i>	<i>Score [bit]</i>	<i>E-Wert</i>
PstS₁	yqgG	<i>Haloarcula marismortui</i>	300	3e-81
	pstS	<i>Haloquadratum walsbyi</i>	248	8e-66
	-	<i>Methanosaeta thermophila</i>	95	2e-19
	-	<i>Methanosaeta thermophila</i>	92	1e-18
	-	<i>Methanosarcina mazei</i>	80	7e-15
	pstS	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	80	7e-15
	pstS	<i>Methanosarcina mazei</i>	79	9e-15
PstS₂	phoX	<i>Haloarcula marismortui</i>	267	2e-71
	phoX	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	263	4e-70
	abc14s	<i>Natronomonas pharaonis</i>	191	9e-49
	abc15s	<i>Natronomonas pharaonis</i>	150	3e-36
	-	<i>Methanosarcina mazei</i>	116	4e-26
	-	<i>Methanosarcina mazei</i>	114	3e-25
	-	<i>Methanosarcina barkeri</i>	111	1e-24

Aus dieser *in silico* Analyse, in der die Homologie der Phosphatbindeproteine von *H. salinarum* zu denen von anderen Mikroorganismen verglichen wurde, geht deutlich hervor, dass die beiden Phosphattransporter Pst1 und Pst2 zwar homolog zueinander sind, jedoch untereinander verwandtschaftlich weiter entfernt liegen als zu Pst-Transportern anderer archaealer Organismen. Die unterschiedliche Identität der beiden Phosphatbindeproteine PstS₁ und PstS₂, bekräftigte die Vermutung, dass beide unterschiedliche Affinitäten zu anorganischem Phosphat (P_i) besitzen und sich somit der Phosphattransport von Pst1 von dem

durch Pst2 unterscheidet. In folgenden Versuchen sollte der Unterschied zwischen beiden Transportern näher untersucht werden.

3.4.2 Kinetische Charakterisierung des Phosphattransports und der Affinität der Pst1- und Pst2-Transporter in *H. salinarum*

Das Genom von *H. salinarum* enthält zwei homologe Operons *pst1* und *pst2*, welche für die phosphatspezifischen ABC-Transporter Pst1 und Pst2 kodieren. Homologievergleiche bestätigten eine Sequenzähnlichkeit zu Pst-Transportern anderer Mikroorganismen (siehe vorheriges Kapitel). *E. coli* und *B. subtilis* beispielsweise, besitzen im Gegensatz zu *H. salinarum* jedoch nur eine Kopie des Pst-Transporters. Die Funktion als ein hoch affiner Phosphattransporter wurde mit Hilfe kinetischer Untersuchungen des P_i-Transports bestätigt (Qi *et al.*, 1997, Rosenberg *et al.*, 1977, Willsky *et al.*, 1973).

In vorliegendem Kapitel werden Rückschlüsse aus der kinetischen Analyse verschiedener *pst*-Knockout-Stämme gezogen, die die vermutete Funktion der beiden ABC-Transporter Pst1 und Pst2 als spezifische Transporter für anorganisches Phosphat bestätigte. Die Untersuchung umfasste zunächst die Aufnahme von Na₂HPO₄ und anschließend die Aufnahme von radioaktiv markiertem Phosphat (³²P_i).

Aufgrund der unterschiedlichen phosphatabhängigen Expression der Operons *pst1* und *pst2* (Kapitel 3.1.4.3; (Wende *et al.*, 2009)) und ihrer verwandtschaftlichen Entfernung wurde außerdem vermutet, dass die Bindeproteine PstS₁ bzw. PstS₂ der beiden Transporter über unterschiedliche Phosphataffinitäten verfügen.

Mit Hilfe von ³²P_i-Aufnahme-Versuchen des Wildtyps, der *pst*-Deletions-Mutanten (Δ *pst1*, Δ *pst2*) und der *pst*-knockout-Mutanten (ko:*pstC1-OE4471R*, ko:*pstC2-phoU2*) sollten die kinetische Parameter K_M und v_{max} bestimmt werden. Auf den Genotyp der einzelnen Mutanten wird in Kapitel 3.3 ausführlich eingegangen.

Wie in Kapitel 3.3 bereits beschrieben wurde, war eine Doppeldeletion beider Pst-Transporter in *H. salinarum* nicht möglich. Daraus wurde geschlussfolgert, dass sie die einzigen beiden funktionalen Transporter für anorganisches Phosphat in *H. salinarum* darstellen (siehe Diskussion, Kapitel 4.1). Im Folgenden wurde davon ausgegangen, dass in den Deletions-Mutanten KF100 und KF101, denen jeweils einer der beiden Pst-Transporter fehlt, der verbliebene Transporter den einzigen Transporter für anorganisches Phosphat darstellt.

Ziel war es mehr Licht in die Charakterisierung des Phosphattransports und der Phosphataffinität von Pst1 und Pst2 zu bringen.

3.4.2.1 Kinetik der Na_2HPO_4 -Aufnahme des Wildtyps und der Deletions-Mutanten KF101 und KF100

Die Untersuchung der Phosphataufnahme der *H. salinarum*-Zellen fand in einem Aufnahmeversuch mit Na_2HPO_4 statt. Die Phosphataufnahme der Deletions-Mutanten KF101, KF100 sowie des Wildtyps wurde über einen bestimmten Zeitraum verfolgt und ergab einen ersten Hinweis auf das unterschiedliche Aufnahmeverhalten der drei Stämme. Daraus konnten Rückschlüsse auf den Na_2HPO_4 -Transport über die ABC-Transporter Pst1 und Pst2 gezogen werden.

Bei der Mutante KF101 wurde das *pst1*-Operon deletiert, der Stamm besitzt folglich nur den Pst2-Transporter. Die Mutante KF100, bei der das *pst2*-Operon deletiert wurde, verfügt nur über den Pst1-Transporter.

Um die Phosphataufnahme bei Verlust eines der beiden Transporter mit der des Wildtyps zu vergleichen, wurden die drei Stämme von $+\text{P}_i$ -Bedingungen in die für den Versuch notwendigen $-\text{P}_i$ -Bedingungen überführt. Dazu wurden die Zellen zunächst in $+\text{P}_i$ -Medium (HM) kultiviert, abzentrifugiert und in $-\text{P}_i$ -Medium (SMOP) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend unter sonst gleichbleibenden Bedingungen weiter kultiviert (siehe 2.2.2). Nach 48 h Phosphatmangelbedingungen (Zeitpunkt 0 h) wurden je zwei verschiedene P_i -Konzentrationen (5 μM , 1 mM) zugegeben und eine Negativkontrolle (0 mM P_i) mitgeführt (siehe 2.4.6). Die intrazelluläre Phosphatkonzentration der Zellen wurde in mehreren Zeitintervallen komplexometrisch bestimmt (siehe 2.4.5). Die verschiedenen Messzeiten betragen 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 210 min, 240 min und 360 min. Es wurden drei unabhängige Versuche mit je 3 Replikaten durchgeführt und die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Abb. 41A zeigt die grafische Darstellung der Kinetik der Phosphatanreicherung in der Zelle nach der Zugabe von 5 μM Na_2HPO_4 und die Negativkontrolle (0 mM Na_2HPO_4). Die Stämme R1 (Wildtyp), KF101(R1 Δ *pst1*) und KF100 (R1 Δ *pst2*) zeigten bei Gabe von 0 mM P_i keine Anreicherung von Phosphat in der Zelle und ihre innere P_i -Zellkonzentration kam nicht über 1,864 mM P_i hinaus. Bei Zugabe von 5 μM Na_2HPO_4 zeigten alle drei Stämme einen klaren Anstieg der inneren P_i -Konzentration mit einem apparenten Höhepunkt der P_i -Konzentration bei 60 min beim Wildtyp, bei 30 min bei Δ *pst1* und bei 90 min bei Δ *pst2*. Danach nahm die innere P_i -Konzentration wieder ab.

3 Ergebnisse

Der $\Delta pst1$ -Stamm, der den Pst2-Transporter enthält, zeigte nach der Zugabe von 5 μM P_i eine schnellere Anreicherung und eine höhere P_i -Zellkonzentration als der Stamm, der nur über den Pst1-Transporter ($\Delta pst2$) verfügt. Die $\Delta pst1$ -Mutante erreichte im Übrigen eine höhere Phosphat-Konzentration im Zellinneren als der Wildtyp. Erst ab 90 min glichen sich die Werte aller drei Stämme an.

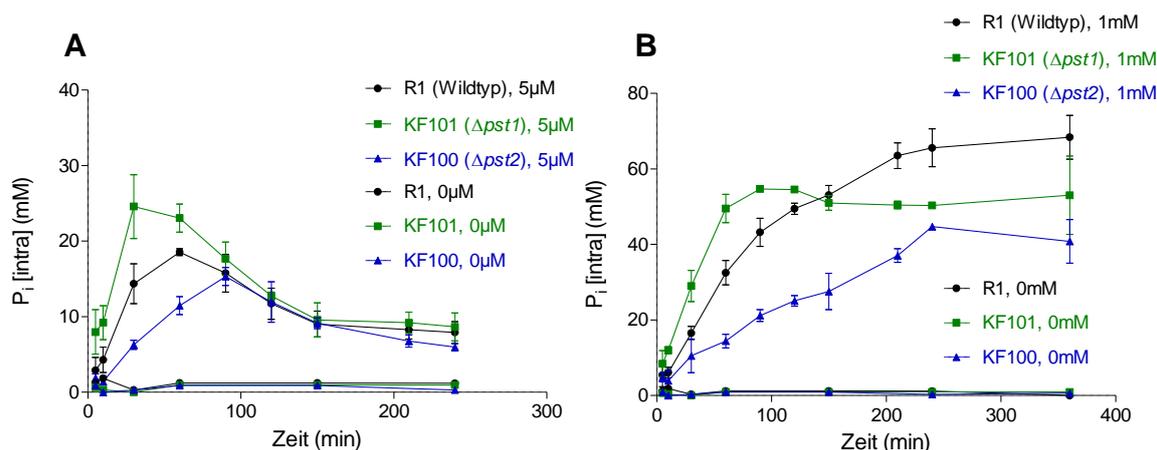


Abb. 41: Graphische Darstellung der Kinetik der Aufnahme von Na_2HPO_4 in den Stämmen R1 (Wildtyp), KF101 ($\text{R1}\Delta pst1$) und KF100 ($\text{R1}\Delta pst2$).

Der Wildtyp ($\Delta pst1$ (grün) und $\Delta pst2$ (blau) wurden 48 h in phosphatlimitiertem Medium inkubiert und anschließend mit 5 μM (A) bzw. 1 mM (B) Na_2HPO_4 versetzt. Es wurden auch Negativkontrollen (0 mM Na_2HPO_4) mitgeführt. Die Zellen wurden in verschiedenen Zeitintervallen (5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 210 min, 240 min und 360 min) geerntet und ihre innere Phosphatkonzentration komplexometrisch bestimmt. Jedes Symbol zeigt den Mittelwert der inneren Phosphatkonzentration aus drei Messreihen mit je drei Replikaten an. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

Abb. 41B zeigt analog zu A die grafische Darstellung nach der Zugabe von 1 mM Na_2HPO_4 und die Negativkontrolle. Auch hier zeigten alle drei Stämme einen klaren Anstieg der inneren P_i -Konzentration bei 1 mM P_i . Die Negativkontrolle (0 mM P_i) zeigte wie erwartet keine Phosphatanreicherung. Im Wildtyp stieg die P_i -Konzentration stetig bis 360 min an. Im Gegensatz dazu erreichte die $\Delta pst1$ -Mutante nach 90 min ihr relatives Maximum, die $\Delta pst2$ -Mutante erst nach 240 min. Ab 240 min ging die innere P_i -Konzentration aller drei Stämme in eine relative Sättigung über.

Auch bei der zugegebenen P_i -Konzentration von 1 mM konnte beobachtet werden, dass der $\Delta pst1$ -Stamm (Pst2-Transporter) gegenüber dem $\Delta pst2$ -Stamm (Pst1-Transporter) schneller Phosphat anreichert und eine höhere P_i -Zellkonzentration erlangt, die er ab 120 min bis 360 min auf einem konstanten Niveau hält. Die höchste innere P_i -Konzentration konnte beim

Wildtyp gemessen werden. Verglichen mit der $\Delta pst1$ -Mutante zeigt dieser zunächst eine niedrigere P_i -Anreicherung, doch ab 120 min nimmt diese im Vergleich kontinuierlich zu.

Der $\Delta pst1$ -Stamm, der den Pst2-Transporter enthält, scheint schneller größere Phosphatmengen aufnehmen zu können. Der Stamm mit Pst1-Transporter nimmt dagegen Phosphat langsamer und gleichmäßiger auf.

3.4.2.2 Kinetik der $^{32}P_i$ -Aufnahme des Wildtyps und der Knockout-Mutanten KF101, KF100, KF105 und KF106

Nachdem sowohl die Deletions-Mutanten KF100 und KF101 als auch der Wildtyp ein unterschiedliches Aufnahmeverhalten bei verschiedenen Na_2HPO_4 -Konzentrationen aufwies, sollten die kinetischen Parameter K_m und v_{max} der $^{32}P_i$ -Aufnahme bestimmt werden. Dazu wurden erneut die Mutanten KF100, KF101 und der Wildtyp R1, aber auch die beiden *knockout*-Mutanten KF105 und KF106 untersucht und deren Werte untereinander verglichen.

3.4.2.2.1 Vergleich von Wildtyp mit den Deletions-Mutanten KF101 ($\Delta pst1$) und KF100 ($\Delta pst2$)

Zunächst war das Ziel die Kinetik der $^{32}P_i$ -Aufnahme sowohl der Deletions-Mutanten KF100 und KF101 als auch des Wildtyps zu verfolgen. Vor allem die unterschiedlichen kinetischen Parameter der Deletions-Stämmen KF100 und KF101 wurden ermittelt und anschließend auch ein Vergleich zwischen Wildtyp und Mutanten gezogen.

Die Durchführung des $^{32}P_i$ -Aufnahmeversuchs (siehe dazu 2.4.7) stellt eine Modifizierung der Prozedur, die in *E. coli* und *B. subtilis* verwendet wurde, dar (Cox *et al.*, 1981, Qi *et al.*, 1997, Steed & Wanner, 1993, Willsky & Malamy, 1980a). Der Versuch begann mit der Überführung der unter $+P_i$ -Bedingungen kultivierten Zellen in $-P_i$ -Bedingungen (siehe 2.2.2). Nach einer Inkubation von 48 h in phosphatlimitiertem Medium, wurden den Stämmen jeweils verschiedene $^{32}P_i$ -Konzentrationen (0,1 μM ; 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 5 μM und 10 μM) zugegeben. Um den K_M -Wert des Stamms KF100 (R1 $\Delta pst2$) genauer bestimmen zu können, wurden zusätzlich niedrigere $^{32}P_i$ -Konzentrationen (0,05 μM ; 0,15 μM ; 0,17 μM ; 0,2 μM) zugegeben, da hier eine höhere $^{32}P_i$ -Affinität festgestellt wurde (siehe unten). Anschließend wurden in verschiedenen Zeitintervallen (0 min; 0,5 min; 1 min; 1,5 min; 2 min; 2,5 min und 3 min) 250 μl Zellen abgenommen und durch eine Nitrocellulose-Membran gefiltert, mit Basalsalz (1 mM P_i) gewaschen und die Radioaktivität [cpm] der Zellen in einem β -Zähler (*Tri-Carb 2100TR liquid scintillation analyzer*) gemessen und anschließend

in mM (Zell- P_i) umgerechnet. Zur Berechnung der aufgenommenen Phosphatkonzentrationen wurden Proben mit bekannten Phosphatmengen als Standard eingesetzt. Der Versuch wurde mindestens in drei unabhängigen Versuchsreihen mit je 3 Replikaten durchgeführt.

Durch eine nicht-lineare Regressionsanalyse wurde ein Hyperbel-Diagramm nach Michaelis-Menten erstellt, welches in Abb. 42A dargestellt ist.

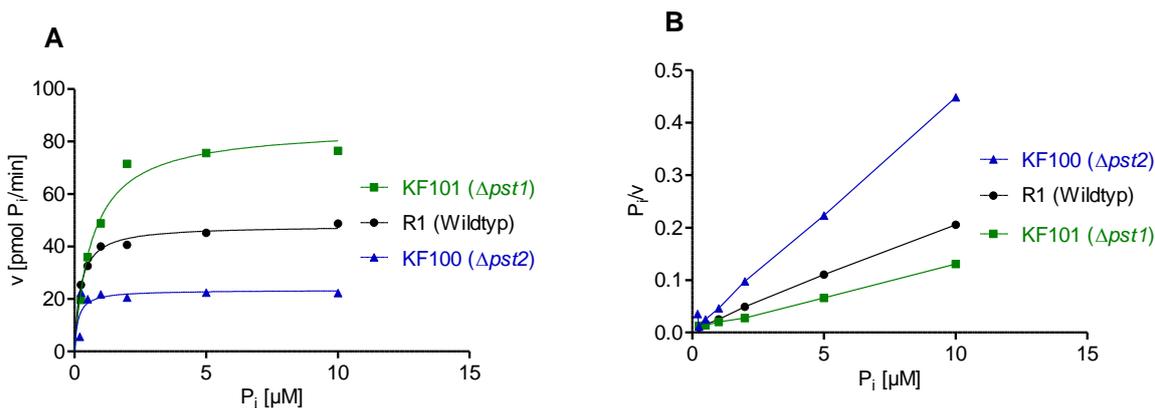


Abb. 42: Graphische Darstellung der $^{32}P_i$ -Aufnahme für Wildtyp (schwarz), $\Delta pst1$ (grün) und $\Delta pst2$ (blau) im Hyperbel-Diagramm nach Michaelis-Menten (A) und im linearisierten Diagramm nach Hanes (B).

Jedes Symbol zeigt das arithmetische Mittel aus mindestens drei Messungen mit je drei Wiederholungen an. Die Zellen wurden in $+P_i$ -Medium (HM) kultiviert und 48 h in $-P_i$ -Medium inkubiert.

Augenscheinlich unterscheidet sich der Kurvenverlauf aller drei untersuchten Stämme (Wildtyp, $\Delta pst1$, $\Delta pst2$) signifikant voneinander. Die Deletions-Mutante R1 $\Delta pst1$ erreicht den höchsten, der Wildtyp einen mittleren und R1 $\Delta pst2$ den niedrigsten V_{max} -Wert. Anhand der nicht-linearen Regressionsanalyse der $^{32}P_i$ -Aufnahme wurden kinetische Parameter (Tab. 10) dreier unabhängiger Versuche mit je drei Replikaten berechnet. Abb. 42B zeigt die Linearisierung der Werte nach Hanes und dient zur Veranschaulichung der Ergebnisse. Die kinetischen Parameter, die aus dem Hanes-Diagramm berechnet wurden, unterscheiden sich nicht auffallend von den Werten aus der nicht-linearen Regressionsanalyse des Michaelis-Menten-Diagramms (Parameter nach Hanes werden nicht gezeigt).

Tab. 10: Kinetische Parameter (K_M - und v_{\max} -Werte) der Transporter Pst1 ($\Delta pst2$), Pst2 ($\Delta pst1$) und beider Transporter (Wildtyp).

Werte wurden mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse aus drei unabhängigen Versuchen der $^{32}\text{P}_i$ -Aufnahme mit je drei Replikaten berechnet.

Mutante	Transporter	K_M [$\mu\text{M P}_i$]	v_{\max} [pmol P_i/min]
KF100 ($\Delta pst2$)	Pst1 (▲)	0,136 \pm 0,07	23,3 \pm 2,1
KF101 ($\Delta pst1$)	Pst2 (■)	0,682 \pm 0,13	85,7 \pm 4,6
Wildtyp R1	Pst1 und Pst2 (●)	0,230 \pm 0,09	47,9 \pm 3,5

Der Pst1-Transporter in der *pst2*-Deletions-Mutante besitzt eine hohe Affinität zu Phosphat ($K_M = 0,136 \mu\text{M P}_i$), transportiert jedoch bei vergleichsweise niedriger Geschwindigkeit ($v_{\max} = 23,3 \text{ pmol P}_i/\text{min}$). Im Vergleich dazu verfügt der Pst2-Transporter ($\Delta pst1$) über eine 5-fach geringere Affinität zu Phosphat ($K_M = 0,682 \mu\text{M P}_i$), erreicht aber eine 3,7-fach höhere Geschwindigkeit ($v_{\max} = 85,7 \text{ pmol P}_i/\text{min}$). Sowohl der K_M - ($0,23 \mu\text{M P}_i$) als auch der v_{\max} -Wert ($47,9 \text{ pmol P}_i/\text{min}$) des Wildtyps liegen etwa zwischen den Parameter-Werten der beiden Deletions-Mutanten.

Sowohl der K_M -Wert des Pst2-Transporters im Stamm $\Delta pst1$ wird durch die Anwesenheit des Pst1-Transporters im Wildtyp 3-fach kleiner als auch der v_{\max} -Wert sinkt um den Faktor 1,8. Der in der Mutante $\Delta pst2$, die den Pst1-Transporter besitzt, gemessene K_M -Wert wird durch die Anwesenheit des Pst2-Transporters im Wildtyp 1,7-fach erhöht und die Geschwindigkeit des Transports steigt um das Doppelte an.

Daraus kann gefolgert werden, dass das Bindeprotein PstS₁ des Phosphattransporters Pst1 eine höhere Affinität zu Phosphat besitzt als das Phosphatbindeprotein PstS₂ des Pst2-Transporters. Die Affinität der Bindeproteine scheint zudem die Geschwindigkeit des Phosphattransports in die Zelle zu beeinflussen, da PstS₂ eine niedrigere Affinität zu Phosphat aufweist und mit einer erhöhten Transport-Geschwindigkeit korreliert. Das Phosphat könnte durch die schwächere Bindung an PstS₂ schneller freigegeben und dadurch auch schneller in die Zelle transportiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass eine hohe Affinität mit einer niedrigeren Geschwindigkeit korreliert und umgekehrt.

3.4.2.2 Vergleich von Wildtyp mit den *knockout*-Mutanten KF105 (*ko:pstC1-OE4471R*) und KF106 (*ko:pstC2-phoU2*)

Sequenzanalysen (Kapitel 3.1.1) zeigen, dass die Proteine PstS₁ und PstS₂ ein Lipobox-Motiv (LAGC) enthalten und somit einen N-terminalen Lipidanker (NLip) aufweisen. Dieser kann sie in die Lage versetzen sich in der Membran verankert horizontal hin und her zu bewegen. Dies könnte eine Interaktion der Bindeproteine mit dem jeweils anderen Pst-Transporter erlauben. Daraus würde resultieren, dass beide Transporter durch zwei Phosphatbindeproteine mit Phosphat versorgt werden. Da das Bindeprotein PstS₁ eine höhere Phosphat-Affinität im Vergleich zu PstS₂ besitzt, ergibt der Wildtyp das arithmetische Mittel aus beiden Affinitäten. Aus den Kurvenverläufen im Michaelis-Menten-Diagramm (Abb. 43A) geht hervor, dass die Phosphataffinität im Stamm, der nur den Pst2-Transporter enthält, bei Anwesenheit des Pst1-Transporters im Wildtyp-Stamm zunimmt. Eine ausführliche Erklärung zu den Ergebnissen wird nachfolgend in Kapitel 4.1 geliefert.

Durch die Untersuchung der Phosphataufnahme zweier *knockout*-Mutanten konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die Phosphatbindeproteine im Wildtyp zu einer Interaktion mit dem jeweils anderen Transporter befähigt sind.

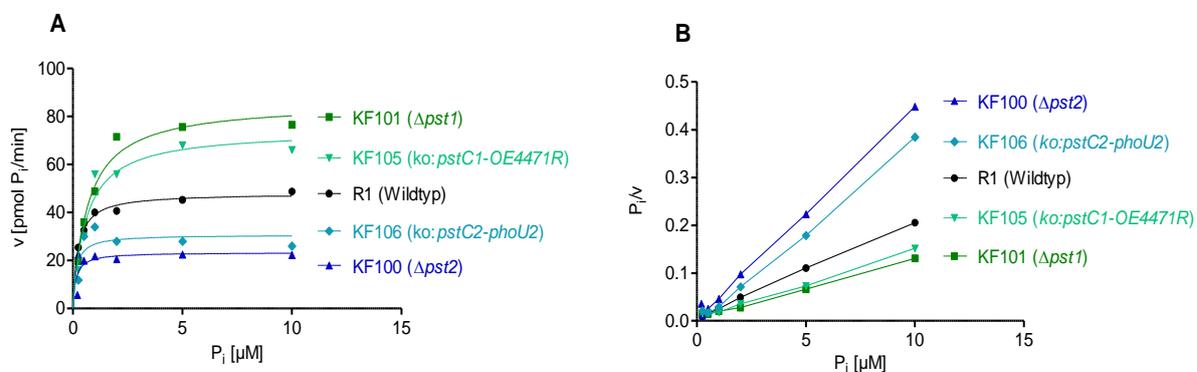


Abb. 43: Graphische Darstellung der ³²P_i-Aufnahme für Wildtyp (schwarz), Δpst1 (grün), Δpst2 (blau), ko:pstC1-OE4471R (hellgrün) und ko:pstC2-phoU2 (hellblau) im Hyperbel-Diagramm nach Michaelis-Menten (A) und im linearisierten Diagramm nach Hanes (B).

Jedes Symbol zeigt den Mittelwert aus mindestens drei Messungen mit je drei Wiederholungen an. Die Zellen wurden in +P_i-Medium (HM) kultiviert und 48 h in -P_i-Medium inkubiert.

Die *knockout*-Stämme KF105 (*ko:pstC1-OE4471R*) und KF106 (*ko:pstC2-phoU2*) enthalten jeweils einen kompletten Transporter und zusätzlich das Phosphatbindeprotein des jeweils anderen Transporters. Die Mutante KF105 (*ko:pstC1-OE4471R*) enthält den funktionsfähigen

Pst2-Transporter sowie das funktionsfähige P_i-Bindeprotein PstS₁, das restliche *pst1*-Operon, welches den Pst1-Transporter kodiert, ist jedoch ausgeschaltet. Entgegengesetzt dazu besitzt die Mutante KF106 (*ko:pstC2-phoU2*) den kompletten Pst1-Transporter und das funktionsfähige Bindeprotein PstS₂, jedoch nicht die restlichen Komponenten des Pst2-Transporters.

Falls PstS₁ und PstS₂ in der Membran lateral beweglich sind und mit dem jeweils anderen Pst-Transporter interagieren, würde sich der aus dem ³²P_i-Transportversuch ergebende K_M- und v_{max}-Wert dem des Wildtyps annähern. Falls beide Bindeproteine nur mit dem ihnen entsprechenden Transporter interagieren können, wären ihre kinetischen Parameter identisch mit dem Deletions-Stamm, dem der gleiche Transporter fehlt.

Die kinetische Messung der ³²P_i-Aufnahme der *knockout*-Mutanten KF105 und KF106 wurde analog zu der im vorherigen Kapitel beschriebenen Prozedur durchgeführt.

Durch eine nicht-lineare Regressionsanalyse wurde ein Hyperbel-Diagramm nach Michaelis-Menten erstellt (Abb. 43A). Zur besseren Orientierung wurden zusätzlich noch die Werte des Wildtyps, $\Delta pst1$ und $\Delta pst2$ (aus Abb. 42A) in grauer Farbe hinterlegt.

Die Graphen beider untersuchter *knockout*-Mutanten KF105 und KF106 weichen von denen des Wildtyps und der beiden Mutanten KF101 und KF100 ab. Der Graph der *knockout*-Mutante R1-*ko:pstC1-OE4475R* liegt etwa zwischen dem der Deletions-Mutante R1 $\Delta pst1$, die den höchsten V_{max}-Wert erreicht und dem des Wildtyps, von der er weiter entfernt ist. Die Hyperbel der *knockout*-Mutante R1-*ko:pstC2-phoU2* liegt zwischen der der Deletions-Mutante R1 $\Delta pst2$, die den niedrigsten V_{max}-Wert erreicht und der des Wildtyps, von der sie weiter entfernt ist. Die kinetischen Parameter (Tab. 11) wurden anhand einer nicht-linearen Regressionsanalyse der ³²P_i-Aufnahme dreier unabhängiger Versuche mit je drei Replikaten berechnet. Die Linearisierung der Werte im Hanes-Diagramm ist in Abb. 43B gezeigt.

Der Pst1-Transporter mit zusätzlichem PstS₂-Bindeprotein in der *knockout*-Mutante KF106 besitzt eine hohe Affinität zu Phosphat (K_M = 0,146 μ M P_i) und transportiert vergleichsweise mit niedriger Geschwindigkeit (v_{max} = 30,7 pmol P_i/min). Die kinetischen Parameter gleichen in ihrer Höhe vergleichsweise am ehesten denen der Deletions-Mutante KF100 (Pst1-Transporter), sind jedoch höher als bei dieser und tendieren daher zu den Werten des Wildtyps.

Der mit dem zusätzlich vorhandenen PstS₁-Bindeprotein untersuchte Pst2-Transporter in der *knockout*-Mutante KF105 besitzt im Vergleich zu der Situation im Stamm KF106 eine 4,1-fach geringere Phosphat-Affinität (K_M = 0,602 μ M P_i) und erreicht eine 2,4-fach höhere

3 Ergebnisse

Geschwindigkeit ($v_{\max} = 74,1 \text{ pmol P}_i/\text{min}$). Das Ergebnis gleicht in seiner Höhe dem der Deletions-Mutante KF101 (Pst2), fällt jedoch sowohl beim K_M - wie auch bei v_{\max} niedriger aus und tendiert daher vergleichsweise zu den Werten des Wildtyps.

Der K_M -Wert des Pst2-Transporters wird durch die zusätzliche Anwesenheit des affineren PstS₁ um den Faktor 1,1 kleiner und der v_{\max} -Wert sinkt 1,3-fach. In gleicher Weise erhöht sich der K_M -Wert des Pst1-Transporters durch die zusätzliche Anwesenheit des Bindeproteins PstS₂ um den Faktor 1,1 und der v_{\max} -Wert wird 1,2-fach höher.

Tab. 11: Kinetische Parameter (K_M - und v_{\max} -Werte) der Transporter Pst1+PstS₂ und Pst2+PstS₁.

Zur Orientierung sind zusätzlich die Werte der Transporter Pst1 ($\Delta pst2$), Pst2 ($\Delta pst1$) und beider Transporter (Wildtyp) in Grau gezeigt. Werte wurden mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse aus drei unabhängigen Versuchen der $^{32}\text{P}_i$ -Aufnahme mit je drei Replikaten berechnet.

Mutante	Transporter	K_M [$\mu\text{M P}_i$]	V_{\max} [pmol P_i/min]
KF106 (ko:<i>pstC2-phoU</i>₂)	Pst1 und PstS ₂ (◆)	0,146 ± 0,12	30,7 ± 3,8
KF105 (ko:<i>pstC1-OE4471R</i>)	Pst2 und PstS ₁ (▼)	0,602 ± 0,26	74,1 ± 8,4
KF100 ($\Delta pst2$)	Pst1 (▲)	0,136 ± 0,07	23,3 ± 2,1
KF101 ($\Delta pst1$)	Pst2 (■)	0,682 ± 0,13	85,7 ± 4,6
Wildtyp R1	Pst1 und Pst2 (●)	0,230 ± 0,09	47,9 ± 3,5

Beide Ergebnisse bestätigen die These, dass die Phosphatbindeproteine mit dem jeweils anderen Pst-Transporter interagieren. Eine ausführlichere Darlegung wird nachfolgend in Kapitel 4.1 geliefert.

3.4.3 Glycerin-3-phosphat-Aufnahme durch den Ugp-Transporter in *H. salinarum*

Um die Funktion des Ugp-Transporters in *H. salinarum* zu untersuchen, wurde das Wachstumsverhalten der beiden Deletions-Mutanten KF102 ($R1\Delta ugp$) und KF103 ($R1\Delta aph\Delta ugp$) analysiert.

Im Rahmen einer vorherigen Arbeit wurde gezeigt, dass eine *aph*-Deletions-Mutante auf Glycerin-3-phosphat als einziger Phosphatquelle wachsen kann (Wende, 2006). Auf anderen Phosphatquellen, wie Glucose-1-phosphat und Glucose-6-phosphat, war kein Wachstum mehr möglich. Dies unterstützte die These, dass *H. salinarum* einen Transporter für Glycerin-3-phosphat besitzt, der es ermöglicht diese Phosphatquelle in die Zelle zu befördern. Im Wildtyp werden Glucose-1-phosphat und Glucose-6-phosphat von der Alkalischen Phosphatase (Aph) extrazellulär zu anorganischem Phosphat gespalten (hydrolysiert) und über die Transporter Pst1 bzw. Pst2 in die Zelle importiert. Doch die *aph*-Deletions-Mutante konnte auf keinem der beiden Organophosphate mehr wachsen, da diese bei Abwesenheit der Aph nicht von der Zelle verwertet werden können. Dies war auch ein Indiz dafür, dass *H. salinarum* keine Transporter für Glucose-1-phosphat bzw. Glucose-6-phosphat besitzt.

In vorliegender Arbeit sollte untersucht werden, ob auch eine *aph-ugp*-Doppeldelentions-Mutante auf Glycerin-3-phosphat als einziger Phosphatquelle wachsen kann. Wenn nicht, wäre dies ein Hinweis darauf, dass Glycerin-3-phosphat durch den Ugp-Transporter in die Zelle befördert wird. Als Kontrolle sollte zusätzlich auch das Wachstum der *ugp*-Deletions-Mutante untersucht werden.

Die Stämme R1 (Wildtyp), KF102 ($R1\Delta ugp$) und KF103 ($R1\Delta ugp\Delta aph$) wurden zunächst in phosphatgesättigtem Halomedium kultiviert und danach in phosphatlimitiertes Medium überführt. Die Stämme wurden sowohl ohne Phosphat (P_i) als auch durch Zugabe von 1 mM P_i oder 1mM Glycerin-3-phosphat (G3P) unter sonst gleichen Bedingungen weiter inkubiert.

Abb. 44A-1 zeigt die Wachstumskurven der Stämme R1, KF102 und KF103 sowohl ohne Phosphat (P_i) als auch mit 1 mM P_i . Alle drei Stämme zeigten der Erwartung entsprechend Wachstum bei 1 mM P_i , jedoch kein Wachstum ohne anorganische Phosphatquelle.

3 Ergebnisse

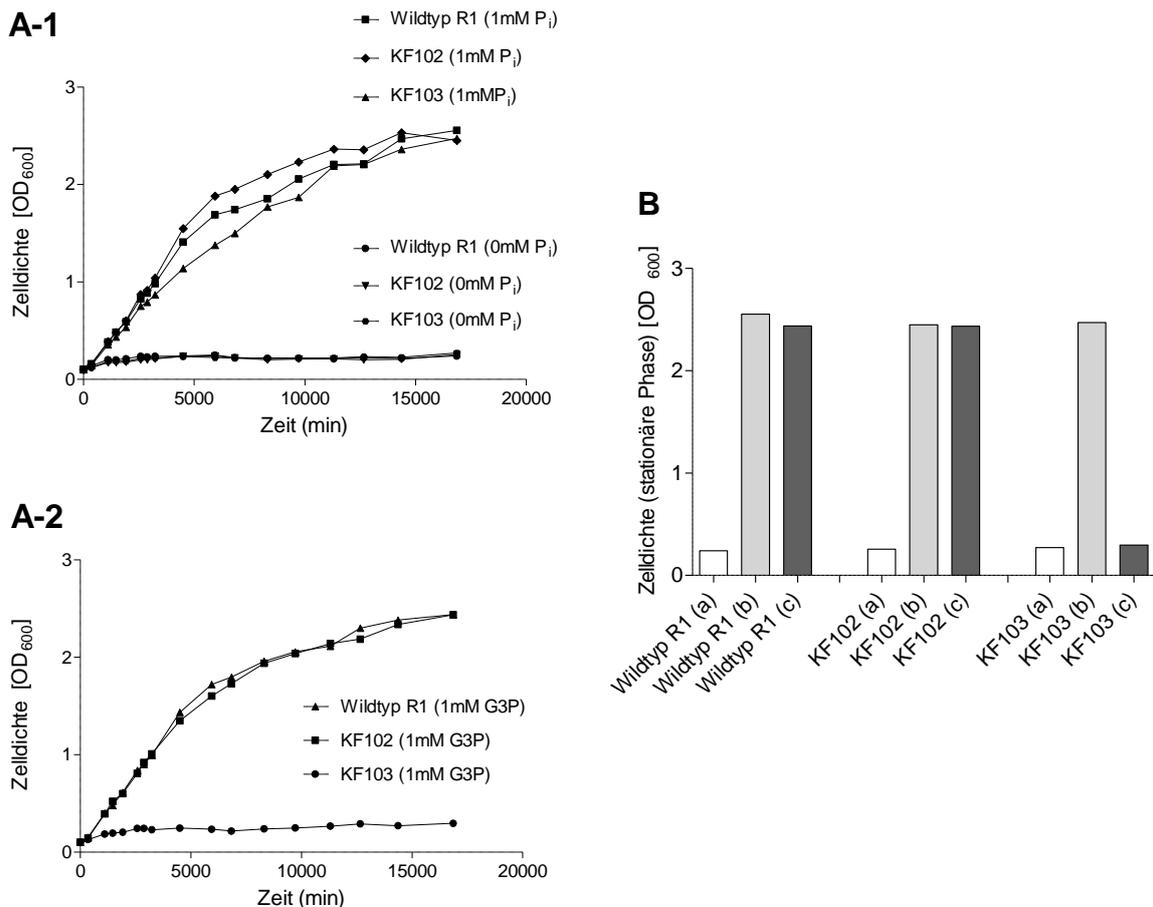


Abb. 44: Graphische Darstellung des Wachstums von *H. salinarum* Wildtyp R1 und den Deletions-Mutanten KF102 ($R1\Delta ugp$) und KF103 ($R1\Delta aph\Delta ugp$) mit 0 mM bzw. 1 mM Na_2HPO_4 (P_i) (A-1) oder 1 mM Glycerin-3-phosphat (G3P) (A-1) als einzige Phosphatquelle in $-P_i$ -Medium.

Zelldichte von R1, $R1\Delta ugp$ und $R1\Delta aph\Delta ugp$ in der stationären Phase des Wachstums unter Zugabe von 0 mM P_i (a, offener Balken), 1 mM P_i (b, hellgrauer Balken) oder 1 mM G3P (c, dunkelgrauer Balken) (B). Die Zellen wurden in $+P_i$ -Medium kultiviert, in $-P_i$ -Medium überführt und nach 48 h wurde je 0 mM P_i , 1 mM P_i oder 1 mM G3P zugegeben. Die optische Dichte bei 600nm (OD_{600}) wurde bis $OD_{600} = 0,7$ unverdünnt in einer Küvette gemessen. Höhere OD -Werte wurden durch die Verdünnung mit Basalsalz gemessen.

In Abb. 44A-2 sind die Wachstumskurven der drei Stämme auf 1 mM G3P gezeigt. Die *ugp*-Deletions-Mutante KF102 kann auf Glycerin-3-phosphat als einziger Phosphatquelle wachsen. Grund hierfür ist die P_i -Abspaltung von G3P mit anschließender Aufnahme in die Zelle über beide P_i -spezifische Pst-Transporter. Der Stamm KF103 mit der *aph-ugp*-Doppeldelation verfügt nicht mehr über die Möglichkeit auf der Phosphatquelle G3P zu wachsen, was die These bekräftigt, dass Ugp das einzige Transportsystem für G3P in *H. salinarum* ist.

In Abb. 44B wird abschließend die erreichte Zelldichte der drei Stämme R1, KF102 und KF103 in der stationären Phase dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass alle drei Stämme mit

anorganischem Phosphat als einziger Phosphatquelle eine hohe Zelldichte erreichen. Sowohl der Wildtyp wie die *ugp*-Deletions-Mutante können vergleichbare Zelldichten mit Glycerin-3-phosphat erreichen. Die einzige Ausnahme bildet die *aph-ugp*-Doppelmutante, die bei Glycerin-3-phosphat kein Wachstum aufweist.

Es konnte folglich gezeigt werden, dass in *H. salinarum* Glycerin-3-phosphat durch den Ugp-Transporter in die Zelle importiert wird und kein alternatives Transportsystem vorhanden ist.

3.5 Untersuchung der Phosphat-Taxis in *H. salinarum*

Unter phosphatlimitierten Bedingungen kann bei *H. salinarum* eine phosphatgerichtete Chemotaxis beobachtet werden (Wende *et al.*, 2009). Um festzustellen ob sich das chemotaktische Verhalten der Zellen durch das Fehlen eines der beiden Pst-Transporter ändert, wurde die Phosphat-Taxis der Stämme *R1Δpst1* und *R1Δpst2* sowie des Wildtyp-Stamms *R1* mit Hilfe des „Chemical-in-plug“-Tests, dem sogenannten CIP-Test (Storch *et al.*, 1999), untersucht.

Die Zellen wurden in phosphathaltigem synthetischem Medium (SM) und in phosphatfreiem synthetischem Medium (SMOP) kultiviert. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert, in dem jeweiligen Medium resuspendiert und bis zu einer OD_{600} von etwa 1,5 kultiviert, wobei die Phosphatlimitierung für 48 h durchgeführt wurde. Die Zellen wurden in 0,25 %igem Agar in Hepes-gepuffertem Basalsalz (BSH) in Petrischalen gegossen. In die Schalen wurden Hartagar-Pfropfen mit NaP_i , Leucin (Positivkontrolle) oder nur BSH (Negativkontrolle) gesetzt. Die Petrischalen enthielten Zellen der Dichte $OD_{600} = 1,7$ (siehe Abb. 45). Nach Erstarren der Zell-Lösung wurden die Platten in einer Acrylbox auf einem Lichtkasten inkubiert und in verschiedenen Zeitabständen mit einem Durchlichtscanner als Graustufenbild dokumentiert (Storch *et al.*, 1999). Die Chemotaxis wird durch einen Ring aus Zellen detektiert. Der zu beobachtende chemotaktische Ring kommt dadurch zustande, dass die motilen Zellen sich ringförmig um den von dem Hartagar-Pfropfen mit NaP_i ausgehenden Phosphatgradienten anhäufen. Im dunklen Bereich des Rings ist die Zelldichte höher, im hellen Bereich geringer. Bei der Phosphat-Taxis halten sich die Zellen dabei konstant in einem Konzentrationsbereich von 100 – 200 μM auf (Wende, 2006).

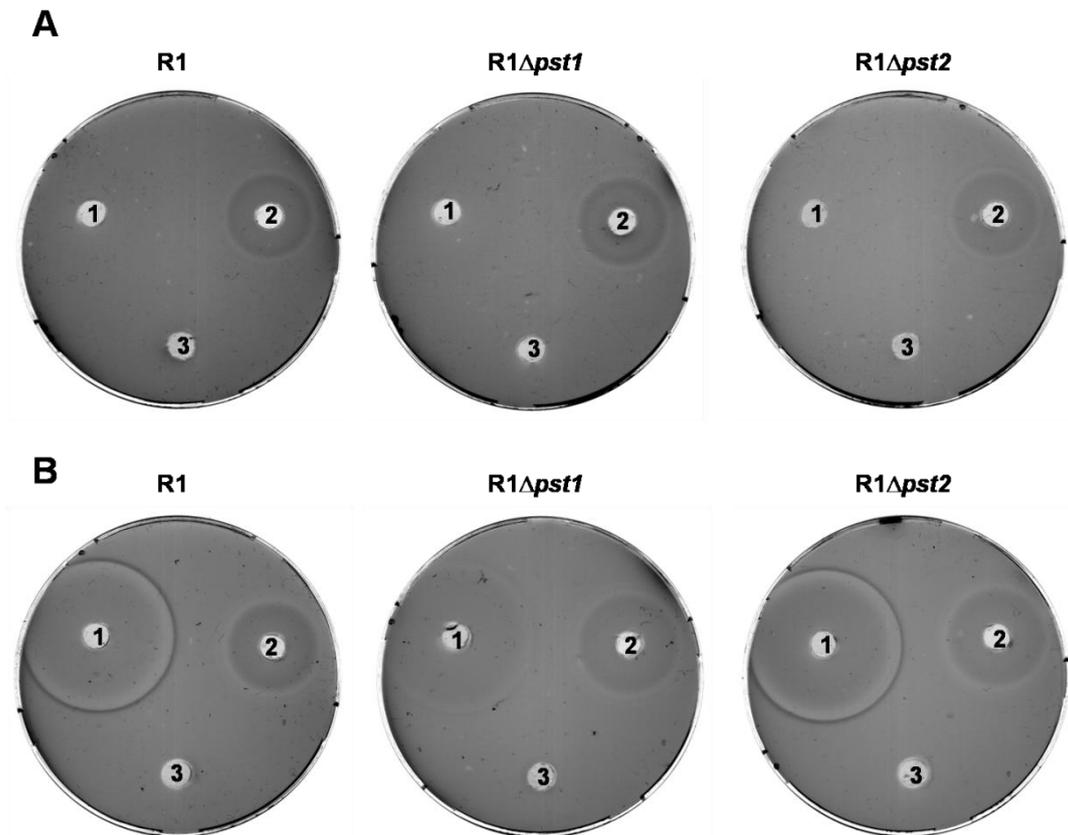


Abb. 45: Chemotaktisches Verhalten der *H. salinarum*-Stämme R1 (Wildtyp), $\Delta pst1$ und $\Delta pst2$ auf Phosphat im CIP-Test.

Zellen wurden sowohl in phosphathaltigem synthetischem Medium (A) als auch in phosphatfreiem synthetischem Medium (B) angezogen. Die Hartagar-Pfropfen enthielten 10 mM NaP_i (1), 10 mM Leucin (2, Positivkontrolle) und BSH (3, Negativkontrolle). Die Petrischalen des CIP-Tests wurden nach 48 h in einem Durchlichtscanner eingelesen. Die Zelldichte (OD_{600}) in den Platten betrug 1,7.

Von den unter phosphatgesättigten Bedingungen vorkultivierten Stämmen zeigte keiner eine phosphatgerichtete Chemotaxis. Es konnte lediglich eine Chemotaxis in Richtung Leucin, der Positivkontrolle, beobachtet werden, die Zellen waren also motil (Abb. 45A). Die in phosphatfreiem Medium (SMOP) vorkultivierten Stämme R1 (Wildtyp) und $R1\Delta pst2$ hingegen bildeten einen deutlichen Chemotaxis-Ring um den Hartagar-Pfropfen mit NaP_i im CIP-Test aus (siehe Abb. 45B). Bei der Deletions-Mutante $R1\Delta pst1$ konnte nur eine sehr schwach ausgeprägte Ringbildung beobachtet werden, die gegenüber dem Wildtyp und der Deletions-Mutante $\Delta pst2$ sehr stark reduziert war (siehe Abb. 45B). Die Positivkontrolle zeigt, dass der $\Delta pst1$ -Stamm genauso motil ist wie die beiden anderen Stämme. Zudem konnte beobachtet werden, dass der chemotaktische Ring des $\Delta pst2$ -Stamms im Zuge der Zeit erheblich differenzierter verblieb im Vergleich zu dem des Wildtyps (Daten werden nicht gezeigt). Somit zeigten Zellen, die allein den Pst1-Transporter enthalten, ein besonders ausgeprägtes chemotaktisches Verhalten.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Pst1-Transporter eine wichtige Bedeutung für die Phosphat-Taxis in *H. salinarum* hat. Sein Fehlen führt zu einer deutlichen Reduktion des chemotaktischen Verhaltens. Auch in *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* und *Enterobacter cloacae* führte das Fehlen des Pst-Transporters zu einer veränderten phosphatgerichteten Chemotaxis. Bei *P. aeruginosa* konnten desweiteren zwei an der Phosphat-Taxis beteiligte MCPs (*methyl accepting chemotaxis proteins*) identifiziert werden. *H. salinarum* besitzt 18 Htrs (*halobacterial transducer proteins*), die Homologe zu bakteriellen MCPs darstellen und an der Signaltransduktion zum Flagellarmotor beteiligt sind. Acht von diesen Transducerproteinen konnte bereits eine Funktion in den Bereichen Phototaxis, Chemotaxis, Osmotaxis, Aerotaxis und der Erfassung des Membranpotentials zugeordnet werden. Meist wird der Reiz von der Sensordomäne des Htr registriert, kann aber auch von einem Sensorprotein, das mit dem Htr assoziiert ist, erfasst werden. In diesem Fall hat das Htr nur die Funktion des Signalübermittlers. Beispiele solcher Sensorproteine und Transducer in *H. salinarum* sind BasB und BasT, die an der Chemotaxis zu fünf Aminosäuren beteiligt sind (Kokoeva & Oesterhelt, 2000) und CosB und CosT, die an der Osmotaxis in Richtung organischer Osmolyte beteiligt sind (Kokoeva *et al.*, 2002). Ein weiteres Beispiel ist der Transducer Car für die Chemotaxis in Richtung der Aminosäure Arginin (Storch *et al.*, 1999).

Deletions-Mutanten jeweils aller 18 Htrs (Koch & Oesterhelt, 2005) wurden auf ihr phosphatgerichtetes chemotaktisches Verhalten untersucht. Alle Deletions-Mutanten, auch die mit bisher nicht zugeordneter Funktion, zeigten eine Ringbildung im CIP- und CIC-Test (Daten werden nicht gezeigt). Der CIC-Test ist eine methodische Modifikation des CIP-Tests. Daraus kann geschlossen werden, dass die Signalübermittlung der Phosphat-Taxis wahrscheinlich Htr-unabhängig verläuft. Diese Vermutung wird nicht unterstützt durch eine weitere Untersuchung des phosphatgerichteten chemotaktischen Verhaltens der Deletions-Mutanten von CheB und CheR (Staudinger, 2007), welche eine sehr schlechte Ringformation im CIP-Test zeigten (Daten werden nicht gezeigt). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass ein bisher nicht identifiziertes Htr-ähnliches Protein an der Phosphat-Taxis beteiligt ist, welches durch CheR methyliert wird und durch CheB demethyliert wird.

3.6 Suche nach regulatorischen Proteinen des PHO-Stimulons in *H. salinarum*

Der regulatorische Mechanismus, der bei Phosphatlimitierung eine Geninduktion bzw. den Anstieg der Transkriptmenge einiger Gene bewirkte, die in Bakterien als Gene des PHO-Regulons definiert sind, ist in Archaeen nur minimal erforscht und bisher noch weitgehend unbekannt (siehe Kapitel 1.1). Basierend auf einer vorherigen Studie wurde jedoch davon ausgegangen, dass das PHO-Stimulon in *H. salinarum* nicht von einem klassischen Zweikomponentensystem reguliert wird (Wende *et al.*, 2009).

Zum Kern der phosphatregulierten Gene in *H. salinarum* gehören die Gene des *pst1-pst2*- und *ugp*-Operons, sowie die Gene *aph* und *phoU3*.

Um einen Einblick in den Regulationsmechanismus des PHO-Stimulons zu erlangen, wurden weitere potentielle Kandidaten untersucht. Die Kandidaten-Proteine waren vier *phoU*-Homologe, von denen *phoU₂* die größte Homologie zu dem Mediatorproteins *phoU* des PHO-Regulon einiger Bakterien aufweist. Die anderen drei *phoU*-Homologen besitzen am N-Terminus eine zusätzliche Region, die homolog zu den Transkriptionsfaktoren AbrB/SpoVT aus *B. subtilis* ist. Darüber hinaus wurde ein *lrp*-Homolog *trh3*, das in einem systembiologischen Modell von (Bonneau *et al.*, 2006) als ein Repressor des Phosphattransportsystems vorausgesagt wurde, untersucht.

Der Einfluss der potentiellen Regulatoren auf die Transkription der Gene des PHO-Stimulons wurde durch einen Enzymtest für Alkalische Phosphatase sowie durch quantitative RT-PCR (RT-qPCR) mit den entsprechenden Knockout-Stämmen überprüft.

Die Gene *phoU₁* und *phoU₂* wurden zunächst mit Hilfe der Deletions-Mutanten der beiden Operons KF101 ($\Delta pst1$) und KF100 ($\Delta pst2$), die jeweils eines der *phoU*-Gene enthalten, untersucht. Zusätzlich wurden auch die *knockout*-Mutanten KF105 und KF106 mittels RT-qPCR überprüft. Gleichzeitig wurden die Mutanten durch diese Methode auch verifiziert (siehe Kapitel 3.3.2).

Ebenso wurde untersucht, ob ein Knockout der Transporter eine Auswirkung auf die Transkription des PHO-Stimulons hat. Beispielsweise in *E. coli* führte die Mutation von *pstB* zu einer Aufhebung der Repression (Cox *et al.*, 1988) durch den Repressorkomplex (siehe 1.1.1). Der Pst-Transporter aus *B. subtilis* dagegen ist ebenso Teil des PHO-Regulons, jedoch nicht an dessen Regulation beteiligt (Qi *et al.*, 1997). Das *phoU₄* wurde mit Hilfe der Deletions-Mutante KF104 ($\Delta phoU_4$) analysiert. Der Versuch *phoU₃* zu deletieren gelang nicht, da die Deletion dieses Gens für die Zellen letal zu sein scheint. Daher wurde eine

Überexpressions-Mutante KF201 (*Pbop-phoU₃*) konstruiert und diese anschließend untersucht. In der Mutante steht das *phoU₃*-Gen vollständig unter der Kontrolle des *bop*-Promotors und das native *phoU₃*-Gen ist ausgeschaltet. Auch von dem oben erwähnten *trh3*-Gen wurde eine analoge Überexpression-Mutante hergestellt.

3.6.1 Regulatorsuche mit Hilfe der Knockout-Stämme KF100, KF101, KF104, KF105 und KF106

Zunächst wurde die alkalische Phosphatase (Aph) als Reporter des halobakteriellen PHO-Stimulons verwendet. Die Aph-Aktivität der drei Deletions-Mutanten KF100, KF101 und KF104, deren Genotyp in Kapitel 3.3 beschrieben ist, wurde mit Hilfe eines Aph-Enzymtests untersucht. In einer vorherigen Arbeit wurden Deletions-Mutanten von jeweils fünf Histidinkinasen und Antwortregulatoren unter Einsatz dieser Methode auf ihren potentiellen Einfluss auf die Expression der Aph überprüft (Wende, 2006).

Die Zellen des entsprechenden Stamms wurden dazu zunächst unter phosphatgesättigten Bedingungen (+P_i) in HM kultiviert. Bei OD₆₀₀ = 0,5 - 0,7 wurde die Aph-Aktivität bestimmt. Danach folgte eine Überführung in phosphatlimitiertes SMOP-Medium (-P_i) und nach 48 h eine erneute Messung der Aph-Aktivität (siehe dazu 2.4.4).

Aus den in Tab. 12 gezeigten Aph-Aktivitäten geht hervor, dass diese nur in der Deletions-Mutante KF100 unter +P_i -Bedingungen vom Wildtyp abwich und leicht erhöht vorlag. Die Induktion der Aph-Aktivität war in dieser Mutante stark vermindert.

Tab. 12: Aph-Aktivität [U-/ OD₆₀₀] der Deletions-Mutanten KF100, KF101 und KF104 von *H. salinarum* im Vergleich zum Wildtyp R1.

Die Zellen wurden sowohl unter +P_i -, als auch unter -P_i-Bedingungen kultiviert und die jeweilige Aph-Aktivität gemessen.

Stamm	Deletierte Gene	Aph-Aktivität [U/OD ₆₀₀]	
		+P _i (4 mM P _i)	48 h -P _i (0 mM P _i)
R1 <i>wt</i>	-	1,6 ± 0,9	30,5 ± 1,3
KF101 <i>Δpst1</i>	<i>pstS₁C₁A₁B₁-phoU₁-OE4475R-OE4471R</i>	1,2 ± 0,2	27,9 ± 1,1
KF100 <i>Δpst2</i>	<i>pstS₂C₂A₂B₂-phoU₂</i>	6,9 ± 1,9	27,3 ± 5,1
KF104 <i>ΔphoU4</i>	<i>phoU4</i>	1,6 ± 0,2	29,7 ± 0,1

Unter Phosphatlimitierung werden im Wildtyp die Gene des *pst1- pst2-* und *ugp*-Operons, sowie die Gene *aph* und *phoU3* induziert. Um eine mögliche Veränderung der Transkription dieser Gene in den Deletions-Mutanten KF100 und KF101 bzw. den *knockout*-Mutanten KF105 und KF106 zu untersuchen, wurden die Transkriptmengenverhältnisse mit Hilfe der RT-qPCR quantifiziert und in Relation zum Wildtyp gesetzt.

Zur Überprüfung, ob sich die Transkriptmengen der Gene des PHO-Stimulons durch die deletierten bzw. promotorlosen Gene des *pst*-Operons verringert, wurde zunächst Gesamt-RNA aus Zellen, die einer 48stündigen Phosphatlimitierung ausgesetzt waren, isoliert und unter Verwendung von unspezifischen Primern durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe 2.3.5.2.2). Anschließend wurde eine qPCR mit spezifischen Primern für die Gene des PHO-Stimulons (Tab. 13) durchgeführt. In dieser quantitativen Echtzeit-PCR wird die Vermehrung der DNA-Fragmente des amplifizierten PCR-Produkts über den gesamten Zyklusverlauf verfolgt. Mit Hilfe des Reporter-moleküls SYBR[®] Green, ein in doppelsträngige DNA interkalierender fluoreszierender Farbstoff, kann die Signalstärke der DNA für jeden Zyklus gemessen werden. Da die detektierten Fluoreszenzsignale einer qPCR auch von mehreren Amplikons stammen können, wurde nach Beendigung der PCR sowohl die Schmelzkurve der amplifizierten DNA bewertet als auch das PCR-Produkt auf einem Agarosegel analysiert (wird nicht gezeigt). Dadurch konnte überprüft werden, ob die beobachtete Fluoreszenz von einem einzelnen, spezifischen PCR-Produkt stammte.

Für die relative Quantifizierung wurde das konstitutiv exprimierte Gen *fdx*, das für das „Haushaltsprotein“ Ferredoxin kodiert, als interner Standard verwendet.

Die Berechnung der relativen Induktion bzw. Repression der Transkription der Gene des PHO-Stimulons, die durch den Regulationsfaktor ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert) ausgedrückt werden, wird im Folgenden kurz dargestellt:

Zunächst wurde der C_t -Wert (*cycle threshold*) in einem Bereich der Fluoreszenzkurve ermittelt, in dem die Amplifikation exponentiell verlief, d.h. die Kurve einen linearen Verlauf hatte. Der aus drei PCR-Proben errechnete C_t -Mittelwert des zu untersuchenden Gens wurde in einem ersten Schritt durch die Differenz mit dem C_t -Mittelwert des Haushaltsgens *fdx* auf einen Standardwert normiert. Im zweiten Schritt wurde die Differenz der erhaltenen C_t -Standardwerte (ΔC_t) der Knockout-Mutante und des Wildtyps ermittelt, woraus der $\Delta\Delta C_t$ -Wert resultiert. Der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert spiegelt den Unterschied der Transkriptmenge des zu untersuchenden Gens zwischen Knockout-Mutante und Wildtyp wieder und wird als Regulationsfaktor bezeichnet. Die Methode basiert auf (Livak & Schmittgen, 2001).

Aus Tab. 13 geht hervor, dass in der Deletions-Mutante KF101 ($\Delta pst1$) eine Induktion der Gene des *pst2*-Operons zu beobachten ist. Die Gene des *pst1*-Operons zeigten eine starke Repression, was die Deletion dieses Operons bestätigte. Die Transkriptmengen der Gene des *ugp*-Operons, *aph* und *phoU3* waren in der Deletions-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nur minimal herunter reguliert.

In der Deletions-Mutante KF100 ($\Delta pst2$) war das Gen *phoU3* induziert. Für alle anderen Gene lagen die Transkriptmengen auf etwa gleichem Niveau wie im Wildtyp. Die Gene des *pst2*-Operons erschienen stark reprimiert, wodurch die Deletion der Gene bestätigt wurde.

Tab. 13: Regulationsfaktoren ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte) für einige Gene des PHO-Stimulons in den Deletions-Mutanten KF100 und KF101 sowie in den *knockout*-Mutanten KF105 und KF106.

Für die RT-qPCR wurde Gesamt-RNA aus Zellen, die 48 h unter $-Pi$ -Bedingungen kultiviert wurden, isoliert.

Gen	KF101	KF100	KF105	KF106
	$\Delta pst1$	$\Delta pst2$	ko: <i>pstC1-OE4471R</i>	ko: <i>pstC2-phoU2</i>
Regulationsfaktor ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert)				
<i>pstS1</i>	-	$-0,46 \pm 1,42$	1,04	1,26
<i>pstC1</i>	-	$-1,15 \pm 0,13$	-12,25	1,25
<i>pstS2</i>	$4,81 \pm 1,44$	-	6,29	0,76
<i>pstC2</i>	$4,46 \pm 0,82$	-	3,50	-12,19
<i>ugpA</i>	-1,87	-1,35		
<i>ugpB</i>	-1,22	-1,20		
<i>aph</i>	-1,44	-1,35		
<i>phoU3</i>	-1,95	4,23		

In der *knockout*-Mutante KF105, in der die Gene *pstC1-OE4471R* ausgeschaltet sind, war verglichen mit dem Wildtyp eine Repression des Gens *pstC1*, jedoch eine gleiche Transkriptmenge des Gens *pstS1* zu beobachten. Damit wurde die Bestätigung für den erfolgreichen Knockout des Gens *pstC1* erbracht. Die beiden Gene des *pst2*-Operons (*pstS1* und *pstC2*) waren wie schon in der Deletions-Mutante KF101 ($\Delta pst1$) hochreguliert.

Im Vergleich zum Wildtyp war in der *knockout*-Mutante KF106, in der die Gene *pstC2-phoU2* ausgeschaltet sind, *pstC2* reprimiert, zeigte jedoch eine gleiche Transkriptmenge für *pstS2*. Damit wurde der erfolgreiche Knockout des Gens *pstC2* bestätigt. Die Transkriptmengen der Gene des *pst1*-Operons lagen in dieser Mutante wie auch bei der Deletions-Mutante KF100 ($\Delta pst2$) auf gleichem Niveau wie im Wildtyp.

Die Repressionen der Gene *pstC₁* bzw. *pstC₂* in der entsprechenden *knockout*-Mutante waren im Vergleich zu den Deletions-Mutanten schwächer, da hier das Gen nicht deletiert, sondern lediglich ausgeschaltet vorliegt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Deletion des *pst2*-Operons sowohl eine schwache Induktion der Aph-Aktivität unter P_i-gesättigten Bedingungen bewirkte als auch *phoU3* unter P_i-limitierten Bedingungen schwach hochreguliert war.

Die Deletion des *pst1*-Operons bewirkte unter P_i-limitierten Bedingungen eine Induktion der Gene des *pst2*-Operons. Die Auswirkungen dieser Induktion für die Ergebnisse des Phosphataufnahmeversuchs in Kapitel 3.4 werden in der Diskussion in Kapitel 4.1 behandelt. Darüber hinaus konnten die *knockout*-Mutanten KF105 und KF106 erfolgreich verifiziert werden.

Ein regulatorisches Protein, das die Transkription aller Gene des PHO-Stimulons kontrolliert konnte nicht gefunden werden.

3.6.2 Regulatorsuche mit Hilfe der Überexpressions-Mutanten KF201 (*Pbop-phoU₃*) und KF202 (*Pbop-trh3*)

Der mögliche Einfluss der beiden Proteine PhoU3 und Trh3 auf die Transkription der Gene des PHO-Stimulons wurde untersucht, indem zwei Überexpressions-Mutanten für die Gene *phoU₃* und *trh3* hergestellt wurden. Die Überexpression beider Gene wurde durch den vorgeschalteten *bop*-Promotor ermöglicht. Der Promotor des *bop*-Gens (*bacterioopsin*) wird unter niedrigen Sauerstoff-Bedingungen und hoher Lichtintensität (Shand & Betlach, 1991, Sumper & Herrmann, 1976) induziert. Die Induktion des *bop*-Promotors durch anaerobe Bedingungen und Licht ermöglichte eine Überexpression der Gene *phoU₃* bzw. *trh3*.

Die Überexpressions-Mutanten wurden sowohl hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens untersucht als auch auf eine mögliche Veränderung der Transkriptmenge der Gene des PHO-Stimulons mit Hilfe der RT-qPCR geprüft.

3.6.2.1 Konstruktion der Überexpressions-Mutanten KF201 (*Pbop-phoU₃*) und KF202 (*Pbop-trh3*)

Die Strategie der Konstruktion des jeweiligen Überexpressions-Vektors für die Gene *phoU₃* und *trh3* ist in Abb. 46 exemplarisch anhand der Herstellung der Überexpression-Mutante für *phoU₃* gezeigt. Analog dazu wurde die Überexpression-Mutante für *trh3* konstruiert.

Die Überexpressions-Vektoren pKF201 (für *phoU3*) und pKF202 (für *trh3*) enthalten die ersten 547 bp des 1005 bp langen *phoU3*-Gens bzw. 407 bp des 414 bp langen *trh3*-Gens (schwarzer Blockpfeil in Abb. 46). Stromaufwärts davon liegt jeweils der *bop*-Promotor (*Pbop*; roter Kasten). Die Vektoren enthalten einen Selektionsmarker (Mevinolinresistenz = Mev^R), der die Selektion der positiven Mutanten auf Agarplatten mit Mevinolin ermöglicht.

Durch die Integration des Vektors in das Genom über homologe Rekombination am *phoU3*- bzw. *trh3*-Gen, wird der native *phoU3*- bzw. *trh3*-Promotor vor die jeweils verkürzten Gene, dahingegen der *bop*-Promotor vor die beiden vollständigen Gene geschaltet. Die Transkription der Gene wird zwar am nativen Promotor (*PphoU3* und *Ptrh3*) initiiert, durch die verkürzten *phoU3*- bzw. *trh3*-Sequenzen (schwarzer Kasten) kann aber keine Termination stattfinden. Die Synthese der *phoU3*- bzw. *trh3*-Transkripte vom nativen Promotor in den Mutanten ist daher gestört. Die effiziente Transkription des *phoU3* bzw. *trh3* (schwarzer Blockpfeil) wird nur von dem vorgeschalteten *bop*-Promotor kontrolliert.

Die Verifizierung der positiven Mutanten erfolgte durch PCR. In einer anschließende RT-qPCR konnte zusätzlich bestätigt werden, dass die Transkription der Gene *phoU3* bzw. *trh3* in der jeweiligen Überexpressions-Mutante induziert wurde (3.6.2.3).

Die PCR wurde unter Verwendung von zwei Oligonukleotiden durchgeführt, von denen eines am *bop*-Promotor (roter Pfeil „for“ in Abb. 46) und das andere stromabwärts des *phoU3*- bzw. *trh3*-Gens (roter Pfeil „rev“) ansetzt. Die resultierenden PCR-Produkte können nur in der Mutante amplifiziert werden, welche den jeweiligen Vektor im Genom integriert haben. Im Wildtyp kann kein PCR-Produkt amplifiziert werden. Die Fragmentgrößen der PCR-Produkte, mit einer erwarteten Länge von etwa 1800 bp (*phoU3*) bzw. 780 bp (*trh3*), wurden durch Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Das Gelbild der Verifizierung der *phoU3*-Überexpressions-Mutante ist in Abb. 46B dargestellt. Nach der Gelextraktion wurde die Sequenzidentität der PCR-Produkte durch eine Sequenzierung bestätigt.

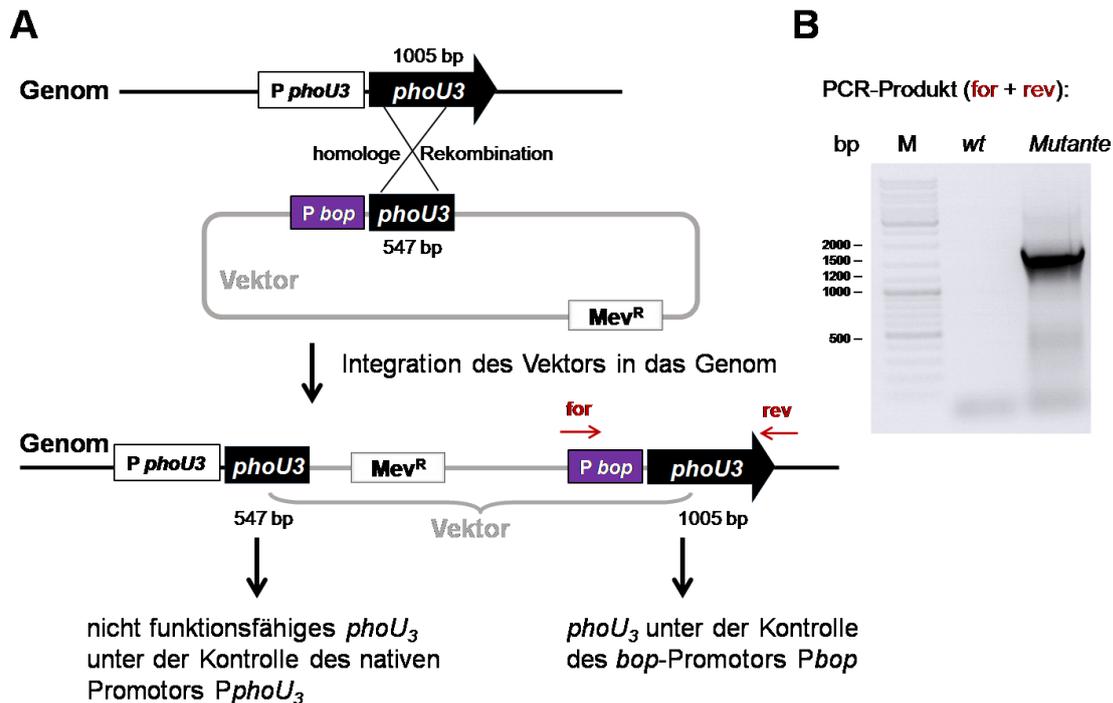


Abb. 46: Schematische Darstellung der Überexpression des *phoU3*-Operons über die Integration des Überexpressions-Vektors in das Genom von *H. salinarum* (A) und Gelbild des PCR-Produkts für die Mutanten-Verifizierung (B).

Die Vorgehensweise, die hier dargestellt wird, wurde analog hierzu für die Überexpression des *trh3* verwendet. Der Vektor enthält die ersten 547 bp (schwarzer Kasten) des 1005 bp langen *phoU3*-Gens (schwarzer Blockpfeil) und den stromaufwärts vorgeschalteten *bop*-Promotor (violetter Kasten). Der Vektor verfügt zusätzlich über einen Selektionsmarker (Mev^R). Nach der Integration des Vektors in das Genom über homologe Rekombination am *phoU3*-Gen, wird die Synthese des *phoU3*-Transkripts in den Überexpressions-Mutanten vom *bop*-Promotor kontrolliert. Am *phoU3*-Promotor kann die mRNA-Synthese des *phoU3* zwar beginnen, jedoch nicht korrekt beendet werden. Das Transkript bricht an unbekannter Stelle ab. Ein funktionales Protein kann nicht translatiert werden. Die Verifizierung der positiven Mutanten erfolgte mit Hilfe einer PCR unter Verwendung von zwei Oligonukleotiden, von welchen eines am *bop*-Promotor (als roter Pfeil und „for“ gezeigt) und eines stromabwärts des *phoU3*-Gens (als roter Pfeil und „rev“ dargestellt) ansetzt. Das PCR-Produkt kann nur in der Mutante amplifiziert werden, welche den Vektor integriert hat. Das PCR-Produkt, mit einer erwarteten Länge von 1800 bp, wurde durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht (B). M = Längenmarker (GeneRuler DNA-Ladder Mix). Die Identität der PCR-Produktsequenz wurde durch Gelextraktion und Sequenzierung bestätigt.

3.6.2.2 Wachstumsverhalten der Überexpressions-Mutanten KF201 (*Pbop-phoU3*) und KF202 (*Pbop-trh3*)

Anfangs wurde das Wachstumsverhalten der hergestellten Stämme untersucht. Die Auswirkung einer Überexpression der Gene *phoU3* bzw. *trh3* auf das Wachstum der Zellen wurde durch den Vergleich der Wachstumskurven der Mutanten und des Wildtyps festgestellt.

Zunächst wurden jeweils 5 μ l aller Stämme in einen 100 ml-Kolben mit 35 ml Komplexmedium (HM) angeimpft und anschließend im Dunkeln unter aeroben Bedingungen kultiviert.

In Abb. 47A ist zu sehen, dass die Wachstumskurve der Überexpression des Gens *phoU₃* (KF201) fast identisch mit der des Wildtyps ist. Die Wachstumskurve der Überexpressions-Mutante des Gens *trh3* (KF202) ist in Abb. 47B gezeigt. Die Messpunkte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen dar. Da dem Medium beider Mutanten zum Erhalt des integrierten Überexpressions-Vektors Mevinolin zugegeben wurde, zeigen beide ein etwas langsames Wachstum als der Wildtyp; besonders ist dies bei der Überexpressions-Mutante KF202 (*P_{bop}-trh3*) zu beobachten.

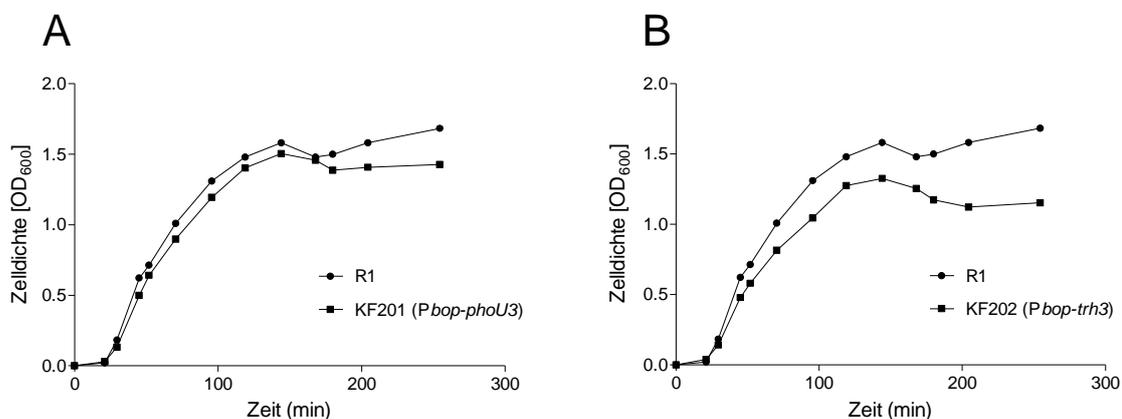


Abb. 47: Wachstumskurven der Überexpressions-Mutanten KF201 (*P_{bop}-phoU₃*) (A) und KF202 (*P_{bop}-trh3*) (B) verglichen mit dem Wildtyp R1.

Die drei Stämme wurden in Komplexmedium (HM) im Dunkeln unter aeroben Bedingungen kultiviert. Die optische Zelldichte wurde durch eine Absorptionmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm ermittelt. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen.

3.6.2.3 Untersuchung der Überexpressions-Mutanten KF201 (*P_{bop}-phoU₃*) und KF202 (*P_{bop}-trh3*) mit Hilfe der RT-qPCR

Die positiven Überexpressions-Stämme KF201 (*P_{bop}-phoU₃*) und KF202 (*P_{bop}-trh3*) wurden mit Hilfe der quantitativen RT-PCR untersucht. Dies diente der Überprüfung, ob sich die mRNA-Mengen der Gene des PHO-Stimulons in den Überexpressions-Stämmen verändern.

Für die Isolierung der Gesamt-RNA (2.3.1.5) wurden die Überexpressions-Stämme und der Wildtyp unter drei verschiedenen Bedingungen kultiviert: (1) unter phosphatgesättigten und

aeroben Bedingungen im Dunkeln, (2) unter Phosphatlimitierung und aeroben Bedingungen im Dunkeln und (3) unter Phosphatlimitierung und anaeroben Bedingungen im Licht.

Die cDNA-Synthese und die RT-qPCR (2.3.5.2.2) wurden analog zu der oben beschriebenen Prozedur durchgeführt. Die Regulationsfaktoren ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte) wurden wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben berechnet und werden in Tab. 14 (*phoU3*) bzw. Tab. 15 (*trh3*) zusammengefasst. Die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte spiegeln den Unterschied der Transkriptmenge des zu untersuchenden Gens zwischen Überexpressions-Mutante und Wildtyp unter den drei verschiedenen Bedingungen wieder.

Wie aus Tab. 14 hervorgeht war das *phoU3* in der Überexpressions-Mutante verglichen zum Wildtyp induziert. Die Aktivität des *bop*-Promotors wurde nicht nur durch Sauerstoffmangel und Licht, sondern auch im Dunkeln induziert. Dies kann damit erklärt werden, dass der *bop*-Promotor eine basale Aktivität besitzt, die stärker zu sein scheint als die des nativen *phoU3*-Promotors. Daher kommt es im Vergleich zum Wildtyp in der Überexpressions-Mutante auch unter aeroben Bedingungen im Dunkeln zu einer Induktion des *phoU3*. Außerdem konnte beobachtet werden, dass der *bop*-Promotor durch die Phosphatlimitierung zusätzlich induziert wird. In Übereinstimmung dazu wurde bei (Wende, 2006) in durchgeführten Transkriptomanalysen die mRNA des *bop*-Gens unter Phosphatmangel induziert.

Tab. 14: Regulationsfaktoren ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte) für einige Gene des PHO-Stimulons in der Überexpressions-Mutante KF201 (*Pbop-phoU3*).

Für die RT-qPCR wurde Gesamt-RNA aus Zellen, die sowohl im Dunkeln sowie im Licht für 48 h unter $-P_i$ -Bedingungen als auch im Dunkeln unter $+P_i$ -Bedingungen kultiviert wurden, isoliert.

Gen	Stamm <i>Pbop-phoU3</i>		
	$-P_i$, dunkel	$-P_i$, Licht	$+P_i$, dunkel
	Regulationsfaktor ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert)		
<i>pstS₁</i>	-3,23	1,65	3,90
<i>pstC₁</i>	-2,83	1,58	2,19
<i>pstS₂</i>	1,84	2,10	2,27
<i>pstC₂</i>	2,43	1,77	2,06
<i>ugpA</i>	-3,53	0,01	-
<i>ugpB</i>	-3,48	0,03	-
<i>aph</i>	-4,50	1,24	2,08
<i>phoU3</i>	48,63	133,79	12,88

Die Gene des PHO-Stimulons wurden im Dunkeln unter $-P_i$ -Bedingungen schwach reprimiert, unter $+P_i$ -Bedingungen dagegen schwach induziert. Eine Ausnahme bildet das

pst2-Operon, das unter beiden Bedingungen minimal induziert war. Die Gene des PHO-Stimulons waren jedoch im Licht unter $-P_i$ -Bedingungen annähernd nicht reguliert, obwohl hier die stärkste Überexpression des *phoU3* zu verzeichnen war. Die Gene des PHO-Stimulons wurden durch die Überexpression nicht signifikant beeinflusst.

Das *trh3*-Gen ist, wie in Tab. 15 gezeigt, in der Überexpressions-Mutante stark überexprimiert, übt jedoch keinen Einfluss auf die Regulation der drei Gene *pstS1*, *pstS2* und *aph* des PHO-Stimulons aus. Wie bei der Überexpressions-Mutante des *phoU3*-Gens bereits beobachtet werden konnte, wird der *bop*-Promotor durch Phosphatlimitierung induziert.

Tab. 15: Regulationsfaktoren ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte) für einige Gene des PHO-Stimulons in der Überexpressions-Mutante KF202 (*Pbop-trh3*).

Für die RT-qPCR wurde Gesamt-RNA aus Zellen, die sowohl im Dunkeln sowie im Licht für 48 h unter $-P_i$ -Bedingungen als auch im Dunkeln unter $+P_i$ -Bedingungen kultiviert wurden, isoliert.

Gen	Stamm <i>Pbop_trh3</i>		
	$-P_i$, dunkel	$-P_i$, Licht	$+P_i$, dunkel
	Regulationsfaktor ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert)		
<i>pstS1</i>	-1,66	1,04	3,31
<i>pstS2</i>	1,91	1,44	1,54
<i>aph</i>	1,03	1,83	1,89
<i>trh3</i>	4097,69	73109,08	195,37

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Gene *phoU3* und *trh3* keinen Einfluss auf die Regulation der Gene des PHO-Stimulons hat.

Ein Regulator, der die Transkription der PHO-Stimulogene kontrolliert, konnte auf diese Weise nicht identifiziert werden. Es wäre auch denkbar, dass die Überexpression von *PhoU3* und *Trh3* keine Auswirkung auf die Transkription hat, wenn beide schon im Wildtyp sättigend wirken.

4 Diskussion

Für eine effektive Aufnahme von Phosphat aus dem umgebenden Medium sind Organismen auf spezifische Transportsysteme angewiesen. In Bakterien sind diese Aufnahmesysteme sehr gut charakterisiert und den meisten untersuchten Spezies stehen neben sekundären Transportern auch primäre Transporter, die zur Familie der ABC-Transporter zählen, zur Verfügung (van Veen, 1997).

Unter Phosphatmangel werden sowohl in Bakterien als auch in Eukaryoten Gene für hoch-affine Phosphattransportsysteme induziert. Bei den Bakterien sind dies Gene des ABC-Transportsystems Pst, die die Aufnahme von anorganischem Phosphat sicherstellen. In *E. coli* werden zusätzlich Gene des Glycerin-3-phosphat spezifischen ABC-Transporters Ugp hochreguliert.

In Archaeen wurde das PHO-Stimulon, welches die Induktion von Genen durch eine Phosphatlimitierung darstellt, bislang nur in *H. salinarum* beschrieben (Wende *et al.*, 2009). Dabei werden die Gene der ABC-Transportsysteme Pst1, Pst2 und Ugp unter Phosphatmangel hochreguliert.

Um tiefere Einblicke in die Phosphat-Aufnahme von Archaeen zu erlangen, war die Charakterisierung der ABC-Transportsysteme Pst1, Pst2 und Ugp in dem halophilen Organismus *H. salinarum* Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass *H. salinarum* zur Aufnahme von Phosphat zwei Bindeprotein-abhängige Transportsysteme mit unterschiedlichen Affinitäten zur Verfügung stehen. Somit wurden erstmals zwei hochaffine Transportsysteme zur Aufnahme von Phosphat in einem Archaeon identifiziert und charakterisiert. Zudem wurde auch die Funktion des ABC-Transporters Ugp als einziges Glycerin-3-phosphat-spezifisches Aufnahmesystem in *H. salinarum* bestätigt.

Die Untersuchung der phosphatabhängig regulierten Operons *pst1*, *pst2* und *ugp* von *H. salinarum*, welche die Komponenten der drei ABC-Transporter kodieren, gibt einen ersten Einblick in die unterschiedliche Expression und Regulation der polycistronischen Operons. Das *pst1*-Operon wird dabei von zwei alternativen Promotoren transkribiert, was bisher einen Einzelfall für Protein-kodierende Operons im Reich der Archaeen darstellt. Es wird erstmals in Archaeen ein Regulationssystem für ein Operon beschrieben, welches neben der Regulation auf Transkriptionsebene eine zusätzliche Regulation auf Translationsebene in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration betreibt.

4.1 Pst1 und Pst2 - zwei primäre Transporter für anorganisches Phosphat

4.1.1 Phosphattransporter im Genom von *H. salinarum*

Das Genom von *H. salinarum* enthält mehrere Gene, die aufgrund ihrer Homologie zu bekannten Transportsystemen aus Bakterien (van Veen, 1997), Transporter für P_i -Aufnahme kodieren könnten. Neben den ABC-Transportern Pst1 und Pst2, sind auch die Gene *phoT2* und *phoT3* für putative Phosphattransporter vorhanden. Desweiteren kodiert *OE4236F* einen mutmaßlichen Phosphattransporter und *OE2113R* vermutlich eine Phosphat-Permease.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die phosphatspezifischen ABC-Transporter Pst1 und Pst2 untersucht. Die Doppeldeletion beider Pst-Transporter ist für die Zellen letal, was vermuten lässt, dass die im Genom von *H. salinarum* kodierten Homologen der Phosphattransporter PhoT2, PhoT3, OE4236F und OE2113R nicht funktionsfähig sind oder kein Phosphat transportieren. Die beiden Pst-Transporter in *H. salinarum* scheinen die einzigen beiden funktionierenden Transporter für anorganisches Phosphat in *H. salinarum* zu sein.

Microarray-Experimente zeigen, dass unter Phosphatmangel ($-P_i$) die Transkriptmenge des Pst1-Transporters stark erhöht war, während die des Pst2-Transporters nur vorübergehend induziert wurde. Die mRNAs der Gene *phoT2*, *phoT3*, *OE4236F* und *OE2113R* wurden unter $-P_i$ -Bedingungen jedoch nicht induziert (Wende *et al.*, 2009). Dagegen führen Eisenmangel-Bedingungen zu einer Induktion von *phoT2* und *phoT3*, wie auch Genen der *pst1*- und *pst2*-Operons (Schwaiger, 2009).

Die Promotorstudien in der vorliegenden Arbeit bestätigen die Ergebnisse der vorigen Transkriptomanalysen. Die Expression des *pst1*-Operons wurde nach 48 h Phosphatmangel etwa 115-fach induziert, die des *pst2*-Operons etwa 4,3-fach. Die Expression des *pst2*-Operons erreichte hingegen unter phosphatgesättigten Bedingungen ein basales Niveau, das etwa 10mal so hoch war wie das des *pst1*-Operons.

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass unter phosphatlimitierten Bedingungen die beiden induzierten Pst-Transporter die einzigen funktionsfähigen Transporter für anorganisches Phosphat sind. Aus diesem Grund wurden die durch die Phosphataufnahmeversuche mit Knockout-Mutanten, in denen jeweils einer der beiden Pst-Transporter ausgeschaltet worden ist, bestimmten kinetischen Parameter dem jeweils in der

Mutante funktionsfähigen Pst-Transporter, bzw. im Wildtyp beiden Transportern, zugeschrieben.

Unter Phosphatmangelbedingungen wird neben dem Pst-Transportsystem für anorganisches Phosphat auch der ABC-Transporter Ugp induziert. Dieser ist Glycerin-3-phosphat-spezifisch und ein Homolog des Ugp-Transporters aus *E. coli* (Argast *et al.*, 1978). Sowohl die Funktion als auch die Monopolstellung des Ugp-Transporters für die Glycerin-3-phosphat-Aufnahme in *H. salinarum* konnte in dieser Arbeit durch Wachstumsversuche mit Deletions-Mutanten bestätigt werden (siehe 3.4.3). *H. salinarum* hat somit die Möglichkeit Glycerin-3-phosphat direkt aus dem Medium aufzunehmen.

Die Genomanalyse zeigt, dass keine Homologen zu Transportsystemen für weitere Organophosphate in *H. salinarum* vorhanden sind.

4.1.2 Funktion der beiden Pst-Transporter in *H. salinarum*

Viele Bakterien besitzen nur ein *pst*-Operon (Vershina & Znamenskaia, 2002). Eine Ausnahme bilden Mycobakterien, die zwei oder mehr Kopien der *pst*-Gene haben. Für *Mycobacterium tuberculosis*, bei dem drei putative *pst*-Operons identifiziert wurden, wird vermutet, dass die Genduplikationen eine subtile Anpassung an verschiedene phosphatlimitierte Bedingungen während seines Infektionszyklus darstellt (Lefevre *et al.*, 1997, Peirs *et al.*, 2005). Einige halophile Archaeen wie *Haloarcula marismortui*, *Natronomonas pharaonis* und *H. salinarum* enthalten zwei Homologe des Pst-Transporters, die evolutionär wahrscheinlich ebenfalls auf eine Genduplikation zurückzuführen sind. Andere Archaeen wiederum, wie *Haloquadratum walsbyi*, *Sulfolobus solfataricus* und *Archaeoglobus fulgidus*, besitzen nur eine *pst*-Genkopie.

Welchen Vorteil Archaeen durch den Besitz von zwei Pst-Transportern haben ist bisher noch unbekannt und wurde am Beispiel von *H. salinarum* durch die Phosphataufnahme- und die Phosphat-Taxis-Versuche in dieser Arbeit ersichtlich.

Der Pst1-Transporter hat gegenüber dem Pst2-Transporter eine 5-fach höhere Phosphat-Affinität und wird daher vor allem unter phosphatlimitierten Bedingungen benötigt. Außerdem ist das Pst1-Transportsystem wichtig für die durch Phosphatmangel induzierte Phosphat-Taxis. Unter phosphatgesättigten Bedingungen operiert hauptsächlich der weniger affine Pst2-Transporter.

Das begründet, weshalb der Pst1-Transporter unter phosphatgesättigten Bedingungen nur geringfügig exprimiert wird, bei Phosphatmangel jedoch sehr stark.

Die vorliegende Arbeit zeigt also deutlich wie durch die Genexpression von zwei unterschiedlich affinen Pst-Transportern, die unterschiedlich reguliert werden, sich die Zelle optimal an die Phosphatkonzentration in der Umgebung anpassen kann.

4.1.3 Die Bedeutung von Pst1 für die Phosphat-Taxis in *H. salinarum*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der Pst1-Transporter neben seiner Funktion als hoch-affiner Phosphattransporter auch eine wichtige Rolle in der Phosphat-Taxis spielt. Die Deletion des Pst1-Transporters führte zu einer erheblichen Reduktion der Phosphat-Taxis bei der die Ringausbildung im CIP-Test sehr stark eingeschränkt war (siehe Abb. 45). Bei der verbliebenen, sehr schwach ausgeprägten Ringbildung handelt es sich höchstwahrscheinlicher um ein bei diesem Test häufiger auftretendes „Artefakt“. Auch in anderen CIP-Tests wurden Ringe und dunkel hervortretende „Scheiben“ um den Hartagar-Pfropfen beobachtet, die jedoch nicht als Chemotaxis interpretiert wurden (Kokoeva & Oesterhelt, 2000, Kokoeva *et al.*, 2002). Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass die schwachen Ringe durch eine geringe Beteiligung des Pst2-Transporters an der Phosphat-Taxis zustande kommen. Der chemotaktische Ring des $\Delta pst2$ -Stamms blieb im Zuge der Zeit wesentlich ausgeprägter erhalten als der des Wildtyps. Daraus wird geschlossen, dass Zellen, die allein den Pst1-Transporter enthalten, eine bessere Phosphat-Taxis betreiben können als der Wildtyp, der zusätzlich den Pst2-Transporter exprimiert. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der wichtigen Rolle des Pst1-Transporters für die Phosphat-Taxis.

Da *H. salinarum*-Zellen der Stämme $\Delta pst1$ und $\Delta pst2$, die zuvor unter $+P_i$ -Bedingungen wuchsen, ebenfalls keine Phosphat-Taxis aufwiesen, haben beide Pst-Transporter keine repressive Wirkung auf die Phosphat-Taxis, wie dies bei *P. aeruginosa* beobachtet wurde. Der Pst1-Transporter aus *H. salinarum* ist, analog zum Pst-Transporter aus *E. cloacae*, demgegenüber sogar notwendig für die phosphatinduzierte Phosphat-Taxis. Es ist zu vermuten, dass das Bindeprotein PstS₁ das Sensorprotein ist, das mit einem bisher nicht identifizierten Signalübermittler, einem Transducer, interagiert. Eine vergleichbare Situation findet man beispielsweise in *E. coli*, dessen Maltosebindeprotein MBP eine Doppelfunktion einerseits für den Maltose-Transport und andererseits für die Maltose-Chemotaxis hat (Zhang *et al.*, 1996). Auch PstS₁ scheint, einerseits als Phosphatbindeprotein für den Phosphattransport und andererseits als Sensorprotein für die Phosphat-Chemotaxis, zwei Funktionen zu haben. Durch eine Phosphatlimitierung wurde zwar *htr13*, eines der

halobakteriellen Transducer (Htr)-Gene, denen noch keine Funktion zugeordnet ist, induziert (Wende, 2006), jedoch konnte experimentell keiner der 18, in *H. salinarum* vorhandenen, Htrs als chemotaktischer Transducer für P_i identifiziert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass entweder ein noch nicht identifiziertes Transducerprotein vorhanden ist oder die Signaltransduktion ohne ein Htr verläuft. Möglich wäre eine Signalübermittlung über PhoU₁ als Mediatorprotein, das homolog zu PhoU aus *E. coli* ist. Diese direkte Interaktion des Pst-Systems über PhoU₁ mit der Histidinkinase CheA könnte damit der Interaktion des Pst-Transporters in *E. coli* über PhoU ähneln, das auf bisher ungeklärte Weise mit der Histidinkinase PhoR interagiert (Wanner, 1994). Zwar konnte in *H. salinarum* eine Phosphat-Taxis bei allen *htr*-Deletions-Mutanten beobachtet werden, jedoch keine bei Deletions-Mutanten von *cheY*, *cheA*, *cheR* und *cheB*. Aus den vorhandenen Daten kann geschlossen werden, dass die Phosphat-Taxis zum einen abhängig ist von Pst1, dem Zweikomponentensystem CheA-CheY sowie CheR und CheB, jedoch nicht von einem der 18 Htrs. Möglicherweise könnten CheR und CheB auch ein anderes, bisher nicht identifiziertes, Htr-ähnliches Protein methylieren bzw. demethylieren. Ein Chemorezeptor für die Phosphat-Taxis konnte bisher nur in *P. aeruginosa* identifiziert werden, welches gleich zwei chemotaktische Transducer für P_i besitzt (CtpH und CtpL) (Wu *et al.*, 2000). Analog zu *H. salinarum* konnte bisher auch in *E. cloacae* kein Chemorezeptor identifiziert werden und eine Phosphat-Taxis fand nur mit intaktem Phosphattransportsystem (Pst) statt (Kusaka *et al.*, 1997). Das hochspezifische Phosphatbindeprotein PstS des Pst-Transporters von *E. cloacae* scheint das Sensorprotein zu sein, das mit einem bisher nicht gefundenen Transducer (MCP) wechselwirken könnte. Eine *cheR*-Deletions-Mutante zeigte keine Phosphat-Taxis, was die Autoren vermuten lässt, dass die Phosphat-Taxis in *E. cloacae* MCP-abhängig ist (Kato *et al.*, 2001). Es kann allerdings auch bei *E. cloacae* nicht ausgeschlossen werden, dass CheR ein bisher unbekanntes MCP-ähnliches Protein methyliert.

4.1.4 Affinität und Interaktion der Phosphatbindeproteine PstS₁ und PstS₂

Ionen-Aufnahme-Prozesse über eine Membran folgen der Michaelis-Menten-Kinetik und können mit der von enzymatischen Prozessen verglichen werden (Epstein & Hagen, 1952, Epstein *et al.*, 1963). Da sich die Dissoziationskonstante (K_D -Wert) des Bindeproteins und die Affinitätskonstante (K_M -Wert) des entsprechenden Substratbindeprotein-abhängigen ABC-Transportsystems in den meisten Fällen ähneln, ist das Bindeprotein für die Spezifität und Affinität des gesamten Systems verantwortlich (Tam & Saier, 1993). Ausgehend von dieser Annahme wird die Affinitätskonstante K_M der Pst-Transporter durch die jeweiligen Phosphatbindeproteine PstS₁ und PstS₂ bestimmt. Je affiner ein Bindeprotein ist, desto stabiler ist seine Bindung zum Substrat. Dies kann zu einer langsameren Abgabe des Substrats an die Permease führen, wodurch sich auch die Transport-Geschwindigkeit verlangsamt. Die Aufnahme-Geschwindigkeit v_{\max} wird also unter anderem auch von der Affinität der Bindeproteine beeinflusst.

Die kinetischen Parameter der beiden Pst-Transporter, die über die Phosphataufnahme der Deletions-Mutanten $\Delta pst1$ und $\Delta pst2$ ermittelt wurden, bildeten im Wildtyp etwa das arithmetische Mittel aus den Werten der einzelnen Transporter (siehe 3.4.2). Der Pst1-Transporter in der Deletions-Mutante $\Delta pst2$ weist eine höhere Substrataffinität ($K_M = 0,136 \pm 0,07 \mu\text{M P}_i$) als der Pst2-Transporter in der Deletions-Mutante $\Delta pst1$ ($K_M = 0,682 \pm 0,13 \mu\text{M P}_i$) auf. Folglich besitzt das Phosphatbindeprotein PstS₁ eine höhere Phosphat-Affinität als PstS₂, wobei der Pst1-Transporter das P_i langsamer aufnimmt als der Pst2-Transporter.

Die gemessenen Affinitäten der beiden Phosphattransporter in *H. salinarum* gleichen den Affinitäten einiger Pst-Transporter in Bakterien. So wurde beispielsweise in *E. coli* für den Pst-Transporter ein K_M -Wert zwischen 0,3 - 0,7 $\mu\text{M P}_i$ gemessen (van Veen, 1997). In *B. subtilis* (Qi *et al.*, 1997) betrug der K_M -Wert 0,5 $\mu\text{M P}_i$ und in *Sinorhizobium meliloti* (Yuan *et al.*, 2006) 0,2 $\mu\text{M P}_i$. In dem Archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* wurde ein sehr niedriger K_M -Wert von 25 nM P_i für ein nicht weiter spezifiziertes Phosphataufnahmesystem gemessen (Krueger *et al.*, 1986), bei dem es sich sehr wahrscheinlich um einen Pst-Transporter handelt.

Da das Mengenverhältnis der Pst-Transporter in den jeweiligen Zellen nicht bekannt ist, konnte dieses nur relativ abgeschätzt werden. Die vergleichsweise hohe Phosphat-Affinität ($K_M = 0,230 \pm 0,09 \mu\text{M P}_i$) des Wildtyps kann dadurch erklärt werden, dass der Pst1-Transporter unter -P_i-Bedingungen stärker induziert wird als der Pst2-Transporter.

In der $\Delta pst1$ -Mutante hingegen ist die Menge an Pst2-Transportern höher als im Wildtyp, da durch die Deletion des *pst1*-Operons die Transkriptmenge des *pst2*-Operons etwa 5-fach erhöht wird. Dieses Expressionsmuster scheint für die Zelle vorteilhaft zu sein. Im $\Delta pst2$ -Stamm werden keine größeren Mengen an Pst1-Transportern benötigt, da der Pst2-Transporter unter $-P_i$ -Bedingungen eine untergeordnete Rolle spielt. Die Deletion des Pst1-Transporters hingegen stellt für die Zelle unter $-P_i$ -Bedingungen den Verlust eines hoch-affinen Phosphattransporters dar. Um diesen Verlust auszugleichen, wird die Genexpression des Pst2-Transporters induziert.

Phosphatbindeproteine konnten bisher nur aus *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Y. pestis* kristallisiert werden (Luecke & Quioco, 1990, Tanabe *et al.*, 2007, Vyas *et al.*, 2003). In der Literatur werden Substratbindeproteine beschrieben, bei denen die Bindung verschiedener Substrate beobachtet wurde (Ames & Lever, 1972, Doeven *et al.*, 2004, Sack *et al.*, 1989). Auch für das Phosphatbindeprotein PstS von *Yersinia pestis* wird auf Grund von Strukturdaten vermutet, dass es verschiedene Phosphat-Substrate bindet (Tanabe *et al.*, 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass eine prokaryotische ABC-Permease verschiedene Substratbinde-Untereinheiten benutzt, die für unterschiedliche Substrate spezifisch sind (Kustu & Ames, 1973). Eine Nutzung von mehreren Substratbinde-Untereinheiten für dasselbe Substrat wurde jedoch für bisher bekannte ABC-Transporter noch nicht beschrieben (Davidson *et al.*, 2008, Tam & Saier, 1993).

Die P_i -Aufnahmeversuche in vorliegender Arbeit zeigen, dass die kinetischen Parameter des Wildtyps sich nicht durch eine Addition der Parameter der Deletions-Mutanten $\Delta pst1$ und $\Delta pst2$ herleiten lassen. Außerdem hat der $\Delta pst1$ -Stamm sowohl eine höhere v_{max} als auch einen höheren K_M -Wert als der Wildtyp (Tab. 10). Daher wurde vermutet, dass, die beiden Phosphatbindeproteine PstS₁ und PstS₂ nicht nur unterschiedliche Affinitäten besitzen, sondern auch in der Lage sind die Permeasen beider Transporter mit Phosphat zu beladen und somit mit beiden und nicht nur mit dem eigenen zu interagieren. Diese Vermutung wurde durch weitere Phosphataufnahmeversuche mit zwei *knockout*-Mutanten bestätigt (siehe 3.4.2.2.2). Die in dieser Arbeit festgelegten Definitionen des Überbegriffs „Knockout“ und der zu unterscheidenden Begriffe „Deletion“ und dem kursiv geschriebenen „*knockout*“ sind in Kapitel 3.3 erläutert. In den *knockout*-Mutanten werden jeweils nur einer der beiden Pst-Transporter und sowohl das „eigene“ als auch das Bindepotein des jeweils anderen Pst-Transporters exprimiert. Die Ergebnisse dieser Aufnahmeversuche ergaben, dass die kinetischen Parameter beider *knockout*-Mutanten nicht mit denen der Deletions-Mutanten, in denen jeweils nur ein Pst-Transporter mit zugehörigem Bindepotein exprimiert wurde,

übereinstimmten. Eine Übersicht der kinetischen Parameter sämtlicher Knockout-Mutanten ist in Tab. 11 zu finden. Wenn das Phosphatbindeprotein eines der beiden Pst-Transporter nicht in der Lage wäre, mit der Permease des anderen Pst-Transporters zu interagieren, wäre das Ergebnis der Phosphataufnahme beider Mutanten identisch. Das zusätzlich exprimierte Phosphatbindeprotein in der *knockout*-Mutante hätte keinen Einfluss auf die Phosphataufnahme des Transporters. Die kinetischen Parameter der *knockout*-Mutanten weichen jedoch von denen der Deletions-Mutanten ab und tendieren in Richtung der Parameter des Wildtyps. Damit erklärt sich zusätzlich, weshalb die kinetischen Parameter des Wildtyps, der beide Transporter exprimiert, das arithmetische Mittel aus den Ergebnissen der beiden Deletions-Mutanten $\Delta pst1$ und $\Delta pst2$ bilden.

Die Transport-Geschwindigkeit ist sowohl von der Anzahl der Transporter als auch von der Affinität des Substratbindeproteins abhängig (Bisswanger, 2000). Da die Transkription des *pst2*-Operons durch die Deletion des *pst1*-Operons induziert wird, ist die Menge an Pst2-Transporter in der $\Delta pst1$ -Mutante größer als im Wildtyp und erklärt somit die höhere Transport-Geschwindigkeit. Zum anderen beeinflusst auch das Phosphatbindeprotein die Geschwindigkeit. Dies konnte durch die Phosphataufnahme-Versuche mit der *knockout*-Mutante, welche den Pst2-Transporter und die Bindeproteine PstS₂ und PstS₁ exprimiert, gezeigt werden. Die Transportgeschwindigkeit war deutlich geringer als die der $\Delta pst1$ -Mutante, welche nur den Pst2-Transporter (und zugehöriges PstS₂) enthält (Abb. 43). Obwohl die oben beschriebene *knockout*-Mutante analog zur $\Delta pst1$ -Mutante mehr Pst2-Transporter als der Wildtyp exprimiert, wie eine Transkriptomanalyse ergab (Tab. 13), ist v_{\max} dennoch geringer. Dies bestätigt, dass die Transportgeschwindigkeit des Pst2-Transporters von PstS₁ beeinflusst wird.

Abb. 48 zeigt das zusammenfassende Interaktionsmodell der beiden Bindeproteine PstS₁ und PstS₂ mit den Permeasen der Transporter Pst1 und Pst2. Beide Phosphatbindeproteine „konkurrieren“ um dasselbe Substrat, wobei das affinere Phosphatbindeprotein PstS₁ anorganisches Phosphat spezifischer bindet als PstS₂. Beide Bindeproteine sind über einen N-terminalen Lipidanker mit der Membran assoziiert und könnten sich daher horizontal in der Membran hin und her bewegen. Somit sind beide Bindeproteine in der Lage, sowohl die Permease des eigenen als auch die des anderen der beiden Pst-Transporter mit Phosphat in Kontakt zu bringen.

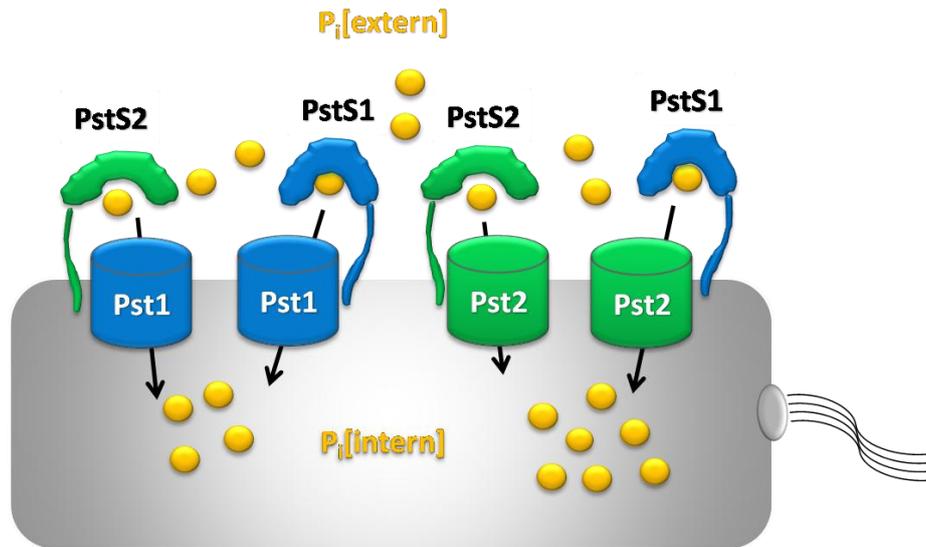


Abb. 48: Interaktionsmodell der Bindeproteine mit den Permeasen der Transporter Pst1 und Pst2.
Die Phosphatbindepoteine PstS₁ (blau) und PstS₂ (grün) können sowohl die Permeasen des Pst1- (blau) als auch des Pst2-Transporters (grün) mit anorganischem Phosphat (gelb) beladen.

4.2 Die Transkripte des *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Operons

4.2.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Transkripte

Die Transkripteinheit der Gencluster *pstS₁C₁A₁B₁-phoU₁-OE4475R-OE4471R* und *pstS₂C₂A₂B₂-phoU₂* wurden mit Hilfe der RT-PCR bestimmt (siehe Abb. 10). Sowohl das *pst1*- als auch das *pst2*-Operon werden als eine mRNA transkribiert. Mit der verwendeten Methode lässt sich die Einheit des längsten vorhandenen Transkripts eines Operons bestimmen, es kann jedoch keine Aussage über die Koexistenz von kürzeren Transkripten getroffen werden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch kürzere mRNAs in der Zelle synthetisiert werden, die entweder durch einen frühzeitigen Transkriptions-Abbruch entstehen oder an einem internen Promotor innerhalb des Operons beginnen.

In Übereinstimmung mit den *pst*-Operons aus Bakterien wie beispielsweise *E. coli* (Aguena *et al.*, 2002) und *B. subtilis* (Qi *et al.*, 1997), konnte für beide *pst*-Operons in *H. salinarum* jeweils ein Transkript identifiziert werden, das die Gene *pstSCAB-phoU* einschließt. Der Promotorbereich befindet sich wie in *E. coli* und *B. subtilis* stromaufwärts des *pstS*-Gens. Das *pst1*-Transkript enthält zwei weitere Gene (*OE4475R* und *OE4471R*), die weder in *E. coli* noch in *B. subtilis* vorhanden sind (Abb. 9B).

Auf Grundlage von bioinformatischen Analysen befindet sich der Promotorbereich des *ugp* (*ugpBAEC*)-Operons analog dem *ugpBAECQ*-Operon in *E. coli* (Overduin *et al.*, 1988) stromaufwärts des *ugpB*-Gens. In *E. coli* konnten zwei Promotoren für das *ugp*-Operon stromaufwärts des *ugpB*-Gens identifiziert werden (Kasahara *et al.*, 1991). Der eine Promotor enthält drei PHO-Boxen und wird von PhoB, dem Antwortregulator des PHO-Regulons in *E. coli*, in Abhängigkeit von Phosphat reguliert. Der andere Promotor hingegen, der nur bei Phosphatsättigung aktiv ist, ist abhängig von cAMP und CRP (*cAMP receptor protein*) (Kasahara *et al.*, 1991). In dieser Arbeit konnte nur ein Promotor und damit nur ein Transkriptionsstart (TSS) für das *ugp*-Operon von *H. salinarum* identifiziert werden.

In Archaeen wurde bisher noch kein Operon mit alternativen Promotoren beschrieben. Dagegen sind vor allem in Eukaryoten (Herrmann *et al.*, 1988, Ryu & Garges, 1994), aber auch in Bakterien (Yoshisue *et al.*, 1997) Operons mit zwei Promotoren gängig. Säugetier-Gene besitzen sogar sehr häufig multiple Transkriptionsstarts (Schroeder & Myers, 2008). Neueste Studien bestätigen eine alternative Promotoraktivität für etwa 7000 menschliche Gene (Singer *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass fast die Hälfte aller Protein-kodierenden Säugetier-Gene alternative Promotoren besitzen (Davuluri *et al.*, 2008, Pankratova, 2008).

Die Transkriptionsstartstellen der drei Operons *pst1*, *pst2* und *ugp* lagen alle, sowohl unter phosphatgesättigten als auch unter phosphatlimitierten Bedingungen, 1 bp stromaufwärts des Startcodons. Im *pst1*-Operon wurde dagegen noch eine zweite Transkriptionsstartstelle identifiziert, die sich 60 bp stromaufwärts des Startcodons befindet und nur unter phosphatgesättigten Bedingungen auftrat. Das *pst1*-Operon besitzt somit, ähnlich wie das *ugp*-Operon von *E. coli* zwei Promotoren, von denen in analoger Weise der eine unter +P_i- und der andere unter -P_i-Bedingungen aktiv ist. Beide Promotoren enthalten ein TATA-Box-Motiv, das etwa 27 bp stromaufwärts des jeweiligen TSS liegt.

Das *pst1*-Transkript besitzt somit unter Phosphatmangel keine 5'-UTR, unter phosphatgesättigten Bedingungen jedoch eine 60 nt lange 5'-UTR. Die *pst2*- und *ugp*-Transkripte besitzen sowohl unter Phosphatsättigung als auch unter phosphatlimitierten Bedingungen keine 5'-UTR.

4.2.2 Untersuchung der alternativen *pstI*-Transkripte mit Hilfe des *bgaH*-Reportersystems

Aus den Transkriptomanalysen von (Wende *et al.*, 2009) geht hervor, dass die Transkriptmengen der Gene des *pstI*-Operons unter $-P_i$ -Bedingungen um ein vielfaches induziert werden. Ein Mikroarray-Experiment zeigt, dass nach 24 h Phosphatmangel die Gene *pstS₁* 25-fach (131-fach in der RT-qPCR) und *pstC₁* 6-fach (408-fach in der RT-qPCR) induziert werden.

Um die Regulation des *pstI*-Promotors besser studieren zu können, wurde ein Fusionskonstrukt des Promotors mit dem Leserahmen des *bgaH*-Gens hergestellt. Dieses Reporterkonstrukt enthält daher den nativen *pstI*-Promotor, allerdings nicht den *pstI*-Terminator, und wurde durch homologe Rekombination des entsprechenden pReport-Plasmids an der Stelle des *OE3349F*-Gens in das Genom von *H. salinarum* inseriert.

Eine Northernblot-Analyse (Kapitel 3.2) dieses *PpstI-bgaH*-Reporterkonstrukts unter Phosphatmangel zeigte nur eine geringe Induktion der Transkriptmenge. Die Transkription im Wildtyp scheint durch einen weiteren Faktor reguliert zu werden, der zu einer sehr hohen Induktion des *pstI*-Transkripts unter phosphatlimitierten Bedingungen führt (Wende *et al.*, 2009). Über die Gründe der verminderten Induktion des Reportergens im Vergleich zum *pstI*-Operon kann nur spekuliert werden. Der Reporterstamm mit dem *PpstI-bgaH*-Reporterkonstrukts enthält nur den nativen *pstI*-Promotor. Es wäre denkbar, dass zusätzliche *cis*-aktive Elemente, welche nicht im *PpstI-bgaH*-Reporterkonstrukt enthalten sind, eine Rolle in der phosphatabhängigen Induktion der *pstI*-Transkription spielen. Zudem könnte die Region innerhalb der Gene des *pstI*-Operons eine für die Induktion benötigte Chromatinstruktur bilden, die dem *bgaH*-Gen fehlt (Koide *et al.*, 2009).

Ein weiterer Grund der verminderten Induktion der Transkriptmenge könnte sein, dass die *PpstI-bgaH*-mRNA instabiler ist als die native *pstI*-mRNA. Es wäre außerdem denkbar, dass das in (Wende *et al.*, 2009) untersuchte *pstI*-Transkript nach 24 h Phosphatmangel stabiler war als das in dieser Arbeit untersuchte *PpstI-bgaH*-Transkript nach 48 h Phosphatmangel.

Obwohl sich die Induktion der Transkriptmengen des *PpstI-bgaH*-Fusionskonstruktes von der des nativen Operons unterscheiden, kann eine deutliche Aussage über die Translationseffizienz der beiden Transkripte mit oder ohne 5'-UTR getroffen werden. Wie im nächsten Kapitel beschrieben wird, findet somit neben der Induktion auf Transkriptionsebene, die von (Wende *et al.*, 2009) beobachtet wurde, eine weitere Induktion auf Translationsebene statt, die die Induktion der Genexpression insgesamt stark erhöht. Im Wildtyp wird die Transkriptmenge des *pstI*-Operons unter phosphatlimitierten Bedingungen stark induziert

(Wende *et al.*, 2009) und somit werden sehr viele Transkripte ohne 5'-UTR synthetisiert (siehe 3.1.3). Diese werden wiederum effizienter translatiert und daher fällt die Expression des *pstI*-Operons im Wildtyp bei Phosphatmangel insgesamt sehr hoch aus.

4.2.3 Die biologische Bedeutung der alternativen *pstI*-Transkripte

Aus Eukaryoten ist die Existenz von alternativen Promotoren schon lange bekannt (Ayoubi & Van De Ven, 1996). Das Umschalten des Promotors führt zu Transkripten von unterschiedlicher Stabilität und Translationseffizienz. Sehr viele krankheitsassoziierte Gene verwenden multiple Promotoren. Unterschiedliche Promotoren werden für verschiedene Gewebetypen oder unterschiedliche Zelltypen verwendet (Davuluri *et al.*, 2008). Eine bioinformatische Studie ergab, dass für 10 – 18 % aller menschlichen Gene multiple Promotoren benutzt werden, die zu alternativen 5'-UTRs führen (Trinklein *et al.*, 2003).

Die Identifizierung der beiden Transkripte des *pstI*-Operons in dieser Arbeit ist die erste Beschreibung von alternativen 5'-UTRs bei Protein-kodierenden Operons im Reich der Archaeen.

Es stellt sich die Frage, welchen physiologischen Selektionsvorteil es für *H. salinarum* hat, zwei verschiedene Promotoren einzusetzen.

Je nach Phosphatgehalt im Medium „schaltet“ der Promotor um und es entsteht ein *leader*-loses Transkript unter phosphatlimitierten und eine Mischung aus Transkripten mit und ohne *leader*-Sequenz bei ausreichendem Phosphatgehalt, wobei die Transkripte mit *leader*-Sequenz überwiegen. Der Vergleich der Transkriptmenge mit der Translationseffizienz unter beiden Phosphatbedingungen zeigte, dass das *leader*-lose Transkript bei gleicher Menge 115-fach effizienter translatiert wird als die Mischung aus Transkripten, die überwiegend eine *leader*-Sequenz enthalten (Abb. 34). Daraus kann geschlossen werden, dass *H. salinarum* die Expression des Pst1-Transporters bei Phosphatmangel durch eine effizientere Translation des *leader*-losen *pstI*-Transkripts zusätzlich reguliert. Die hohe Expressionsrate des in erster Linie unter phosphatlimitierten Bedingungen benötigten Pst1-Transporters wird von der Zelle somit sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene reguliert. Durch die Synthese der Transkripte mit oder ohne 5'-UTR kann die Zelle eine feine Abstimmung der benötigten Proteinmenge des hoch-affinen Pst1-Transporters erzielen.

Es wäre denkbar, dass unter phosphatlimitierten Bedingungen ein zusätzlicher Faktor gebildet wird, der die Translationseffizienz des Transkripts steigert. Diese Vermutung kann jedoch nicht durch das Ergebnis der Transformante KF1D in Abb. 34 bestätigt werden. Diese

Transformante bildet unter beiden Phosphatbedingungen ein *leader*-loses Transkript und die BgaH-Aktivität bleibt in beiden Fällen in etwa gleich hoch. Wäre ein zusätzlicher Faktor für die Steigerung der Translationseffizienz verantwortlich, müsste er hier die BgaH-Aktivität unter Phosphatmangel induzieren. Die Steigerung der Translationseffizienz wird somit allein durch die *leader*-Sequenz beeinflusst. Auch in einer anderen Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die Deletion der 5'-UTR eines halobakteriellen Transkripts die Proteinkonzentration um das 15-fache steigert (Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004) und die Translationseffizienz von der 5'-UTR beeinflusst wird. Zudem stellen Transkripte, die eine *leader*-Sequenz besitzen, eine Minderheit in *H. salinarum* dar. Daher ging bereits (Brenneis *et al.*, 2007) davon aus, dass 5'-UTRs im Vergleich zu *leader*-losen Transkripten, die hoch-effizient translatiert werden, eine repressive Funktion auf die Translationseffizienz haben könnten. Aus anderen Arbeiten ist bereits bekannt, dass die 5'-UTRs die Translationseffizienz beeinflussen (Mignone *et al.*, 2002, Pesole *et al.*, 2000, Wilkie *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte diese These für die 5'-UTR des *pst1*-Transkripts bestätigt werden.

Für die 5'-UTR bzw. *leader*-Sequenz des *pst1*-Promotors lässt sich eine Haarnadelstruktur vorhersagen, deren mögliche Struktur in Abb. 49 dargestellt ist. Diese Haarnadelstruktur könnte die Effizienz der Translation und / oder die Stabilität der mRNA beeinflussen.

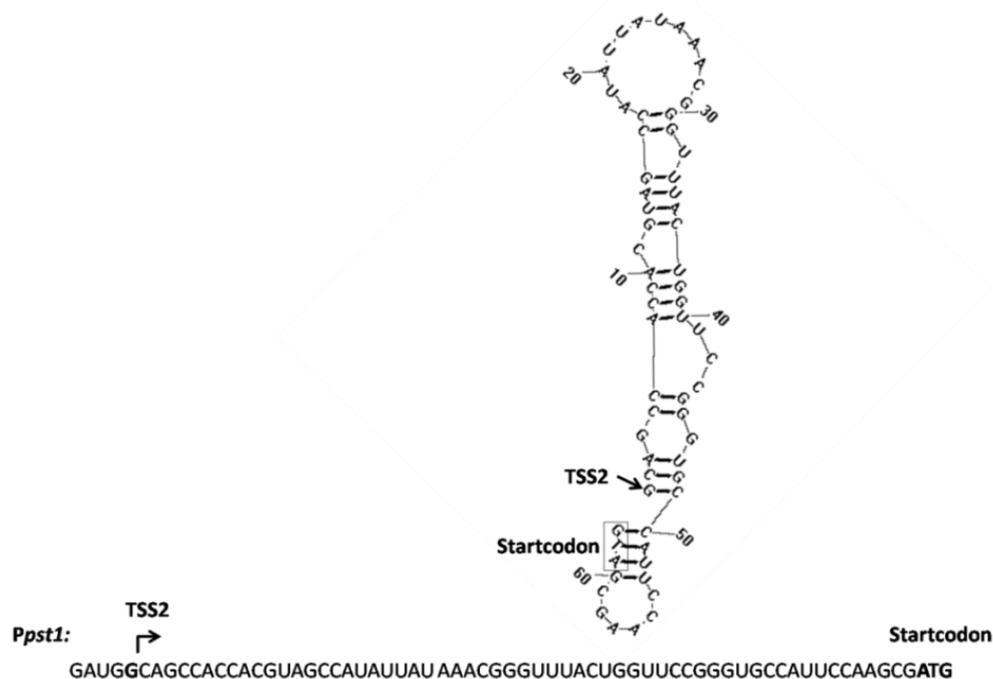


Abb. 49: Mögliche Haarnadelstruktur der 60 nt langen 5'-UTR im *pst1*-Promotor (Ppst1).

Die Transkription von Transkriptionsstartstelle TSS-2 führt zu einem Transkript mit 60 nt langer 5'-UTR, das eine Haarnadelstruktur bilden könnte. Die Haarnadel wurde mit dem Programm *RNAstructure* dargestellt.

4.3 Untersuchung der *pst1*-, *pst2*-, und *ugp*-Promotoren

Da die Promotorstudien mit Hilfe von Reporterkonstrukten in *H. salinarum* durchgeführt wurden, sind in der Zelle auch die nativen Promotoren neben den durch das Reporterplasmid eingeführten analogen Promotoren *Ppst1*, *Ppst2* und *Pugp* vorhanden. Diese nehmen keinen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse der vergleichenden Promotorstudien der partiell deletierten oder mutierten Promotorkonstrukte (Kapitel 3.1.4.5). Da die Studien unter gleichbleibenden Bedingungen stattfanden und die verschiedenen Promotorkonstrukte nur miteinander verglichen wurden, können Rückschlüsse auf die Promotoraktivität und auf *cis*-aktive Elemente im Promotor gezogen werden.

In anderen Studien wurden Promotoren aus *H. salinarum* in *H. volcanii*, das diese Promotoren nicht enthält, untersucht (Gregor & Pfeifer, 2001, Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004). Die absolute Promotorstärke kann jedoch auch in diesem System nicht gemessen werden, da die Promotoraktivität indirekt über die gemessene BgaH-Aktivität erfasst wird. Es kann also nur eine Aussage über die relative Promotorstärke bzw. Expression des zugehörigen Operons getroffen werden.

4.3.1 Phosphatabhängige Expression der *pst1*-, *pst2*-, und *ugp*-Operons

Die Expression des *pst1*- sowie des *pst2*-Operons wird durch eine Phosphatlimitierung induziert und ist somit phosphatabhängig. Die *pst1*-Expression wurde nach 48 h Phosphatmangel etwa 115-fach induziert, die *pst2*-Expression lediglich 4,3-fach. Die Expression des *pst2*-Operons war unter +P_i-Bedingungen 10mal so hoch wie die des *pst1*-Operons. Die P_i-abhängige Expression des *pst1*-Operons war etwa 2,8mal so hoch wie die des *pst2*-Operons. Das Ergebnis der *pst1*- und *pst2*-Expressionen steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer vorangegangenen Transkriptomanalyse (Wende *et al.*, 2009). Unter Verwendung der Microarray-Technologie und RT-qPCR wurde gezeigt, dass die Gene des *pst1*-Operons innerhalb einer 24-stündigen Phosphatlimitierung ansteigend induziert werden. Die Gene des *pst2*-Operons zeigten im Vergleich dazu nur eine schwache Induktion, die nach 10 h wieder abnahm.

In dieser Arbeit ist ebenfalls eine Abnahme der *pst2*-Expression nach 9 h gemessen worden; gefolgt von einer Zunahme nach 12 h Phosphatlimitierung mit ihrem Höhepunkt bei 48 h (Abb. 19).

Die Northernblot-Analyse (Kapitel 3.2) zeigte, dass die mRNA-Mengen mit oder ohne *leader*-Sequenz unter beiden Phosphatbedingungen vergleichbar waren. Die hohe phosphatabhängige Induktion ist also das Ergebnis der hohen Translationseffizienz des Transkripts, das keinen *leader* besitzt im Vergleich zu der mRNA mit *leader* unter P_i -gesättigten Bedingungen. Das *pst2*-Operon hat unter beiden Phosphatbedingungen nur einen Transkriptionsstart und somit immer ein Transkript ohne *leader*-Sequenz. Die Aktivität des *pst2*-Promotors wird von der BgaH-Aktivität im ONPG-Enzymtest wiedergegeben.

Es soll noch erwähnt werden, dass der *pst2*-Promotor eine höhere Promotoraktivität unter $+P_i$ -Bedingungen in der Transformante KF0B besitzt, die das Konstrukt mit dem auf 105 bp verkürzten *pst2*-Promotor trägt (siehe Abb. 23). Diese höhere Aktivität des verkürzten Promotorkonstrukts könnte darauf hinweisen, dass möglicherweise in der deletierten Region ein repressives Element vorhanden ist, welches bei Abwesenheit zu einer gesteigerten Aktivität führt. Die höhere BgaH-Aktivität bei der Untersuchung des *pst2*-Promotors unter $+P_i$ -Bedingungen könnte durch eine hohe Translationseffizienz des zugehörigen Transkripts erreicht worden sein. Das *pst2*-Transkript besitzt unter $+P_i$ -Bedingungen keinen *leader*, wohingegen das *pst1*-Transkript bevorzugt einen *leader* aufweist, der zu einer geringeren BgaH-Aktivität führte.

Die Ergebnisse zeigen verschiedene Regulationsmechanismen der Induktion unter Phosphatlimitierung für das *pst1*- und *pst2*-Operon. Während die Induktion des *pst2*-Operons auf Transkriptionsebene reguliert wird, wird das *pst1*-Operon darüber hinaus auch posttranskriptionell reguliert.

Auch die Expression des *ugp*-Operons wurde mit Hilfe des *bgaH*-Reportersystems untersucht. Sowohl die Expression unter phosphatgesättigten Bedingungen als auch die P_i -abhängige Expression waren im Vergleich zu denen von *pst1* und *pst2* wesentlich geringer (siehe Abb. 19). Diese geringe *ugp*-Expression steht nicht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis aus einer vorherigen Transkriptomanalyse, in welcher die Gene *ugpA* und *ugpB* innerhalb einer 24-stündigen Phosphatlimitierung ansteigend induziert wurden und sogar eine höhere Induktion als die Gene *pstS₁* und *pstC₁* aufwiesen (Wende *et al.*, 2009). Der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der geringen Translationseffizienz des *bgaH*-Transkripts in der KF2A-Transformante liegen. Mit der Herstellung weiterer Promotorkonstrukte, die längere oder kürzere Bereiche des *ugp*-Promotors tragen, könnte möglicherweise Klarheit geschaffen werden, ob sich die gemessene Expression des *ugp*-Operons mit den Ergebnissen der Transkriptomanalyse von (Wende *et al.*, 2009) in Übereinstimmung bringen lässt und worin der Grund der geringen Expression liegt.

4.3.2 Die Promotorstruktur der Operons *pst1* und *pst2*

4.3.2.1 TATA-Box

Das *bgaH*-Reportersystem wurde in erster Linie dazu eingesetzt, um *cis*-aktive Elemente in den *pst1*- und *pst2*-Promotoren zu identifizieren. Dabei wurde zunächst die Lage der TATA-Boxen bestimmt. Das Zentrum der TATA-Box des *pst2*-Promotors und der beiden TATA-Boxen der Transkriptionsstarts TSS-1 und TSS-2 des *pst1*-Promotors liegen etwa in dem von (Brenneis *et al.*, 2007) beschriebenen Abstand (-27/-28) zum jeweiligen Transkriptionsstart. Punktmutationen in diesen Bereichen führten zu einem totalen Ausfall der BgaH-Aktivität im ONPG-Enzymtest. Northernblot-Analysen (Abb. 34) zeigten, dass die mRNA-Menge durch Punktmutationen in der TATA-1-Box des *pst1*-Promotors unter Phosphatmangel stark zurückgeht. Das Ergebnis zeigt, dass die Synthese des *leader*-losen Transkripts unter $-P_i$ -Bedingungen durch die Mutation der TATA-1-Box gestört wird. Unter phosphatgesättigten Bedingungen hat dieselbe Mutation nur eine geringe Auswirkung, da hier hauptsächlich das Transkript mit *leader*-Sequenz entsteht. Auch bei Punktmutationen in der TATA-2-Box nehmen die mRNA-Mengen je nach Punktmutation mehr oder weniger stark ab. Die Mutation der TATA-2-Box wirkt sich stärker auf das Transkript mit *leader*-Sequenz unter phosphatgesättigten Bedingungen aus, jedoch scheint auch die Synthese des *leader*-losen Transkripts beeinflusst zu werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die TATA-2-Box auch unter Phosphatmangel an der Transkription ausgehend von TSS-1 beteiligt ist. Die BgaH-Aktivität, welche die Genexpression widerspiegelt, nimmt in den drei TATA-2-Box-Mutanten verglichen mit dem Wildtyp unter $-P_i$ -Bedingungen etwa um die Hälfte bis hin zum 36-fachen ab (Abb. 34). Auf die Rolle der TATA-2-Box im *pst1*-Promotor wird später noch weiter eingegangen.

Die Analyse der Transformanten in denen der *pst1*-Promotorbereich schrittweise deletiert wurde, zeigt, dass die Region zwischen 101 bp und 74 bp stromaufwärts von TSS-1 ein für die phosphatabhängige Promotoraktivität wichtiger Bereich ist. Die TATA-2- bzw. die zweite P-Box liegt in diesem Bereich.

Die Analyse der Transformante mit einer Deletion des 3'-Endes des *pst1*-Promotors bis zum TSS-2 zeigt, dass dieser Bereich unter $+P_i$ -Bedingungen für die Transkription ausreicht, da die mRNA-Mengen dieser Mutante im Northernblot gleich groß waren wie im Wildtyp. Aus dem ONPG-Assay ging hervor, dass dieses *leader*-lose Transkript etwas ineffizienter translatiert wird als die Transkripte in der Mutante mit dem gesamten Promotor. Dagegen

wird unter $-P_i$ -Bedingungen, unter denen die Transkription nur am TSS-1 initiiert, fast kein Transkript und dementsprechend auch fast kein Translationsprodukt gebildet.

Eine Mutation in gleichzeitig beiden TATA-Boxen des *pst1*-Promotors könnte die Transkription unter phosphatgesättigten Bedingungen ganz ausschalten und zusätzlich bestätigen, dass die TATA-2-Box die TATA-Box des TSS-2 ist. Solange jedoch die Transkription von TSS-1 noch erfolgen kann, ist auch ein Transkript unter $+P_i$ -Bedingungen zu sehen.

Die Transkriptionsstartbestimmung einer Transformante mit mutierter TATA-2-Box zeigte keine Transkripte mehr, die von TSS-2 initiiert wurden. Die Transkription konnte nur noch von TSS-1 erfolgen. Dies beweist, dass TATA-2 die zum Transkriptionsstart bei -59 bp (TSS-2) zugehörige TATA-Box ist.

4.3.2.2 P-Box – eine AT-reiche Sequenz

Die basale archaeale Transkriptionsmaschinerie ist eine vereinfachte Version des eukaryotischen Typus, ihre Aktivität wird jedoch häufiger von Bakterien-ähnlichen Faktoren kontrolliert (Bell *et al.*, 1999). Die Regulation vieler bakterieller Gene verläuft über Zweikomponentensysteme. Sämtliche bisher untersuchten bakteriellen PHO-Regulons werden von einem Zweikomponentensystem kontrolliert (Vershina & Znamenskaia, 2002). *H. salinarum* besitzt zwar zu Bakterien homologe Gene mehrerer Histidinkinasen und Antwortregulatoren, jedoch fehlt ein Operon des klassischen PHO-Regulon-Zweikomponentensystems. Zudem wurde die Regulation über eines der vorhandenen Zweikomponentensysteme ausgeschlossen (Wende *et al.*, 2009).

Daraus folgt, dass das Vorhandensein einer klassischen PHO-Box, wie sie in Bakterien vorkommt, in der Promotorregion von *pst1* und *pst2* unwahrscheinlich ist.

Ein *cis*-aktives Element, das allein für die phosphatabhängige Promotoraktivität von *pst1* und *pst2* in *H. salinarum* verantwortlich ist, konnte nicht gefunden werden. Es konnte jedoch eine Sequenz identifiziert werden, die für die phosphatabhängige Promotoraktivität essentiell ist, und der die Bezeichnung P-Box gegeben wurde. Die P-Box stellt einen AT-reichen Bereich stromaufwärts der TATA-Box des *pst2*-Promotors und der TATA-1-Box des *pst1*-Promotors dar.

Punktmutationen im Bereich -36 bis -39 im *pst1*-Promotor und -46 bis -49 im *pst2*-Promotor führten zu einem unterschiedlich starken Verlust der Promotoraktivität sowohl unter $+P_i$ - als auch unter $-P_i$ -Bedingungen. Die zum zweiten Transkriptionsstart bei -59 bp (TSS-2) gehörende TATA-2-Box des *pst1*-Promotors hat nur unter phosphatgesättigten Bedingungen

die Funktion einer TBP-Bindestelle, da nur unter diesen Bedingungen vom TSS-2 transkribiert wird. Unter phosphatlimitierten Bedingungen scheint die TATA-2-Box die Funktion einer zweiten P-Box zu übernehmen, da die *pstI*-Promotoraktivität bei Mutation in diesem Bereich stark beeinträchtigt wird. Somit wird vor allem die phosphatabhängige Promotoraktivität des *pstI*-Promotors durch die zweite P-Box-Sequenz beeinflusst, da diese Sequenz auch die Transkription von TSS-1 reguliert und somit nur an der phosphatabhängigen Promotoraktivität beteiligt ist. Besonders effektive Punktmutationen in der zweiten P-Box enthielten ein Guanin an erster Stelle sowie mehrere Guanine und Cytosine (siehe Abb. 31). Diese Mutationen führten zu einem totalen Ausfall der Promotoraktivität. Punktmutationen, die noch Adenin und Thymin enthielten, konnten die Aktivität reduzieren, jedoch nicht ausschalten.

Ein Vergleich der Sequenzen der P-Boxen führt zu der Konsensussequenz ATATWWW²⁰. Auch der *ugp*-Promotor enthält bei -46 bis -52 eine zum Konsensus passende P-Box, die jedoch experimentell nicht untersucht wurde (siehe Abb. 14).

Die TATA-2-Box könnte eine P-Box sein, da sie unter $-P_1$ -Bedingungen die Menge der mRNA und die Intensität der Genexpression beeinflusst. Dies wurde zum einen durch eine Northernblot-Analyse bestätigt, in der die Mutation der TATA-2-Box zu einer niedrigeren mRNA-Menge führte. Zum anderen wurde die im ONPG-Enzymtest gemessene BgaH-Aktivität je nach Punktmutation unterschiedlich stark verringert (siehe Abb. 34). Die mRNA-Menge und BgaH-Aktivität erscheinen dabei entgegengesetzt beeinflusst zu werden. Beispielsweise war bei der Transformante KF1A2mut3 die mRNA-Menge hoch, jedoch die BgaH-Aktivität stark verringert (siehe Abb. 34). Dies könnte darauf hindeuten, dass die synthetisierten Transkripte der TATA-2-Box-Mutante nicht mehr translatiert werden können. AT-reiche Regionen stellen Bindungssequenzen für diverse Regulatoren, TBP oder die RNA-Polymerase dar. Aus Bakterien ist ein AT-Basenpaar-reiches sogenanntes UP-Element stromaufwärts der -35 -Region bekannt, das durch Anbindung an die α -Untereinheit der RNA-Polymerase und / oder räumlicher Annäherung zur Promotorregion durch Krümmung der DNA zu einer Verstärkung der Promotoraktivität führt (Aiyar *et al.*, 1998, Estrem *et al.*, 1998, Ross *et al.*, 1998). Ein Beispiel aus Eukaryoten sind AT-reiche Regionen in Promotoren von Genen des PHO-Regulons in *S. cerevisiae*, die neben zwei UAS (*upstream activator sequence*) liegen und von einigen Transkriptionsfaktoren zusammen mit Pho2p gebunden werden (Barbaric *et al.*, 1996, Magbanua *et al.*, 1997a).

²⁰ W = A oder T

Es wäre möglich, dass die AT-reiche Region in *H. salinarum* analog zu der von *S. cerevisiae* an eine bisher unbekannte UAS angrenzt oder selbst eine UAS darstellt.

Die stromaufwärts der TATA-1-Box liegende P-Box des *pstI*-Operons grenzt an das BRE-Element. Zwischen der TATA-1-Box und der P-Box liegen 7 Nukleotide, die vermutlich das BRE-Element darstellen. Das BRE-Element ist eine Purin-reiche Sequenz. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Ende der P-Box ein Teil des BRE-Elements ist. Es wurde in dieser Arbeit jedoch vermutet, dass das purinreiche BRE-Element stromabwärts der P-Box liegt.

Eine genauere Promotoranalyse würde zeigen in welchem Bereich das BRE-Element liegt, falls die Grenzen nicht fließend sind.

Einige Promotoren benutzen auch zwei TATA-Boxen für einen Transkriptionsstart, wie aus der Hefe (Iyer & Struhl, 1995, Li & Sherman, 1991) und dem Menschen (Santra *et al.*, 1994) bekannt ist. Die AT-reiche P-Box in *H. salinarum* könnte auch eine solche zweite TATA-Box darstellen.

4.3.3 Das Regulationsmodell für den *pstI*-Promotor

Auf Grundlage sämtlicher Ergebnisse aus der *pstI*-Promotoranalyse wurde ein Modell der Transkriptions-Regulation des *pstI*-Operons erstellt, das in Abb. 50 vorgestellt wird.

Unter +P_i-Bedingungen wird die Initiation der Transkription zu 80 % am TSS-2 eingeleitet. Das TBP bindet beide TATA-Boxen, jedoch bevorzugt die TATA-2-Box. Es entstehen 80 % Transkripte mit einer *leader*-Sequenz und 20 % *leader*-lose Transkripte (Abb. 50). Das Verhältnis der Transkripte wurde durch das Mengen-Verhältnis der Klone bestimmt, die die Fragmente mit den alternativen Transkriptionsstarts trugen (siehe dazu 5'-RACE in Kapitel 2.3.5.2.3). 80 % der Klone enthielten ein Fragment mit 60 nt langem 5'-UTR, 20 % der Klone enthielten ein Fragment ohne 5'-UTR.

Mutationen in der TATA-2-Box führen dazu, dass die Transkription unter +P_i-Bedingungen am TSS-1 eingeleitet wird. Es wurde jedoch beobachtet, dass bei mehreren Transkripten das 5'-Ende innerhalb der Gensequenz stromabwärts des TSS-1 lag. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Transkription in den TATA-2-Box-Mutanten nicht mehr an der korrekten Transkriptionsstartstelle (TSS-1) eingeleitet wird, sondern an einer anderen Stelle. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtung nur aufgrund von RNA-Degradationen entstanden ist. Wie aus der Northernblot-Analyse hervorging, änderte sich die Menge der mRNA, die durch diese Mutation von TSS-1 ausgehend transkribierte

wurde, nicht wesentlich verglichen mit der BgaH-Aktivität, die je nach Stärke der Punktmutation in der TATA-2-Box sehr stark verringert war (Abb. 34). Daraus könnte geschlossen werden, dass eine Mutation in der TATA-2-Box dazu führt, dass einige Transkripte, die synthetisiert wurden nicht mehr translatiert werden können.

Der *pst1*-Promotorbereich mit einer Länge von 101 bp zeigt eine doppelt so hohe Promotoraktivität wie bei der Gesamtlänge von 155 bp (siehe Abb. 22). Die Region zwischen 101 bp und 74 bp stromaufwärts von TSS-1, in dem die TATA-2-Box liegt, ist der essentielle Bereich für die basale Transkription ausgehend von TSS-2.

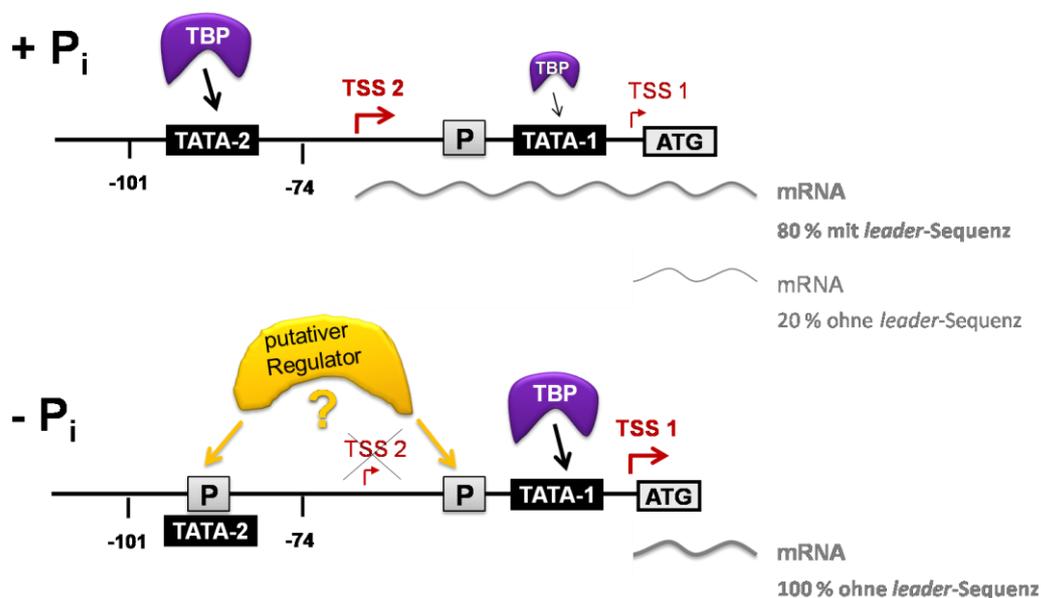


Abb. 50: Regulationsmodell der Transkription des *pst1*-Operons.

Unter phosphatgesättigten Bedingungen wird etwa viermal häufiger ein Transkript mit *leader*-Sequenz synthetisiert als ohne *leader*-Sequenz. Der Transkriptionsstart TSS-2 wird also häufiger als Startpunkt genutzt als TSS-1. Das TATA-Bindeprotein (TBP) bindet die TATA-2-Box besser bzw. häufiger. Dies könnte in einem besseren TATA-Box-Motiv begründet sein oder andere bisher unbekannte Gründe haben. Bei Phosphatmangel bindet TBP nur die TATA-1-Box, da die Transkription nur am TSS-1 beginnt. Es werden nur Transkripte ohne *leader*-Sequenz synthetisiert. Die TATA-2-Box wird unter $-P_i$ nicht als TATA-Box verwendet. Möglich wäre, dass die TATA-2-Box als zweite P-Box fungiert an die ein bisher unbekanntes Regulatorprotein bindet. An eine zweite P-Box stromaufwärts der TATA-1-Box könnte der Regulator ebenfalls binden.

Unter $-P_i$ -Bedingungen wird nur der Transkriptionsstart TSS-1 verwendet. Das TBP bindet nur die TATA-1-Box (siehe Abb. 50) und es werden zu 100% *leader*-lose Transkripte synthetisiert. Mutationen in der TATA-1-Box stören die von TSS-1 ausgehende Transkription, was zu einer minimalen Menge an mRNA und Translationsprodukt führt.

Mutationen in der TATA-2-Box beeinflussen auch unter phosphatlimitierten Bedingungen die Transkription vom Transkriptionsstart TSS-1. Die mRNA-Mengen gleichen denen im Wildtyp, jedoch wird die Translationseffizienz (BgaH-Aktivität) je nach Punktmutation unterschiedlich stark beeinflusst (Abb. 34).

Der Bereich zwischen -101 und -74 ist für eine phosphatabhängige Transkription von TSS-1 essentiell. Der durch eine Deletion auf 74 bp reduzierte Promotor hat unter $-P_i$ -Bedingungen keine Promotoraktivität mehr (siehe Abb. 22). In diesem Bereich liegt die TATA-2-Box, die unter $-P_i$ -Bedingungen wahrscheinlich als P-Box fungiert. Ein bisher unbekanntes regulatorisches Protein, das die phosphatabhängige Transkription reguliert, könnte unter $-P_i$ -Bedingungen an die P-Box (TATA-2-Box) binden und beispielsweise die Anbindung von TBP verhindern (Abb. 50). Das regulatorische Protein könnte zusätzlich auch die zweite P-Box stromaufwärts der TATA-1-Box binden. Das TBP bindet nur die TATA-1-Box und die Transkription der *leader*-losen mRNA beginnt nur von TSS-1. Die beiden Elemente (TATA-1-Box und P-Box) alleine sind nicht ausreichend, um eine phosphatabhängige Promotoraktivität zu gewährleisten. Es wird noch die zweite TATA-2-Box, die als zweite P-Box fungiert benötigt.

4.4 Regulation des PHO-Stimulons

Suche nach einem Regulator des PHO-Stimulons

Das PHO-Stimulon wird als die Summe aller Gene definiert, die auf Phosphat mit verstärkter oder verringerter Transkription reagieren und wird in *H. salinarum* nicht von einem klassischen Zweikomponentensystem reguliert (Wende *et al.*, 2009). Das regulative Protein, das die Induktion des PHO-Stimulons kontrolliert, konnte bisher nicht identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die Überexpression des PhoU-Homologs PhoU₃ als auch des Lrp-Homologs Trh3 im Vergleich zum Wildtyp keinen Einfluss auf die Transkription der Gene des PHO-Stimulons nimmt. Eine regulatorische Wirkung der beiden Proteine kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, da die Proteine bereits im Wildtyp gesättigt vorliegen könnten. Darüber hinaus war die Deletion des *phoU*₃-Gens letal, was auf eine wichtige Funktion schließen lässt.

Die Expression der Alkalischen Phosphatase Aph veränderte sich durch eine jeweilige Deletion der Pst-Transporter Pst1 und Pst2 oder des PhoU-Homologs PhoU₄ im Vergleich zum Wildtyp nicht. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Deletion des Pst1-

Transporters unter $-P_i$ -Bedingungen eine leichte Induktion des Pst2-Transporters bewirkt. Dies ist eine für die Zelle essentielle Reaktion, da der weniger affine Pst2-Transporter unter $-P_i$ -Bedingungen eine untergeordnete Rolle spielt, bei Abwesenheit des hoch-affinen Pst1-Transporters jedoch für die Versorgung der Zelle mit P_i wichtig wird. Der Mechanismus, der die Induktion des Pst2-Transporters bewirkt, ist unbekannt. Es besteht die Möglichkeit, dass ein oder mehrere Gene des *pst1*-Operons eine repressive Wirkung auf die Transkription des *pst2*-Operons besitzen.

Gene des *pst1*-Operons könnten auch verantwortlich sein für eine Autoregulation des *pst1*-Operons. Es wird momentan daran gearbeitet die Gene *phoU1*, *OE4475R* oder *OE4471R* des *pst1*-Operons zu deletieren bzw. zu überexprimieren. Eine Deletion bzw. Überexpression des *phoU1*, *OE4475R* oder *OE4471R* wird zeigen, ob diese Gene die Transkription des *pst1*-Operons beeinflussen.

Das Gen *OE4475R* kodiert ein konserviertes hypothetisches Protein mit einem putativen Zink-Finger Motiv, das dem aus dem *brz*-Gen (*OE3104F*) ähnelt (Tarasov *et al.*, 2008). Das Protein ist aus 66 Aminosäuren aufgebaut, Brz aus 60 Aminosäuren. Der Abstand zwischen den beiden Cystein-Motiven beträgt sowohl bei Brz als auch bei *OE4475R* 35 Aminosäuren. Das Brz-Motiv lautet CPRCG – 35 – CRNDHE, das *OE4475R*-Motiv hingegen CDACG - 35 – CFECI. Das Gen *OE4471R* kodiert laut einer *in silico* Untersuchung ein Protein mit einer putativen Helikasedomäne, was auf einen Transkriptionsfaktor mit Helikaseaktivität hindeuten könnte. Ein Zusammenwirken beider Proteine an der Regulation des eigenen *pst1*-Operons wäre denkbar. Zudem könnte auch das PhoU1 bei derselben Regulation eine Rolle spielen, da es wie das PhoU3 eine hohe Konservierung sowohl des AbrB/SpoVT- Bereichs aus *B. subtilis* als auch des PhoU-Bereichs aus *E. coli* hat.

Wie aus Transkriptomanalysen hervorgeht, könnte Lrp ein möglicher Regulator (Aktivator) des *pst2*-Operons sein (Schwaiger, 2009). Die Transkription von Genen des *pst2*-Operons wurde in einer Lrp-Deletions-Mutante reprimiert, in einer Lrp-Überexpressionsmutante induziert. Lrp scheint somit die Transkription des *pst2*-Operons zu aktivieren. Weitere Gene des PHO-Stimulons wurden jedoch durch Lrp nicht reguliert.

Die Expression beider Pst-Transporter, die Teil des PHO-Stimulons sind, wird durch einen Phosphatmangel induziert. Daraus wird geschlossen, dass das *pst1*- und *pst2*-Operon von demselben Regulator kontrolliert werden.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass auf beide Operons weitere Regulationsmechanismen wirken. Zum einen wird die Regulation des Pst2-Transporters durch die Deletion von Genen des *pst1*-Operons beeinflusst. Zum anderen spielt der globale Regulator Lrp eine aktivierende Rolle für

die Transkription des *pst2*-Operons, jedoch nicht für die des *pst1*-Operons (Schwaiger, 2009). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Pst1-Transporter dagegen nicht nur auf transkriptioneller, sondern auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert wird. Durch die alternativen Promotoren des *pst1*-Operons werden in Abhängigkeit von Phosphat zwei unterschiedliche Transkripte synthetisiert, die eine unterschiedliche Translationseffizienz haben. Zudem wird vermutet, dass das *pst1*-Operon autoregulativ sein könnte. Dies wurde bisher jedoch noch nicht gezeigt.

Über den Regulationsmechanismus des Ugp-Transporters ist wenig bekannt. Sämtliche bisher experimentell identifizierten archaealen Zucker-spezifischen ABC-Transporter, wie beispielsweise das Trehalose/Maltose-System von *Thermococcus litoralis* und *Pyrococcus furiosus* sowie der Glucosetransporter von *Sulfolobus solfataricus*, weisen eine C-terminale Verlängerung auf, die auch typisch für den Maltosetransporter MalK aus *E. coli* ist (Lee *et al.*, 2007). Eine Ausnahme bildet hier der Ugp-Transporter aus *H. salinarum*, der zwar nicht zu den Zucker-spezifischen Transportern gezählt wird, jedoch ebenso diesen C-terminalen Fortsatz trägt. Diese Verlängerung am C-Terminus stellt eine regulatorische Domäne dar, welche dem Ugp-Transporter die Verbindung zu seiner Genregulation oder der Kontrolle über die Transportaktivität durch Stoffwechselprozesse ermöglichen könnte (Lee *et al.*, 2007).

4.5 Fazit und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der phosphatabhängig regulierten Operons *pst1*, *pst2* und *ugp* durch die Definition ihrer Transkriptionseinheiten und die nähere Untersuchung der zugehörigen Promotorbereiche. Es sollte ein Einblick in die Regulationsmechanismen und die Funktion der beiden Phosphattransporter Pst1 und Pst2 gegeben werden.

Mit Hilfe verschiedener Knockout-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportsysteme Pst1 und Pst2 spezifische Phosphattransporter mit unterschiedlicher Affinität darstellen. Zudem wurde die auf Homologie zu anderen Organismen basierende Annahme bestätigt, dass der ABC-Transporter Ugp der einzige Glycerin-3-phosphat-spezifische Transporter in *H. salinarum* ist.

Eine eingehendere kinetische Charakterisierung der ABC-Transporter Pst1 und Pst2 könnte mit Phosphataufnahme-Versuchen weiterer Mutanten ermöglicht werden. Einerseits könnten zwei *knockout*-Mutanten hergestellt werden, in denen beide Pst-Transporter enthalten sind, jedoch jeweils nur eines der beiden Bindeproteine. Auf diese Weise wäre auch die Induktion des *pst2*-Operons durch die Deletion des *pst1*-Operons umgangen. Es könnte untersucht werden, ob sich die Transportgeschwindigkeit in dieser Mutante bei einer dem Wildtyp äquivalenten Menge an Pst2-Transportern ändert. Ein interessanter Ansatz wäre es Mutanten herzustellen, welche jeweils einen Transporter und nur das Bindeprotein des anderen Transporters enthalten. Wäre diese Mutante nicht letal, würde sie die Interaktion der Bindeproteine mit dem anderen Transporter bestätigen. Die ermittelten kinetischen Parameter des Phosphattransports in diesen Mutanten könnten mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen der Deletions-Mutanten verglichen werden (Kapitel 3.4.2.2) und die noch offenen Fragen damit beantwortet werden.

Interessant wären ferner weitere Untersuchungen der Phosphatbindeproteine. Die beiden Phosphatbindeproteine lassen sich möglicherweise heterolog in *E. coli* exprimieren und ihre Bindungsaffinität K_D durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) mit P_i als Substrat bestimmen. Eine Strukturaufklärung durch Co-Kristallisation mit P_i könnte darüber hinaus die Gründe für die unterschiedliche Substrataffinität liefern.

Ein weiteres Ziel wäre, die kinetischen Parameter der Glycerin-3-phosphataufnahme des Ugp-Transporters zu bestimmen.

In dieser Arbeit konnte die phosphatabhängige *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Expression bestätigt werden. Darüber hinaus wurden die Transkriptionseinheiten und Transkriptionsstarts der

Operons bestimmt und die jeweils zugehörige TATA-Box identifiziert. Im *pst1*- und *pst2*-Promotor wurde ein neues AT-reiches regulatives Element, die P-Box, gefunden. Für den *pst1*-Promotor wurde ein Regulationsmodell der Transkription entworfen.

Offen ist noch die exakte Definition der *cis*-aktiven Elemente wie der TATA-Box, des BRE-Elements und der P-Box in den Promotoren *Ppst1*, *Ppst2* und *Pugp*. Dies könnte durch die Durchführung eines umfangreicheren Promotor-Screenings mit Hilfe des *bgaH*-Reportersystems erreicht werden. Die Rolle der P-Box in der Transkriptionsregulation müsste noch weiter untersucht werden.

Im Rahmen der Untersuchungen wurde gezeigt, dass die mRNA des *pst1*-Operons in Abhängigkeit von Phosphat mit bzw. ohne *leader*-Sequenz synthetisiert wird. Das *leader*-lose *Ppst1-bgaH*-Transkript unter Phosphatmangelbedingungen wird effizienter translatiert als das Transkript mit *leader*-Sequenz unter phosphatgesättigten Bedingungen. Es wäre interessant die *pst1*-Transkriptmengen durch eine Northernblot-Analyse unter beiden Phosphatbedingungen zu untersuchen und diese in Relation zur Proteinmenge der exprimierten Gene des *pst1*-Operons in einer Westernblotanalyse zu setzen. Diese weiterführenden Experimente könnten bestätigen, dass die Translation des Transkripts ohne 5'-UTR analog zum *Ppst1-bgaH*-Fusionskonstrukt auch beim nativen *pst1*-Transkript effizienter ist.

Es bedarf weiterer Forschung, die Funktion der mRNA-*leader*-Sequenz weiter zu untersuchen, um einen tieferen Einblick in die Initiation der Translation zu erlangen.

Von großer Bedeutung wäre es, den bzw. die Regulatoren des PHO-Stimulons zu identifizieren, wie auch den regulatorischen Mechanismus eines möglichen PHO-Regulons in *H. salinarum* aufzudecken. Zudem könnte weiterhin nach den Regulatoren der Pst-Transporter gesucht werden, die für deren differentielle Expression verantwortlich sind. Die Untersuchung weiterer Deletions-Mutanten und Überexpressionsmutanten der Gene *OE4475R*, *OE4471R* und *phoU₁* sollte klären, welche Gene für die Induktion des *pst2*-Operons in der Δ *pst1*-Mutante verantwortlich sind. Schließlich könnte noch die Autoregulation des *pst1*-Operons überprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde abschließend gezeigt, dass der Pst1-Transporter für die Phosphat-Taxis wichtig ist. Es wäre weitergehende Arbeit nötig, um das Gesamtbild zu erweitern und alle an der Phosphat-Taxis beteiligten Proteine zu finden. Interessant wäre hierbei das bisher nicht identifizierte Htr-ähnliche System, über das die Signalvermittlung für die Phosphat-Taxis vermutlich verläuft, zu finden.

5 Literaturverzeichnis

- Agüena, M. & B. Spira, (2009) Transcriptional processing of the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **58**: 264-267.
- Agüena, M., E. Yagil & B. Spira, (2002) Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics* **268**: 518-524.
- Aiyar, S. E., R. L. Gourse & W. Ross, (1998) Upstream A-tracts increase bacterial promoter activity through interactions with the RNA polymerase alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14652-14657.
- Alam, M. & D. Oesterhelt, (1984) Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *J Mol Biol* **176**: 459-475.
- Albers, S. V., S. M. Koning, W. N. Konings & A. J. Driessen, (2004) Insights into ABC transport in archaea. *J Bioenerg Biomembr* **36**: 5-15.
- Allenby, N. E., N. O'Connor, Z. Pragai, N. M. Carter, M. Miethke, S. Engelmann, M. Hecker, A. Wipat, A. C. Ward & C. R. Harwood, (2004) Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *pst* operon encoding a phosphate-specific ABC transporter. *Microbiology* **150**: 2619-2628.
- Ames, G. F. & J. E. Lever, (1972) The histidine-binding protein J is a component of histidine transport. Identification of its structural gene, *hisJ*. *J Biol Chem* **247**: 4309-4316.
- Anba, J., M. Bidaud, M. L. Vasil & A. Lazdunski, (1990) Nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *phoB* gene, the regulatory gene for the phosphate regulon. *J Bacteriol* **172**: 4685-4689.
- Andreev, D. E., I. M. Terenin, Y. E. Dunaevsky, S. E. Dmitriev & I. N. Shatsky, (2006) A leaderless mRNA can bind to mammalian 80S ribosomes and direct polypeptide synthesis in the absence of translation initiation factors. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 3164-3169.
- Antelmann, H., C. Scharf & M. Hecker, (2000) Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J Bacteriol* **182**: 4478-4490.
- Aoyama, T., M. Takanami, K. Makino & A. Oka, (1991) Cross-talk between the virulence and phosphate regulons of *Agrobacterium tumefaciens* caused by an unusual interaction of the transcriptional activator with a regulatory DNA element. *Mol Gen Genet* **227**: 385-390.
- Argast, M. & W. Boos, (1980) Co-regulation in *Escherichia coli* of a novel transport system for sn-glycerol-3-phosphate and outer membrane protein Ic (e, E) with alkaline phosphatase and phosphate-binding protein. *J Bacteriol* **143**: 142-150.
- Argast, M., D. Ludtke, T. J. Silhavy & W. Boos, (1978) A second transport system for sn-glycerol-3-phosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **136**: 1070-1083.
- Ayoubi, T. A. & W. J. Van De Ven, (1996) Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J* **10**: 453-460.
- Baginski, E. S., P. P. Foa & B. Zak, (1967) Determination of rat liver microsomal glucose-6-phosphatase activity: study of citrate and G-6-P inhibition. *Anal Biochem* **21**: 201-207.
- Bagyan, I., J. Hobot & S. Cutting, (1996) A compartmentalized regulator of developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**: 4500-4507.
- Baliga, N. S. & S. DasSarma, (2000) Saturation mutagenesis of the haloarchaeal *bop* gene promoter: identification of DNA supercoiling sensitivity sites and absence of TFB recognition element and UAS enhancer activity. *Mol Microbiol* **36**: 1175-1183.
- Baliga, N. S., Y. A. Goo, W. V. Ng, L. Hood, C. J. Daniels & S. DasSarma, (2000) Is gene expression in *Halobacterium* NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors? *Mol Microbiol* **36**: 1184-1185.

- Baliga, N. S., S. P. Kennedy, W. V. Ng, L. Hood & S. DasSarma, (2001) Genomic and genetic dissection of an archaeal regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 2521-2525.
- Banerjee, A. K., (1980) 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev* **44**: 175-205.
- Barbaric, S., M. Munsterkotter, C. Goding & W. Horz, (1998) Cooperative Pho2-Pho4 interactions at the PHO5 promoter are critical for binding of Pho4 to UASp1 and for efficient transactivation by Pho4 at UASp2. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 2629-2639.
- Barbaric, S., M. Munsterkotter, J. Svaren & W. Horz, (1996) The homeodomain protein Pho2 and the basic-helix-loop-helix protein Pho4 bind DNA cooperatively at the yeast PHO5 promoter. *Nucleic Acids Res* **24**: 4479-4486.
- Bardin, S. D. & T. M. Finan, (1998) Regulation of phosphate assimilation in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. *Genetics* **148**: 1689-1700.
- Barns, S. M., C. F. Delwiche, J. D. Palmer & N. R. Pace, (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 9188-9193.
- Bartlett, M. S., (2005) Determinants of transcription initiation by archaeal RNA polymerase. *Curr Opin Microbiol* **8**: 677-684.
- Bell, S. D., A. B. Brinkman, J. van der Oost & S. P. Jackson, (2001) The archaeal TFIIEalpha homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. *EMBO Rep* **2**: 133-138.
- Bell, S. D., S. S. Cairns, R. L. Robson & S. P. Jackson, (1999) Transcriptional regulation of an archaeal operon in vivo and in vitro. *Mol Cell* **4**: 971-982.
- Bell, S. D. & S. P. Jackson, (1998) Transcription and translation in Archaea: A mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends in Microbiology* **6**: 222-228.
- Bell, S. D. & S. P. Jackson, (2000) Mechanism of autoregulation by an archaeal transcriptional repressor. *J Biol Chem* **275**: 31624-31629.
- Bell, S. D., C. Jaxel, M. Nadal, P. F. Kosa & S. P. Jackson, (1998) Temperature, template topology, and factor requirements of archaeal transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15218-15222.
- Bennett, R. L. & M. H. Malamy, (1970) Arsenate resistant mutants of *Escherichia coli* and phosphate transport. *Biochem Biophys Res Commun* **40**: 496-503.
- Birkey, S. M., W. Liu, X. Zhang, M. F. Duggan & F. M. Hulett, (1998) Pho signal transduction network reveals direct transcriptional regulation of one two-component system by another two-component regulator: *Bacillus subtilis* PhoP directly regulates production of ResD. *Mol Microbiol* **30**: 943-953.
- Bisswanger, H., (2000) *Enzymkinetik, Theorie und Methoden*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Bonneau, R., M. T. Facciotti, D. J. Reiss, A. K. Schmid, M. Pan, A. Kaur, V. Thorsson, P. Shannon, M. H. Johnson, J. C. Bare, W. Longabaugh, M. Vuthoori, K. Whitehead, A. Madar, L. Suzuki, T. Mori, D. E. Chang, J. Diruggiero, C. H. Johnson, L. Hood & N. S. Baliga, (2007) A predictive model for transcriptional control of physiology in a free living cell. *Cell* **131**: 1354-1365.
- Bonneau, R., D. J. Reiss, P. Shannon, M. Facciotti, L. Hood, N. S. Baliga & V. Thorsson, (2006) The Inferelator: an algorithm for learning parsimonious regulatory networks from systems-biology data sets de novo. *Genome Biology* **7**: -.
- Boussau, B., S. Blanquart, A. Necsulea, N. Lartillot & M. Gouy, (2008) Parallel adaptations to high temperatures in the Archaeal eon. *Nature* **456**: 942-945.
- Boyd, J., M. N. Oza & J. R. Murphy, (1990) Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria toxin iron-dependent regulatory element (dtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5968-5972.
- Braibant, M., P. Lefevre, L. de Wit, P. Peirs, J. Ooms, K. Huygen, A. B. Andersen & J. Content, (1996) A *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding proteins of a phosphate transporter homologous to the *Escherichia coli* Pst system. *Gene* **176**: 171-176.

- Brenneis, M., O. Hering, C. Lange & J. Soppa, (2007) Experimental characterization of Cis-acting elements important for translation and transcription in halophilic archaea. *PLoS Genet* **3**: e229.
- Brenneis, M. & J. Soppa, (2009) Regulation of translation in haloarchaea: 5'- and 3'-UTRs are essential and have to functionally interact in vivo. *PLoS ONE* **4**: e4484.
- Brinkman, A. B., S. D. Bell, R. J. Lebbink, W. M. de Vos & J. van der Oost, (2002) The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability. *J Biol Chem* **277**: 29537-29549.
- Brinkman, A. B., I. Dahlke, J. E. Tuininga, T. Lammers, V. Dumay, E. de Heus, J. H. Lebbink, M. Thomm, W. M. de Vos & J. van Der Oost, (2000) An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *J Biol Chem* **275**: 38160-38169.
- Brinkman, A. B., T. J. Ettema, W. M. de Vos & J. van der Oost, (2003) The Lrp family of transcriptional regulators. *Molecular Microbiology* **48**: 287-294.
- Brochier, C., S. Gribaldo, Y. Zivanovic, F. Confalonieri & P. Forterre, (2005) Nanoarchaea: representatives of a novel archaeal phylum or a fast-evolving euryarchaeal lineage related to Thermococcales? *Genome Biology* **6**: -.
- Brzoska, P. & W. Boos, (1988) Characteristics of a *ugp*-encoded and *phoB*-dependent glycerophosphoryl diester phosphodiesterase which is physically dependent on the *ugp* transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 4125-4135.
- Brzoska, P., M. Rimmele, K. Brzostek & W. Boos, (1994) The *Pho* Regulon-Dependent *Ugp* Uptake System for Glycerol-3-Phosphate in *Escherichia-Coli* Is Trans Inhibited by P-I. *Journal of Bacteriology* **176**: 15-20.
- Bucher, M., (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* **173**: 11-26.
- Burbulys, D., K. A. Trach & J. A. Hoch, (1991) Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.
- Chan, F. Y. & A. Torriani, (1996) *PstB* protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. *J Bacteriol* **178**: 3974-3977.
- Chen, Y. F., Y. Wang & W. H. Wu, (2008) Membrane transporters for nitrogen, phosphate and potassium uptake in plants. *J Integr Plant Biol* **50**: 835-848.
- Cline, S. W., W. L. Lam, R. L. Charlebois, L. C. Schalkwyk & W. F. Doolittle, (1989) Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Can J Microbiol* **35**: 148-152.
- Cohen, G. N., V. Barbe, D. Flament, M. Galperin, R. Heilig, O. Lecompte, O. Poch, D. Prieur, J. Querellou, R. Ripp, J. C. Thierry, J. Van der Oost, J. Weissenbach, Y. Zivanovic & P. Forterre, (2003) An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol Microbiol* **47**: 1495-1512.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang & L. Hsu, (1972) Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria - Genetic Transformation of *Escherichia-Coli* by R-Factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 2110-&.
- Condo, I., A. Ciammaruconi, D. Benelli, D. Ruggero & P. Londei, (1999) Cis-acting signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* **34**: 377-384.
- Conlin, C. A., S. L. Tan, H. J. Hu & T. Segar, (2001) The *apeE* gene of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is induced by phosphate limitation and regulated by *phoBR*. *Journal of Bacteriology* **183**: 1784-1786.
- Cox, G. B., H. Rosenberg, J. A. Downie & S. Silver, (1981) Genetic analysis of mutants affected in the *Pst* inorganic phosphate transport system. *J Bacteriol* **148**: 1-9.
- Cox, G. B., D. Webb, J. Godovac-Zimmermann & H. Rosenberg, (1988) Arg-220 of the *PstA* protein is required for phosphate transport through the phosphate-specific transport system in *Escherichia coli* but not for alkaline phosphatase repression. *J Bacteriol* **170**: 2283-2286.

- Dahlke, I. & M. Thomm, (2002) A Pyrococcus homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. *Nucleic Acids Res* **30**: 701-710.
- Dassarma, S., U. L. Rajbhandary & H. G. Khorana, (1984) Bacterio-opsin mRNA in wild-type and bacterio-opsin-deficient Halobacterium halobium strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 125-129.
- Davidson, A. L. & J. Chen, (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**: 241-268.
- Davidson, A. L., E. Dassa, C. Orelle & J. Chen, (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 317-364, table of contents.
- Davuluri, R. V., Y. Suzuki, S. Sugano, C. Plass & T. H. Huang, (2008) The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends Genet* **24**: 167-177.
- DeLong, E. F., (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5685-5689.
- DeLong, E. F. & N. R. Pace, (2001) Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst Biol* **50**: 470-478.
- Dennis, P. P. & L. C. Shimmin, (1997) Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 90-&.
- Di Giulio, M., (2007) The tree of life might be rooted in the branch leading to Nanoarchaeota. *Gene* **401**: 108-113.
- Doeven, M. K., R. Abele, R. Tampe & B. Poolman, (2004) The binding specificity of OppA determines the selectivity of the oligopeptide ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* **279**: 32301-32307.
- Dundas, I. E., (1977) Physiology of halobacteriaceae. *Adv Microb Physiol* **15**: 85-120.
- Dym, O., M. Mevarech & J. L. Sussman, (1995) Structural Features That Stabilize Halophilic Malate Dehydrogenase from an Archaeobacterium. *Science* **267**: 1344-1346.
- Eder, S., W. Liu & F. M. Hulett, (1999) Mutational analysis of the phoD promoter in Bacillus subtilis: implications for PhoP binding and promoter activation of Pho regulon promoters. *J Bacteriol* **181**: 2017-2025.
- Epstein, E. & C. E. Hagen, (1952) A Kinetic Study of the Absorption of Alkali Cations by Barley Roots. *Plant Physiol* **27**: 457-474.
- Epstein, E., D. W. Rains & O. E. Elzam, (1963) Resolution of Dual Mechanisms of Potassium Absorption by Barley Roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **49**: 684-692.
- Esteban, A., M. Diaz, A. Yepes & R. I. Santamaria, (2008) Expression of the pstS gene of Streptomyces lividans is regulated by the carbon source and is partially independent of the PhoP regulator. *BMC Microbiol* **8**: 201.
- Estrem, S. T., T. Gaal, W. Ross & R. L. Gourse, (1998) Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9761-9766.
- Facciotti, M. T., D. J. Reiss, M. Pan, A. Kaur, M. Vuthoori, R. Bonneau, P. Shannon, A. Srivastava, S. M. Donohoe, L. E. Hood & N. S. Baliga, (2007) General transcription factor specified global gene regulation in archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 4630-4635.
- Falb, M., F. Pfeiffer, P. Palm, K. Rodewald, V. Hickmann, J. Tittor & D. Oesterhelt, (2005) Living with two extremes: conclusions from the genome sequence of Natronomonas pharaonis. *Genome Res* **15**: 1336-1343.
- Fiedler, T., M. Mix, U. Meyer, S. Mikkat, M. O. Glocker, H. Bahl & R. J. Fischer, (2008) The two-component system PhoPR of Clostridium acetobutylicum is involved in phosphate-dependent gene regulation. *J Bacteriol* **190**: 6559-6567.
- Finn, R. D., J. Mistry, B. Schuster-Bockler, S. Griffiths-Jones, V. Hollich, T. Lassmann, S. Moxon, M. Marshall, A. Khanna, R. Durbin, S. R. Eddy, E. L. Sonnhammer & A. Bateman, (2006) Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* **34**: D247-251.

- Finn, R. D., J. Tate, J. Mistry, P. C. Coghill, S. J. Sammut, H. R. Hotz, G. Ceric, K. Forslund, S. R. Eddy, E. L. Sonnhammer & A. Bateman, (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **36**: D281-288.
- Fischer, R. J., S. Oehmcke, U. Meyer, M. Mix, K. Schwarz, T. Fiedler & H. Bahl, (2006) Transcription of the pst operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on phosphate concentration and pH. *J Bacteriol* **188**: 5469-5478.
- Foster, J. W. & M. P. Spector, (1986) Phosphate Starvation Regulon of *Salmonella-Typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **166**: 666-669.
- Fuhrman, J. A., K. McCallum & A. A. Davis, (1992) Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**: 148-149.
- Furbass, R., M. Gocht, P. Zuber & M. A. Marahiel, (1991) Interaction of AbrB, a transcriptional regulator from *Bacillus subtilis* with the promoters of the transition state-activated genes *tycA* and *spoVG*. *Mol Gen Genet* **225**: 347-354.
- Furukawa, K., K. Hasunuma & Y. Shinohara, (1987) Characterization of Pi-Repressible Enzymes Secreted in Culture Media by *Neurospora-Crassa* Wild-Type Cells and Null-Type Mutants. *Journal of Bacteriology* **169**: 4790-4795.
- Garrity, G. M., Bell, J.A. & Lilburn, T.G. , (2004) Taxonomic Outline of the Prokaryotes. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag (ed). New York, pp. 1-399.
- Gebhard, S., S. L. Tran & G. M. Cook, (2006) The Phn system of *Mycobacterium smegmatis*: a second high-affinity ABC-transporter for phosphate. *Microbiology* **152**: 3453-3465.
- Geiduschek, E. P. & M. Ouhammouch, (2005) Archaeal transcription and its regulators. *Mol Microbiol* **56**: 1397-1407.
- Geissdorfer, W., A. Ratajczak & W. Hillen, (1998) Transcription of *ppk* from *Acinetobacter* sp. strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation. *Appl Environ Microbiol* **64**: 896-901.
- Goldstein, A. H., D. A. Baertlein & R. G. McDaniel, (1988a) Phosphate Starvation Inducible Metabolism in *Lycopersicon esculentum*: I. Excretion of Acid Phosphatase by Tomato Plants and Suspension-Cultured Cells. *Plant Physiol* **87**: 711-715.
- Goldstein, A. H., A. Danon, D. A. Baertlein & R. G. McDaniel, (1988b) Phosphate Starvation Inducible Metabolism in *Lycopersicon esculentum*: II. Characterization of the Phosphate Starvation Inducible-Excreted Acid Phosphatase. *Plant Physiol* **87**: 716-720.
- Goldstein, A. H., S. P. Mayfield, A. Danon & B. K. Tibbot, (1989) Phosphate Starvation Inducible Metabolism in *Lycopersicon esculentum*: III. Changes in Protein Secretion under Nutrient Stress. *Plant Physiol* **91**: 175-182.
- Gottesman, M. M. & S. V. Ambudkar, (2001) Overview: ABC transporters and human disease. *J Bioenerg Biomembr* **33**: 453-458.
- Grant, W. D. a. L., H., (1989) Extremely halophilic archaeobacteria In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. B. Staley, Pfennig, and Holt (ed). Baltimore: The Williams and Wilkins Co., pp. 2216-2219.
- Gregor, D. & F. Pfeifer, (2001) Use of a halobacterial *bgaH* reporter gene to analyse the regulation of gene expression in halophilic archaea. *Microbiology* **147**: 1745-1754.
- Grunberg, S., M. S. Bartlett, S. Naji & M. Thomm, (2007) Transcription factor E is a part of transcription elongation complexes. *J Biol Chem* **282**: 35482-35490.
- Gualerzi, C. O. & C. L. Pon, (1990) Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **29**: 5881-5889.
- Guggino, W. B. & B. A. Stanton, (2006) New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 426-436.
- Hain, J., W. D. Reiter, U. Hudepohl & W. Zillig, (1992) Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* **20**: 5423-5428.
- Hakenbeck, R. & J. B. Stock, (1996) Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Rna Polymerase and Associated Factors, Pt A* **273**: 281-300.

- Hanzelka, B. L., T. J. Darcy & J. N. Reeve, (2001) TFE, an archaeal transcription factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* related to eucaryal transcription factor TFIIEalpha. *J Bacteriol* **183**: 1813-1818.
- Harrison, M. J. & M. L. van Buuren, (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. [see comment]. *Nature* **378**: 626-629.
- Hartmann, R., H. D. Sickinger & D. Oesterhelt, (1980) Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 3821-3825.
- Hausner, W., U. Lange & M. Musfeldt, (2000) Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archaeal RNA polymerase. *J Biol Chem* **275**: 12393-12399.
- Hausner, W. & M. Thomm, (1993) Purification and characterization of a general transcription factor, aTFB, from the archaeon *Methanococcus thermolithotrophicus*. *J Biol Chem* **268**: 24047-24052.
- Hausner, W., J. Wettach, C. Hethke & M. Thomm, (1996) Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase. *J Biol Chem* **271**: 30144-30148.
- Hengge, R., T. J. Larson & W. Boos, (1983) sn-Glycerol-3-phosphate transport in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **155**: 186-195.
- Hering, O., M. Brenneis, J. Beer, B. Suess & J. Soppa, (2009) A novel mechanism for translation initiation operates in haloarchaea. *Mol Microbiol* **71**: 1451-1463.
- Herrmann, A., W. Schulz & K. Hahlbrock, (1988) Two alleles of the single-copy chalcone synthase gene in parsley differ by a transposon-like element. *Mol Gen Genet* **212**: 93-98.
- Hethke, C., A. C. Geerling, W. Hausner, W. M. de Vos & M. Thomm, (1996) A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* **24**: 2369-2376.
- Hickey, A. J., E. Conway de Macario & A. J. Macario, (2002) Transcription in the archaea: basal factors, regulation, and stress-gene expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**: 537-599.
- Hirani, T. A., I. Suzuki, N. Murata, H. Hayashi & J. J. Eaton-Rye, (2001) Characterization of a two-component signal transduction system involved in the induction of alkaline phosphatase under phosphate-limiting conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **45**: 133-144.
- Hochheimer, A., R. Hedderich & R. K. Thauer, (1999) The DNA binding protein Tfx from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: structure, DNA binding properties and transcriptional regulation. *Molecular Microbiology* **31**: 641-650.
- Hollenstein, K., D. C. Frei & K. P. Locher, (2007) Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* **446**: 213-216.
- Holmes, M. L. & M. L. Dyall-Smith, (1990) A plasmid vector with a selectable marker for halophilic archaeobacteria. *J Bacteriol* **172**: 756-761.
- Holmes, M. L. & M. L. Dyall-Smith, (2000) Sequence and expression of a halobacterial beta-galactosidase gene. *Mol Microbiol* **36**: 114-122.
- Holmes, M. L., R. K. Scopes, R. L. Moritz, R. J. Simpson, C. Englert, F. Pfeifer & M. L. Dyall-Smith, (1997) Purification and analysis of an extremely halophilic beta-galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochim Biophys Acta* **1337**: 276-286.
- Huber, H., M. J. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V. C. Wimmer & K. O. Stetter, (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.
- Hulett, F. M., (1995) Complex phosphate regulation by sequential switches in *Bacillus subtilis*. In: Two component signal transduction. J. A. H. a. T. J. Silhavy (ed). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 289-302.
- Hulett, F. M., (1996) The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 933-939.
- Hulett, F. M., J. Lee, L. Shi, G. Sun, R. Chesnut, E. Sharkova, M. F. Duggan & N. Kapp, (1994) Sequential action of two-component genetic switches regulates the PHO regulon in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 1348-1358.

- Iyer, V. & K. Struhl, (1995) Mechanism of differential utilization of the his3 TR and TC TATA elements. *Molecular & Cellular Biology* **15**: 7059-7066.
- Jensen, K. K., E. Sharkova, M. F. Duggan, Y. Qi, A. Koide, J. A. Hoch & F. M. Hulett, (1993) Bacillus subtilis transcription regulator, Spo0A, decreases alkaline phosphatase levels induced by phosphate starvation. *J Bacteriol* **175**: 3749-3756.
- Jiang, W. H., W. W. Metcalf, K. S. Lee & B. L. Wanner, (1995) Molecular-Cloning, Mapping, and Regulation of Pho Regulon Genes for Phosphonate Breakdown by the Phosphonatase Pathway of Salmonella-Typhimurium Lt2. *Journal of Bacteriology* **177**: 6411-6421.
- Jones, J. G., N. R. Hackett, J. T. Halladay, D. J. Scothorn, C. F. Yang, W. L. Ng & S. DasSarma, (1989) Analysis of insertion mutants reveals two new genes in the pNRC100 gas vesicle gene cluster of Halobacterium halobium. *Nucleic Acids Res* **17**: 7785-7793.
- Kamekura, M., (1998) Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* **2**: 289-295.
- Kasahara, M., K. Makino, M. Amemura, A. Nakata & H. Shinagawa, (1991) Dual regulation of the ugp operon by phosphate and carbon starvation at two interspaced promoters. *J Bacteriol* **173**: 549-558.
- Kashefi, K. & D. R. Lovley, (2003) Extending the upper temperature limit for life. *Science* **301**: 934.
- Kato, J., A. Ito, T. Nikata & H. Ohtake, (1992) Phosphate taxis in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **174**: 5149-5151.
- Kato, J., C. Nagata, L. Yang, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi & H. Ohtake, (2001) Isolation and characterization of the Enterobacter cloacae cheR mutant defective in phosphate taxis. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 456-458.
- Kato, J., Y. Sakai, T. Nikata & H. Ohtake, (1994) Cloning and characterization of a Pseudomonas aeruginosa gene involved in the negative regulation of phosphate taxis. *J Bacteriol* **176**: 5874-5877.
- Koch, M. K. & D. Oesterhelt, (2005) MpcT is the transducer for membrane potential changes in Halobacterium salinarum. *Mol Microbiol* **55**: 1681-1694.
- Koide, T., D. J. Reiss, J. C. Bare, W. L. Pang, M. T. Facciotti, A. K. Schmid, M. Pan, B. Marzolf, P. T. Van, F. Y. Lo, A. Pratap, E. W. Deutsch, A. Peterson, D. Martin & N. S. Baliga, (2009) Prevalence of transcription promoters within archaeal operons and coding sequences. *Mol Syst Biol* **5**: 285.
- Kokoeva, M. V. & D. Oesterhelt, (2000) BasT, a membrane-bound transducer protein for amino acid detection in Halobacterium salinarum. *Mol Microbiol* **35**: 647-656.
- Kokoeva, M. V., K. F. Storch, C. Klein & D. Oesterhelt, (2002) A novel mode of sensory transduction in archaea: binding protein-mediated chemotaxis towards osmoprotectants and amino acids. *EMBO J* **21**: 2312-2322.
- Konig, H., (1988) Archaeobacterial Cell Envelopes. *Canadian Journal of Microbiology* **34**: 395-406.
- Kosa, P. F., G. Ghosh, B. S. DeDecker & P. B. Sigler, (1997) The 2.1-A crystal structure of an archaeal preinitiation complex: TATA-box-binding protein/transcription factor (II)B core/TATA-box. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6042-6047.
- Kozak, M., (1978) How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* **15**: 1109-1123.
- Kozak, M., (1983) Translation of insulin-related polypeptides from messenger RNAs with tandemly reiterated copies of the ribosome binding site. *Cell* **34**: 971-978.
- Kozak, M., (1989) Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Molecular & Cellular Biology* **9**: 5073-5080.
- Krueger, R. D., S. H. Harper, J. W. Campbell & D. E. Fahrney, (1986) Kinetics of phosphate uptake, growth, and accumulation of cyclic diphosphoglycerate in a phosphate-limited continuous culture of Methanobacterium thermoautotrophicum. *J Bacteriol* **167**: 49-56.
- Kruger, K., T. Hermann, V. Armbruster & F. Pfeifer, (1998) The transcriptional activator GvpE for the halobacterial gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein. *J Mol Biol* **279**: 761-771.

- Kusaka, K., K. Shibata, A. Kuroda, J. Kato & H. Ohtake, (1997) Isolation and characterization of *Enterobacter cloacae* mutants which are defective in chemotaxis toward inorganic phosphate. *J Bacteriol* **179**: 6192-6195.
- Kushner, D. J., (1988) What Is the True Internal Environment of Halophilic and Other Bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **34**: 482-486.
- Kustu, S. G. & G. F. Ames, (1973) The hisP protein, a known histidine transport component in *Salmonella typhimurium*, is also an arginine transport component. *J Bacteriol* **116**: 107-113.
- Lam, W. L. & W. F. Doolittle, (1992) Mevinolin-resistant mutations identify a promoter and the gene for a eukaryote-like 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *J Biol Chem* **267**: 5829-5834.
- Langworthy, T. A. & J. L. Pond, (1986) Archaeobacterial Ether Lipids and Chemotaxonomy. *Systematic and Applied Microbiology* **7**: 253-257.
- Lanyi, J. K., (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **38**: 272-290.
- Lee, S. J., A. Bohm, M. Krug & W. Boos, (2007) The ABC of binding-protein-dependent transport in Archaea. *Trends Microbiol* **15**: 389-397.
- Lee, S. J., A. Engelmann, R. Horlacher, Q. Qu, G. Vierke, C. Hebbeln, M. Thomm & W. Boos, (2003) TrmB, a sugar-specific transcriptional regulator of the trehalose/maltose ABC transporter from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J Biol Chem* **278**: 983-990.
- Lefevre, P., M. Braibant, L. de Wit, M. Kalai, D. Roeper, J. Grotzinger, J. P. Delville, P. Peirs, J. Ooms, K. Huygen & J. Content, (1997) Three different putative phosphate transport receptors are encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* **179**: 2900-2906.
- Lenburg, M. E. & E. K. O'Shea, (1996) Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem Sci* **21**: 383-387.
- Leong, K., L. Brunet & A. J. Berk, (1988) Factors responsible for the higher transcriptional activity of extracts of adenovirus-infected cells fractionate with the TATA box transcription factor. *Molecular & Cellular Biology* **8**: 1765-1774.
- Li, W. Z. & F. Sherman, (1991) Two types of TATA elements for the CYC1 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology* **11**: 666-676.
- Littlefield, O., Y. Korkhin & P. B. Sigler, (1999) The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13668-13673.
- Liu, C., U. S. Muchhal, M. Uthappa, A. K. Kononowicz & K. G. Raghothama, (1998) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* **116**: 91-99.
- Liu, W. & F. M. Hulett, (1997) *Bacillus subtilis* PhoP binds to the phoB tandem promoter exclusively within the phosphate starvation-inducible promoter. *Journal of Bacteriology* **179**: 6302-6310.
- Liu, W. & F. M. Hulett, (1998) Comparison of PhoP binding to the tuaA promoter with PhoP binding to other Pho-regulon promoters establishes a *Bacillus subtilis* Pho core binding site. *Microbiology* **144** (Pt 5): 1443-1450.
- Livak, K. J. & T. D. Schmittgen, (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lottspeich, F., Zorbach, H., (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Luecke, H. & F. A. Quioco, (1990) High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds. *Nature* **347**: 402-406.
- Lux, R., K. Jahreis, K. Bettenbrock, J. S. Parkinson & J. W. Lengeler, (1995) Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11583-11587.

- Lux, R., V. R. Munasinghe, F. Castellano, J. W. Lengeler, J. E. Corrie & S. Khan, (1999) Elucidation of a PTS-carbohydrate chemotactic signal pathway in *Escherichia coli* using a time-resolved behavioral assay. *Mol Biol Cell* **10**: 1133-1146.
- Magbanua, J. P., K. Fujisawa, N. Ogawa & Y. Oshima, (1997a) The homeodomain protein Pho2p binds at an A/T-rich segment flanking the binding site of the basic-helix-loop-helix protein Pho4p in the yeast PHO promoters. *Yeast* **13**: 1299-1308.
- Magbanua, J. P., N. Ogawa, S. Harashima & Y. Oshima, (1997b) The transcriptional activators of the PHO regulon, Pho4p and Pho2p, interact directly with each other and with components of the basal transcription machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* **121**: 1182-1189.
- Makino, K., M. Amemura, S. K. Kim, A. Nakata & H. Shinagawa, (1994) Mechanism of Transcriptional Activation of the Phosphate Regulon in *Escherichia-Coli*. *Phosphate in Microorganisms*: 5-12; 347.
- Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, T. Kawamoto, M. Yamada & A. Nakata, (1989) Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol* **210**: 551-559.
- Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, S. Kimura, A. Nakata & A. Ishihama, (1988) Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein in vitro. *J Mol Biol* **203**: 85-95.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. , (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mantis, N. J. & S. C. Winans, (1993) The chromosomal response regulatory gene *chvI* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *Escherichia coli* *phoB* mutation and is required for virulence. *J Bacteriol* **175**: 6626-6636.
- Martin, D. D., Ciulla, R. A. und Roberts, M. F. , (1999) Osmoadaptation in Archaea. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1815-1825.
- Mathews, D. H., M. D. Disney, J. L. Childs, S. J. Schroeder, M. Zuker & D. H. Turner, (2004) Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7287-7292.
- Medveczky, N. & H. Rosenberg, (1971) Phosphate transport in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **241**: 494-506.
- Mendes, M. V., S. Tunca, N. Anton, E. Recio, A. Sola-Landa, J. F. Aparicio & J. F. Martin, (2007) The two-component *phoR-phoP* system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of *phoP* reduces the negative phosphate regulation of pimaricin biosynthesis. *Metab Eng* **9**: 217-227.
- Mendrygal, K. E. & J. E. Gonzalez, (2000) Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **182**: 599-606.
- Metcalf, W. W. & B. L. Wanner, (1991) Involvement of the *Escherichia coli* *phn* (*psiD*) gene cluster in assimilation of phosphorus in the form of phosphonates, phosphite, Pi esters, and Pi. *J Bacteriol* **173**: 587-600.
- Michel, H. & D. Oesterhelt, (1980) Electrochemical proton gradient across the cell membrane of *Halobacterium halobium*: effect of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, relation to intracellular adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, and phosphate concentration, and influence of the potassium gradient. *Biochemistry* **19**: 4607-4614.
- Mignone, F., C. Gissi, S. Liuni & G. Pesole, (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* **3**: REVIEWS0004.
- Minder, A. C., F. Narberhaus, H. M. Fischer & H. Hennecke, (1998) The *Bradyrhizobium japonicum* *phoB* gene is required for phosphate-limited growth but not for symbiotic nitrogen fixation. *FEMS Microbiol Lett* **161**: 47-52.
- Mizutani, T., M. Masuda, E. Nakai, K. Furumiya, H. Togawa, Y. Nakamura, Y. Kawai, K. Nakahira, S. Shinkai & K. Takahashi, (2008) Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1). *Curr Drug Metab* **9**: 167-174.

- Moll, I., G. Hirokawa, M. C. Kiel, A. Kaji & U. Blasi, (2004) Translation initiation with 70S ribosomes: an alternative pathway for leaderless mRNAs. *Nucleic Acids Res* **32**: 3354-3363.
- Nakano, M. M. & P. Zuber, (1998) Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu Rev Microbiol* **52**: 165-190.
- Napoli, A., J. van der Oost, C. W. Sensen, R. L. Charlebois, M. Rossi & M. Ciaramella, (1999) An Lrp-like protein of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* which binds to its own promoter. *J Bacteriol* **181**: 1474-1480.
- Nelson, H. C. M., (1995) Structure and Function of DNA-Binding Proteins. *Current Opinion in Genetics and Development* **5**: 180-189.
- Ng, W. V., S. P. Kennedy, G. G. Mahairas, B. Berquist, M. Pan, H. D. Shukla, S. R. Lasky, N. S. Baliga, V. Thorsson, J. Sbrogna, S. Swartzell, D. Weir, J. Hall, T. A. Dahl, R. Welti, Y. A. Goo, B. Leithauser, K. Keller, R. Cruz, M. J. Danson, D. W. Hough, D. G. Maddocks, P. E. Jablonski, M. P. Krebs, C. M. Angevine, H. Dale, T. A. Isenbarger, R. F. Peck, M. Pohlschroder, J. L. Spudich, K. W. Jung, M. Alam, T. Freitas, S. Hou, C. J. Daniels, P. P. Dennis, A. D. Omer, H. Ebhardt, T. M. Lowe, P. Liang, M. Riley, L. Hood & S. DasSarma, (2000) Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12176-12181.
- Nikata, T., Y. Sakai, K. Shibata, J. Kato, A. Kuroda & H. Ohtake, (1996) Molecular analysis of the phosphate-specific transport (pst) operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* **250**: 692-698.
- Novak, R., A. Cauwels, E. Charpentier & E. Tuomanen, (1999) Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. *J Bacteriol* **181**: 1126-1133.
- O'Donnell, S. A. & G. R. Janssen, (2002) Leaderless mRNAs bind 70S ribosomes more strongly than 30S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **184**: 6730-6733.
- Oesterhelt, D. & G. Krippahl, (1983) Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants. *Ann Microbiol (Paris)* **134B**: 137-150.
- Oesterhelt, D. & W. Stoeckenius, (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol* **233**: 149-152.
- Oesterhelt, D. & W. Stoeckenius, (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 2853-2857.
- Offner, S., G. Wanner & F. Pfeifer, (1996) Functional studies of the gvpACNO operon of *Halobacterium salinarium* reveal that the GvpC protein shapes gas vesicles. *Journal of Bacteriology* **178**: 2071-2078.
- Ogawa, N., J. DeRisi & P. O. Brown, (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell* **11**: 4309-4321.
- Ogawa, N., H. Saitoh, K. Miura, J. P. Magbanua, M. Bun-ya, S. Harashima & Y. Oshima, (1995) Structure and distribution of specific cis-elements for transcriptional regulation of PHO84 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **249**: 406-416.
- Oldham, M. L., D. Khare, F. A. Quioco, A. L. Davidson & J. Chen, (2007) Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature* **450**: 515-521.
- Oren, A., (1994) Enzyme diversity in halophilic archaea. *Microbiologia* **10**: 217-228.
- Oshima, Y., (1997) The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst* **72**: 323-334.
- Osorio, G. & C. A. Jerez, (1996) Adaptive response of the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 to phosphate starvation. *Microbiology* **142 (Pt 6)**: 1531-1536.
- Overduin, P., W. Boos & J. Tommassen, (1988) Nucleotide sequence of the *ugp* genes of *Escherichia coli* K-12: homology to the maltose system. *Mol Microbiol* **2**: 767-775.
- Pabo, C. O. & R. T. Sauer, (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* **61**: 1053-1095.
- Pankratova, E. V., (2008) [Alternative promoters and the complexity of the mammalian transcriptome]. *Mol Biol (Mosk)* **42**: 422-433.

- Patenge, N., A. Berendes, H. Engelhardt, S. C. Schuster & D. Oesterhelt, (2001) The fla gene cluster is involved in the biogenesis of flagella in *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* **41**: 653-663.
- Patenge, N., A. Haase, H. Bolhuis & D. Oesterhelt, (2000) The gene for a halophilic beta-galactosidase (bgaH) of *Haloferax alicantei* as a reporter gene for promoter analyses in *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* **36**: 105-113.
- Peirs, P., P. Lefevre, S. Boarbi, X. M. Wang, O. Denis, M. Braibant, K. Pethe, C. Loch, K. Huygen & J. Content, (2005) *Mycobacterium tuberculosis* with disruption in genes encoding the phosphate binding proteins PstS1 and PstS2 is deficient in phosphate uptake and demonstrates reduced in vivo virulence. *Infect Immun* **73**: 1898-1902.
- Perego, M., P. Glaser & J. A. Hoch, (1996) Aspartyl-phosphate phosphatases deactivate the response regulator components of the sporulation signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 1151-1157.
- Persson, B. L., J. O. Lagerstedt, J. R. Pratt, J. Pattison-Granberg, K. Lundh, S. Shokrollahzadeh & F. Lundh, (2003) Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **43**: 225-244.
- Pesole, G., G. Grillo, A. Larizza & S. Liuni, (2000) The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis. *Brief Bioinform* **1**: 236-249.
- Pfeifer, F., J. Griffig & D. Oesterhelt, (1993) The fdx gene encoding the [2Fe--2S] ferredoxin of *Halobacterium salinarum* (*H. halobium*). *Mol Gen Genet* **239**: 66-71.
- Pfeiffer, F., S. C. Schuster, A. Broicher, M. Falb, P. Palm, K. Rodewald, A. Ruepp, J. Soppa, J. Tittor & D. Oesterhelt, (2008) Evolution in the laboratory: the genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1. *Genomics* **91**: 335-346.
- Pfluger, K., A. Ehrenreich, K. Salmon, R. P. Gunsalus, U. Deppenmeier, G. Gottschalk & V. Muller, (2007) Identification of genes involved in salt adaptation in the archaeon *Methanosarcina mazei* Go1 using genome-wide gene expression profiling. *FEMS Microbiol Lett* **277**: 79-89.
- Pinkett, H. W., A. T. Lee, P. Lum, K. P. Locher & D. C. Rees, (2007) An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* **315**: 373-377.
- Pohlschroder, M., K. Dilks, N. J. Hand & R. Wesley Rose, (2004) Translocation of proteins across archaeal cytoplasmic membranes. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 3-24.
- Qi, Y., Y. Kobayashi & F. M. Hulett, (1997) The pst operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the Pho regulon. *Journal of Bacteriology* **179**: 2534-2539.
- Qureshi, S. A., S. D. Bell & S. P. Jackson, (1997) Factor requirements for transcription in the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *EMBO J* **16**: 2927-2936.
- Qureshi, S. A. & S. P. Jackson, (1998) Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Mol Cell* **1**: 389-400.
- Rao, N. N. & A. Torriani, (1988) Utilization by *Escherichia coli* of a high-molecular-weight, linear polyphosphate: roles of phosphatases and pore proteins. *J Bacteriol* **170**: 5216-5223.
- Rao, N. N. & A. Torriani, (1990) Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**: 1083-1090.
- Reeve, J. N., (2003) Archaeal chromatin and transcription. *Molecular Microbiology* **48**: 587-598.
- Reeve, J. N., K. Sandman & C. J. Daniels, (1997) Archaeal histones, nucleosomes, and transcription initiation. *Cell* **89**: 999-1002.
- Reiter, W. D., U. Hudepohl & W. Zillig, (1990) Mutational analysis of an archaebacterial promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9509-9513.
- Reysenbach, A. L., K. Longnecker & J. Kirshtein, (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3798-3806.

- Rice, C. D., J. E. Pollard, Z. T. Lewis & W. R. McCleary, (2009) Employment of a Promoter-Swapping Technique Shows that PhoU Modulates the Activity of the PstSCAB(2) ABC Transporter in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 573-582.
- Rodriguez-Valera, F., (1993) Introduction to Saline Environments. In: The biology of halophilic bacteria. R. H. a. H. Vreeland, L.I. (ed). Boca Raton: CRC Press, pp. 1-23.
- Rosenberg, H., R. G. Gerdes & K. Chegwidden, (1977) Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **131**: 505-511.
- Ross, W., S. E. Aiyar, J. Salomon & R. L. Gourse, (1998) *Escherichia coli* promoters with UP elements of different strengths: modular structure of bacterial promoters. *J Bacteriol* **180**: 5375-5383.
- Rowe, S. M., S. Miller & E. J. Sorscher, (2005) Cystic fibrosis. *N Engl J Med* **352**: 1992-2001.
- Rowlands, T., P. Baumann & S. P. Jackson, (1994) The TATA-binding protein: a general transcription factor in eukaryotes and archaeobacteria. *Science* **264**: 1326-1329.
- Rudolph, H. & A. Hinnen, (1987) The yeast PHO5 promoter: phosphate-control elements and sequences mediating mRNA start-site selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 1340-1344.
- Rudolph, J. & D. Oesterhelt, (1995) Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J* **14**: 667-673.
- Rudolph, J., N. Tolliday, C. Schmitt, S. C. Schuster & D. Oesterhelt, (1995) Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *EMBO J* **14**: 4249-4257.
- Ryu, S. & S. Garges, (1994) Promoter switch in the *Escherichia coli* pts operon. *J Biol Chem* **269**: 4767-4772.
- Sack, J. S., M. A. Saper & F. A. Quioco, (1989) Periplasmic binding protein structure and function. Refined X-ray structures of the leucine/isoleucine/valine-binding protein and its complex with leucine. *J Mol Biol* **206**: 171-191.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erlich, (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Saitou, N. & M. Nei, (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Sambrook, J. F., E.F. und Maniatis, T., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Santangelo, T. J. & J. N. Reeve, (2006) Archaeal RNA polymerase is sensitive to intrinsic termination directed by transcribed and remote sequences. *J Mol Biol* **355**: 196-210.
- Santra, M., K. G. Danielson & R. V. Iozzo, (1994) Structural and functional characterization of the human decorin gene promoter. A homopurine-homopyrimidine S1 nuclease-sensitive region is involved in transcriptional control. *J Biol Chem* **269**: 579-587.
- Sartorius-Neef, S. & F. Pfeifer, (2004) In vivo studies on putative Shine-Dalgarno sequences of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* **51**: 579-588.
- Schembri, M. A., R. C. Bayly & J. K. Davies, (1995) Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. *J Bacteriol* **177**: 4501-4507.
- Schleper, C., G. Puhler, B. Kuhlmoorgen & W. Zillig, (1995) Life at extremely low pH. *Nature* **375**: 741-742.
- Schneider, E., (2000) ATP-binding cassette transport systems: A protein family for the transport of chemical compounds across biological membranes. *Chemie in Unserer Zeit* **34**: 90-98.
- Schobert, B. & J. K. Lanyi, (1982) Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J Biol Chem* **257**: 10306-10313.
- Schroeder, D. I. & R. M. Myers, (2008) Multiple transcription start sites for FOXP2 with varying cellular specificities. *Gene* **413**: 42-48.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork & C. P. Ponting, (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5857-5864.

- Schwaiger, R., (2009) *Genexpressions- und Protein-DNA-Interaktions-Studien des Aminosäure-Metabolismus und metallabhängiger Prozesse in Halobacterium salinarum R1*. (Dissertation) LMU München.
- Schwarz, C., (unveröffentlicht). (Dissertation) LMU, München.
- Sehgal, S. N. & N. E. Gibbons, (1960) Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Canadian Journal of Microbiology* **6**: 165-169.
- Sensen, C. W., H. P. Klenk, R. K. Singh, G. Allard, C. C. Chan, Q. Y. Liu, S. L. Penny, F. Young, M. E. Schenk, T. Gaasterland, W. F. Doolittle, M. A. Ragan & R. L. Charlebois, (1996) Organizational characteristics and information content of an archaeal genome: 156 kb of sequence from *Sulfolobus solfataricus* P2. *Mol Microbiol* **22**: 175-191.
- Shand, R. F. & M. C. Betlach, (1991) Expression of the *bop* gene cluster of *Halobacterium halobium* is induced by low oxygen tension and by light. *J Bacteriol* **173**: 4692-4699.
- Shine, J. & L. Dalgarno, (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 1342-1346.
- Shporer, M. & M. M. Civan, (1977) Pulsed nuclear magnetic resonance study of 39K within halobacteria. *J Membr Biol* **33**: 385-400.
- Siehnell, R. J., E. A. Worobec & R. E. Hancock, (1988) Regulation of components of the *Pseudomonas aeruginosa* phosphate-starvation-inducible regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **2**: 347-352.
- Silver, S., K. Budd, K. M. Leahy, W. V. Shaw, D. Hammond, R. P. Novick, G. R. Willsky, M. H. Malamy & H. Rosenberg, (1981) Inducible plasmid-determined resistance to arsenate, arsenite, and antimony (III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **146**: 983-996.
- Singer, G. A., J. Wu, P. Yan, C. Plass, T. H. Huang & R. V. Davuluri, (2008) Genome-wide analysis of alternative promoters of human genes using a custom promoter tiling array. *BMC Genomics* **9**: 349.
- Slupska, M. M., A. G. King, S. Fitz-Gibbon, J. Besemer, M. Borodovsky & J. H. Miller, (2001) Leaderless transcripts of the crenarchaeal hyperthermophile *Pyrobaculum aerophilum*. *J Mol Biol* **309**: 347-360.
- Sola-Landa, A., A. Rodriguez-Garcia, E. Franco-Dominguez & J. F. Martin, (2005) Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol Microbiol* **56**: 1373-1385.
- Soppa, J., (1999) Normalized nucleotide frequencies allow the definition of archaeal promoter elements for different archaeal groups and reveal base-specific TFB contacts upstream of the TATA box. *Mol Microbiol* **31**: 1589-1592.
- Soppa, J., (2001) Basal and regulated transcription in archaea. *Adv Appl Microbiol* **50**: 171-217.
- Southern, E. M., (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-517.
- Spriggs, K. A., M. Bushell, S. A. Mitchell & A. E. Willis, (2005) Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ* **12**: 585-591.
- Spriggs, K. A., M. Stoneley, M. Bushell & A. E. Willis, (2008) Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* **100**: 27-38.
- Staudinger, W., (2007) *Investigations on Flagellar Biogenesis, Motility and Signal Transduction of Halobacterium salinarum*. (Dissertation) LMU, München.
- Steed, P. M. & B. L. Wanner, (1993) Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *J Bacteriol* **175**: 6797-6809.
- Storch, K. F., J. Rudolph & D. Oesterhelt, (1999) Car: a cytoplasmic sensor responsible for arginine chemotaxis in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *EMBO J* **18**: 1146-1158.
- Streif, S., W. F. Staudinger, W. Marwan & D. Oesterhelt, (2008) Flagellar rotation in the archaeon *Halobacterium salinarum* depends on ATP. *J Mol Biol* **384**: 1-8.

- Summers, M. L., J. G. Elkins, B. A. Elliott & T. R. McDermott, (1998) Expression and regulation of phosphate stress inducible genes in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 1094-1101.
- Sumper, M. & G. Herrmann, (1976) Biosynthesis of purple membrane: control of retinal synthesis by bacterio-opsin. *FEBS Lett* **71**: 333-336.
- Sun, G., E. Sharkova, R. Chesnut, S. Birkey, M. F. Duggan, A. Sorokin, P. Pujic, S. D. Ehrlich & F. M. Hulett, (1996) Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**: 1374-1385.
- Szurmant, H. & G. W. Ordal, (2004) Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 301-319.
- Takemaru, K., M. Mizuno & Y. Kobayashi, (1996) A *Bacillus subtilis* gene cluster similar to the *Escherichia coli* phosphate-specific transport (pst) operon: evidence for a tandemly arranged pstB gene. *Microbiology* **142** (Pt 8): 2017-2020.
- Tam, R. & M. H. Saier, Jr., (1993) Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 320-346.
- Tanabe, M., O. Mirza, T. Bertrand, H. S. Atkins, R. W. Titball, S. Iwata, K. A. Brown & B. Byrne, (2007) Structures of OppA and PstS from *Yersinia pestis* indicate variability of interactions with transmembrane domains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**: 1185-1193.
- Tarasov, V. Y., H. Besir, R. Schwaiger, K. Klee, K. Furtwangler, F. Pfeiffer & D. Oesterhelt, (2008) A small protein from the bop-brp intergenic region of *Halobacterium salinarum* contains a zinc finger motif and regulates bop and crtB1 transcription. *Mol Microbiol* **67**: 772-780.
- Tarasov, V. Y., M. G. Pyatibratov, S. L. Tang, M. Dyall-Smith & O. V. Fedorov, (2000) Role of flagellins from A and B loci in flagella formation of *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* **35**: 69-78.
- Thomm, M., (2000) Die Transkriptionsmaschinerie der Archaea. *Biospektrum* **3**: 179-185.
- Thomm, M. & G. Wich, (1988) An archaeobacterial promoter element for stable RNA genes with homology to the TATA box of higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **16**: 151-163.
- Thompson, D. K., J. R. Palmer & C. J. Daniels, (1999) Expression and heat-responsive regulation of a TFIIB homologue from the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol* **33**: 1081-1092.
- Tolstrup, N., C. W. Sensen, R. A. Garrett & I. G. Clausen, (2000) Two different and highly organized mechanisms of translation initiation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* **4**: 175-179.
- Tomassen, J. & T. Dekroon, (1987) Subcellular-Localization of a Phoe-Lacz Fusion Protein in *Escherichia-Coli* by Protease Accessibility Experiments Reveals an Inner-Membrane-Spanning Form of the Protein. *Febs Letters* **221**: 226-230.
- Tomassen, J., K. Eiglmeier, S. T. Cole, P. Overduin, T. J. Larson & W. Boos, (1991) Characterization of 2 Genes, Glpq and Ugpq, Encoding Glycerophosphoryl Diester Phosphodiesterases of *Escherichia-Coli*. *Molecular & General Genetics* **226**: 321-327.
- Trinklein, N. D., S. J. Aldred, A. J. Saldanha & R. M. Myers, (2003) Identification and functional analysis of human transcriptional promoters. *Genome Res* **13**: 308-312.
- van Veen, H. W., (1997) Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **72**: 299-315.
- Venter, U., J. Svaren, J. Schmitz, A. Schmid & W. Horz, (1994) A nucleosome precludes binding of the transcription factor Pho4 in vivo to a critical target site in the PHO5 promoter. *EMBO J* **13**: 4848-4855.
- Ventosa, A. & A. Oren, (1996) *Halobacterium salinarum* nom corrig, a name to replace *Halobacterium salinarum* (Elazari-Volcani) and to include *Halobacterium halobium* and *Halobacterium cutirubrum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 347-347.
- Vershinina, O. A. & L. V. Znamenskaia, (2002) [The Pho regulons of bacteria]. *Mikrobiologiya* **71**: 581-595.

- Vogel, K., W. Horz & A. Hinnen, (1989) The two positively acting regulatory proteins PHO2 and PHO4 physically interact with PHO5 upstream activation regions. *Mol Cell Biol* **9**: 2050-2057.
- von Kruger, W. M., S. Humphreys & J. M. Ketley, (1999) A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. *Microbiology* **145** (Pt 9): 2463-2475.
- Vyas, N. K., M. N. Vyas & F. A. Quioco, (2003) Crystal structure of M tuberculosis ABC phosphate transport receptor: specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions. *Structure* **11**: 765-774.
- Wackett, L. P., B. L. Wanner, C. P. Venditti & C. T. Walsh, (1987) Involvement of the phosphate regulon and the psiD locus in carbon-phosphorus lyase activity of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **169**: 1753-1756.
- Wadhams, G. H. & J. P. Armitage, (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 1024-1037.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick & N. J. Gay, (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**: 945-951.
- Wanner, B. L., (1993) Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* **51**: 47-54.
- Wanner, B. L., (1994) Multiple Controls of the *Escherichia-Coli* Pho Regulon by the P(I)-Sensor Phor, the Catabolite Regulatory Sensor Crec, and Acetyl Phosphate. *Phosphate in Microorganisms*: 13-21; 347.
- Wanner, B. L., (1996) Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. *Kidney Int* **49**: 964-967.
- Watanabe, H., T. Gojobori & K. Miura, (1997) Bacterial features in the genome of *Methanococcus jannaschii* in terms of gene composition and biased base composition in ORFs and their surrounding regions. *Gene* **205**: 7-18.
- Waters, E., M. J. Hohn, I. Ahel, D. E. Graham, M. D. Adams, M. Barnstead, K. Y. Beeson, L. Bibbs, R. Bolanos, M. Keller, K. Kretz, X. Lin, E. Mathur, J. Ni, M. Podar, T. Richardson, G. G. Sutton, M. Simon, D. Soll, K. O. Stetter, J. M. Short & M. Noordewier, (2003) The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12984-12988.
- Wende, A., (2006) *Signaltransduktion durch Zwei-Komponenten Systeme in dem halophilen Archaeon Halobacterium salinarum*. (Dissertation) LMU, München.
- Wende, A., K. Furtwangler & D. Oesterhelt, (2009) Phosphate Dependent Behavior of the Archaeon *Halobacterium salinarum* Strain R1. *J Bacteriol* **191**: 3852-3860.
- Werner, F. & R. O. Weinzierl, (2002) A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription. *Mol Cell* **10**: 635-646.
- Wilkie, G. S., K. S. Dickson & N. K. Gray, (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* **28**: 182-188.
- Willsky, G. R., R. L. Bennett & M. H. Malamy, (1973) Inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*: involvement of two genes which play a role in alkaline phosphatase regulation. *J Bacteriol* **113**: 529-539.
- Willsky, G. R. & M. H. Malamy, (1980a) Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**: 356-365.
- Willsky, G. R. & M. H. Malamy, (1980b) Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**: 366-374.
- Woese, C. R., (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8392-8396.
- Woese, C. R. & G. E. Fox, (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5088-5090.
- Woese, C. R., O. Kandler & M. L. Wheelis, (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4576-4579.

- Wosten, M. M., C. T. Parker, A. van Mourik, M. R. Guilhabert, L. van Dijk & J. P. van Putten, (2006) The *Campylobacter jejuni* PhosS/PhosR operon represents a non-classical phosphate-sensitive two-component system. *Mol Microbiol* **62**: 278-291.
- Wu, H., J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi & H. Ohtake, (2000) Identification and characterization of two chemotactic transducers for inorganic phosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 3400-3404.
- Wu, H., H. Kosaka, J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi & H. Ohtake, (1999) Cloning and characterization of *Pseudomonas putida* genes encoding the phosphate-specific transport system. *J Biosci Bioeng* **87**: 273-279.
- Xu, K. & M. A. Strauch, (2001) DNA-binding activity of amino-terminal domains of the *Bacillus subtilis* AbrB protein. *J Bacteriol* **183**: 4094-4098.
- Yang, C. F., J. M. Kim, E. Molinari & S. DasSarma, (1996) Genetic and topological analyses of the *bop* promoter of *Halobacterium halobium*: stimulation by DNA supercoiling and non-B-DNA structure. *J Bacteriol* **178**: 840-845.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J, Messing, J. , (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yoshisue, H., H. Sakai, K. Sen, M. Yamagiwa & T. Komano, (1997) Identification of a second transcriptional start site for the insecticidal protein gene *cryIVA* of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *Gene* **185**: 251-255.
- Yuan, J. S., P. J. Tranel & C. N. Stewart, Jr., (2007) Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci* **12**: 6-13.
- Yuan, Z. C., R. Zaheer & T. M. Finan, (2006) Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity phosphate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**: 1089-1102.
- Zhang, X. & F. M. Hulett, (2000) ResD signal transduction regulator of aerobic respiration in *Bacillus subtilis*: *ctaA* promoter regulation. *Mol Microbiol* **37**: 1208-1219.
- Zhang, Y., D. E. Mannering, A. L. Davidson, N. Yao & M. D. Manson, (1996) Maltose-binding protein containing an interdomain disulfide bridge confers a dominant-negative phenotype for transport and chemotaxis. *J Biol Chem* **271**: 17881-17889.
- Zillig, W., P. Palm, W. D. Reiter, F. Gropp, G. Puhler & H. P. Klenk, (1988) Comparative evaluation of gene expression in archaeobacteria. *Eur J Biochem* **173**: 473-482.

6 Abkürzungsverzeichnis

+ / - P _i	Phosphatgesättigte / phosphatlimitierte Bedingungen
°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Adenin
AAP	‘Abridged Anchor Primer’
Abb.	Abbildung
ABC	‘ATP binding cassette’
amp ^R	Ampicillinresistenz
Aph	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
AUAP	‘Abridged Universal Amplification Primer’
bla	β-Lactamase Gen
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BRE	‘B recognition element’
BSA	‘bovine serum albumin’ (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Che	Chemotaxis
cm	Zentimeter
Ct	Cycle threshold, PCR-Zyklus in dem ein bestimmter Fluoreszenzwert überschritten wird
d.h.	das heißt
dC	Desoxycytosin
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethyl-pyrocbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	et altera
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
G3P	Glycerin-3-phosphat
GSP	genspezifischer Primer
h	Stunde(n)

6 Abkürzungsverzeichnis

H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
HM	Halomedium
Htr	´halobacterial transducer protein´
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilo Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo Dalton
K _M	Michaelis-Konstante
kV	Kilovolt
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
M	Molar
MCS	´multiple cloning site´
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie / Massenspektroskopie
ms	Millisekunden
N	Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-Galaktosid
ORF	open reading frame
P	Promotor
PCR	´polymerase chain reaction´ (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Pikogramm
pH	umgekehrter dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	anorganisches Phosphat
PIC	Prä-Initiationskomplex
Pst	Phosphat spezifischer Transporter
Pu	Purinbase
Py	Pyrimidinbase
qPCR	quantitative PCR
R	Adenin oder Guanin
RACE	´Rapid Amplification of cDNA Ends´
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	DNA-abhängige RNA Polymerase
rpm	´rounds per minute´ (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)

6 Abkürzungsverzeichnis

SM	synthetisches Medium
SMOP	Synthetisches Medium ohne Phosphat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBP	TATA-Bindungsprotein
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
Temp.	Temperatur
TF	Transkriptionsfaktor
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	Transkriptionsstartstelle
U	`unit` (Einheit)
UAS	`upstream activating sequences`
UE(s)	Untereinheit(en)
ü. N.	über Nacht
Ugp	Glycerin-3-phosphat-spezifischer Transporter (`uptake of glycerol-3-phosphate`)
UTR	`untranslated region`
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl	vergleiche
W	Adenin oder Thymin
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
Y	Cytosin oder Thymin
ZKS	Zweikomponentensysteme

7 Anhang

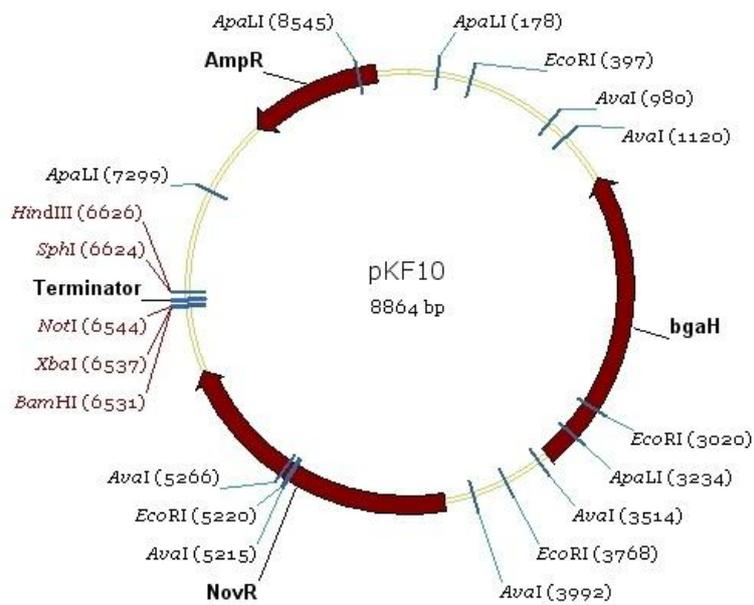
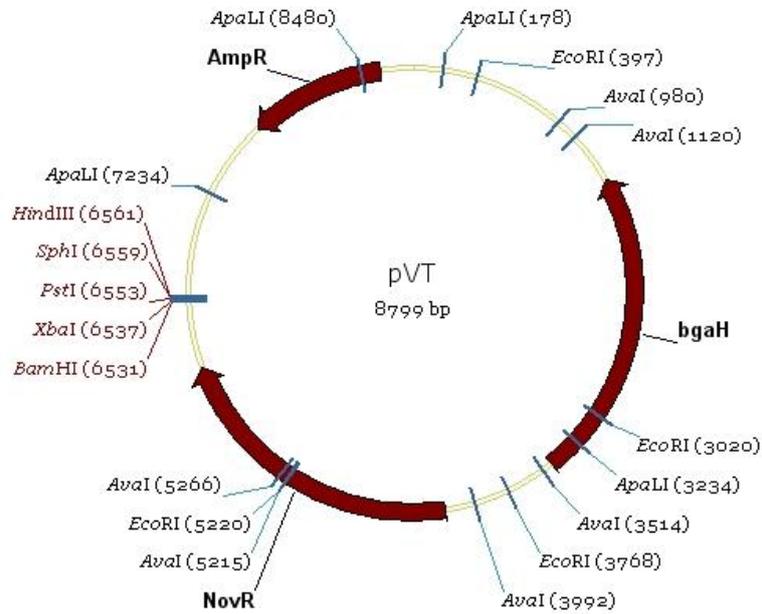


Abb. 51: Vektorkarten der Plasmide pVT und pKF10.

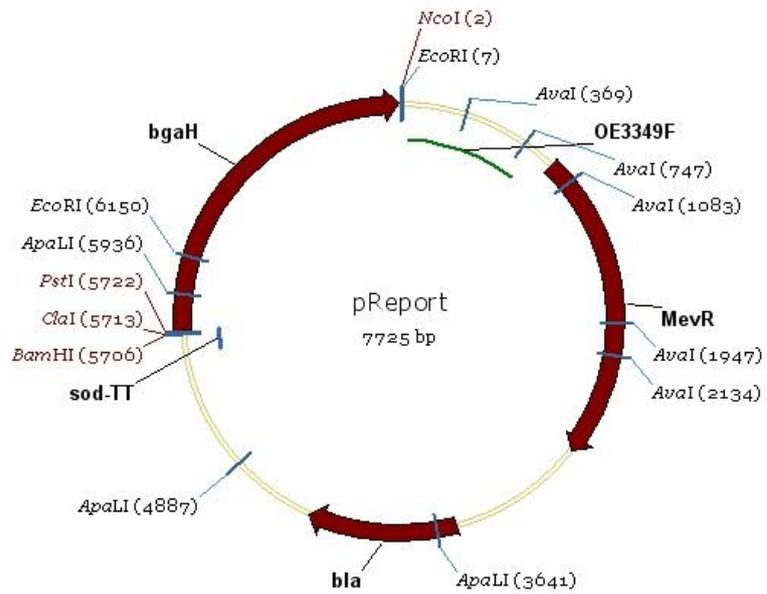
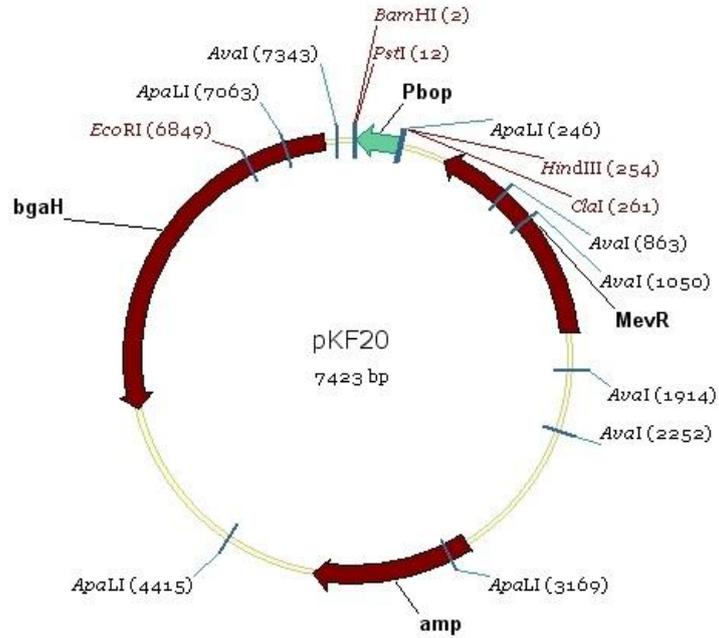


Abb. 52: Vektorkarten der Plasmide pKF20 und pReport.

Tab. 16: Liste der mit Hilfe des ONPG-Enzymtests gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten aus Abb. 20 und Abb. 22B bis Abb. 33B.

Die analog zu den Abbildungen angegebene β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein) ist der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je drei Wiederholungen. Die berechnete Standardabweichung ist ebenfalls angegeben. Nicht messbare β -Galaktosidase-Aktivität ($< 0,0005$ U/mg) = n.m.. Besonders niedrige Werte wurden in den Abbildungen teilweise ebenfalls als nicht messbar (n.m.) angegeben.

Abbildung	Transformante	+/- P _i	β -Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein)	
Abb. 20	KF1A (<i>pst1</i>)	+	0,0068	$\pm 0,0020$
	KF0A (<i>pst2</i>)	+	0,0655	$\pm 0,0085$
	KF2A (<i>ugp</i>)	+	0,0006	$\pm 0,0003$
	KF1A (<i>pst1</i>)	-	0,7845	$\pm 0,1315$
	KF0A (<i>pst2</i>)	-	0,2847	$\pm 0,0914$
	KF2A (<i>ugp</i>)	-	0,1802	$\pm 0,0236$
Abb. 22 (<i>pst1</i>)	KF1A	+	0,0070	$\pm 0,0020$
		-	0,7845	$\pm 0,1320$
	KF1B	+	0,0150	$\pm 0,0021$
		-	0,7752	$\pm 0,1683$
	KF1C	+	0,0024	$\pm 0,0023$
		-	0,0013	$\pm 0,0017$
	KF1D	+	0,0025	$\pm 0,0012$
		-	0,0016	$\pm 0,0010$
KF1E	+	0,0030	$\pm 0,0010$	
	-	0,0020	$\pm 0,0010$	
Abb. 23 (<i>pst2</i>)	KF0A	+	0,0655	$\pm 0,0085$
		-	0,2847	$\pm 0,0914$
	KF0B	+	0,1667	$\pm 0,0375$
		-	0,3391	$\pm 0,0393$
	KF0C	+	0,1606	$\pm 0,0922$
		-	0,2386	$\pm 0,0527$
	KF0D	+	0,0900	$\pm 0,0463$
		-	0,2136	$\pm 0,0654$
KF0E	+	0,0183	$\pm 0,0121$	
	-	0,0082	$\pm 0,0041$	
Abb. 24 (<i>pst1</i>)	KF1A	+	0,0070	$\pm 0,0020$
		-	0,7845	$\pm 0,1315$
	KF1A1mut1	+	n.m.	-
		-	0,0016	$\pm 0,0006$
	KF1A1mut2	+	n.m.	-
		-	0,0029	$\pm 0,0025$
KF1A1mut3	+	0,0010	$\pm 0,0010$	
	-	0,0021	$\pm 0,0015$	
Abb. 25 (<i>pst1</i>)	KF1A	+	0,0070	$\pm 0,0020$
	KF1A2mut1	+	0,0010	$\pm 0,0002$
	KF1A2mut2	+	0,0010	$\pm 0,0003$
	KF1A2mut3	+	n.m.	-
	KF1A2mut4	+	0,0010	$\pm 0,0010$

Abbildung	Transformante	+/- P _i	β-Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein)
Abb. 26 (<i>pst1</i>)	KF1B	+	0,0150 ± 0,0021
	KF1B2mut1	+	n.m. -
	KF1B2mut2	+	0,0020 ± 0,0016
	KF1B2mut3	+	0,0008 ± 0,0003
	KF1B2mut4	+	0,0011 ± 0,0011
Abb. 27 (<i>pst2</i>)	KF0A	+	0,076 ± 0,028
		-	0,285 ± 0,091
	KF0A1mut1	+	n.m. -
		-	0,001 ± 0,001
	KF0A1mut2	+	0,001 ± 0,000
	-	n.m. -	
Abb. 28 (<i>pst2</i>)	KF0E	+	0,0183 ± 0,0121
		-	0,0082 ± 0,0041
	KF0E1mut1	+	0,0021 ± 0,0008
		-	0,0013 ± 0,0018
	KF0E1mut2	+	0,0014 ± 0,0020
		-	0,0006 ± 0,0009
	KF0E1mut3	+	n.m. -
		-	0,0006 ± 0,0008
	KF0E1mut4	+	n.m. -
	-	n.m. -	
		+	0,0017 ± 0,0004
		-	0,0014 ± 0,0004
Abb. 29 (<i>pst1</i>)	KF1A	+	0,0070 ± 0,0020
		-	0,7845 ± 0,1315
	KF1A3mut1	+	0,0010 ± 0,0010
		-	0,0016 ± 0,0002
	KF1A3mut2	+	0,0020 ± 0,0000
		-	0,0008 ± 0,0011
	KF1A3mut3	+	0,0020 ± 0,0020
		-	0,0030 ± 0,0006
		+	0,0100 ± 0,0070
		-	0,1352 ± 0,0026
Abb. 30 (<i>pst1</i>)	KF1A	-	0,7845 ± 0,1315
	KF1A2mut1	-	0,3014 ± 0,1151
	KF1A2mut2	-	0,1531 ± 0,0426
	KF1A2mut3	-	0,0217 ± 0,0101
	KF1A2mut4	-	0,3507 ± 0,0593
Abb. 31 (<i>pst1</i>)	KF1B	-	0,7752 ± 0,1683
	KF1B2mut1	-	0,0026 ± 0,0013
	KF1B2mut2	-	0,0579 ± 0,0245
	KF1B2mut3	-	0,0031 ± 0,0011
	KF1B2mut4	-	0,0025 ± 0,0011

Abbildung	Transformante	+/- P_i	β-Galaktosidase-Aktivität (U/mg Gesamtprotein)
Abb. 32 (<i>pst2</i>)	KF0D	+	0,0900 ± 0,0463
		-	0,1805 ± 0,0952
	KF0D3mut1	+	0,0041 ± 0,0014
		-	0,0066 ± 0,0022
	KF0D3mut2	+	0,0057 ± 0,0006
		-	0,0116 ± 0,0104
	KF0D3mut3	+	0,0150 ± 0,0007
-		0,0288 ± 0,0172	
Abb. 33 (<i>pst1</i>)	KF1A	+	0,0070 ± 0,0020
		-	0,7845 ± 0,1315
	KF1A4mut1	+	0,0010 ± 0,0010
		-	0,6044 ± 0,1475
	KF1A4mut2	+	0,0120 ± 0,0130
		-	0,8399 ± 0,1613
	KF1A4mut3	+	0,0030 ± 0,0020
-		0,7677 ± 0,0204	

	-220	-210	-200	-190	-180	-170	-160			
Promotor <i>pst1</i>(-155 bp):										
Promotor <i>pst2</i>(-227 bp):	TGCGACCACGTATCGATGCCTGTAATATAAATCCCGGTCACGATACATAGTTACTACACCAAACCACTGTA									
Promotor <i>ugp</i>(-181 bp):						GAATCCAACAGCCACCCACACAACG				
	-150	-140	-130	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60
	ATAGGTTCCGGTTGGGGCGTCACCTGGTTAAGTGTTTCAGCCGGCTGACTGGTGGTCTCACCAGTGATATATAGCACACACAGTCCCTATGGAGGGATG <u>G</u>									
	GAGGAGAATAAAGCGCTTGCAGGCGCTCGGGTCGAAATATACATCGACGACGAGCGTCGAATCGATTTCGGGACATGCGATGTGAACTGTTCCCTAT									
	ACTGGTTCGATATTA AAAACCGGGT CAGT TCTGGAACGT CGACGGTATTGCTGCGCGCCGCCCATGCACGGCTCAATAGGTCTCCAGAACTGTCT									
	-50	-40	-30	-20	-10	+1				
	CAGCCACCACGTAGCCATATTATAAACGGGTTTACTGGTTCGGGTGCCATTCCAAGC <u>G</u> ATGCACTCACTGCAGCAT <i>ATG-bgaH</i>									
								<i>PstI</i>	<i>NdeI</i>	
	GTACTGCTATATATACGTAATAGCAGAGTACTTATTCGCATCGCGGCGAGCATAACGAC <u>G</u> ATGCCAGCACTGCAGCAT <i>ATG-bgaH</i>									
								<i>PstI</i>	<i>NdeI</i>	
	GGACGGATATTTCAACTCATATAAGCACTCATCCGAGGACCCCGAGTTGCGTTATCC <u>G</u> ATGGCGCCCTGCAGCAT <i>ATG-bgaH</i>									
								<i>PstI</i>	<i>NdeI</i>	

Abb. 53: Gesamter Promotorbereich des *pst1*-, *pst2*- und *ugp*-Operons im pReport-Vektor (*Ppst1*, *Ppst2* und *Pugp*).

Die Länge der Promotorsequenzen beträgt 155 bp für *Ppst1*, 227 bp für *Ppst2* und 181 bp für *Pugp*. In Fettdruck sind die identifizierten Transkriptionsstarts unterstrichen und die Startcodons im Vektor kursiv dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen *PstI* und *NdeI* sind unter der jeweiligen Sequenz angegeben.

7 Anhang

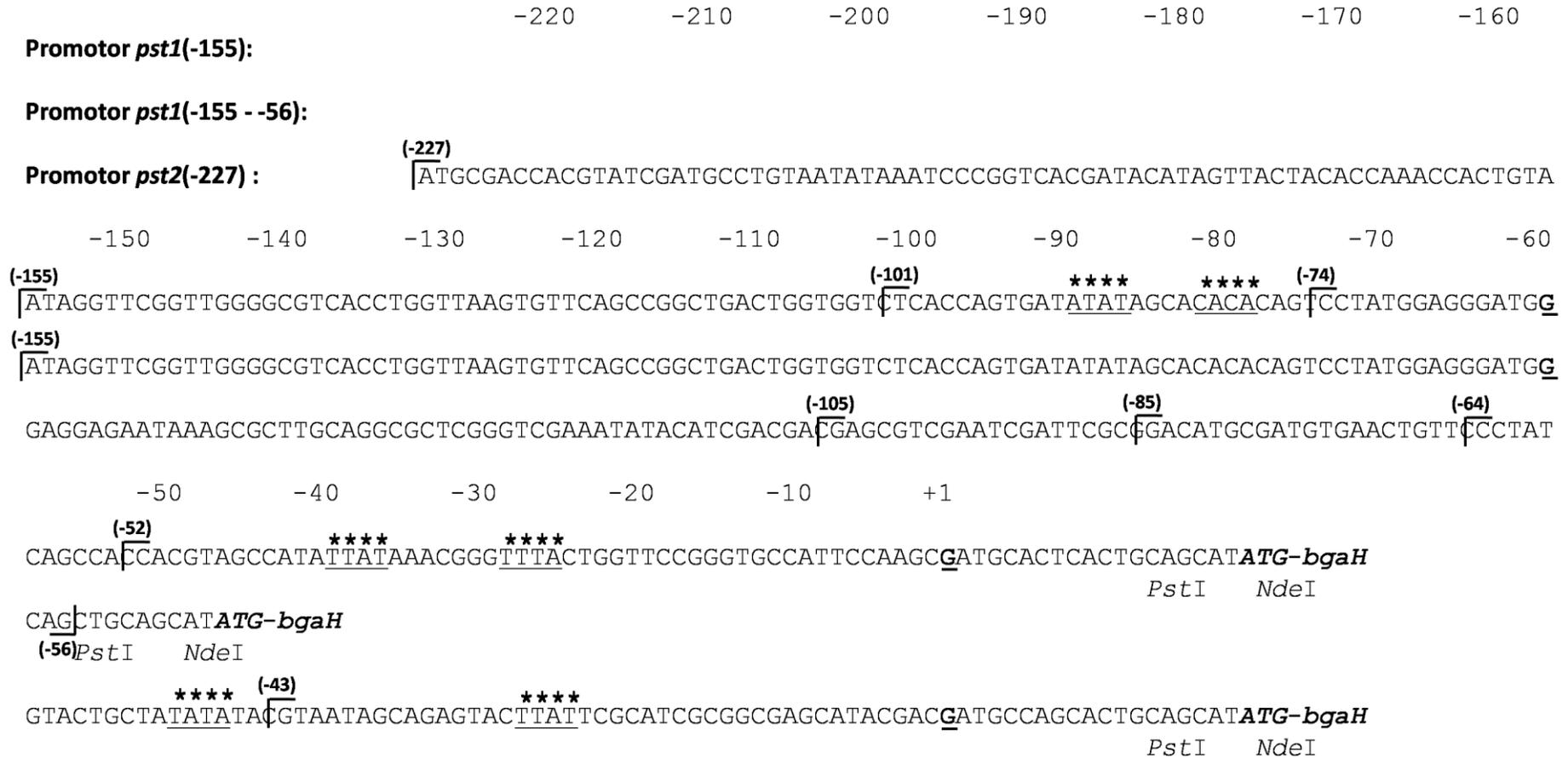


Abb. 54: Mutierte und deletierte Promotorbereiche des *pst1*- und *pst2*-Operons (*Ppst1* und *Ppst2*).

Basen, die in den Promotorfusionskonstrukten durch Punktmutation mutiert wurden, sind durch Fettdruck und darüber liegendem Stern dargestellt. Längen der Schritt-für-Schritt-Deletion des Promotorbereiches sind angegeben. In Fettdruck sind die Transkriptionsstarts unterstrichen und die Startcodons kursiv dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen *PstI* und *NdeI* sind unter der jeweiligen Sequenz angegeben.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Oesterhelt für seine wissenschaftliche Betreuung während der gesamten Promotion danken. Mein Dank gilt seiner großzügigen Unterstützung, seinem Vertrauen und der Bereitstellung aller Mittel und die Freiheit eigene Ideen zu verwirklichen. Seine konstruktiven Anregungen haben mich stets motiviert und entscheidend zu der Anfertigung dieser Arbeit beigetragen.

Ich bedanke mich ganz besonders bei Prof. Dr. Klaus Förstemann (LMU, Genzentrum) für die Erstellung des Zweit-Gutachtens.

Ein großer Dank geht an Frau Eleonore Haack, ohne die ein Funktionieren der Arbeitsgruppe nicht möglich wäre. Ich möchte ihr für die stete Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft danken.

Andy Wende möchte ich dafür danken, dass er mir nach einem erfolglosen „CIC-Assay“-Jahr, seine Zustimmung zur Zusammenarbeit am PHO-Stimulon gab. Im ersten Jahr nach meinem Themenwechsel war er die wichtigste Anlaufstelle zur Beantwortung meiner Fragen und ohne seine Hilfe bei der Einarbeitung in dieses Thema wäre diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen.

Für das gute Gelingen dieser Arbeit möchte ich zudem besonders Valéry Tarasov danken, der stets hilfsbereit war und mir geduldige Hilfestellungen bei verschiedenen Methoden gab. Die wertvollen Tipps und vielen anregenden Diskussionen rund um Halos sowie seine Ideen haben diese Arbeit entscheidend beeinflusst. Auch danke ich ihm für die äußerst angenehme Zusammenarbeit an den „brz“- und „Flagellin“-Publikationen.

Bei Dr. Gunter Meister möchte ich mich ganz herzlich für die Benutzung der RT-qPCR-Maschine bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Birgit Wiltschi für die Korrektur der Arbeit bedanken. Ohne die erste Anweisung ein „Strukturkonzept“ und eine „Stichpunktliste“ zu erstellen, wäre das Schreiben sehr müßig geworden. Vielen Dank!

Auch an Arthur Miller ein außerordentliches Dankeschön für das Korrekturlesen dieser Arbeit! Auf „Thurli“ konnte ich in vielen Belangen immer zählen ☺ ! Ich danke ihm auch für die lustige Zeit im und außerhalb des Labors – was haben wir nicht Tränen gelacht, schön war's!

Bei Kosta Konstantinidis (Cordalis ☺) möchte ich mich für seine verlässliche Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Kaffeepausen bedanken. Ein riesen Dankeschön auch für das Korrekturlesen der Zusammenfassung und Diskussion! Uns verbindet nicht nur die frühere Zeit bei AG Ebel und die jetzige Zeit im „Oe“-Department, wir haben ja auch am selben Tag Geburtstag, gell?!

My special thanks go to Mike Dyall-Smith for correcting my manuscript and supporting me with his knowledge and interest. I also want to thank him for sharing lots of interesting and entertaining coffee breaks with Mirit, Valery and his wife and having a great time at his house.

Christoph Schwarz („Blacky“) danke ich für die ersten Tipps und den pReport-Vektor auf dessen Grundlage ich die Hälfte dieser Arbeit „gefüllt“ habe. Darüber hinaus möchte ich ihm auch für die unzähligen Gespräche und die schöne Zeit außerhalb des Halolabors danken.

Rita Schwaiger („Blondy“, oder auch liebevoller „Omsl“) danke ich herzlich für die unzähligen ernstesten und lustigen Gespräche und Unternehmungen. Die Büronachbarschaft und der fast tägliche Gang zur Kantine und die sozusagen obligatorische *Latte machiato* danach

Danksagung

verschönerten den öden Laboralltag. Zudem danke ich Rita für die nette Zusammenarbeit in der Dunkelkammer bei der Durchführung von Microarrays und meinem Mitwirken für ihre Publikation. Ich wünsche ihr, dass sie ihre Künstler-Berufung verwirklicht!

Auch Tanja Oberwinkler möchte ich für eine sehr schöne Zeit im Büro und auf der Genetik-Konferenz in Berlin mit Rita danken.

My heartfelt thanks go to Mirit Kolog-Gulko for a lot of discussions and sharing very funny Pilates lessons. Never give up! Your thesis will be perfect ☺.

Alex Broicher möchte ich neben den unterhaltsamen Kantinengängen und auch sonstigen Aktivitäten für die Lösung so manchen Computerproblemchens danken.

Auch Kathrin Klee danke ich für die Hilfestellung mit dem Endnote-Programm.

I want to thank Patrick Johansson for lots of interesting discussions and coffee brakes at the MPI and having a great time watching e.g. "Coupling" or going to the "Biergarten".

Ronald Vollrath danke ich für manche nette Unterhaltung und die Bereitstellung seiner Pipette.

Bei Peter Reichelt bedanke ich mich für die Hilfestellungen im Isotopenlabor, super Musikbeschallung und manch bierseeligem Beisammensein.

Martin Grininger danke ich dafür, dass er sich das Lesen der allerersten Version meiner Arbeit angetan hat.

Snezan Marinkovic danke ich für die äußerst schnellen Sequenzierungen.

Bei Peter Palm möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und die lustige Zeit auf Ringberg bedanken

Darüber hinaus gilt allen Mitgliedern der Bioinformatik mein besonderer Dank, allen voran Friedhelm Pfeiffer für sein unermüdliches Engagement bei der Weiterentwicklung des HaloLex. Alberto Marin danke ich für den Tipp GraphPadPrism zu benutzen.

Ein besonderer Dank geht an Jörg Tittor für alle Hilfestellungen im Isotopenlabor wie auch beim Vortragen des „besinnlichen“ Weihnachtsgedichts.

Walter Erhard und ganz besonders Silvia Haslbeck möchte ich ganz herzlich für die Erleichterung der Arbeit im Labor danken!

Mein großer Dank gilt im Übrigen allen Labormitgliedern aus meinem ersten „kleinen Labor“, dem zweiten „Hefelabor“ und dem momentanen „Oe-Labor“ für die angenehme Arbeits-Atmosphäre.

Allen restlichen Mitgliedern des „Oe“-Departments, die ich jetzt nicht mehr nennen konnte, gilt mein Dank für die freundschaftliche, gemütliche und soziale Atmosphäre und für die einzigartigen Jahre am MPI, die ich mit allen verbringen durfte!!!

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern, ohne die weder meine Arbeit noch ich existierte. Danke für ihr Verständnis während der Doktorarbeit, wegen der ich ihnen häufig zu wenig Zeit widmen konnte. Meinen Freunden, die mich schon länger begleiten, möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass sie mich während der gesamten Zeit nicht hängen gelassen haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten. Ein ganz spezielles Dankeschön gilt meiner besten Freundin Julia für unsere lange Freundschaft, ihre mentale Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen und nicht zuletzt für das Lesen der Diskussion!

Моя глубокая благодарность Валерию за его большую эмоциональную поддержку и любовь!!! ♥

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Katarina Saskia Lucia Furtwängler
Geburtsdatum: 03.09.1978
Geburtsort: München, Deutschland
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1984 – 07/1988 Gebele-Volksschule, München
09/1988 – 07/1997 Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium, München
06/1997 Abitur (Fächer: Biologie, Deutsch, Mathematik, Religion)

Akademische Ausbildung:

1997 - 1998 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1998-2004 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
10/2000 - 12/2001 Hilfswissenschaftliche Mitarbeit bei Herr Prof. Dr. Jürgen Ebel (Biochemie und Phytopathologie)
08/2002 - 05/2003 Diplomarbeit bei Herr Prof. Dr. Jürgen Ebel
Thema: Flavonsynthese II in Zellsuspensionskulturen der Sojabohne (*Glycine max* L.)
2003/2004 Diplomprüfung (Fächer: Pflanzenphysiologie, Zellbiologie, Biochemie, Pharmakologie und Toxikologie)

Tätigkeiten in der Industrie und weitere Qualifikationen:

10/2004 - 12/2004 Hilfswissenschaftliche freiberufliche Mitarbeit bei Sloning BioTechnology, Puchheim
2006 Marketing Praktikum bei Sloning BioTechnology, Puchheim
2008 Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für die Biologische Sicherheit, MPI für Biochemie in Martinsried

Promotion:

seit 01/2005 Promotionsarbeit bei Herr Prof. Dr. Dieter Oesterhelt am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried
Thema: Expression und Funktion der ABC-Transporter für anorganisches Phosphat und Glycerin-3-phosphat in *Halobacterium salinarum* R1

Martinsried, den 14.09.2009