

**Untersuchungen zur Bedeutung des Gens *yhgI*
für die Stressanpassung von
Halomonas elongata DSM 2581^T und *Escherichia coli* K-12**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Daniel Burdziak

aus

Bonn

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. Erwin A. Galinski
2. Referent: Prof. Dr. Dr. Hans G. Trüper

Tag der Promotion:

FÜR AMAL

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Osmoadaptation: Anpassung an ein niedriges chemisches Potential des Wassers.....	1
2. Akkumulation osmoregulatorischer Solute.....	2
2.1 Akkumulation anorganischer Ionen.....	2
2.2 Akkumulation organischer osmoregulatorischer Solute.....	2
3. Kompatible Solute zur Stabilisierung von Proteinen und anderen zellulären Strukturen.....	4
4. Weitere Mechanismen der Antwort auf Stressbedingungen.....	5
4.1 Variation der Membranzusammensetzung.....	6
4.2 Hitzeschock-Proteine, Chaperone und verwandte Funktionen.....	8
5. Ziel der Arbeit.....	10
II. Material und Methoden	13
1. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.....	13
2. Nährmedien.....	15
2.1 Medien zur Stammhaltung und Selektion von <i>H. elongata</i> und <i>E. coli</i>	15
2.2 Medien für Übernacht- und Vorkulturen von <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	16
2.3 Medien für Transformationsexperimente mit <i>E. coli</i>	16
2.4 Medien für Konjugationsexperimente mit <i>H. elongata</i>	17
2.5 Medien für die Herstellung chromosomaler Mutationen in <i>H. elongata</i>	17
2.6 Medienzusätze.....	17
3. Puffer und Lösungen.....	18
4. Kultivierungsverfahren.....	20
4.1 Stammhaltung.....	20
4.2 Allgemeine Bakterienanzucht.....	20
4.3 Messung des bakteriellen Wachstums.....	21
4.4 Untersuchungen zum Wachstum unter Stressbedingungen.....	21
4.4.1 Untersuchung von Salzstress.....	22
4.4.2 Untersuchung von Hitzestress.....	22
4.4.3 Untersuchung von Harnstoffstress.....	22
5. Transformation von <i>E. coli</i>	23
5.1 Herstellung superkompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	23
5.2 Standardprotokoll zur Transformation superkompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	24
5.3 Blau/Weiß-Selektion.....	24
6. Isolierung, Reinigung und photometrische Überprüfung von DNA.....	24
6.1 Isolierung genomischer DNA.....	24
6.1.1 Minipräparation von Gesamt-DNA.....	24
6.1.2 Genomic-tip 100/G (Qiagen).....	25
6.2 Isolierung von Plasmid-DNA.....	25
6.2.1 QIAprep Plasmid MiniPrep Kit (Qiagen).....	25
6.2.2 Plasmid Midi Kit (Qiagen).....	26
6.3 Reinigung von DNA nach enzymatischer Modifikation.....	26
6.3.1 DNA-Aufreinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion.....	26
6.3.2 DNA-Aufreinigung mit PCR-Purification-Protokoll (Qiagen).....	26
6.3.3 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegelblöckchen mit dem QIAquick Gelextraktions Kit (Qiagen).....	26
6.4 Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren (DNA und RNA).....	27
7. Enzymatische Modifikation von DNA.....	27
7.1 Restriktionsverdau von DNA.....	27
7.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	28
7.3 Herstellung glatter Enden aus kohäsiven Enden.....	28
7.4 Ligation von DNA.....	28
8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
8.1 Standard-PCR-Reaktion.....	29

8.2 Spezielle PCR-Anwendungen.....	30
8.2.1 Verschachtelte (nested) PCR	30
8.2.2 Ligase-vermittelte PCR.....	30
8.2.3 PCR an ganzen Zellen (<i>in situ</i> -PCR).....	31
8.2.4 SOE-PCR (splicing by <u>o</u> verlap <u>e</u> xtension).....	31
8.2.5 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde	31
8.3 Herstellung von Promotorfusionen mittels PCR	31
8.4 Verwendete Primer	33
9. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	35
9.1 Agarosegelelektrophorese	35
9.2 Southern-Hybridisierung	36
9.2.1 Southern-Transfer.....	36
9.2.2 Hybridisierungsreaktion und immunologischer Nachweis der DNA-Hybride.....	36
10. RNA-Arbeitstechniken.....	37
10.1 RNA-Isolierung.....	37
10.2 Reinigung von RNA.....	38
10.3 5'-RACE-PCR (rapid <u>a</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>e</u> nds)	38
10.4 Reverse Transkriptase vermittelte (RT)-PCR.....	40
11. Konjugation	40
12. Herstellung chromosomaler Mutationen durch homologe Rekombination	42
12.1 Chromosomale Mutationen in <i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 ^T	42
12.1.1 Herstellung des für die Mutagenese verwendeten DNA-Konstruktes	42
12.1.2 Konjugativer Transfer des Konstruktes auf <i>H. elongata</i> und Selektion auf den ersten Cross-Over-Prozess	42
12.1.3 Selektion auf zweiten Cross-Over-Prozess	42
12.2 Chromosomale Mutationen in <i>E. coli</i> K12.....	43
12.2.1 Herstellung des für die Mutagenese verwendeten DNA-Konstruktes	43
12.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> K12 und Bildung des Cointegrates	44
12.2.3 Auflösen der Cointegrate	44
13. Proteinbiochemische Methoden.....	45
13.1 Verwendetes Expressionssystem	45
13.2 Fraktionierung von Zellen	45
13.2.1 Anzucht von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pETY5	45
13.2.2 Zellernte	45
13.2.3 Zellaufschluss mit einer „French-Press“	45
13.2.4 Gewinnung der unlöslichen Fraktion	46
13.2.5 Ultrazentrifugation zur Gewinnung von löslicher und Membranfraktion	46
13.3 Nickelchelate-Chromatographie.....	46
13.4 Pufferwechsel mit Vivaspin 20 ml	47
13.5 Proteinbestimmung	47
13.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
13.6.1 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (SDS-PAGE).....	48
13.6.2 Diskontinuierliche PAGE unter nativen (nicht denaturierenden und nicht reduzierenden) Bedingungen.....	50
13.6.3 Coomassie-Färbung	50
13.6.3 Gel Trocknung.....	50
13.7 Western-Blot	50
13.7.1 Western-Transfer	51
13.7.2 Immunohybridisierung.....	51
13.7.3 Kolorimetrischer Nachweis	51
13.8 Insulin-Reduktionstest.....	52
14. BacterioMatch [®] Two-Hybrid-System	53
14.1 Konstruktion der Vektoren für das Two-Hybrid-System.....	54
14.2 Selektion positiver Klone.....	55
15. Sequenzierung von DNA.....	56
16. Software und Internet-basierte Computeranalysen	56
17. Verwendete Chemikalien	57

III. Ergebnisse	60
1. Sequenzierungen der genomischen DNA von <i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 ^T im Bereich von <i>yhgl</i> / <i>metH</i>	60
1.1 Sequenzierung stromaufwärts des bekannten DNA-Bereiches	60
1.2 Sequenzierung stromabwärts des bekannten DNA-Bereiches	61
2. Analyse von DNA und abgeleiteter Aminosäuresequenz	61
2.1 Die abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF1 zeigt Sequenzähnlichkeiten zu der Methionin-Synthase MetH	62
2.2 Die abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF2 zeigt Sequenzähnlichkeiten zu einer Gruppe von hypothetischen Proteinen	64
3. Molekularbiologischen Arbeiten an <i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T zur Identifizierung des durch die Tn1732-Insertion in <i>H. elongata</i> ABU44 betroffenen Gens	69
3.1 Unterbrechung der Expression von <i>metH</i> durch Insertionsmutagenese	70
3.2 Molekularbiologische Arbeiten zur Charakterisierung von <i>yhgl</i> aus <i>H. elongata</i>	72
3.2.1 Herstellung der <i>yhgl</i> -Deletionsmutanten <i>H. elongata</i> KB5 und KB6	72
3.2.2 Klonierung von <i>yhgl</i> aus <i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T und <i>E. coli</i> K12 in pBBR1MCS	73
3.2.3 Herstellung von <i>H. elongata</i> KB7	74
4. Salinitätsabhängiges Wachstumsverhalten der <i>H. elongata</i> Stämme	75
4.1 Wachstumsverhalten der nicht plasmidtragenden Stämme von <i>H. elongata</i>	75
4.2 Plasmidvermittelte funktionelle Komplementierung der <i>yhgl</i> -Deletionsmutanten <i>H. elongata</i> KB5 und KB6	78
5. Molekularbiologische Arbeiten zur Deletion von <i>yhgl</i> aus <i>E. coli</i> K12	80
5.1 Herstellung der <i>yhgl</i> -Deletionsmutante <i>E. coli</i> BK1	80
5.2 Funktionelle Komplementierung von <i>E. coli</i> BK1	82
6. Salinitätsabhängiges Wachstumsverhalten der plasmidtragenden Stämme von <i>E. coli</i> BK1	84
7. Suche nach Wechselwirkungspartner von YhgI mittels eines <i>E. coli</i> basierten Two-Hybrid-Systems (BacterioMatch [®] Two-Hybrid)	87
7.1 Versuchte Erstellung einer plasmidkodierte Genbank für das Two-Hybrid-System	87
7.2 YhgH als mögliches Zielprotein im BacterioMatch [®] Two-Hybrid-System	88
8. Charakterisierung einer <i>yhgH</i> -Deletionsmutante von <i>E. coli</i> K12	90
8.1 Molekularbiologische Arbeiten zur Deletion von <i>yhgH</i> in <i>E. coli</i> K12	90
8.2 Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> BK2, BK3 und BK4	92
8.3 Funktionelle Komplementierung von <i>E. coli</i> BK2	93
9. Untersuchungen zur Expression von <i>yhgl</i>	95
9.1 Identifizierung transkriptionsregulatorischer Elemente in <i>E. coli</i> K12	96
9.1.1 RACE-PCR an <i>E. coli</i> K12 zur Identifizierung von Transkriptionsstartpunkten und vorgelagerter potentieller Promotorsequenzen	96
9.1.2 Reverse Transkriptase-vermittelte PCR zur Überprüfung einer Koexpression von <i>yhgH</i> und <i>yhgl</i>	98
9.1.3 Identifizierung eines möglichen Transkriptionsterminationssignals in <i>E. coli</i>	100
9.1.4 Analyse der möglichen <i>E. coli</i> Promotoren	101
9.2 Identifizierung transkriptionsregulatorischer Elemente in <i>H. elongata</i>	102
9.2.1 RACE-PCR an <i>H. elongata</i> zur Identifizierung von Transkriptionsstartpunkten und vorgelagerter potentieller Promotorsequenzen	102
9.2.2 Reverse Transkriptase-vermittelte PCR zur Identifizierung längerer Transkripte in <i>H. elongata</i>	105
9.2.3 Identifizierung möglicher Transkriptionsterminationssignale in <i>H. elongata</i>	105
9.2.4 Sequenzierungen an des Tn1732-Insertionsortes von <i>H. elongata</i> ABG31	106
10. Untersuchung der Auswirkungen von salinitätsunabhängigem Stress auf die <i>yhgl</i> -Mutanten von <i>H. elongata</i> und <i>E. coli</i>	108
10.1 Hitzeabhängiges Wachstum	108
10.1.1 Untersuchungen zum Hitzestress bei <i>E. coli</i>	108
10.1.2 Untersuchungen zum Hitzestress bei <i>H. elongata</i>	108
10.2 Harnstoffabhängiges Wachstum	110
10.2.1 Untersuchungen zur Harnstoffsensitivität von <i>E. coli</i>	110
10.2.2 Untersuchungen zur Harnstoffsensitivität von <i>H. elongata</i>	112
11. Charakterisierung und Reinigung von YhgI aus <i>H. elongata</i>	113
11.1 Computergestützte Analyse von YhgI aus <i>H. elongata</i> und ähnlicher Sequenzen	114

11.2 Herstellung eines <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Klones zur Expression von <i>yhgl</i> aus <i>H. elongata</i>	116
11.3 Vorversuche zur Expression von Yhgl-(His) ₆	116
11.4 Erste Fraktionierung des Zellmaterials zur Überprüfung einer Expression von Yhgl-(His) ₆	118
11.5 Expression von Yhgl-(His) ₆ für eine Aufreinigung	120
11.6 Aufreinigung von Yhgl-(His) ₆ mittels Nickelchelate-Chromatographie	120
11.7 Aktivitätstests und Charakterisierung des gereinigten Proteins	122
11.7.1 Pufferwechsel und Konzentrierung von Yhgl-(His) ₆	122
11.7.2 Reduktion von Insulin zum Nachweis einer Thioredoxin-Aktivität	122
11.7.3 Absorptionsspektrum von Yhgl-(His) ₆	124
11.8 Analyse von Yhgl-(His) ₆ im Western-Blot	125
11.8.1 Analyse der Zellfraktionen von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pETY5 im Western-Blot.....	125
11.8.2 Native PAGE mit gereinigtem Yhgl-(His) ₆ zur Untersuchung des Oligomerisierungszustandes.....	127
IV. Diskussion	129
1. Vorangegangene Arbeiten und Anhaltspunkte	129
2. Auswertung der DNA-Sequenzierung in Bezug auf die Vorarbeiten	130
3. Charakterisierung der Mutanten von <i>H. elongata</i>	130
3.1 Methionin-auxotrophes Wachstumsverhalten von <i>H. elongata</i> KB4	130
3.2 Salinitätsabhängiges Wachstumsverhalten der <i>yhgl</i> -Mutanten <i>H. elongata</i> KB5, KB6 und KB7.....	131
4. Salinitätsabhängiges Wachstum der <i>yhgl</i> -Mutante von <i>E. coli</i> K12	133
5. Auswertung von Anhaltspunkten in Literatur und Sequenz zur Planung der weiteren Experimente	134
5.1 Hinweise aus der Literatur	134
5.2 Hinweise aus der Proteinsequenz und Datenbanken.....	136
5.3 Ausrichtung der geplanten Experimente.....	138
6. Untersuchung einer Beteiligung von Yhgl an Kompetenzmechanismen.....	138
6.1 Nutzung des BacterioMatch® Two-Hybrid-Systems zur Identifizierung möglicher Bindungspartner von Yhgl.....	138
6.2 Wachstumsverhalten der <i>yhglH</i> -Mutanten von <i>E. coli</i> K12	140
6.3 Eine Beteiligung von Yhgl an Kompetenzmechanismen lässt sich nicht bestätigen.....	140
7. Analysen der Transkriptionsregulation.....	143
7.1 σ^{70} -abhängige Promotoren	144
7.2 σ^{32} -abhängige Promotoren	145
7.3 σ^{54} -abhängige Promotoren	147
7.4 Vergleiche der Regulation von <i>yhgl</i> mit der Regulation anderer an der Stressanpassung beteiligter Gene	148
7.5 Termination der Transkription von <i>yhgl</i> aus <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	148
7.6 Versuche zum Nachweis der Aktivität der <i>E. coli</i> Promotoren	149
7.7 Nachweis von langen Transkripten ohne nachweisbare Transkriptionsstartpunkte.....	149
8. Untersuchung alternativer Stresseinwirkungen	150
8.1 Wachstum unter Hitzestress, Vergleich mit den Ergebnissen der Salzstress-Experimente	151
8.2 Wachstum von <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i> unter Harnstoffstress	153
9. Charakterisierung von Yhgl.....	155
9.1 Überexpression Yhgl-(His) ₆	156
9.2 Reinigung von Yhgl-(His) ₆	156
9.3 Charakterisierung des gereinigten Yhgl-(His) ₆	157
9.3.1 Yhgl-(His) ₆ im Insulin-Reduktionstest	157
9.3.2 Absorptionsspektrum von Yhgl-(His) ₆	158
9.3.3 Analysen zu einer möglichen Membranassoziation	158
9.3.4 Untersuchung des Oligomerisierungszustandes des gereinigten Yhgl-(His) ₆ in einer nativen PAGE	161
10. Mögliche Aktivierung, Wirkungsweisen und Funktionen von Yhgl	161
11. Ausblick.....	164

V. Zusammenfassung	166
VI. Literatur	168
Anhang	

Abkürzungen und Trivialnamen

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binding-Cassette
As	Aminosäuren
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz(gen), Ampicillin-resistent
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BCC-Transporter	Betain/Carnitin/Cholin-Transporter
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat
Betain	Glycin-Betain
bp	Basenpaar / Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
Carb	Carbenicillin
Carb ^R	Carbenicillin-Resistenz(gen), Carbenicillin-resistent
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	(Kalbs-) intestinale alkalische Phosphatase
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz, Chloramphenicol-resistent
Cm ^S	Chloramphenicol-sensitiv
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
Ectoin	1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin-4-carbonsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
g	Fallbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H ₂ O _{demin.}	demineralisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
Hydroxyectoin 4-carbonsäure	S,S-β-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydro-2-mehtyl-pyrimidin-
IDA	Iminodiessigsäure
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin

Abkürzungen und Trivialnamen

Km ^R	Kanamycin-Resistenz(gen), Kanamycin-resistent
LDH	Lactat-Dehydrogenase
max.	maximal
MCS	Multiple Klonierungsstelle (Multiple Cloning Site)
MFS-Transporter	Major-Facilitator-Superfamily-Transporter
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
OD _{xxx}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx nm
ORF	„open-reading-frame“, „offener Leserahmen“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PETG	Phenylethyl-β-D-thio-Galaktosid
pI	isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-Ethansulfonsäure
% (v/v)	prozentualer Volumenanteil
% (w/v)	prozentualer Massenanteil pro Volumeneinheit
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
rbs	Ribosomenanbindungsstelle
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
Sm ^R	Streptomycin-Resistenz(gen), Streptomycin-resistent
SOE	Splicing by Overlap Extension
Spec	Spectinomycin
Spec ^R	Spectinomycin-Resistenz(gen), Spectinomycin-resistent
str.	strain (Stamm)
T _a	Anlagerungstemperatur der PCR
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofolat
T _m	Schmelztemperatur
TMAO	Trimethylaminoxid
TRAP-Transporter	Tripartite-ATP-Independent-Periplasmic-Transporter
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit

Abkürzungen und Trivialnamen

upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
<i>yhgI_{Ec}</i>	<i>yhgI</i> aus <i>Escherichia coli</i>
YhgI _{Ec}	YhgI aus <i>Escherichia coli</i>
<i>yhgI_{He}</i>	<i>yhgI</i> aus <i>Halomonas elongata</i>
YhgI _{He}	YhgI aus <i>Halomonas elongata</i>

I. Einleitung

1. Osmoadaptation: Anpassung an ein niedriges chemisches Potential des Wassers

Als Osmoadaptation wird die Anpassung eines Organismus an ein niedriges chemisches Potential des umgebenden Mediums bezeichnet. Sie umfasst alle physiologischen Mechanismen, die es einem Mikroorganismus ermöglichen sich dem osmotischen Stress anzupassen.

Das Lösen eines Solut (z.B. NaCl oder Zucker) in Wasser führt zu einer Potentialänderung, die durch die Änderung der Gibbs'schen Energie (ΔG) beschrieben werden kann¹. Das Wasser erfährt dabei eine Änderung des chemischen Potentials $\Delta\mu_w = \Delta H_w - T\Delta S_w$. Nach Sweeney & Beuchat (1993) kommt es durch Lösen von NaCl in Wasser zur Störung der Ordnung der Wassermoleküle, damit hauptsächlich zu einer Entropieerhöhung ($\Delta S_w > 0$) und folglich zur Erniedrigung des chemischen Potentials ($\Delta\mu_w < 0$) des Wassers. ΔH_w bleibt jedoch unverändert. Damit geht eine Verminderung des Dampfdrucks und des Gefrierpunkts sowie eine Erhöhung des Siedepunkts und des osmotischen Drucks einher. Sind zwei wässrige Lösungen mit unterschiedlichem chemischem Potential durch eine nur für Wasser permeable Membran getrennt, kommt es entlang des Potentialgradienten zu einer Wanderung des Wassers vom Ort hohen Potentials zum Ort niedrigen Potentials, bis der Gradient nicht mehr besteht.

Zellen enthalten eine hohe Konzentration von gelösten Osmolyten, welche das intrazelluläre chemische Potential des Wassers erniedrigen. Da die cytoplasmatische Membran für Ionen und die meisten anderen gelösten Verbindungen impermeabel, für Wasser jedoch permeabel ist, kommt es in einem umgebendem hypoosmotischen Medium zu einem Nettoinflux von Wasser in die Zelle. Dabei bildet sich ein hydrostatischer Druck aus, der bei 1 – 5 atm (Gram-negative) bzw. 5 – 25 atm (Gram-positive) liegt (Wood *et al.*, 2001). Vor allem bei Gram-positiven *Bacteria* soll dieser Druck für Zellwachstum und Teilung erforderlich sein (Koch, 1990). Mikrobielle Zellen bestehen zu 70 – 90 % (w/w) aus Wasser. Das Cytoplasma bildet eine wässrige Umgebung, innerhalb derer die Stoffwechselaktivität der Zelle abläuft. Für die Lebensfähigkeit einer Zelle ist es daher essentiell, das zelluläre Wasser zu behalten. An vielen Standorten jedoch, z.B. in Salinen oder zuckerhaltiger Lösung, ist das externe chemische Potential des Wassers durch hohe Konzentrationen gelöster Stoffe sehr niedrig. Dadurch bedingt kommt es zu einem Nettoefflux des *freien* cytoplasmatischen Wassers, zu einem Turgorverlust der Zelle und zur Plasmolyse (Cayley *et al.*, 2000).

Zur Anpassung an diesen osmotischen Stress erniedrigen Mikroorganismen das interne chemische Potential des Wassers, um einen Ausstrom des Wassers zu verhindern oder rückgängig zu machen, bis sich ein osmotisches Gleichgewicht zwischen Cytoplasma und umgebendem Medium einstellt (Csonka, 1989). Dies erfolgt durch Akkumulation osmoregulatorischer Solute. Dabei gibt es zwei Stra-

¹ Dafür gilt: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ mit ΔH = Änderung der Enthalpie, T = Temperatur und ΔS = Änderung der Entropie. ΔG gilt für isobar-isotherme Prozesse.

tegien: Eine Gruppe von Mikroorganismen akkumuliert anorganische Ionen („Salz-im-Cytoplasma-Strategie“), die andere Gruppe akkumuliert organische osmoregulatorische Solute („Organische-Osmolyte-Strategie“) (Galinski, 1995a).

2. Akkumulation osmoregulatorischer Solute

2.1 Akkumulation anorganischer Ionen

Diese Strategie der Osmoadaptation wird vor allem zur Anpassung an hohe Salinitäten, nicht jedoch als Anpassung an hochosmolare Zuckerlösungen angewendet.

In den meisten Fällen werden Kaliumionen als anorganische osmoregulatorische Solute akkumuliert, aber auch Natriumionen können Wachstumsphasen-abhängig akkumuliert werden. Vertreter dieser Strategie gibt es in den Domänen der *Archaea* und *Bacteria*. Dazu gehören u.a. die aeroben *Archaea* der Familie *Halobacteriaceae*, die anaeroben *Bacteria* der Ordnung *Halanaerobiales* sowie das aerobe, extrem halophile Bakterium *Salinibacter ruber* (Anton *et al.*, 2002; Galinski & Trüper, 1994; Oren *et al.*, 2002).

Die hohe resultierende Ionenstärke des Cytoplasmas macht eine Anpassung des zellulären Apparates erforderlich. Nicht nur Enzyme, sondern auch Cofaktoren und Ribosomen, weisen im Vergleich zu den Komponenten nicht-halophiler Vertreter zusätzliche negative Ladungen auf (Galinski, 1995a). Erreicht wird dies durch einen hohen Anteil saurer Aminosäuren (Glutamat und Aspartat) und einen niedrigen Anteil basischer Aminosäuren (Lysin und Arginin). Gleichzeitig ist der Anteil hydrophober Aminosäuren verringert, der Anteil der sog. „borderline hydrophobic“ Aminosäuren Serin und Threonin jedoch erhöht (Lanyi, 1974). Die halophile Malat-Dehydrogenase von *Halobacterium marismortui* weist 20 % saure Aminosäuren im Vergleich zu 6 % bei einem entsprechenden nicht-halophilen Enzym auf. Der Anteil basischer Aminosäuren ist gleichbleibend. Der Ladungsüberschuss dient einer verstärkten Bindung der Hydrathülle an das Molekül (Galinski, 1995a). Mit sinkender Kationenstärke des Cytoplasmas kommt es aufgrund einer fehlenden Abschirmung der negativen Oberflächenladungen zu Abstoßungsreaktionen innerhalb des Moleküls und damit zu einer Destabilisierung und Aktivitätsverlust. Destabilisierend wirkt auch das Fehlen stabiler hydrophober Wechselwirkungen. Die halophilen Organismen, welche diese Anpassungsstrategie anwenden, sind daher weniger flexibel, was Schwankungen der Salinität des umgebenden Mediums angeht.

2.2 Akkumulation organischer osmoregulatorischer Solute

Die Akkumulation organischer osmoregulatorischer Solute wird von vielen nicht-halotoleranten, halotoleranten und halophilen *Bacteria*, von halophilen methanogenen *Archaea* und von eukaryontischen Mikroorganismen zur Erniedrigung des internen chemischen Potentials des Wassers verwendet (Galinski & Trüper, 1994; Galinski, 1995a; Severin, 1993; Ventosa *et al.*, 1998). Organische Solute können durch Eigensynthese akkumuliert werden. Bei der Anwesenheit organischer Solute oder ihrer Vorstufen im umgebenden Medium, können jedoch diese aufgenommen und akkumuliert werden, was energetisch günstiger als die Eigensynthese ist (Galinski & Trüper, 1994).

Die verwendeten organischen Solute sind niedermolekulare, polare, gut wasserlösliche organische Verbindungen, die bei neutralem pH-Wert ungeladen sind (Galinski & Trüper, 1994; Galinski, 1995a). Die Verbindungen gehören zu den Stoffklassen der Aminosäuren (Prolin, Glutamat), Aminosäurederivate (Glycin-Betain, Ectoin und Hydroxyectoin), Polyole (Glycerol, Arabitol), Zucker (Trehalose, Saccharose, Glucosylglycerol, Mannosylglycerat, Mannosylglyceramid) und Schwefelverbindungen (Dimethylsulfiopropionat). Diese Verbindungen können in hoher Konzentration im Cytoplasma akkumuliert werden, ohne den Zellmetabolismus negativ zu beeinflussen (Brown, 1976), und werden daher auch als kompatible Solute bezeichnet.

Die Gruppen kompatibler Solute sind spezifisch für bestimmte Organismengruppen und Salinitätsbereiche. Bei den kompatiblen Soluten aus den Gruppen der Polyole, Zucker und Schwefelverbindungen handelt es sich um die Osmolyte von Organismen mit geringer Salztoleranz (Galinski & Trüper, 1994). Trehalose ist das einzige von *E. coli de novo* synthetisierte kompatible Solut. Damit kann *E. coli* eine Salinität von ca. 3,8 % NaCl in Mineralsalzmedium tolerieren (Larsen *et al.*, 1987). Bei der Trehalose-Synthese werden UDP-Glucose und Glucose-6-P durch die Glucose-6-Phosphat-Synthase (OtsA) zu Trehalose-6-P kondensiert, welches dann durch die Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase (OtsB) zu Trehalose hydrolysiert wird (Giæver *et al.*, 1988; Kaasen *et al.*, 1994). Trehalose, Saccharose und die übrigen Solute dieser Gruppe werden nicht in Konzentrationen über 500 mM akkumuliert und sind in Organismen an marinen Standorten nur bei Vertretern mit geringer Salztoleranz zu finden (Galinski, 1995b). Bei den Disacchariden könnte dies in einem zu hohen spezifischen Gewicht oder einer zu starken Zunahme der Viskosität des Cytoplasmas begründet sein (Oren, 1999). Zudem ist die Synthese von Disacchariden zur Osmoadaptation energetisch gesehen ungünstiger als die Synthese von Aminosäurederivaten, wie Glycin-Betain (später auch als Betain bezeichnet) und Ectoin (Maskow & Babel, 2001; Oren, 1999). Dieser energetische Vorteil ist zum Teil auch in der Menge des Solutes, das pro verwertetem Nährstoff produziert werden kann, begründet. Für die Synthese von 1 mol Trehalose werden 2 mol Glucose benötigt.

Für die Anpassung an hochsaline Standorte sind die kompatiblen Solute aus der Gruppe der Aminosäuren und Aminosäurederivate von größerer Bedeutung. Diese werden in Konzentrationen über 500 mM angereichert und sind charakteristisch für halophile Organismen (Galinski, 1995a; Ventosa *et al.*, 1998). Glycin-Betain (N,N,N-Trimethylglycin) wird in oxygenen und anoxygenen phototrophen *Bacteria* und methanogenen *Archaea de novo* aus Glycin synthetisiert (Galinski & Trüper, 1994; Lai *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1992). Unter den heterotrophen *Bacteria* sind *Actinopolyspora halophila* (Galinski, 1995a; Nyysölä *et al.*, 2000) und *Halomonas pantelleriensis* (Romano *et al.*, 2001) zu einer *de novo* Synthese von Glycin-Betain fähig. *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T (früher *Halomonas elongata* DSM 3043) und andere *Bacteria* (z.B. *E. coli*) können aus dem Medium aufgenommenes Cholin in zwei Schritten zu Glycin-Betain oxidieren (Canovas *et al.*, 1998; Landfald & Strøm, 1986; Styrvold *et al.*, 1986; Ventosa *et al.*, 1998).

Ectoin (1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin-4-carbonsäure) wurde zuerst bei dem phototrophen Schwefelbakterium *Ectothiorhodospira halochloris* identifiziert (Galinski *et al.*, 1985). Es dient hier als Nebensolut. Unter aeroben chemoheterotrophen *Bacteria* (z.B. *H. elongata*) ist Ectoin ein weit verbreitetes Hauptsolut (Galinski, 1995a). Das hydroxylierte Derivat wird hauptsächlich von Gram-

positiven *Bacteria* genutzt (Severin *et al.*, 1992). Die Synthese von Ectoin erfolgt in drei Schritten, ausgehend von Aspartatsemialdehyd. Zunächst katalysiert die Diaminobuttersäure-Transaminase (EctB) die Transaminierung zu L-2,4-Diaminobuttersäure. In einem zweiten Schritt wird diese durch die Diaminobuttersäure-Acetyltransferase (EctA) zu N γ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure umgesetzt. Zuletzt erfolgt der Ringschluss durch die Ectoin-Synthase (EctC) (Louis & Galinski, 1997; Peters *et al.*, 1990). Die kodierenden Gene (*ectABC*) liegen bei *H. elongata* hintereinander angeordnet im Genom vor (Göller *et al.*, 1998). Bei *Streptomyces chrysomallus* konnte ein Enzym (ThpD) identifiziert werden, das die α -Ketoglutarat-abhängige Hydroxylierung von Ectoin zu Hydroxyectoin katalysiert (Grammel, 1999). Gleichermaßen konnte in *Salibacillus salexigens* eine Ectoin-Hydroxylase charakterisiert werden (Bursy *et al.*, 2004).

Die Anpassung an hyperosmotische Verhältnisse erfolgt jedoch nicht nur durch die Akkumulation dieser kompatiblen organischen Solute. Gerade nach einem hyperosmotischen Schock kommt es bei *H. elongata* und *E. coli* zu einer Akkumulation des anionischen nicht-kompatiblen Solutes Glutamat als Gegenion zu dem ebenfalls akkumulierten K⁺ (Dinnbier *et al.*, 1988; Kraegeloh, 1998; Kraegeloh & Kunte, 2002; Stumpe *et al.*, 1996). K⁺ und Glutamat übersteigen dabei in *H. elongata* gemeinsam nicht eine Konzentration von 800 mM. Im weiteren Verlauf wird K⁺/Glutamat bei *E. coli* innerhalb von ca. 2 h durch Trehalose ersetzt. Bei *H. elongata* setzt mit der Akkumulation von K⁺/Glutamat die Synthese von Ectoin ein, trotzdem bleibt der K⁺/Glutamat-Level über mindestens 8 h erhöht. Nach Kraegeloh & Kunte (2002) wird anschließend ein Absinken des K⁺-Levels auf das Grundniveau vermutet.

3. Kompatible Solute zur Stabilisierung von Proteinen und anderen zellulären Strukturen

Die Wirkung kompatibler Solute geht über ihre Funktion als osmoregulatorische Solute hinaus. Kompatible Solute können bestimmte Enzyme gegen unterschiedliche stressbedingte Schäden schützen. So konnten Lippert und Galinski (1992), Göller (1995) und Göller & Galinski (1999) für Glycin-Betain und Ectoin anhand der Lactat-Dehydrogenase (LDH) eine enzymstabilisierende Wirkung nachweisen. Lippert & Galinski (1992) und Knapp *et al.* (1999) zeigten durch Modellversuche mit Ribonuklease A, Phosphofruktokinase und LDH, dass Proteine unter Zusatz kompatibler Solute erst bei höherer Temperatur denaturieren. Für Trehalose konnte eine stabilisierende Wirkung auf *E. coli* Zellen bei Austrocknung gezeigt werden. Vermutet wird in diesem Zusammenhang eine stabilisierende Wirkung auf Membranen (Welsh & Herbert, 1999).

Wasserstoffbrückenbindungen, Van der Waals Kräfte, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen sind die thermodynamischen Kräfte, die für die Stabilisierung der Tertiärstruktur eines Proteins verantwortlich sind (Stryer, 1996). Ein zusätzlicher stabilisierender Einfluss wird in wässriger Lösung durch kompatible Solute ausgeübt. Erklärt wird diese Stabilisierung durch unterschiedliche Modelle, z.B. das Modell der „preferential interaction“ bzw. „preferential exclusion“ von Arakawa & Timasheff (1983). Ein neueres Modell beschreibt die stabilisierende Wirkung als einen „osmophoben Effekt“, der durch kompatible Solute hervorgerufen wird (Bolen & Baskakov, 2001). Hier erfolgt in

Analogie des „hydrophoben Effekts“ durch hydrophobe Aminosäureseitenketten eine zusätzliche Stabilisierung von Proteinen durch kompatible Solute. Der „hydrophobe Effekt“ bewirkt, dass sich in einem wässrigen Milieu die hydrophoben Seitenketten im Inneren der Proteine zusammenlagern, um so die Oberfläche zwischen sich und dem hydrophilen Medium Wasser zu minimieren. Der „osmophobe Effekt“ wirkt jedoch nicht auf die Seitenketten, sondern auf das Proteinerückgrat. Das Rückgrat eines Proteins wird in einer Solutelösung bevorzugt abgestoßen und so die native Proteinkonformation stabilisiert. So ist in einer solutereichen Lösung die Gibbs'sche-Energie (freie Transferenergie) eines denaturierten Proteins (größere Interaktionsfläche) im Vergleich zu der nativ gefalteten Form erhöht, da sich die Entropie des Wassers erhöhen würde. Damit ist der denaturierte Zustand thermodynamisch unvorteilhafter und das Gleichgewicht zwischen nativer und denaturierter Form wird in Richtung der nativen Struktur verschoben (Liu & Bolen, 1995). Zusätzlich steigern kosmotrope Verbindungen, wie kompatible Solute, Zucker, Salze und Aminosäuren die Oberflächenspannung einer wässrigen Lösung (Kita *et al.*, 1994; Lee & Timasheff, 1981).

Chaotrope Verbindungen wie Harnstoff senken die Oberflächenspannung des Wassers. Gleichzeitig ist Harnstoff ein gutes Lösungsmittel für das Rückgrat von Proteinen (Wang & Bolen, 1997), was in einer Destabilisierung der hydrophoben Wechselwirkungen resultiert. Beide Effekte führen zu einer Auffaltung von Proteinen und im Fall einer Exponierung von hydrophoben Seitenketten zu einer Aggregation von Proteinen.

Aufgrund der unterschiedlichen Einflüsse auf die Wasserstruktur und das Proteinerückgrat haben kompatible Solute einen dem Harnstoff entgegengesetzten Effekt. Die proteinstabilisierende Wirkung kommt dadurch zustande, dass sie das Proteinerückgrat wesentlich schlechter lösen als Wasser. Trimethylamin-N-oxid (TMAO) hat dabei eine besonders große stabilisierende Wirkung, so dass 1 M TMAO ausreicht, um den destabilisierenden Effekt von 2 M Harnstoff zu kompensieren (Wang & Bolen, 1997). Daher wird bei Haien und Rochen neben Harnstoff TMAO gegen den Salzstress des Meerwassers akkumuliert (Withers *et al.*, 1994).

4. Weitere Mechanismen der Antwort auf Stressbedingungen

Neben der Akkumulation der kompatiblen Solute als Osmolyte oder Schutzstoffe für Proteine und andere zelluläre Strukturen muss es noch andere Mechanismen der Anpassung geben, die für die Ausprägung von Halotoleranz oder Halophilie eines Organismus verantwortlich sind. Oren (2002) bestimmt als Voraussetzung für die Halophilie eines Organismus die Fähigkeit, bei einer Salinität von mindestens 10 % NaCl noch gut wachsen zu können, auch wenn das Optimum deutlich niedriger liegen kann. *E. coli* kann mit der *de novo* synthetisierten Trehalose bis zu einer Salinität von ca. 3,8 % NaCl in Mineralsalzmedium wachsen (Larsen *et al.*, 1987) und kann auch unter Zusatz bevorzugter kompatibler Solute (z.B. Glycin-Betain) nur eine Salinität von knapp über 5 % NaCl (Gouesbet *et al.*, 1994) tolerieren. Damit toleriert *E. coli* eine geringere Salinität als halotolerante bzw. marine *Bacteria*. Das halophile Gram-negative γ -Proteobakterium *H. elongata* verkraftet dagegen Salinitäten zwischen 0,3 und 25 % NaCl in Mineralsalzmedium ohne Zusatz externer Solute (Vreeland *et al.*, 1980). Diese im Vergleich zu *E. coli* wesentlich höhere Toleranz gegenüber hohen Salinitäten muss durch zusätzliche Mechanismen erreicht werden. Dabei dürfte auch die salzabhängige Anpassung von Membran-

lipiden (Imhoff & Thiemann, 1991; Thiemann & Imhoff, 1991), die spezielle Anpassung von Proteinen, aber auch das Vorhandensein effizienter „Renaturierungsmechanismen“ für geschädigte zelluläre Proteine eine entscheidende Rolle spielen. Jedoch beziehen sich diese Mechanismen der Anpassung nicht allein auf die Osmoadaptation oder Anpassung an hohe Ionenstärke.

4.1 Variation der Membranzusammensetzung

Biologische Membranen sind aus Phospholipiden aufgebaut, die unter physiologischen Bedingungen von selbst eine zweischichtige Struktur (Bilayer) ausbilden. Die treibende Kraft für diesen Prozess sind hydrophobe Interaktionen, welche zur Abschirmung der Acylketten vom Lösungsmittel Wasser und zur Exponierung der hydrophilen Kopfgruppen zum Wasser führen (Stryer, 1996).

Dynamische und strukturelle Charakteristika einer Membran können durch veränderliche Umweltbedingungen, veränderte molekulare Zusammensetzung oder das Hinzufügen „fremder“ Moleküle (z.B. Lösungsmittel), die mit der Membran interagieren, beeinflusst werden (Beney & Gervais, 2001). Wechselnde Umweltbedingungen führen zu einer veränderten Membranfluidität, jedoch können Zellen aktiv die Fluidität der Membran durch Variation ihrer Zusammensetzung auf einem optimalen Level halten.

In wässriger Lösung können Lipide als flüssig-kristalline Doppelschicht (L_{α} -Zustand), als kristalline Doppelschicht (Gelphase, L_{β} -Zustand) oder als nicht-lamellare Struktur (z.B. invertierter Hexagonal-II-Zustand (HII)) vorliegen (Abb. 1: (Beney & Gervais, 2001; Melchior, 1982)). Dabei kommt dem L_{α} -Zustand die größte biologische Bedeutung zu, da er die Funktion der Membran als Permeabilitätsbarriere sicherstellt. Zudem konnte dem L_{α} -Zustand eine proteinunterstützende Funktion nachgewiesen werden (Beney & Gervais, 2001). In diesem Zustand sind die Lipide beweglich. Verschiedene Parameter, z.B. erhöhter Druck oder sinkende Temperaturen, führen in einer bestehenden Membran zu einer zunehmenden Viskosität und bei einer kritischen Übergangstemperatur (T_m) zu einem Übergang zum L_{β} -Zustand. Trocknung, Hitze oder steigende Salinität führen zum Übergang vom L_{α} - zum HII-Zustand (Beney & Gervais, 2001). Cullis & de Kruijff (1979) vermuten eine biologische Bedeutung von HII in Transportvorgängen und Membranfusionen. Für beide Phasenübergänge gibt es eine veränderliche, da membran- und umweltabhängige, Übergangstemperatur ($T_m(L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}) < T_m(L_{\alpha} \rightarrow \text{HII})$). Mit steigender Salinität wird der Temperaturbereich, in dem L_{α} stabil ist, eingengt, da sich die Übergangstemperaturen aufeinander zubewegen (Seddon *et al.*, 1983; Sutton *et al.*, 1991).

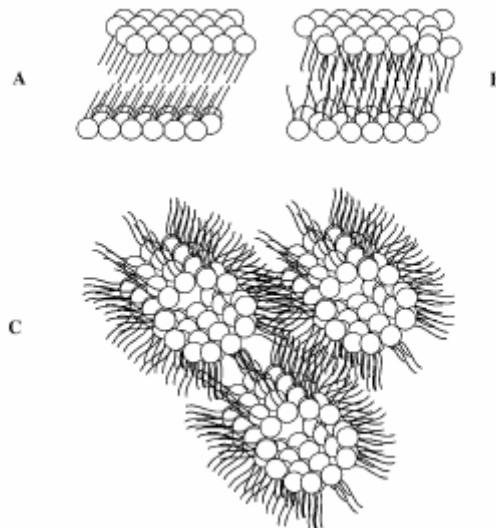


Abb. 1: Organisation von Phospholipiden

A: Doppelschicht in kristallinem L_{β} -Zustand (Gel-Phase), **B:** Doppelschicht in flüssig-kristallinem L_{α} -Zustand, **C:** nicht-lamellarer Hexagonal-Zustand (HII); Abbildung: (Beney & Gervais, 2001).

Die Kopfgruppen der Phospholipide bestimmen die Neigung der Membran, die unterschiedlichen Zustände einzugehen. Phosphatidylethanolamin (PE) und Cardiolipin sind potentielle Bildner nicht-lamellarer Strukturen (z.B. HII), während Phosphatidylglycerin (PG) und Phosphatidylcholin (PC) stabile Doppelschichten (L_{α}) ausbilden (Cullis & de Kruijff, 1979). Bei der Untersuchung der halophilen Organismen *Ectothiorhodospira mobilis*, *E. halophila* und *H. elongata* ist mit steigender Salinität eine Zunahme des anionischen Doppelschichten-bildenden PG zu beobachten (Thiemann & Imhoff, 1991; Vreeland *et al.*, 1984). Gleichzeitig kommt es bei *Ectothiorhodospira* Stämmen zu unterschiedlichen Reduzierungen der Anteile von PE bzw. Cardiolipin. Seddon (1990) führte aus, dass Cardiolipin über 1,5 M NaCl invertierte Micellen (nicht-lamellar) ausbildet, um die Dehydratation der Kopfgruppen zu verstärken, während PG auch bei hohen Salzkonzentrationen über einen weiten Temperaturbereich (-50 bis +50 °C) Doppelschichten ausbildet (Sutton *et al.*, 1991).

Nicht nur die Kopfgruppen der Lipide, sondern auch die Fettsäurereste spielen bei der Stabilität der Membran eine bedeutende Rolle. Die Kontrolle der Membranfluidität durch Variation der Fettsäuren wird unter dem Begriff der „homeoviscous adaptation“ zusammengefasst (Sinensky, 1974). Wiederum bei *Ectothiorhodospira* wurde bei steigender Salinität eine Zunahme von kurzkettigen und gesättigten Fettsäuren beobachtet (Imhoff & Thiemann, 1991). Kürzere und gesättigte Fettsäurereste unterstützen den L_{α} -Zustand durch Steigerung der Übergangstemperatur (T_m) von L_{α} nach HII (Seddon, 1990).

Interaktionen von Alkoholen oder organischen Lösungsmitteln mit dem hydrophoben Kern der Membran beeinflussen deren Fluidität und destabilisieren sie. In diesem Prozess wurden erhöhte Beweglichkeit der Acylketten, erhöhte Permeabilität für hydrophile Verbindungen und ein Übergang zum HII-Zustand bei *E. coli* beobachtet (Beney & Gervais, 2001). Bei einem Wachstum in Gegenwart von Ethanol verändert *E. coli* seine Membranzusammensetzung (Dombek & Ingram, 1984). Auch für Harnstoff hatten sich in Modellsystemen Hinweise auf membranschädigende Wirkungen ergeben,

welche die hydrophoben Wechselwirkungen der Membran betreffen ((Mukerjee & Ray, 1963) zitiert in (Barton *et al.*, 1999)). *In vivo* könnte dies zu einer Erhöhung der Fluidität der Membran führen, wofür an künstlichen Liposomen Hinweise gefunden werden konnten (Barton *et al.*, 1999). Folglich ist auch eine Veränderung der Membranzusammensetzung als Antwort auf hohe Harnstoffkonzentrationen denkbar. Festgestellt wurde in Vesikelexperimenten, dass eine geringere Membranfluidität auch eine verringerte Diffusion von Harnstoff zur Folge hat (Lande *et al.*, 1995; Mathai *et al.*, 2001).

4.2 Hitzeschock-Proteine, Chaperone und verwandte Funktionen

Hitzeschock-Proteine (Hsp) erfüllen vielfältige Aufgaben in der Proteinfaltung. Sie spielen jedoch nicht nur unter Hitzestressbedingungen sondern auch unter Normalbedingungen und hitzeunabhängigen Stresszuständen eine wichtige Rolle. Die Chaperone und Chaperonine von *E. coli* untergliedern sich in eine Vielzahl funktioneller Familien (Narberhaus, 2002).

Hsp100-Familie:

Die Chaperone mit dem höchsten Molekulargewicht stellen die Proteine der Hsp100-Familie (ClpB, ClpA und ClpX). ClpA und ClpX bilden hexamere Ringstrukturen aus und sind an der ATP-abhängigen Entfaltung von Proteinen als Vorbereitung für eine Proteolyse beteiligt. Sie bilden einen Teil der Proteasen ClpAP und ClpXP. ClpB ist als Hexa- oder Heptamer aktiv, ist dabei an der Auflösung von Proteinaggregaten beteiligt und stellt Proteine für eine Renaturierung durch das DnaK-System (Hsp70) bereit.

Hsp90-Familie:

HtpG verhindert eine Proteinaggregation und ist als Dimer aktiv. Wie ClpB wird es nach einem Hitzeschock verstärkt exprimiert (Richmond *et al.*, 1999). Die physiologische Funktion von HtpG ist noch nicht vollständig geklärt, vermutet wird jedoch eine Beteiligung an der nativen Faltung von Proteinen nach einem Hitzeschock (Thomas & Baneyx, 2000).

Hsp60 & Hsp70-Familien:

Gut untersuchte Gruppen von Chaperonen sind die Mitglieder der Familien Hsp 60 und Hsp70. Unter normalen, nicht gestressten Bedingungen durchlaufen bei *E. coli* ca. 20 – 30 % der cytoplasmatischen Proteine während ihrer Synthese die DnaK (Hsp70) bzw. GroEL (Hsp60) Chaperon-Maschinerie (Narberhaus, 2002). DnaJ und GrpE bzw. GroES dienen diesen Systemen als Cochaperone. Defekte in DnaK werden bei *E. coli* erst bei hohen Temperaturen erkennbar (Paek & Walker, 1987), während GroEL auch unter Normalbedingungen essentiell ist (Fayet *et al.*, 1989). Die Bedeutung von DnaK für die Stressanpassung wird auch darin deutlich, dass es nach einem Hitzeschock eines der am stärksten exprimierten Systeme ist (Richmond *et al.*, 1999).

Sowohl DnaK als auch GroEL erkennen hydrophobe Bereiche in ungefalteten Proteinen. Jedoch führen beide Systeme völlig unterschiedliche Arten der Prozessierung von Substratproteinen aus. DnaK ist als Monomer aktiv. Seine Substratbindungsdomäne besitzt einen Kanal mit einer hydrophoben Tasche (Zhu *et al.*, 1996) und bindet daher kurze hydrophobe Bereiche in großen Substrat-

proteinen. GroEL bildet einen zylindrischen Komplex aus zwei Homoheptameren (Xu *et al.*, 1997), in dem komplette kleinere Substratproteine (20 – 60 kDa) umschlossen werden können (Houry *et al.*, 1999).

Der Prozessierungszyklus von DnaK wird durch DnaJ und GrpE angetrieben (Beissinger & Buchner, 1998; Bukau & Horwich, 1998). DnaJ aktiviert die ATPase- und Bindungsfunktion von DnaK, GrpE fördert den Austausch von ADP gegen ATP.

ATP und GroES regulieren Konformationsänderungen in GroEL und fördern so die Faltung von Peptiden in der zentralen Höhlung. ATP-Hydrolyse entlässt GroES und das Substratprotein aus dem Komplex mit GroEL (Bukau & Horwich, 1998).

α -kristalline Hitzeschock-Proteine (α -Hsp-Familie):

Eine weitere Gruppe von Chaperonen bilden die α -kristallinen Hsps, wie z.B. IbpAB bei *E. coli*. Ihre Bedeutung bei der Antwort auf Hitzestress wird durch ihre besonders starke Expression nach einem Hitzeschock hervorgehoben. Diese übertrifft sogar noch die Expression von DnaK. Unter optimalen Wachstumsbedingungen produzieren die meisten Bakterien vernachlässigbar geringe Mengen von α -Hsps. In *E. coli* wird *ibpAB* nach einem Hitzeschock um den Faktor 300 verstärkt transkribiert (Richmond *et al.*, 1999). Identifiziert wurden sie als „inclusion-body“-assoziierte Proteine bei der Überexpression rekombinanter Proteine (Allen *et al.*, 1992). Eine Überexpression von *ibpAB* in *E. coli* führt zu erhöhter Hitze- und Superoxidresistenz (Kitagawa *et al.*, 2000). Eine *ibpAB*-Deletion in *E. coli* zeigt nur in Kombination mit einer DnaK-Deletion Auswirkungen. Gleichzeitige Mutationen in *groESL* haben keine Auswirkungen. Dadurch lässt sich eine enge Kooperation mit der DnaK-Maschinerie erschließen (Thomas & Baneyx, 1998). DnaK entlässt vermutlich die Substratproteine aus dem Komplex mit α -Hsps. Die weitere Aufarbeitung kann dann wahrscheinlich auch durch das GroEL-System erfolgen (Veinger *et al.*, 1998).

Anders als die übrigen Chaperone zeigen α -Hsps keine ATPase-Aktivität (Jakob *et al.*, 1993). Sie binden denaturierte Proteine und verhindern unvorteilhafte Interaktionen, die zu einer Aggregation von Proteinen führen können. Daher scheint es die Aufgabe der α -Hsps zu sein, Substratproteine in einem faltbaren Zustand zu halten (Lee *et al.*, 1997). Sie selbst führen keine Faltung von Proteinen durch und prägen ihre Funktion nur in dem Multichaperon-Netzwerk aus. Die Bindungskapazität der α -Hsps liegt deutlich über der von GroEL. GroEL bindet ein Substratmolekül pro 14 Untereinheiten, während die α -Hsps eine molare Bindungsrate von 1:1 aufweisen können (Narberhaus, 2002).

α -Hsps bilden sehr große oligomere Strukturen unterschiedlichen Ausmaßes, die im Fall von IbpB von *E. coli* bis zu 2 MDa groß sein können (Shearstone & Baneyx, 1999). Hsp16,5 aus *Methanococcus jannashii* bildet Komplexe mit einem Molekulargewicht von ca. 400 kDa, die sich aus 24 Untereinheiten zusammensetzen (Kim *et al.*, 1998). Die Oligomergröße, in der die α -Hsps ihre Chaperon-Aktivität entfalten, ist sehr variabel (Narberhaus, 2002). Beim Aufbau dieser oligomeren Strukturen kommt es zu einer dynamischen Polymerisierung und Depolymerisierung. Die meisten α -Hsps bilden eine sphärische Struktur mit einer zentralen Höhlung. Dabei dienen kleinere Partikel aus wenigen Untereinheiten als Bausteine. Temperaturerhöhungen führen bei IbpB zu Konformationsänderungen und zur Präsentation hydrophober Sequenzbereiche (Shearstone & Baneyx, 1999). Diesen wird eine

Funktion in der Erkennung falschgefalteter Proteine zugerechnet, bei denen ebenfalls hydrophobe Sequenzbereiche exponiert sein können.

Hsp33-Familie:

Bei Hsp33 von *E. coli* handelt es sich um ein redoxreguliertes Chaperon, das die Aggregation thermisch oder oxidativ geschädigter Proteine verhindert (Jakob *et al.*, 1999). Hauptmerkmal sind konservierte Cysteinreste, die im reduzierten, monomeren Zustand des Proteins ein Zink koordinieren. Nach der Oxidation von Hsp33 wird Zink entlassen und Hsp33 geht in eine aktive dimere Form über (Barbirz *et al.*, 2000).

5. Ziel der Arbeit

Halomonas elongata DSM 2581^T (Familie *Halomonadaceae*, Ordnung *Oceanospirillales*), ein halophiles, Gram-negatives γ -Proteobakterium wurde erstmals aus einem Salzgewinnungsbecken (solar saltern, 25 % NaCl) auf den niederländischen Antillen (Insel Bonaire) isoliert (Vreeland *et al.*, 1980). *H. elongata* ist für die Erforschung von Mechanismen der Osmoadaptation von großem Interesse, da es in Mineralsalzmedium ein weites Salinitätsspektrum (0,3 – 25 % NaCl) toleriert und außerdem genetisch sehr gut zugänglich ist (Göller, 1999; Kunte & Galinski, 1995).

An *H. elongata* wurden in den letzten Jahren verschiedenste Untersuchungen bezüglich der Stressanpassung, vor allem der Anpassung an hohe externe Mediensalinität durchgeführt.

Charakteristisch für *H. elongata* ist die schnelle Akkumulation von Kalium nach einem hyperosmotischen Schock. Dabei wird gleichzeitig Glutamat als Gegenion akkumuliert. Für die Akkumulation von Kalium verantwortlich sind die Aufnahmesysteme TrkAI und TrkAH (Kraegeloh & Kunte, 2002; Kraegeloh, 2003; Kraegeloh *et al.*, 2004). Gleichermaßen wird durch *E. coli* Kalium zusammen mit Glutamat akkumuliert (Dinnbier *et al.*, 1988; Stumpe *et al.*, 1996). Mit der Akkumulation von Kalium setzt bei *H. elongata* die Synthese des kompatiblen Solute Ectoin ein, jedoch bleibt der Kalium-Level über mehr als 8 Stunden erhöht und sinkt dann ab. Bei *E. coli* erfolgt die Kalium-Akkumulation kurzfristiger. Die einsetzende *de novo* Synthese von Trehalose führt zu einem schnelleren Absinken des im Vergleich zu *H. elongata* höheren Kalium-Levels.

Bisher wurden vier Transportsysteme zur Aufnahme kompatibler Solute in *H. elongata* gefunden. Bei dem sekundären Transporter TeaABC (Grammann *et al.*, 2002), der zur Familie der TRAP-Transporter gehört (Forward *et al.*, 1997), handelt es sich um ein Aufnahmesystem für Ectoin. BetH und BetG sind Mitglieder der BCC-Transporter und sind für die Glycin-Betain-Aufnahme verantwortlich. Außerdem wurden drei Genorte (*proX*, *opuAA* und *opuAB*) identifiziert, die für Komponenten potentieller ABC-Transporter kodieren (Kraegeloh, 2003). Die Aufnahme von Betain und Prolin ist einer Mutante von *H. elongata*, der diese genannten vier Transporter fehlen, noch immer möglich (Kraegeloh, 2003). Daher muss mindestens ein fünfter Transporter vorhanden sein. In *E. coli* K-12 gibt nur zwei Transportsysteme für die unterschiedlichen Solute. Dabei handelt es sich um die Aufnahmesysteme ProU (ABC-Transporter, Glycin-Betain, (Gowrishankar, 1989)) und ProP (sekundärer MFS-Transporter, Prolin, Glycin-Betain, Ectoin, (Culham *et al.*, 1993)). Vor kurzem wurde

außerdem in einem pathogenen *E. coli* Stamm ein Transporter identifiziert, der zur Gruppe der BCC-Transporter gehört (Ly *et al.*, 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es neue Mechanismen zu identifizieren, die *H. elongata* ein Wachstum bei 25 % NaCl in Mineralsalzmedium ermöglichen, *E. coli* jedoch ohne Zusatz von kompatiblen Soluten nur ein Wachstum bei maximal ca. 3,8 % NaCl erlauben.

H. elongata und *E. coli* besitzen ähnliche Grundvoraussetzungen was die Mechanismen der Osmoadaptation angeht. Trotzdem weisen beide Organismen grundverschiedenen Toleranzen auf, was ihre Anpassungsfähigkeit an hohe Ionenstärke des umgebenden Mediums betrifft. Begründet werden kann dies z.T. durch die *de novo* synthetisierten kompatiblen Solute, durch die Strategie der Anpassung nach einem hyperosmotischen Schock, aber auch durch qualitative Unterschiede der Transportsysteme. So besitzt *H. elongata* eine viel größere Anzahl von Transportern, die z.T. zusätzlich auf ein kompatibles Solut spezialisiert sind. TeaABC von *H. elongata* transportiert als einzige Substrate Ectoin und Hydroxyectoin. Es müssen jedoch in halophilen Organismen noch weitere Strategien vorhanden sein, da *E. coli* auch mit Zusatz externer bevorzugter Solute (z.B. Betain) nur eine Salinität von etwas über 5 % NaCl toleriert. Es kann sich dabei um zusätzliche Mechanismen halophiler Organismen handeln, aber auch um Mechanismen, die gleichzeitig in *H. elongata* und *E. coli* vorkommen. In letzterem Fall müsste der Anpassungsmechanismus qualitative Unterschiede aufweisen oder selbst den Salinitätsbereich, in welchem dem Organismus ein Wachstum möglich ist, mitbestimmen.

Erste Schritte in Richtung der Zielsetzung waren durch die Identifizierung der salzsensitiven Transposonmutante (Tn1732) *H. elongata* ABU44 getan worden (Burdziak, 1999). Das Wachstumsdefizit dieses Stammes schien unabhängig von der Ectoin-Synthese zu sein und deutete auf einen neuen Mechanismus in der Osmoadaptation hin. Tn1732 hatte in der Promotorregion zweier entgegengesetzt orientierter hypothetischer Gene, *yhgI* und *metH*, inseriert. Welches der Gene durch die Mutation betroffen war, blieb unklar. Zu beiden Genen oder abgeleiteten Proteinsequenzen gibt es ähnliche Sequenzen in *E. coli*.

Basierend auf diesen ersten Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit eine vergleichende molekularbiologische und physiologische Analyse dieser neuen Komponente der Osmoadaptation in *H. elongata* DSM 2581^T und *E. coli* K-12 durchgeführt. Dabei wurde zunächst mittels molekularbiologischer Techniken und physiologischer Charakterisierungen die Relevanz von *yhgI* und *metH* für die Osmoadaptation von *H. elongata* geklärt. Damit vergleichend wurden entsprechende Experimente auch mit *E. coli* durchgeführt. In weiteren Untersuchungen wurde eine mögliche Beteiligung von *yhgI* an Kompetenzmechanismen überprüft. Dabei kam u.a. das BacterioMatch[®] Two-Hybrid-System zum Einsatz. Zur Untermauerung der physiologischen Relevanz wurden anschließend Analysen der transkriptionsregulatorischen Elemente von *yhgI* in beiden Organismen vorgenommen, um dann, den Hinweisen aus der Literatur nachgehend, den Einfluss einer *yhgI*-Deletion auf die Anpassungsfähigkeit von *H. elongata* und *E. coli* an salzunabhängige Stressbedingungen zu bestimmen. Zuletzt wurde eine heterologe Expression von Yhgl aus *H. elongata* als (His)₆-tag Fusionsprotein durch-

geführt. Nach der Reinigung durch Nickelchelate-Chromatographie wurde das Protein mit Hilfe biochemischer Methoden charakterisiert.

II. Material und Methoden

1. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

<i>Halomonas elongata</i> Stämme	Genotyp	Herkunft/ Referenz
DSM 2581 ^T	Wildtyp	(Vreeland <i>et al.</i> , 1980)
ABU44	Tn1732-Mutante von <i>H. elongata</i>	(Burdziak, 1999)
KB4	<i>metH::Ω</i>	diese Arbeit
KB5	Δ <i>yhgl::Ω</i>	diese Arbeit
KB6	Δ <i>yhgl</i>	diese Arbeit
KB7	Δ <i>yhgl::yhgl</i> _{Ec}	diese Arbeit

Tab. 1a: Verwendete *Halomonas elongata* Stämme

<i>Escherichia coli</i> Stämme	Genotyp	Herkunft/Referenz
K-12	Wildtyp	DSM 498
DH5 α	F ⁻ , <i>supE44</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>relA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>gyrA96</i> , λ -, <i>thi-1</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZΔM15</i>)	(Hanahan, 1983)
S17-1	RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7) chromosomal integriert; Sm ^R , Pro	(Simon <i>et al.</i> , 1982)
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , λ , (DE3)	(Studier & Moffat, 1986)
XL1-blue MRF ⁺ Kan ^R	Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn5</i> (Kan ^R)]	Stratagene
BacterioMatch [®] I (Reporterstamm)	Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>lacI^q bla lacZ</i> Kan ^R]	Stratagene
BK1	Δ <i>yhgl</i>	diese Arbeit
BK2	Δ <i>yhgH ΔbioH</i> 1-11	diese Arbeit
BK3	Δ <i>yhgH</i> 52-618	diese Arbeit
BK4	Δ <i>yhgH</i> 522-729	diese Arbeit

Tab. 1b: Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Plasmide	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pK18 <i>mobsacB</i>	Km ^R , <i>lacZ'</i> , <i>mob</i> , <i>sacB</i> , ori pMB1	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK18KB4	pK18 <i>mobsacB</i> mit PCR-Produkt zur KB4-Herstellung	diese Arbeit
pK18KB4::Ω	pK18 <i>mobsacB</i> mit PCR-Produkt und integrierter Ω-Kassette zur KB4-Herstellung	diese Arbeit
pK18KB5	pK18 <i>mobsacB</i> mit SOE-Produkt zur KB5/KB6-Herstellung	diese Arbeit
pK18KB5::Ω	pK18 <i>mobsacB</i> mit SOE-Produkt zur KB5-Herstellung	diese Arbeit

pK18KB7	pK18 <i>mobsacB</i> mit PCR-Produkt zur KB7-Herstellung	diese Arbeit
pK18BK3	pK18 <i>mobsacB</i> mit PCR-Produkt zur BK3-Herstellung	diese Arbeit
pK18BK3ΔNdel	pK18 <i>mobsacB</i> mit verkürztem PCR-Produkt zur BK3-Herstellung	diese Arbeit
pMAK705	Cm ^R , <i>lacZ'</i> , ori pSC101 (temperatursensitiv)	(Hamilton <i>et al.</i> , 1989)
pMAKBK1	pMAK705 mit SOE-Produkt zur BK1-Herstellung	diese Arbeit
pMAKBK2	pMAK705 mit SOE-Produkt zur BK2-Herstellung	diese Arbeit
pMAKBK3ΔNdel	pMAK705 mit verkürztem PCR-Produkt zur BK3-Herstellung	diese Arbeit
pMAKBK4	pMAK705 mit SOE-Produkt zur BK4-Herstellung	diese Arbeit
pHSG575	Cm ^R , <i>lacZ'</i> , ori pSC101	(Takeshita <i>et al.</i> , 1987)
pHSGyhgIHe	pHSG575 mit integr. <i>yhgI</i> aus <i>H. elongata</i>	diese Arbeit
pHSGyhgIHe-His	pHSG575 mit integr. <i>yhgI-His</i> aus <i>H. elongata</i>	diese Arbeit
pHSGyhgH	pHSG575 mit integr. <i>yhgH</i> aus <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pHSGNoProF	pHSG575 mit <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> , ohne Promotor, entsprechend <i>lacZ'</i> orientiert	diese Arbeit
pHSGNoProR	pHSG575 mit <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> , ohne Promotor, entgegen <i>lacZ'</i> orientiert	diese Arbeit
pHSG54FusF	pHSG575 mit <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> als σ^{54} -Promotor-Fusion, entsprechend <i>lacZ'</i> orientiert	diese Arbeit
pHSG54FusR	pHSG575 mit <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> als σ^{54} -Promotor-Fusion, entgegen <i>lacZ'</i> orientiert	diese Arbeit
pHSGHeatCF	pHSG575 mit <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> als σ^{32} -Promotor-Fusion, entsprechend <i>lacZ'</i> orientiert	diese Arbeit
pHSGHeatCR	pHSG575 mit <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> als σ^{32} -Promotor-Fusion, entgegen <i>lacZ'</i> orientiert	diese Arbeit
pHSGyhgIEcF	pHSG575 mit <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> mit σ^{70} -Promotor, entsprechend <i>lacZ'</i> orientiert	diese Arbeit
pHSGyhgIEcR	pHSG575 mit <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> mit σ^{70} -Promotor, entgegen <i>lacZ'</i> orientiert	diese Arbeit
pHSGBK4F	pHSG575 mit <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> als PCR-Produkt aus BK4, entsprechend <i>lacZ'</i> orientiert	diese Arbeit
pHSGBK4R	pHSG575 mit <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> als PCR-Produkt aus BK4, entgegen <i>lacZ'</i> orientiert	diese Arbeit
pHP45	Amp ^R , Ω (Sm ^R /Spec ^R), ori pMB1	(Prentki & Krisch, 1984)
pBBR1MCS	Cm ^R , <i>lacZ'</i> , <i>mob</i>	(Kovach <i>et al.</i> , 1994)
pBByhgIHe	pBBR1MCS1 mit integriertem <i>yhgI</i> aus <i>H. elongata</i>	diese Arbeit
pBByhgIEc	pBBR1MCS1 mit integriertem <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET22b(+)	Amp ^R , T7 <i>lac</i> , pelB, His-tag	Novagen (Madison/WI, USA)
pETY5	pET22b(+) mit integriertem <i>yhgI</i> aus <i>H. elongata</i> , C-terminale (His) ₆ -tag-Fusion zur heterologen Expression	diese Arbeit
pBT	Cm ^R , ori p15A, <i>lacUV5</i> Promotor, λ cl-Protein	Stratagene
pBTyhgIEc	pBT mit integriertem <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> K-12, λ cl-Fusion	diese Arbeit
pBTyhgIHe	pBT mit integriertem <i>yhgI</i> aus <i>H. elongata</i> , λ cl-Fusion	diese Arbeit

pBTyhgH	pBT mit integriertem <i>yhgH</i> aus <i>E. coli</i> K-12, λ cl-Fusion	diese Arbeit
pBT-LGF2	pBT mit integrierter LGF2 Dimerisierungsdomäne des Gal4 Aktivatorproteins, λ cl-Fusion	Stratagene
pTRG	Tet ^R , ori ColE1, lacUV5 & lpp Promotor, Fusion mit α -UE der RNA-Polymerase	Stratagene
pTRGyhgIEc	pTRG mit integriertem <i>yhgI</i> aus <i>E. coli</i> K-12, Fusion mit α -UE der RNA-Polymerase	diese Arbeit
pTRGyhgIHe	pTRG mit integriertem <i>yhgI</i> aus <i>H. elongata</i> , Fusion mit α -UE der RNA-Polymerase	diese Arbeit
pTRGyhgH	pTRG mit integriertem <i>yhgH</i> aus <i>E. coli</i> K-12, Fusion mit α -UE der RNA-Polymerase	diese Arbeit
pTRG-Gal11 ^P	pTRG mit integrierter Domäne einer Mutantenform des Gal 11 Proteins, Fusion mit α RNA-Polymerase	Stratagene

Tab. 2: Verwendete Plasmide

2. Nährmedien

Die Nährmedien wurden je nach Bedarf mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen hergestellt (0,5 % bis 16 % NaCl). Die Prozentangabe (w/v) der zugefügten NaCl-Menge ist der Medienbezeichnung angehängt, z.B. steht MM63-2 für MM63-Medium mit 2 % NaCl. Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der entsprechenden Medien aufgeführt.

2.1 Medien zur Stammhaltung und Selektion von *H. elongata* und *E. coli*

Minimalmedium MM63: (Miller, 1972) modifiziert nach (Larsen *et al.*, 1987) (l⁻¹)

KH ₂ PO ₄	13,61	g	
KOH	4,21	g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98	g	
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25	g	
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,0011	g	(als Stammlösung zugegeben)
NaCl	variabel	%	
pH 7,2 mit KOH (1 M)			
Glucose x H ₂ O	5,0	g	
Agar	2,0	%	

Das Medium wurde zur Stammhaltung von *H. elongata*, aber auch zur Selektion von Konjuganten und für Stressexperimente verwendet. Glucose wurde getrennt von der Mineralsalzlösung sterilisiert und nach Abkühlen des Mediums zugegeben. Für die Herstellung von Agarplatten wurden die Salze in

0,7 l H₂O_{demin.} gelöst. Glucose wurde zusammen mit 2 % Agar in dem Restvolumen (0,3 l) gelöst. Betain wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugesetzt.

AB-Medium: (l⁻¹)

Antibiotic medium No. 3	17,5	g
NaCl	variabel	%
pH 7,2		

Mit 2 % Agar wurde das Medium zur Stammhaltung, ohne Agar für die Anzucht von Übernachtskulturen eingesetzt.

2.2 Medien für Übernacht- und Vorkulturen von *E. coli* und *H. elongata*

LB-Medium (Luria Bertani Medium): (Miller, 1972) (l⁻¹)

Caseinhydrolysat (Trypton)	10	g
Hefeextrakt	5,0	g
NaCl	variabel	%
pH 7,2		

Mit 2 % Agar wurde dieses Medium zum Ausplattieren von Transformationsansätzen verwendet.

2.3 Medien für Transformationsexperimente mit *E. coli*

SOB-Medium: (Inoue *et al.*, 1990) (l⁻¹)

Caseinhydrolysat (Trypton)	20,0	g	
Hefeextrakt	5,0	g	
NaCl	0,585	g	
KCl	0,187	g	
MgCl ₂ x 6H ₂ O	2,033	g	
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,493	g	(wurde getrennt sterilisiert)
pH 6,7			

Dieses Medium wurde zur Anzucht von *E. coli* bei der Herstellung superkompetenter Zellen verwendet.

SOC-Medium: (Inoue *et al.*, 1990) (l⁻¹)

SOB-Medium + 20 mM Glucose

Nach Zugabe von Glucose wurde das gesamte Medium sterilfiltriert und aliquotiert. Verwendet wurde dieses Medium zur Regeneration der *E. coli* Zellen bei der Transformation.

2.4 Medien für Konjugationsexperimente mit *H. elongata*

Bouillonmedium (NB): (l⁻¹)

Nährbouillon	8,0	g
NaCl	1,0	%

Das Medium wurde für Konjugationsexperimente zur Anzucht von *H. elongata* Übernachtskulturen verwendet.

2.5 Medien für die Herstellung chromosomaler Mutationen in *H. elongata*

LBG-Medium: (l⁻¹)

Caseinhydrolysat (Trypton)	10	g
Hefeextrakt	5,0	g
Glucose x H ₂ O	2,0	g
NaCl	2,0	%
pH7,2		

Dieses Medium wurde bei der Herstellung der *H. elongata* Mutanten für Schüttelkulturen eingesetzt. Hier erfolgt spontan der zweite Rekombinationsprozess zur Ausgliederung des Vektors aus dem Genom.

LBG-Saccharose-Medium: (l⁻¹)

wie LBG-Medium +

Saccharose	220	g
Agar	2	%
pH 7,2		

Mit diesem Medium wurden *H. elongata* Mutanten selektioniert, bei denen der zweite Rekombinationsprozess stattgefunden hat.

2.6 Medienzusätze

Antibiotika:

Zur Selektion plasmidtragender *E. coli* und *H. elongata* Stämme oder zur Selektion von Mutanten enthielten die Medien Antibiotika. Chloramphenicol (Stammlösung in 98 % Ethanol) wurde dem Medium vor dem Autoklavieren zugesetzt. Die übrigen Antibiotika (Stammlösung in H₂O_{demin.}) wurden erst nach dem Autoklavieren in unterschiedlicher Konzentration zum handwarmen Medium gegeben (Tab. 3).

Antibiotikum	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) für Selektion von <i>E. coli</i>	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) für Selektion von <i>H. elongata</i>
Ampicillin (Amp)	100 (LB und AB-0,5)	n.v.
Carbenicillin (Carb)	100 (LB und AB-0,5)	n.v.
Chloramphenicol (Cm)	50 (LB und AB)	100 (MM63, LB und AB)
Kanamycin (Km)	50 (LB und AB-0,5)	250 (MM63-2), 100 (MM63-1, AB-2)
Spectinomycin (Spec)	200 (LB und AB-0,5)	n.v.
Streptomycin (Sm)	200 (LB und AB-0,5)	800 (MM63-2), 200 (LB und AB-2)
Tetracyclin (Tet)	15 (LB und AB-0,5)	n.v.

Tab. 3: Antibiotika-Endkonzentrationen im Medium zur Selektion von resistenten *E. coli* und *H. elongata* Stämmen

In der ersten Spalte der Tabelle sind die verschiedenen Antibiotika nebst ihrer Abkürzung (in Klammern) angegeben. In der zweiten und dritten Spalte sind die Medien-Endkonzentrationen der unterschiedlichen Antibiotika für verschiedenen Medien aufgeführt, die für die Selektion Antibiotika-resistenter Stämme verwendet wurden. „n.v.“ bedeutet „nicht verwendet“. Antibiotikakonzentrationen sind im Folgenden verkürzt angegeben. So bedeutet Cm50: 50 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol.

Vitamine, Aminosäuren und kompatible Solute:

Biotin wurde in den Wachstumsexperimenten mit *yhgH*-Deletionsmutanten von *E. coli* K-12 eingesetzt. Von einer sterilen Biotin-Stammlösung (0,1 g/l in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$) wurden 1,5 ml pro Liter gebrauchsfertigen Mediums eingesetzt. Methionin wurde als sterilisierte Stammlösung nach dem Autoklavieren dem Medium in einer Endkonzentration von 1 mM, 2 mM, 10 mM und 20 mM zugegeben, um das auxotrophe Wachstum von *H. elongata* KB4 zu komplementieren. Glycin-Betain (Betain) wurde als sterile Stammlösung (1 M) in einer Endkonzentration von 5 mM bei den Untersuchungen zur Salzsensitivität von *E. coli* Mutanten eingesetzt

3. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für DNA-Isolierung und Lagerung:

EB-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,5
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
TES-Puffer	50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8,0
Natriumacetat-Puffer	3 M Na-Acetat, pH 4,8
SDS-Lösung	20 % (w/v) SDS in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$

Puffer und Lösungen für RNA-Isolierung:

Puffer A	50 mM Na-Acetat x 3 H_2O , 10 mM EDTA
Chloroform/Isoamylalkohol	24 ml Chloroform, 1 ml Isoamylalkohol
Phenol/Chlorof./Isoamylalk.	Phenol : Chloroform/Isoamalyalkohol-Gemisch (1:2)
Na-Acetat	3 M in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$
SDS-Lösung	10 % (w/v) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$

Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese mit DNA:

TB-Puffer	90 mM Tris, 90 mM Borat, 2,5 mM EDTA, ca. pH 8,3 (kann 5 bis 10 x angesetzt werden)
Probenpuffer (6 x)	60 mM EDTA, 0,09 % (w/v) Bromphenolblau, 60 % (v/v) Glycerol

Puffer und Lösungen für die Transformation:

TFB-Puffer	10 mM PIPES, 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl, 55 mM MnCl ₂ (sterilfiltriert zugesetzt), pH 6,7
------------	---

Puffer und Lösungen für Southern-Hybridisierung:

Denaturierungslösung	0,4 M NaOH
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7,5
SDS-Lösung	10 % (w/v) SDS in H ₂ O _{demin.}
20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Acetat
SSC-A	2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS
SSC-B	0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS
Vorhybridisierungslösung	25 ml 20 x SSC, 0,3 ml (35 %ig) Lauroylsarcosin, 0,2 ml 10 % (w/v) SDS, 0,5 g Blockingreagenz ad. 100 ml
Hybridisierungslösung	5-10 ml Vorhybridisierungslösung mit frisch denaturierter (10 min kochen) Digoxigenin (DIG)-Sonden-DNA
Puffer 1	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 (bis 10 x anzusetzen)
Puffer 2	0,5 % (w/v) Blockingreagenz in Puffer 1
Puffer 3	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , pH 9,5 (nur kurz aufkochen, nicht autoklavieren)
Puffer 4	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 (bis 10 x anzusetzen)

Puffer und Lösungen für Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Laufpuffer SDS-Page	50 mM Tris-HCl, 0,37 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3 - 8,6
Laufpuffer native Page	50 mM Tris-HCl, 0,37 M Glycin, pH 8,3 - 8,6
den./red. Probenpuffer (2 x)	0,5 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Glycerin, 4 % SDS, 1,25 % (v/v) β-Mercaptoethanol, Spatelspitze Bromphenolblau
nativer Probenpuffer (2 x)	0,5 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Glycerin, Spatelspitze Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0,115 % (w/v) Coomassie-brilliant-blue R250 (über Nacht rühren, dann filtrieren)
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0,8 l H ₂ O _{demin}

Puffer und Lösungen für Western-Blot:

Towbin-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, ca. pH 8,3 (nicht titrieren)
TBS	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
TBSTT	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,5, dann 0,05 % (v/v) Tween- 20, 0,2 % (v/v) TritonX-100
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , pH 9,4
Blockierungsreagenz	TBS mit 1 % (w/v) Casein, 3 % (w/v) BSA Fraktion V, (pH auf 7,5 nachtitrieren)
Lsg. sekundärer Antikörper	TBS mit 1 % (w/v) Casein und 10 % (w/v) Magermilchpulver

Puffer und Lösungen für Nickelchelate-Chromatographie:

Bindepuffer (8x)	160 mM Tris-HCl, 40 mM Imidazol, 4 M NaCl, pH 7,9
Waschpuffer (St-Lsg.)	20 mM Tris-HCl, 80 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, pH 7,9
Verd. für Waschpuffer	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,9
Elutionspuffer (4x)	80 mM Tris-HCl, 4 M Imidazol, 2 M NaCl, pH 7,9
Entladepuffer (4x)	80 mM Tris-HCl, 0,4 M EDTA, 2 M NaCl, pH 7,9
Ladepuffer (8x)	0,4 M NiSO ₄

Puffer für Insulin-Reduktionstest:

Puffer für Insulin-Stammlsg.	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Reaktionspuffer	0,1 M KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , 2 mM EDTA, pH 7,0

4. Kultivierungsverfahren**4.1 Stammhaltung**

H. elongata DSM 2581^T und seine Mutanten wurden abwechselnd auf AB-3 und MM63-3 Medium (ggf. mit Antibiotikum) ausgestrichen und gelagert. Dazu wurde der Organismus alle zwei bis drei Monate überimpft.

E. coli Stämme wurden über Zeiträume bis zu drei Monaten auf Agarplatten mit AB-0,5 Medium (gegebenenfalls mit Antibiotikum) kultiviert. *E. coli* K-12 und seine Mutanten wurde zusätzlich im Abstand von ca. drei Monaten auf ihr Vermögen zum Wachstum auf MM63-Medium hin überprüft.

4.2 Allgemeine Bakterienanzucht

Die Anzucht von *E. coli* und *H. elongata* Stämmen für Isolierung von genomischer oder Plasmid-DNA, für die Herstellung kompetenter Zellen sowie für Konjugationsexperimente erfolgte in 25 – 50 ml Flüssigmedium. Die Kulturen wurden mit Kolonien von einer Agarplatte beimpft. Für die Anzucht wurden, falls nicht anders angegeben, sog. OD-Kolben (250 ml mit 50 ml Medium) oder Erlenmeyerkolben (100 ml mit 25 ml Medium) verwendet. Die OD-Kolben sind mit Schikane und einem seitlich angebrachtem Glasrohr ausgestattete Erlenmeyer-Weithalskolben, in denen die OD mit

Hilfe des Glasrohres direkt in einem Photometer bestimmt werden kann. Die Anzucht der Organismen erfolgte, falls nicht anders angegeben, über Nacht bei 37 °C für *E. coli* und bei 30 °C für *H. elongata* in einem Thermoschüttler bei 180 upm (Infors AG, Bottminger, Schweiz).

4.3 Messung des bakteriellen Wachstums

Zur groben Bestimmung des bakteriellen Wachstums wurde die OD₆₀₀ gegen Luft als Nullwert gemessen. Diese konnte, bei Verwendung von OD-Kolben, ohne Probennahme direkt gemessen werden, was jedoch bei höheren Werten (>0,5) zu größeren Ungenauigkeiten führt.

Zur genaueren Bestimmung der OD₆₀₀ erfolgte eine Probennahme und Messung in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Ab einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Proben vor der Messung mit dem entsprechenden Medium verdünnt. Als Nullwert diente identisches Medium.

Die OD der Kulturen wurde in einem Novaspec II-Photometer (Pharmacia, Uppsala, Schweden) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

Die Wachstumsrate einer Bakterienkultur wird in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Der Eintritt in diese Phase lässt sich aus der halblogarithmischen Auftragung der Zeit (h) gegen den natürlichen Logarithmus der OD₆₀₀-Werte ermitteln. Zum Zeitpunkt eines exponentiellen Wachstums zeigt die Funktion einen linearen Verlauf. Die Wachstumsrate zu diesem Zeitpunkt berechnet sich folgendermaßen:

$$\mu = (\ln OD_2 - \ln OD_1) / (t_2 - t_1)$$

μ :	Wachstumsrate (h ⁻¹)
OD ₁ :	OD ₆₀₀ Zeit t ₁
OD ₂ :	OD ₆₀₀ Zeit t ₂
t ₁ :	Zeitpunkt 1 (h)
t ₂ :	Zeitpunkt 2 (h)

4.4 Untersuchungen zum Wachstum unter Stressbedingungen

Um den Einfluss unterschiedlicher Stressfaktoren auf das bakterielle Wachstum zu bestimmen, wurde verschiedene Vorgehensweisen angewendet. In einigen Fällen wurde die Wachstumsrate der Kulturen bestimmt, in anderen Fällen wurde die optische Dichte der Kulturen nach einer festgelegten Inkubationsdauer gemessen. Die Messungen erfolgten bei *E. coli* nach 12 h und bei *H. elongata* nach 16 h Inkubation. Dabei wurde davon ausgegangen, dass bei einem stressbedingt langsamerem Wachstum nach der Inkubationsdauer eine geringere OD₆₀₀ erreicht wird. Die Abweichung der OD₆₀₀ gestresster Zellen von der OD₆₀₀ ungestresster Zellen wurde als Maß für die Auswirkungen des Stressfaktors herangezogen.

Teilweise wurden die Experimente auch als Agarplattentest durchgeführt. Dies geschah aus Gründen der Durchführbarkeit oder auch zur Absicherung von Ergebnissen, die in Flüssigmedium bestimmt worden waren. Dabei wurde das Wachstum auf Agarplatten über mehrere Tage beobachtet und mittels Digitalkamera dokumentiert.

4.4.1 Untersuchung von Salzstress

Wachstum auf MM63-Agarplatten:

Zur Durchführung wurden die Stämme von *H. elongata* bzw. *E. coli* auf AB-Agarplatten (3 % NaCl bzw. 0,5 % NaCl) ausgestrichen und über Nacht bei der entsprechenden Temperatur (30 °C bzw. 37 °C) bebrütet. Am nächsten Morgen wurden jeweils 4 einzelne Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf die Selektionsplatten (MM63-Medium mit steigender NaCl-Konzentration) überpickt und anschließend bis zu 8 Tage bebrütet und fotografiert.

Wachstum in Flüssigmedium zur Wachstumsratenbestimmung:

Um das Wachstum unterschiedlicher *H. elongata* Stämme näher zu charakterisieren wurde eine Wachstumsratenbestimmung in MM63-Medium bzw. LB-Medium steigender Salinität (2, 4, 8 und 10 % NaCl) durchgeführt. In die Kulturen wurde kein Antibiotikum zur Selektion eingesetzt, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Nach den Experimenten erfolgte jeweils eine Stammkontrolle mittels Kolonie-PCR.

Zur Bestimmung der Wachstumsrate in MM63-Medium wurden die Stämme zunächst in einer LB-Vorkultur bei der entsprechenden Salinität über Nacht (180 upm, 30 °C) angezogen. Von dieser Kultur wurde eine MM63-Vorkultur 2 %ig angeimpft und gleichermaßen für 20 – 36 h (salinitätsabhängig) inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde schließlich die Hauptkultur zur Bestimmung der Wachstumsrate 2 %ig ($OD_{600} = 2,5$) angeimpft und das Wachstum durch Messung OD_{600} (bis $OD_{600} = 0,7$) verfolgt. Für die Bestimmung der Wachstumsrate in LB-Medium wurde nur eine Vorkultur verwendet. Die Messungen der OD_{600} erfolgten in gleicher Weise. Aus den bestimmten OD_{600} -Werten konnte schließlich die Wachstumsrate berechnet werden.

4.4.2 Untersuchung von Hitzestress

Sowohl bei *E. coli* als auch bei *H. elongata* wurden die Auswirkung von Hitze auf das Wachstum in AB-Medium untersucht. Dazu wurde morgens mit den zu untersuchenden Stämmen eine Vorkultur mit AB-Medium (25 ml mit 0,5 % NaCl für *E. coli* und 3 % NaCl für *H. elongata*) angeimpft und über den Tag im Schüttler inkubiert (180 upm). Abends wurde die exakte OD_{600} bestimmt und mit den Vorkulturen die entsprechenden Hauptkulturen (25 ml gleichen Mediums) angeimpft. Dabei wurden die Hauptkulturen bei einer $OD_{600}=1,84$ der Vorkultur 1 %ig angeimpft. Höhere und niedrigere OD_{600} wurde entsprechend umgerechnet. Die Hauptkulturen wurde für 12 h bzw. 16 h im Schüttler inkubiert und anschließend ihre exakte OD_{600} bestimmt.

4.4.3 Untersuchung von Harnstoffstress

Wachstum in MM63-Flüssigmedium:

Entsprechend den Versuchen mit Hitzestress sollte auch das harnstoffabhängige Wachstumsverhalten der *H. elongata* und *E. coli* Stämme überprüft werden. Die Messung der OD_{600} erfolgte hier in MM63-Medium. Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit der Vorversuche wurde dieses Experiment in Flüssigmedium nur mit den *E. coli* Stämmen *E. coli* K-12 und BK1 durchgeführt.

Zur Durchführung wurden die *E. coli* Stämme abends in AB-0,5 Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 upm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden diese Kulturen 1 %ig in MM63-0,5 Medium überimpft und bis zum Abend bei 37 °C und 180 upm inkubiert. Anschließend wurden die Hauptkulturen (MM63-Medium steigender Harnstoffkonzentration) aus den MM63-Vorkulturen angeimpft. Diese wurden wiederum bei einer $OD_{600} = 1,84$ 1 %ig angeimpft und 12 h bei 180 upm und 37 °C inkubiert.

Wachstum auf MM63-Agarplatten:

Zur Bestätigung der Ergebnisse in Flüssigmedium wurde das harnstoffabhängige Wachstum der *E. coli* Stämme auch auf MM63-Agarplatten dokumentiert. Gleiches geschah mit den *H. elongata* Stämmen, nur dass hier zusätzlich zu den unterschiedlichen Harnstoff-Konzentrationen (0 – 0,8 M) variierende NaCl-Konzentrationen (1 – 3 %) eingesetzt wurden. Das Wachstum wurde jeweils über vier Tage mittels Digitalkamera dokumentiert.

5. Transformation von *E. coli*

Als Transformation wird die Aufnahme freier DNA durch eine Bakterienzelle bezeichnet. *E. coli* erlangt durch Behandlung mit $CaCl_2$ und Kälte vorübergehend diese Kompetenz zur DNA-Aufnahme (Cohen *et al.*, 1972). Der genaue Wirkmechanismus von $CaCl_2$ ist weitgehend unbekannt. $CaCl_2$ könnte für eine Veränderung der Zellwand, aber auch für eine Bindung der DNA an die Zelloberfläche verantwortlich sein (Old & Primrose, 1992). Die Aufnahme der DNA wird durch einen Hitzeschock erleichtert. Das Vermögen zur DNA-Aufnahme kann durch DMSO-Zusatz noch verstärkt werden (superkompetente Zellen nach (Inoue *et al.*, 1990)).

5.1 Herstellung superkompetenter Zellen von *E. coli*

- Morgens wurden 25 ml LB-Medium (0,5 % NaCl) mit *E. coli* angeimpft und bei 37 °C und 180 upm über den Tag inkubiert.
- Abends wurden 100 ml SOB-Medium 0,5 % ig mit LB-Vorkultur angeimpft. Die SOB-Kultur wurde anschließend bei 22 °C über Nacht in einem Schüttler (INFORS AG, 180 upm) inkubiert.
- Bei einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 wurden die Kulturen für 10 min auf Eis gelagert und anschließend abgeerntet (4 °C, GSA-Rotor, 5000 x g, 10 min).
- Das Pellet wurde in 64 ml Transformationspuffer (TFB) resuspendiert und wiederum für 10 min auf Eis gelagert. Die resuspendierten Zellen wurden erneut für 10 min zentrifugiert.
- Das Pellet wurde in 16 ml TFB-Lösung resuspendiert, mit 1,12 ml DMSO versetzt und für 10 min auf Eis gelagert.
- Die nun kompetenten Zellen wurden in Aliquots abgefüllt (1 ml), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.2 Standardprotokoll zur Transformation superkompetenter Zellen von *E. coli*

- Für die Transformation wurden 200 μl auf Eis aufgetauter Zellen mit einem Ligationsansatz oder 2 bis 4 μl der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt und für 30 min in Eiswasser inkubiert.
- Anschließend wurde nach einem Hitzeschock (42 °C, 2,5 min) 800 μl SOC-Medium zugegeben.
- Die Zellen wurden für 60 min unter zwischenzeitlichem Invertieren bei 37 °C regeneriert.
- Vom Transformationsansatz wurden unterschiedliche Teilvolumen auf Selektionsmedium ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

5.3 Blau/Weiß-Selektion

Viele der verwendeten Plasmide (pHSG575, pK18*mobsacB*, pBBR1MCS) tragen ein *lacZ'*-Fragment, das für das α -Peptid der β -Galaktosidase kodiert. Das entsprechende Gen ist in *E. coli* DH5 α , der für Klonierungszwecke genutzt wurde, deletiert. Ein das entsprechende Plasmid tragender Transformant von *E. coli* DH5 α ist jedoch zur Ausbildung einer funktionsfähigen β -Galaktosidase befähigt. Innerhalb des *lacZ'*-Fragments befindet sich eine multiple Klonierungsstelle, die Schnittstellen für unterschiedliche Restriktionsenzyme enthält. Eine Insertion von Fremd-DNA innerhalb dieser Schnittstellen bewirkt eine Inaktivierung des *lacZ'*-Fragments und so der β -Galaktosidase. Die Zugabe eines Induktors (IPTG: Isopropyl -1-thio- β -D-galaktopyranosid) und eines Substrates (X-Gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid) für die β -Galaktosidase ermöglicht eine Unterscheidung rekombinanter und nicht rekombinanter Klone nach einer Transformation. Klone mit intakter β -Galaktosidase (nicht rekombinante Klone) setzen X-Gal zu einem blauen Indolfarbstoff um, was die Kolonien blau anfärbt. Rekombinante Klone bleiben weiß und können so unterschieden werden. Für eine Blau/Weiß-Selektion wurden 10 μl einer IPTG-Stammlösung (0,1 M) und 50 μl einer X-Gal-Stammlösung (0,05 M in DMSO) zusammen mit den Zellen ausplattiert.

6. Isolierung, Reinigung und photometrische Überprüfung von DNA

6.1 Isolierung genomischer DNA

6.1.1 Minipräparation von Gesamt-DNA

Diese Methode nach Marmur (1961) diente der schnellen Gewinnung kleinerer Mengen von Gesamt-DNA aus *E. coli* oder *H. elongata* Stämmen. Die Zelllyse erfolgt bei dieser Methode mit SDS, die Aufreinigung der DNA erfolgt durch mehrmaliges Ausschütteln mit Phenol/Chloroform und anschließender Phasentrennung durch hochtourige Zentrifugation.

Zellanzucht und Zellernte:

- *E. coli* bzw. *H. elongata* wurden über Nacht in einem geeigneten Medium bei 180 upm und 37 bzw. 30 °C angezogen.
- 1,5 – 3 ml Kulturvolumen wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415, 15800 x g, 1 min) abgeerntet.
- Das Zellpellet wurde in 1 ml TES-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert.

Zellyse:

- Das Zellpellet wurde erneut in TES-Puffer (hier 800 µl) resuspendiert. Für die Zellyse wurde 20 µl einer 20 %ige SDS-Lösung zugegeben.
- Der Ansatz wurde nach Durchmischung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Phenol/Chloroform-Extraktion:

- Das Lysat wurde mit 300 µl einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und kräftig geschüttelt.
- Zur Phasentrennung wurde das Extraktionsgemisch mit einer Tischzentrifuge (Heraeus fresco) bei maximaler Umdrehung (ca. 16000 x g) für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Oberphase (ca. 700 µl) abgenommen. Abhängig vom Bakterienstamm wurde die Extraktion 3 - 5 mal wiederholt, bis keine Zwischenphase mehr erkennbar war.

DNA-Fällung:

- Zur Oberphase wurden 1/10 ihres Volumens Natriumacetat (3 M, pH 4,8) und 1 Volumen Isopropanol hinzugegeben und der Ansatz durch Schwenken gemischt. Die Fällung erfolgte für mindestens 20 min bei -20 °C im Gefrierschrank. Anschließend wurde der Fällungsansatz für 10 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415) bei maximaler Umdrehung (ca. 15800 x g) zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Die gefällte DNA wurde mit 500 µl Ethanol (70 %ig) bei RT für 10 min gewaschen, erneut zentrifugiert und dann bei 60 °C im Wärmeschrank getrocknet.
- Die getrocknete DNA wurde durch 10-minütige Inkubation bei 70 °C in 50 µl EB-Puffer aufgenommen und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren geschert.
- Die Aufbewahrung der Gesamt-DNA erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank

6.1.2 Genomic-tip 100/G (Qiagen)

Größere Mengen genomischer DNA mit hohem Reinheitsgrad von *H. elongata* wurden mit Genomic-tips 100/G der Firma Qiagen (Hilden) gewonnen. Dabei wurden die Zellen mit Lysozym lysiert, Proteine durch Proteasen und RNA durch RNase abgebaut. Die Aufreinigung und Trennung der DNA von anderen Zellbestandteilen erfolgte an einer Silicamatrix. Die DNA wurde spezifisch gebunden, während Proteinbruchstücke, Salze und andere Zellbestandteile durch Waschschriffe entfernt wurden. Nach Isopropanol-Fällung wurde die genomische DNA in 200 µl H₂O_{reinst} bei 60 °C gelöst. Es wurden die Angaben des Herstellers befolgt.

6.2 Isolierung von Plasmid-DNA**6.2.1 QIAprep Plasmid MiniPrep Kit (Qiagen)**

Die Plasmidisolierung aus einer *E. coli* bzw. *H. elongata* Übernachtskultur (0,5 bzw. 3 % NaCl) erfolgte mit Hilfe des Plasmidisolierungs-Kits der Firma Qiagen (Hilden) aus 1,5 bis 8 ml Kulturvolumen. Nach alkalischer Lyse (Birnboim & Doly, 1979) der Zellen wurde die Plasmid-DNA in Gegenwart hoher

Salzkonzentrationen an eine Silicamatrix gebunden, gewaschen und schließlich mit 50 µl EB-Puffer eluiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

6.2.2 Plasmid Midi Kit (Qiagen)

Die Isolierung größerer Mengen des low-copy-plasmids pHSG575 oder der Plasmide für das BacterioMatch® Two-Hybrid-System erfolgte mit dem Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden). Die Isolierung erfolgte aus 100 ml Kulturvolmen (LB-0,5 mit Antibiotikum) einer über Nacht angezogenen Kultur. Die Isolierung beruht wiederum auf der alkalischen Lyse (Birboim & Doly, 1979) und einer Aufreinigung an einer Silicamatrix. Das Protokoll des Herstellers wurde abgeändert. So wurden 100 ml Kultur abgeerntet und das Pellet nach Resuspendierung in 10 ml Puffer P1 einer alkalischen Lyse mit 10 ml Puffer P2 unterzogen. 10 ml Puffer P3 dienten dem Absenken des pH-Wertes. Die gesamte Präparation wurde anschließend mit einer tip-100 Säule entsprechend den Herstellerangaben in einer Midi-Präparation aufgereinigt. Nach der Isopropanol-Fällung wurde die Plasmid-DNA durch Inkubation bei 60 °C für 20 min in 150 µl H₂O_{reinst} aufgenommen.

6.3 Reinigung von DNA nach enzymatischer Modifikation

6.3.1 DNA-Aufreinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Diese Aufreinigungsmethode kam zum Einsatz, wenn nach einer enzymatischen Behandlung hochmolekulare DNA-Fragmente oder PCR-Produkte aufzureinigen waren. Dies war insbesondere bei der Erstellung einer Genbank aus partiell hydrolysierten (*Sau 3A*) *H. elongata* DNA erforderlich. Zur Durchführung wurde die DNA mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurde wie bei der Minipräparation zur Gewinnung von genomischer DNA verfahren.

6.3.2 DNA-Aufreinigung mit PCR-Purification-Protokoll (Qiagen)

Diese Methode dient der schnellen Aufreinigung nieder- bis mittelmolekularer DNA-Fragmente oder PCR-Produkte, die nicht durch störende andere DNA verunreinigt sind. Verwendet wurde das QIAquick Gelextraktions Kit nach dem PCR-Purification-Protokoll unter Verwendung des PB-Puffers aus dem Plasmid MiniPrep Kit von Qiagen. Wiederum wird die DNA an eine Silicamatrix gebunden.

6.3.3 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegelblöckchen mit dem QIAquick Gelextraktions Kit (Qiagen)

Das QIAquick Gelextraktions-Kit (Qiagen, Hilden) beruht auf der spezifischen Bindung von DNA an eine Silicamatrix. Die Agarose wird zunächst mit Hilfe chaotroper Salze aufgelöst und die DNA, gebunden an die Matrix, anschließend in mehreren Waschschritten von Verunreinigungen befreit. Zuletzt wird die DNA mit EB-Puffer von der Matrix eluiert. Die Aufreinigung der DNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Angewendet wurde dieses Verfahren bei der Reinigung und Isolierung restriktionsverdauter Vektoren und PCR-Produkte bei Klonierungsexperimenten.

6.4 Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nucleinsäuren (DNA und RNA)

Die Konzentration und Reinheit von Nucleinsäuren lässt sich spektralphotometrisch bestimmen. Die Purin und Pyrimidin-Bestandteile weisen bei 260 nm ein Absorptionsmaximum auf, das zur Konzentrationsbestimmung genutzt wird. Bei einer Schichtdicke der zu verwendenden Quarzküvette von 1 cm entspricht eine Absorption von 1 einem Gehalt von 50 µg doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg RNA.

Zur Bestimmung von Verunreinigungen durch Proteine wird zusätzlich die Absorption bei 280 nm vermessen. Hier liegt das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren. Der Quotient der Absorptionen (A_{260}/A_{280}) wird bestimmt und ist ein Maß für die Reinheit der Probe. Liegt der Quotient bei 1,7 - 1,9 kann von reiner DNA ausgegangen werden. Ein Quotient unter 1,7 deutet auf Verunreinigungen mit Protein hin, ein Werte über 2 deutet auf reine RNA hin.

Die Konzentration der DNA in einer Probe kann aber auch im Agarosegel durch den Vergleich mit DNA-Proben bekannter Konzentration abgeschätzt werden. Als Referenz-DNA wurde *Hin* dIII-hydrolysierte λ -DNA eingesetzt (0,125 µg, 0,25 µg und 0,375 µg). Nach Ethidiumbromid-Färbung der im Gel aufgetrennten Proben wurden die Leuchtintensitäten der zu bestimmenden DNA-Proben und der Referenz-Banden verglichen.

7. Enzymatische Modifikation von DNA

7.1 Restriktionsverdau von DNA

Für Klonierungsexperimente und Restriktionsanalysen wurde DNA mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Die Hydrolyse erfolgte mit den vom Hersteller gelieferten Puffern bei der empfohlenen Inkubationstemperatur.

Der Verdau von Vektor- und Insert-DNA für Ligationsreaktionen erfolgte in einem Gesamtvolumen von 40 µl. Hier wurden 10 – 20 U Restriktionsenzym, 4 µl Reaktionspuffer (10 x) und bis zu 10 µg DNA eingesetzt. Die Ansätze wurden mindestens 5 h, in einigen Fällen auch über Nacht, bei der entsprechenden Temperatur im Wasserbad inkubiert. Wenn möglich wurde die Reaktion anschließend durch Erhitzen auf 65 – 70 °C (20 min) abgestoppt. Falls erforderlich wurde die DNA zur Aufreinigung anschließend in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Sollte die DNA nicht im Agarosegel gereinigt werden, und konnte das Restriktionsenzym nicht durch Erhitzen denaturiert werden, wurde die DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (>8 kb) oder nach dem PCR-Purification Protokoll (kleinere DNA-Fragmente) aufgereinigt.

Hydrolysen für Restriktionsanalysen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Hier wurden 5 – 10 U Restriktionsenzym, 2 µl Reaktionspuffer (10 x) und ca. 0,5 – 1 µg DNA eingesetzt. Die Ansätze wurden für 1,5 bis 2 h im Wasserbad inkubiert und anschließend in einem Agarosegel analysiert.

Einen Sonderfall stellt die partielle Hydrolyse von DNA dar. Dabei wird DNA mittels eines Restriktionsenzym unvollständig hydrolysiert. Vektoren, die mehrere Schnittstellen eines Restriktionsenzym besitzen, wurden kurze Zeit (5 bis 10 min) mit unterschiedlichen Mengen von Restriktionsenzym

inkubiert. Dabei wurden zunächst mehrere gleiche Ansätze ohne Restriktionsenzym fertiggestellt. In den ersten Ansatz mit doppeltem Reaktionsvolumen wurde z.B. 10 U des Enzym hinzugegeben, der Ansatz wurde gemischt und ein Volumen in den nächsten Reaktionsansatz pipettiert. Die Probe wurde wiederum gemischt und das Teilvolumen weiterpipettiert. Auf diese Weise wurde jeweils eine Halbierung der Enzymmenge erreicht, die dann nach festgelegter Inkubationszeit zu unterschiedlich starker Hydrolyse führte. In einem der Ansätze überwog dann der Anteil einfach hydrolysierter DNA. Mit dem partiellen Verdau genomischer DNA kann man die durchschnittliche Fragmentlänge für die Erstellung einer Genbank optimieren. Verwendet wurde hier das Restriktionsenzym *Sau* 3A mit einer Erkennungssequenz von vier Basenpaaren (\downarrow GATC). Da eine vollständige Hydrolyse zu sehr kleinen DNA-Fragmenten führen würde, kann durch Variation der Enzymmenge und der Inkubationszeit die gewünschte durchschnittliche Fragmentlänge eingestellt werden.

7.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Eine Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA verhindert bei Ligationsreaktionen die Religation des Vektors ohne Insertion von Fremd-DNA. Die Dephosphorylierung wurde während der präparativen Hydrolyse von Vektor-DNA durchgeführt. Dazu wurden 2 h nach Beginn der Hydrolyse 2 U CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) zum Restriktionsansatz hinzugegeben. Die weitere Inkubation wurde für mindestens 3 h fortgesetzt. Die Dephosphorylierung wurde durch Erhitzen auf 65 °C (20 min) abgestoppt.

7.3 Herstellung glatter Enden aus kohäsiven Enden

Sollen DNA-Fragmente mit nicht-komplementären kohäsiven Enden ligiert werden, bietet es sich an, diese in glatte Enden zu überführen. Dazu verwendet man die T4-DNA-Polymerase. Dieses Enzym verfügt über eine Exonuklease-Funktion, die überstehende 3'-Enden zu glatten hydrolysiert, aber auch überhängende 5'-Enden durch Polymerisation zugesetzter Nukleotide zu glatten Enden auffüllt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 25 μ l durchgeführt. Im Reaktionsansatz waren Reaktionsuffer (1 x), 5 U T4-DNA-Polymerase, 0,12 mM je dNTP und 2 – 5 μ g der zu modifizierenden DNA enthalten. Die Inkubation erfolgte für 5 – 7 min bei 37 °C. Anschließend wurde die Reaktion bei 65 °C (20 min) abgestoppt

7.4 Ligation von DNA

Die nach einer Restriktion entstandenen kohäsiven oder glatten Enden können nach ihrer zufälligen Zusammenlagerung durch T4-DNA-Ligase verknüpft werden. Dabei werden die Phosphatgruppen der 5'-Enden mit den OH-Gruppen der 3'-Enden verknüpft.

Durchgeführt wurde die Ligation in dem mitgelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 μ l. In den Ligationsansatz wurden dephosphorylierte Vektor-DNA und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:4 eingesetzt. Es wurden ca. 100 bis 200 ng Vektor-DNA, 2 U T4-DNA-Ligase und Reaktionspuffer (1 x) eingesetzt. In Ligationen, in denen DNA mit glatten Enden eingesetzt wurde,

wurde die Enzymmenge auf 4 U erhöht. Außerdem wurden dem Ansatz 2 µl PEG 4000 zugesetzt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C in einem Thermocycler (MWG) inkubiert.

8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR können *in vitro* DNA-Bereiche definierter Länge und Sequenz selektiv amplifiziert werden (Mullis & Faloona, 1987). Als Matrize dient ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit der zu amplifizierenden Sequenz. Das zu amplifizierende Fragment wird von zwei zugesetzten Oligonukleotid-Primern flankiert, die mit den komplementären Strängen der Zielsequenz hybridisieren. Eine thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von diesen Primern den komplementären Strang an die Matrizen-DNA. Durch zyklische Wiederholung von DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation wird die durch die Primer flankierte DNA exponentiell amplifiziert.

Für die PCR können unterschiedliche thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt werden. Standardmäßig wird *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet. Für spezielle Anwendungen, bei denen eine höhere Fehlerkorrekturrate erforderlich ist (Klonierung, Expression und Mutagenese) wird die *Pwo*-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* verwendet, die aus mehreren Gründen der *Taq*-Polymerase vorzuziehen ist:

- Die *Pwo*-Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonuclease-Funktion und ist damit in der Lage, den Einbau von falschen Nukleotiden zu korrigieren.
- Die *Pwo*-Polymerase hängt nicht, wie die *Taq*-Polymerase, an das Ende der amplifizierten DNA ein Adenin an. Dadurch wird die Konstruktion der Primer für spezielle PCR-Anwendungen erheblich vereinfacht.
- Die *Pwo*-Polymerase weist eine höhere Thermotoleranz auf.

8.1 Standard-PCR-Reaktion

Reaktionsansatz:

	50	pmol	Primer 1
	50	pmol	Primer 2
	200	µM	je dNTP
	5	µl	Puffer 10x
	1,5- 4	mM	MgCl ₂ bzw. MgSO ₄
	0,5	µl	DNA
	1-2,5	U	DNA-Polymerase
ad.	50	µl	H ₂ O _{reinst}

Die angegebenen Komponenten wurden in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Die DNA-Polymerasen wurden erst während der Initialdenaturierung (siehe unten) zugesetzt.

PCR-Programm:

Initialdenaturierung:	94 °C	5	min
Schleife: (30x)			
Denaturierung:	94 °C	0,5 - 1	min
Anlagerung:	59 °C	45	sec
Elongation:	72 °C	0,5 - 3	min
verlängerte Elongation:	72 °C	5	min
Ende:	4,0 °C	Lagerung	

Die Denaturierungszeit wurde in Abhängigkeit des GC-Gehaltes der zu amplifizierenden Region gewählt. Höherer GC-Gehalt macht eine längere Denaturierung erforderlich. Die Anlagerungstemperatur wurde abhängig von der Schmelztemperatur der Primer ausgewählt. Die Schmelztemperatur wird durch den Hersteller der Primer angegeben. Standardmäßig wurde mit einer Anlagerungstemperatur begonnen, die im Bereich der Schmelztemperatur lag. Bei Verwendung der *Pwo*-Polymerase wurde grundsätzlich eine 3 – 4 °C niedrigere Anlagerungstemperatur ausgewählt. Die Elongationszeit wurde durch die Länge der zu amplifizierenden DNA bestimmt. Pro Minute wird ca. 1 kb PCR-Produkt synthetisiert.

8.2 Spezielle PCR-Anwendungen

8.2.1 Verschachtelte (nested) PCR

Diese spezielle Technik wurde angewendet, wenn während einer ersten PCR nicht genügend spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden konnte. Die Primer dieser PCR hybridisieren innerhalb der DNA-Abschnitte, die durch das erste Primerpaar amplifiziert wurden. Dabei dient das in der ersten PCR spezifisch synthetisierte PCR-Produkt als Matrize. Die Spezifität der Reaktion wird erheblich gesteigert, da die unspezifischen Produkte der ersten Reaktion in der Regel nicht genügend komplementäre Sequenzen für die eingerückten Primerpaare aufweisen und somit nicht als Matrize für die Amplifikation zur Verfügung stehen. Die verschachtelte PCR kann auch als Variante mit nur einem eingerückten Primer angewendet werden.

8.2.2 Ligase-vermittelte PCR

Die Ligase-vermittelte PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Bereichen verwendet, bei denen nur eine flankierende Sequenz bekannt war. Dies war insbesondere für die Sequenzierung von DNA Sequenz stromabwärts einer bekannten Sequenz notwendig. Nach der Hydrolyse genomischer DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym wurden die DNA-Fragmente mit dem linearisierten Vektor pUC18 ligiert. Mit einem innerhalb des Vektors und einem innerhalb der bekannten Sequenz gelegenen Primer wurde eine PCR auf dem Ligationsansatz durchgeführt. Dazu wurden 1 µl des Ligationsansatzes in die PCR eingesetzt.

8.2.3 PCR an ganzen Zellen (*in situ*-PCR)

Eine Amplifikation von PCR-Produkten aus intakten bakteriellen Zellen ohne vorherige DNA-Isolierung wurde zuerst durch Joshi *et al.* (1991) durchgeführt. Die Methode wurde vor allem zur Identifizierung von Deletions- oder Insertionsmutanten verwendet. Statt gereinigter DNA wird bei diesem Verfahren resuspendiertes Zellmaterial in den Reaktionsansatz eingesetzt. Das Zellmaterial wird mit einer sterilen Pipettenspitze (Automatikpipette) von der Agarplatte gekratzt und in 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert. 0,5 μl dieser Suspension wurden in den PCR-Ansatz eingesetzt. Um eine größere Anzahl von Kolonien zu überprüfen, wurde Zellmaterial von bis zu 10 Kolonien in einem Volumen von 50 bis 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert. Davon wurden ebenfalls 0,5 μl in die PCR eingesetzt. Für den Aufschluss der Zellen wurde die Initialdenaturierung auf 10 min verlängert.

8.2.4 SOE-PCR (splicing by overlap extension)

Die SOE-PCR ist eine spezielle Methode, die eine Verknüpfung zweier DNA-Fragmente ohne Verwendung von Restriktionsendonukleasen und Ligasen ermöglicht (Horton *et al.*, 1989). Sie wurde vor allem zur Herstellung von Konstrukten für die Mutageneseverfahren verwendet. Für diese Variante der PCR müssen mindestens vier Primer konstruiert werden. Mit dem einen Paar wird die DNA-Flanke stromaufwärts, mit dem anderen die DNA-Flanke stromabwärts des zu deletierenden DNA-Bereiches amplifiziert. Die Primerpaare sollten so gewählt werden, dass beide Flanken dieselbe Länge aufweisen. Beide mittleren Primer setzen sich aus zwei Teilen DNA-Sequenz zusammen. Ein Teil liegt stromaufwärts, der andere stromabwärts der zu deletierenden Sequenz. Da die beiden mittleren Primer aus komplementären DNA-Bereichen abgeleitet sind, sind sie selbst zueinander komplementär. Der erste Schritt der SOE-PCR wird in zwei getrennten PCR-Ansätzen durchgeführt. Im zweiten Schritt werden die gereinigten ersten PCR-Produkte unter Zusatz der beiden äußeren Primer fusioniert. Das Produkt ist ein DNA-Fragment, in dem der zwischen den Einzelprodukten liegende Bereich deletiert ist. Grund hierfür ist die komplementäre Sequenz der beiden mittleren Primer, welche in Hybridisierung der ersten PCR-Produkte resultiert, die dann am 3'-Ende bis zu den äußeren Primern verlängert werden. Die SOE-PCR wurde mit der *Pwo*-Polymerase durchgeführt.

8.2.5 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Digoxigenin-markierte PCR-Sonden wurden zur Detektion spezifischer DNA-Sequenzen in einem Southern-Hybridisierungsexperiment verwendet. In Abänderung zu einer Standard-PCR werden je 100 μM dATP, dCTP und dGTP, 70 μM dTTP und 30 μM DIG-11-dUTP eingesetzt.

8.3 Herstellung von Promotorfusionen mittels PCR

In der vorliegenden Arbeit wurden Fusion von *yhgl* aus *E. coli* K-12 mit unterschiedlichen Promotorsequenzen hergestellt. Es wurden PCR-Produkte amplifiziert in denen nur ein funktionierender hypothetischer Promotor *yhgl* vorgeschaltet ist. Das PCR-Produkt in dem nur der σ^{70} -abhängige Promotor

yhgI vorgeschaltet ist, konnte durch eine Standard-PCR auf *E. coli* K-12 DNA amplifiziert werden. Gleiches gilt für das Produkt ohne vorgeschalteten Promotor (Negativkontrolle). Das PCR-Produkt zur Kontrolle der vorhandenen Promotoren in *E. coli* BK4 wurde auf *E. coli* BK4 DNA amplifiziert. Die Produkte zur Kontrolle des σ^{32} - und des σ^{54} -abhängigen Promotors wurden in einer SOE-PCR amplifiziert. Die Einzelheiten der Amplifikation und die Benennung der Vektoren sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Promotor	Primerpaar	Produktgröße bp	PCR-Bedingung		Plasmidbezeichnung
			T _a (°C)	MgCl ₂ (mM)	
σ^{70} (<i>yhgIEc</i>)	<i>yhgIEc1</i> & <i>yhgIEc2</i>	1,059	56	1,5	pHSG <i>yhgIEcR</i> , pHSG <i>yhgIEcF</i>
σ^{32} (HeatC)	ProHeat1 & ProHeat2	0,303	56	1,5	pHSGHeatCR, pHSGHeatCF
	ProHeat3 & <i>yhgIEc2</i>	0,905	56	2	
	<u>Fusionsprodukt:</u> ProHeat1 & <i>yhgIEc2</i>	1,160	56	1,5	
σ^{54} (Sig54)	Sig54ATest1 & Sig54BNT	0,382	56	1,5	pHSG54FusR, pHSG54FusF
	Sig54C & <i>yhgIEc2</i>	0,915	56	3	
	<u>Fusionsprodukt:</u> Sig54ATest1 & <i>yhgIEc2</i>	1,275	56	2	
Kein Promotor	NoPro1 & <i>yhgIEc2</i>	0,905	56	1,5	pHSGNoProR, pHSGNoProF
BK4-Test	ProHeat1 & <i>yhgIEc2</i>	1,092	56	1,5	pHSGBK4R, pHSGBK4F

Tab. 4: Konstrukte zur Überprüfung der *E. coli* Promotoren

In der Tabelle sind Primer und Amplifikationsbedingungen, die für die Herstellung der unterschiedlichen Promotorfusionen benötigt wurden, aufgeführt. In der ersten Spalte ist der entsprechende zu überprüfende Promotor vermerkt. In der letzten Spalte der Tabelle sind die Bezeichnung der Vektorkonstrukte bestehend aus pHSG575 und den inserierten PCR-Produkten angegeben. Alle Produkte außer des Produktes „BK4-Test“ wurden auf *E. coli* K-12 DNA amplifiziert. „BK4-Test“ wurde auf *E. coli* BK4-DNA amplifiziert. Aufgeführt ist die Länge der Einzel- und Fusionsprodukte. „HeatC“ bzw. „Sig54“ wurden in einer SOE-PCR amplifiziert. Für die Fusion tragen die Primer ProHeat2 und ProHeat3 bzw. Sig54BNT und Sig54C komplementäre Sequenzen. Die Plasmide pHSGNoPro dienten als Negativkontrolle. Diese sollten kein oder nur verringertes Wachstum von *E. coli* BK1 auf Mineralsalzmedium bei zunehmender Salinität ermöglichen. Die Zusätze „R“ bzw. „F“ in der Plasmidbezeichnung deuten auf eine im Verhältnis zum *lacZ'*-Fragment des Vektor reverse bzw. gleiche Orientierung des im Plasmid integrierten *yhgI*-Gens hin. Alle Konstrukte sind über *Hin* dIII-Schnittstellen in pHSG575 inseriert.

8.4 Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m (°C)	3' Pos./ Strang/ Org.	Merkmale
<i>H. elongata</i>				
Mutanten				
SOE2 (3')	caataaatcagtgctccgatgctctcactggtc	69,5	2593/ - /He	
SOE3 (5')	gaccagtgagagcatcggagacactgattattg	69,5	3217/ + /He	
SOE1b	agcgctaaagcttaggtcccggaaatcatcac	69,5	1701/ + /He	<i>Hin</i> dIII
SOE4b	atcctaaagcttaagcgcaggaagcagccaat	68,2	4104/ - /He	<i>Hin</i> dIII
INSEY1	cggaatacggatcatgatgctctcactggct	69,5	2592/ - /He	
INSEY2	gaccagtgagagcatcatgaccgtattccg	69,5	2153/ + /Ec	
INSEY3	ataaatcagtgctccttagtagtaggagtg	64,4	2699/ - /Ec	
INSEY4	acactcctactactaaggagacactgattat	64,4	3215/ + /He	
methH-rev	tgccctggcctgctgatct	61,4	72/ + /He	
<i>E. coli</i>				
Mutanten				
EYDel1	actccaagcttccaaatggctttatcaggtg	66,9	1145/ + /Ec	<i>Hin</i> dIII
EYDel2	caaaagaggggataacagtaatggcctaatagt	65,8	2122/ - /Ec	
EYDel3	actattaggccattactgttatccccttttga	66	2732/ + /Ec	
EYDel4	ggtccaggatccgacgccaagctcgcatct	74,6	3723/ - /Ec	<i>Bam</i> HI
SOEyhgh1Ec	gtgaatgctgactactgcaaaactggcgacgctgt	71,9	349/ + /Ec	<i>Sal</i> I
SOEyhgh2Ec	atagcccatcatcgaggctctggtggcagaccaaaggtc	>75	1329/ - /Ec	
SOEyhgh3Ec	gaccttggctgcccaccagagcctcctgatgggctgat	>75	2100/ + /Ec	
SOEyhgh4Ec	aacaacgtcgacacaccgatagcaacaatgact	68,2	3082/ - /Ec	<i>Sal</i> I
DelSOE2yhghEc	tacgccatcatcgaggctctaccgtgactgtagcggctcg	>75	1849/ - /Ec	
DelSOE3yhghEc	cgaaagccgtcacagctacaggttagagcctcctgatgggctga	>75	2099/ + /Ec	
DelSOE1yhghEc	gtcaacgtcgaccatcggaacgccagaacggt	73,2	870/ + /Ec	<i>Sal</i> I
BacterioMatch®				
Two-Hybrid				
YhgpBTfor	cagtgagaattccatgagcgacagcatccaga	69,5	2627/ + /He	<i>Eco</i> RI
YhgpBTrev	atcagtggatccttagcggtaatagcc	65	3185/ - /He	<i>Bam</i> HI
pTRGyhghEcfor	ttggtcgccgcccgatgttattcatccgctattg	73	1368/ + /Ec	<i>Not</i> I
pTRGyhghEcrev	atcatcgaattcctacaaggttcgacaaaggca	67	2060/ - /Ec	<i>Eco</i> RI
pBTyhgiEcfor	aactatgcccggctgctatgatccgtatttccga	71,8	2155/ + /Ec	<i>Not</i> I
pBTyhgiEcrev	aaaagagggggatccttagtagtaggagtggt	66,9	2698/ - /Ec	<i>Bam</i> HI
pTRGyhghEcrev	aaaagagggctcaggttagtagtaggagtggtc	68,2	2697/ - /Ec	<i>Xho</i> I
pTRGyhghEfor	accagtccgcccgcctgagcgacagcatccagat	>75	2628/ + /He	<i>Not</i> I
pTRGyhghHerev	atcagtgaattccttagcggtaatagcggt	64	3182/ - /He	<i>Eco</i> RI
Expression von				
<i>Yhgl_{He}</i>				
yhgi-upNdeI	accagtgagagccatgatgagcgacagcatccagat	71,8	2628/ + /He	<i>Nde</i> I
yhgi-downNotI	caataaatcagtgccggcccgcgggtaatagcgct	74,2	3183/ - /He	<i>Not</i> I

RACE/RT-PCR

AAP	ggccacgcgctcgactagtagcgggiiggggiiggiig	70,8		Sal I
AUAP	ggccacgcgctcgactagta	61		Sal I
Race1He	tcgaggaagggtacgctgtt	59,4	2822/ - /He	
Race2He	acgctgttctgtccaggta	57,3	2810/ - /He	
Race2HeEco	tcgagggaaattcagctgttctgtccaggta	69,5	2810/ - /He	Eco RI
RaceHeTest1	tcgcaattcgtcgaagggtga	62,1	1865/ + /He	
RaceHeTest4	ctgccttctcaacgagat	59,8	957/ + /He	
RaceHeTest5	tcgtcgaccagcaagcggtga	61,4	813/ + /He	
RaceHeTest7	aacgagaaggaaacgttgga	55,3	639/ + /He	
RaceHeTest8	cgtagttattgttctcctgat	56,5	732/ + /He	
Race1Ec	cccttcttcagcgtcacat	57,3	2605/ - /Ec	
Race2Ec	cgacatggaacaaccgtta	57,3	2585/ - /Ec	
Race3EcEco	gctccagaattcgtgatcgtctgccacttta	69,5	2435/ - /Ec	Eco RI
RaceEcKon3	agcaagtgcagcgcaccaa	59,4	1193/ + /Ec	
RaceEcKon4	cacgtctgttactattggaa	53,2	1699/ + /Ec	

Ligase-vermittelte**PCR, Sequenzierung**

LacZ	tgtgaaataccgcacagatg	58	pUC18	
KnTn1732A/1	gggtccgggaactgaatcg	58,2	2009/ - /He	
methH-1	agcgcctgccgtgatgatt	61,4	1693/ - /He	
methH-2	aacgttcttctcgttccg	57,3	617/ - /He	
methH-seq	ttcaagcgcctgatcaagga	57,3	1196/ - /He	
Bu-7HG/-Pr.2	aagatgcccaagggtcaacg	58	2927/ + /He	
yhgl-2	tggagcgcacccggagcct	63,5	3142/ + /He	
Bu-YHGI-Pr.3	tccgtctgttctgctatg	54	3471/ + /He	

DIG-PCR-Sonde

yhgl-1	agtgatctccagcgtatgaa	58	2316/ + /He	
yhgl-rev	gtcaactgcaccagctgat	57,3	3008/ - /He	

Komplementierung

Yhgi-nested	cgatgccgcgtcgcgatgtg	63,5	2406/ + /He	
yhgl-nestedBamHI	tcggacggatcccgatgccgcgtcgcgatgtg	>75	2407/ + /He	Bam HI
yhgl-rev2	accagcacgaacagctcaat	57,3	3498/ - /He	
yhgl-rev2BamHI	actaccggatccgaccagcacgaacagctcaat	72	3498/ - /He	Bam HI
YhgiHis-up	tca(gtg)x6ctcagagtgcggccgcgcg... gtaataggcgttggtggtatcgg	>75	3170/ - /He	Not I
YhgiHis-down	cgcgccggccgactcagag(cac)x6tga... ggagacactgattattgctgcgctcg	>75	3226/ + /He	Not I
YhgiEc1	cgttgtaagcttggtgattgtggatgatgctg	68,2	1985/ + /Ec	Hin dIII
YhgiEc2	aacgtgaagcttaacagagatattcgggcacc	68,2	2981/ - /Ec	Hin dIII
YhHEcrev	tggtgcaagcttctcatcaacatacgcgggtca	69,5	2320/ - /Ec	Hin dIII

Promotorfusionen

ProHeat1	caccacaagcttgcaattgccggatcgcgatcgt	72	1746/ + /Ec	Hin dIII
ProHeat2	atagtaatggcctaatagtgtcatccacaatcaccatattggcgacct	72,8	1954/ - /Ec	
ProHeat3	ccatattggtgattgtggatgacaactattaggccattactatgatccgt	72,8	2147/ + /Ec	
Sig54C	cgaaagcgtcacacgtacacggcaactattaggccattactatgatccgt	>75	2147/ + /Ec	
Sig54ATest1	cacagaaagcttggtatgccacaatgtggatta	67,1	1522/ + /Ec	Hin dIII
Sig54BNT	ccgtgtacgtgtgacggcttcg	65,8	1849/ - /Ec	
NoPro1	aactaaagcttcaactattaggccattactatgatccgt	67,4	2147/ + /Ec	Hin dIII

Sonstige			
Tn1732/A	cacgagaacaccgtagc	56	Tn1732
Tn1732-B	gccggtggacggcgagctgctgc	>75	Tn1732
Knrev/1	ccagggcacagttgag	57,6	1593/ + /He

Tab. 5: Namen und Sequenzen der verwendeten Primer

Angegeben sind die Anbindungspositionen der 3'-Enden der jeweiligen Primer. Die Positionen beziehen sich jeweils auf die DNA-Sequenzen von *H. elongata* bzw. *E. coli* im Anhang der Arbeit. Für welchen Organismus der Primer verwendet wurde, ist durch die Kürzel „He“ (*H. elongata*) bzw. „Ec“ (*E. coli*) in der Positionsangabe vermerkt. „+“ bzw. „-“ geben an, von welchem DNA-Strang der Primer abgeleitet wurde. „+“ bezieht sich auf den oberen Strang, „-“ auf den unteren Strang der Sequenzen im Anhang. Im Primer enthaltene Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen dargestellt und zusätzlich namentlich genannt. Komplementäre Sequenzbereiche zusammengehöriger Primerpaare sind gleichfarbig dargestellt.

9. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

9.1 Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle wandern in einer Elektrophorese aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode, wobei mit steigender Molekülgröße die Wanderungsgeschwindigkeit abnimmt. Moleküle gleicher Länge bewegen sich gleich schnell und wandern gemeinsam in einer Bande. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird auch durch die Porengröße des Gels bestimmt. Mit steigender Agarosekonzentration sinkt die Porengröße. Zur analytischen und präparativen Trennung von Nukleinsäuren wurden Gele mit Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 und 2 % verwendet.

Ein Agarosegel gewünschter Konzentration wurde mit TB-Puffer (1 x) angesetzt. Das Gemisch wurde aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C in den Gelträger gegossen. Anschließend wurde ein geeigneter Probenkamm eingesetzt. Nach dem Erkalten des Gels wurde dieses mit TB-Puffer (1 x) überschichtet und konnte mit den Proben beladen werden.

Zur Probenaufbereitung wurden die aufzutrennende DNA mit Probenpuffer (6 x) versetzt. Zum DNA-Längenvergleich musste auch eine Marker-DNA vorbereitet werden. Standardmäßig wurde dafür 1 kb-Marker oder 100 bp-Marker (Fa. Fermentas) genutzt. Hiervon wurden 0,5 µl mit 9,5 µl TE-Puffer und 2 µl Probenpuffer (6 x) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Für präparative Agarosegele wurde das Volumen der Marker-DNA auf 1,5 µl erhöht und entsprechend weniger TE-Puffer eingesetzt.

Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 60 – 80 V durchgeführt. Nach dem Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel für 5 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) inkubiert und dann für 5 min mit H₂O_{demin} entfärbt. Anschließend wurde das Gel unter starkem UV-Licht (Durchlicht) photographiert. Bei präparativen Gelen wurde zunächst eine Photo unter schwachem UV-Licht hergestellt. Anschließend wurde die gesuchte DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten, in ein steriles Mikro-Reaktionsgefäß überführt und mit dem QIAquick Gelextraktions Kit gereinigt. Nach dem Ausschneiden der DNA-Bande wurde das Gel unter starkem UV-Licht photographiert.

9.2 Southern-Hybridisierung

Diese Verfahren nach Southern (1975) dient dem Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz in einem DNA-Gemisch. Die restriktionshydrolysierte DNA wird zunächst in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, denaturiert, unter Beibehaltung des DNA-Bandenmusters auf eine Nylonmembran übertragen und gleichzeitig fixiert. Die gesuchte DNA-Sequenz kann dann mit einer komplementären, markierten DNA-Sonde hybridisiert und durch eine Färbereaktion detektiert werden. Als DNA-Sonde wurde Digoxigenin-markierte PCR-Sonde verwendet, die mittels Antikörper nachgewiesen wurde.

9.2.1 Southern-Transfer

Der Southern-Transfer wurde mit dem VacuGene™ XL Vacuum blotting Systems der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Mit dieser Apparatur erfolgt der Transfer der DNA durch Anlegen eines Vakuums, welches die DNA-Banden auf die Nylonmembran saugt.

Die zu untersuchende DNA wurde zunächst in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend unter UV-Licht photographiert. Eine ausreichend großes Stück Nylonmembran wurde mit H₂O_{demin} angefeuchtet und entsprechend der Herstellerangaben auf die Blotting-Apparatur aufgebracht. Nach dem Auflegen der Maske und des Gels wurde die Apparatur geschlossen und ein Vakuum angelegt. Durch das Auftropfen der Denaturierungslösung auf das Gel wurde die DNA denaturiert. Gleichzeitig diente die Denaturierungslösung auch als Transferlösung in deren Strom die DNA auf die Membran übertragen wird. Der Transfer wurde für 1 h durchgeführt. Nach dem DNA-Transfer wurde der Blot abgebaut und die Nylonmembran mit der kovalent vernetzten DNA für 5 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Nylonmembran für 10 min bei RT getrocknet. Das Agarosegel wurde zur Überprüfung des Transfers erneut mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht kontrolliert.

9.2.2 Hybridisierungsreaktion und immunologischer Nachweis der DNA-Hybride

Für die Hybridisierung mit der zu detektierenden DNA wurde eine Digoxigenin-Desoxyuridintriphosphat (DIG-11-dUTP) markierte PCR-DNA-Sonde verwendet. Diese war mit den Primern yhgi-2 und yhgi-rev2 amplifiziert worden und diente dem Nachweis des *yhgl*-tragenden *Pst* I-Restriktionsfragmentes. Hierdurch sollte die zu erwartende Größe des PCR-Produktes der Ligase-vermittelten PCR ermittelt werden.

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde die Nylonmembran mit Blocking-Reagenz inkubiert, um unspezifische Wechselwirkungen der Sonde mit der Membran zu verhindern (Vorhybridisierung). Die so behandelte Membran wurde dann unter stringenten Bedingungen (65 °C) mit der DIG-markierten Sonde inkubiert. Nach dieser Hybridisierung wurde restliche Sonde durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgte der immunologische Nachweis der DNA-Hybride. Dabei dient Digoxigenin als Antigen, das durch polyklonale DIG-spezifische Antikörper (Fab-Fragment) detektiert wird. An den Antikörper ist eine alkalische Phosphatase gebunden, die bei der anschließenden Färbereaktion die Umsetzung von BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) und NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) zu

einer blauen Verbindung hervorruft. Durch diese Färbereaktion werden die DNA-Fragmente hervorgehoben, die eine komplementäre Sequenz zu der verwendeten Sonden-DNA aufweisen.

Hybridisierung:

- Die getrocknete Nylonmembran wurde in eine Glasröhre überführt und anschließend ca. 50 ml einer vortemperierten Vorhybridisierungslösung (65 °C) hinzugegeben. Die Membran wurde so für 3 h im Hybridisierungssofen (UNI Equip, Martinsried) bei 65 °C inkubiert.
- Die Vorhybridisierungslösung wurde durch frisch denaturierte, eisgeschockte Hybridisierungslösung mit DIG-markierter PCR-Sonde ersetzt und für 12 h bei 65 °C inkubiert.
- Anschließend wurde die Hybridisierungslösung abgegossen (bei -20 °C aufbewahrt) und die Nylonmembran zweimal 5 min mit SSC-A-Lösung (65 °C) und zweimal 15 min SSC-B-Lösung (65 °C) auf einem Schüttler (IKA Vibrax, VRX, Staufen) gewaschen.

Immunologischer Nachweis:

- Die Membran wurde 1 min (RT) auf dem Schüttler mit Puffer 1 gewaschen, für 30 min mit Puffer 2 und wiederum durch kurzes Schwenken mit Puffer 1 gewaschen.
- 4 µl Antikörperkonjugat wurden mit 20 ml Puffer 2 verdünnt (1:5000), zur Membran gegeben und mit dieser für 30 min (RT) in Hybridisierungssofen inkubiert.

Färbereaktion:

- Nach Abgießen des Antikörperkonjugats wurde die Membran für 2 min mit Puffer 3 äquilibriert.
- Anschließend wurden ca. 10 ml der Färbelösung (10 ml Puffer 3, 35 µl BCIP und 37 µl NBT-Lösung) zur Membran gegeben und diese im Dunkeln (RT) in Hybridisierungssofen inkubiert.

Die DNA-Hybride waren nach ca. 5 min erkennbar. Nach Abgießen der Färbelösung wurde die Färbereaktion durch Schwenken mit Puffer 4 abgestoppt. Die Membran konnte anschließend fotografiert und dann in Folie eingeschweißt im Dunkeln aufbewahrt werden.

10. RNA-Arbeitstechniken

Für RNA-Arbeiten wurden RNase-freie Puffer und Lösungen verwendet. Puffer und Lösungen ohne Tris wurden mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt, für mindestens 2 h auf einem Magnetrührer gerührt und 2 x autoklaviert. Tris-haltige Puffer wurde mit RNase-freiem Wasser angesetzt. Glasflaschen, Glasgefäße, Messzylinder und Spatel wurden bei 160 °C für mindestens 6 h gebacken. Arbeitsflächen und Arbeitsmaterialien wurden mit „RNase-away“ gesäubert.

10.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde eine Übernachtskultur (100 ml MM63-Medium) von *H. elongata* bzw. *E. coli* K-12 mit frischem Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt (Gesamtvolumen: 100 ml) und bis zu einer OD von 0,7 kultiviert.

Die Kultur wurde im GSA-Rotor (7000 x g) für 15 min bei 4 °C geerntet. Ca. 100 mg des Zellpellets wurden für die Isolierung in ein Falcon-Röhrchen überführt und in 4 ml Puffer A (vorgekühlt) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 0,5 ml 10 %igem SDS versetzt, kurz geschüttelt,

sofort mit 5 ml Phenol (65 °C) überschichtet und unter mehrmaligem Invertieren bei 65 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach 4 min Inkubation wurde der Ansatz für mindestens 2 min in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Für die Phasentrennung wurde der Ansatz in der Labofuge AE (Heraeus) für 10 min bei 2700 x g zentrifugiert.

Je 400 µl Oberphase wurden auf 2 ml Mikro-Reaktionsgefäße verteilt und mit je 400 µl des Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches versetzt. Die Ansätze wurden wiederum geschüttelt. Für die Phasentrennung wurden die Proben in einer Tischzentrifuge bei 4 °C für 5 min bei 8000 x g zentrifugiert

Für die Fällung wurde die RNA-haltige Oberphase in neue 2 ml Mikro-Reaktionsgefäße überführt, mit 1/10 Volumen Na-Acetat und 2,5 Volumen Ethanol (100 %) versetzt und bei -70 °C bis zur weiteren Aufarbeitung (mehrere Wochen) gelagert.

10.2 Reinigung von RNA

Nach Bedarf wurden zwei RNA-Fällungsansätze in einer Kühlzentrifuge (4 °C) bei 8000 x g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Pellets in je 50 µl H₂O_{reinst} aufgenommen, vereinigt und mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) nach Beschreibung des Herstellers aufgereinigt.

Da die RNA in RT- oder RACE-PCR Verwendung finden sollte, wurde die RNA mit gleichzeitiger DNA-Hydrolyse (30 – 60 min bei RT) auf der RNeasy-Säule gereinigt. Zur Überprüfung der RNA auf DNA-Verunreinigungen wurde eine PCR durchgeführt. Nur DNA, nicht jedoch RNA, wird von der DNA-Polymerase als Matrize erkannt. In der PCR wurden unterschiedliche Primer eingesetzt, mit denen kurze Produkte amplifiziert (200 – 500 bp) werden konnten. Das Vorhandensein eines möglichen PCR-Produktes wurde im Agarosegel überprüft. Die DNA-Hydrolyse wurde solange wiederholt bis keine PCR-Produkte mehr amplifiziert werden konnten, mindestens jedoch dreimal.

10.3 5'-RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends)

Die 5'-RACE-PCR wurde verwendet, um im Rahmen von Promotoranalysen den Transkriptionsstartpunkt vor *yhgI* aus *E. coli* und *H. elongata* zu identifizieren. Ursprünglich jedoch war die Methode entwickelt worden, um vollständige 5'-cDNA-Enden einer nicht vollständig bekannten cDNA-Sequenz zu klonieren (Tillett *et al.*, 2000).

Ausgehend eines sequenzspezifischen reverse-Primers, der im Leserahmen des zu untersuchenden Gens abgeleitet ist, wird zunächst entlang des mRNA-Stranges die cDNA bis zum 5'-Ende des Transkriptes synthetisiert. Anschließend wird die RNA hydrolysiert und der cDNA-Strang an seinem unbekanntem 3'-Ende verlängert. Die letztere als „tailing“ bezeichnete Reaktion wird durch eine terminale Desoxynucleotidyl-Transferase katalysiert. Durch den Einbau von dCTP entsteht eine definierte Verlängerung des cDNA-Erststranges („C-Überhang“ oder „C-tail“). In einer sich anschließenden PCR bindet ein spezifischer Primer (AAP) an diesen Überhang und ermöglicht die Zweitstrangsynthese. Mit Hilfe eines zweiten reverse-Primers, der in der bekannten Sequenz der cDNA bindet, wird das Produkt amplifiziert.

Für die Durchführung wurde die Anleitung 5'-RACE-PCR für GC-reiche Sequenzen von Invitrogen zugrundegelegt.

Primer-Mix für cDNA-Synthese bzw. Negativkontrolle:

Gesamt-RNA	5	µg
Primer	5	pmol
H ₂ O _{reinst}	ad. 19,5	µl

<u>Mix:</u>	<u>cDNA+</u>	<u>cDNA-</u>	
RT-Puffer 10x	1 x	1 x	
MgCl ₂	125	125	nmol
DTT	500	500	nmol
dNTP-Mix (pro Nucleotid)	25	25	nmol
H ₂ O _{bideest.} ad.	24	28	µl

Die RNA/Primer-Ansätze wurden im Thermocycler für 10 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf 50 °C abgekühlt. Beim Erreichen der Temperatur wurde der Mix „cDNA+“ und „cDNA-“ mit „RNase-out“ (2,5 µl, 100 U) versetzt. Zusätzlich wurde zu „cDNA+“ 200 U reverse Transkriptase (Superskript II, 4 µl) hinzugegeben. Anschließend „cDNA+“ und „cDNA-“ zum Primer-Mix hinzupipettiert. Der Ansatz „cDNA-“ enthält keine reverse Transkriptase und dient daher als Negativkontrolle, in der keine cDNA gebildet wird und daher in den späteren PCR-Kontrollen auch keine Produkte entstehen dürften. Die Inkubationszeit für die cDNA-Synthese betrug 50 min. Danach wurde die Reaktion bei 70 °C für 15 min abgestoppt.

Anschließend wurde die RNA in den Ansätzen mit einem RNase-Gemisch aus RNase H (2 U) und RNase A (Qiagen, 25 µg/µl) bei 37 °C für 30 min hydrolysiert. Nukleotide, Primer und Enzyme wurden mit dem Qiaquick PCR-Purification Kit entfernt. Dabei wurde die cDNA mit 50 µl vorgewärmten H₂O_{reinst} von der Säule eluiert.

Sollte die cDNA in einer RACE-PCR eingesetzt werden, wurde anschließend der „C-Überhang“ an die bestehende cDNA angehängt.

<u>„C-tailing“ Reaktion:</u>	<u>C-tail+</u>	<u>C-tail-</u>	
RT-Puffer	0,5 x	0,5 x	
MgCl ₂	37,5	37,5	nmol
dCTP	5,0	5,0	nmol
cDNA gereinigt	10	10	µl
H ₂ O _{reinst} ad.	24	25	µl

Zusätzlich zum eigentlichen Reaktionsansatz („C-tail+“) wurde ein Ansatz als Negativkontrolle („C-tail-“) pipettiert. Die RNA in beiden Proben wurde in einem Thermocycler für 2 – 3 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf 37 °C abgekühlt. Unmittelbar nach Erreichen der Temperatur wurde zum Start der „tailing“-Reaktion („C-tail+“) 15 U des Enzyms terminale Desoxynucleotidyl-Transferase

zugegeben. Nach 10 min Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Reaktion bei 65 °C für 10 min abgestoppt.

Die Amplifikation des RACE-Produktes erfolgte in einer PCR-Reaktion mit einem sequenzspezifischen, im Vergleich zum cDNA-Synthese-Primer eingerückten Primer (20 pmol), einem für den „C-Überhang“ spezifischen sog. 5' RACE Abridged Anchor Primer (AAP, 20 pmol, Invitrogen) und 5 µl cDNA aus der „C-tailing“ Reaktion. Um die Spezifität des AAP-Primers zu überprüfen, wurde ein zweiter Ansatz pipettiert, in den 5 µl des Kontrollansatzes der „C-tailing“-Reaktion eingesetzt wurde.

Reaktionszyklus:

	95°C	2 min
30 x	95°C	0,5 min
	55°C	1 min
	72°C	1 min
	72°C	5 min

10.4 Reverse Transkriptase-vermittelte (RT)-PCR

Die RT-PCR diente zur Untersuchung der Transkriptlänge von *yhgI* aus *H. elongata* und *E. coli*. Aufgrund der hohen Sensitivität ermöglicht diese Methode auch den Nachweis von Transkripten, die in sehr geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegen und in der RACE-PCR möglicherweise keine Signale ergeben.

In einem ersten Schritt wurde die DNA-freie mRNA ausgehend von einem sequenzspezifischen Primer mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. In einer sich anschließenden PCR, die mit einem eingerückten reverse-Primer und ein forward-Primer angesetzt wurde, konnte die Länge der synthetisierten cDNA überprüft werden. Es wurden forward-Primer eingesetzt, die noch stromaufwärts von den identifizierten Transkriptionstartpunkten abgeleitet wurden. So konnte überprüft werden, ob sich Transkripte von *yhgI* über diese Bereiche hinaus erstrecken. Für die cDNA-Synthese wurde das Protokoll aus Abschnitt 10.3 verwendet. In die nachfolgende PCR-Reaktionen wurde 2 µl aus dem cDNA-Syntheseansatz („cDNA+“) bzw. dem Kontrollansatz („cDNA-“) eingesetzt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und dokumentiert.

11. Konjugation

Unter bakterieller Konjugation versteht man den horizontalen Austausch genetischen Materials durch die Übertragung eines Plasmids von einer Donor- auf eine Rezipientenzelle. Der notwendige Kontakt zwischen den beteiligten Mikroorganismen wird über Sex-Pili hergestellt. Bei weiterer Annäherung kommt es zur Ausbildung einer Plasmabrücke zwischen den beiden beteiligten Mikroorganismen. Über diese erfolgt der Austausch des genetischen Materials.

In dieser Arbeit wurden Derivate zweier nicht konjugativer, jedoch mobilisierbarer Plasmide verwendet. pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) wurde für die Herstellung von *H. elongata* Mutanten genutzt. Es handelt sich bei diesem Vektor um ein pBR322 Derivat mit einem pMB1 Replicon (Sutcliffe,

1979). Die Wirtsspezifität des Plasmids ist daher nur auf *E. coli* und die nah verwandten Gattungen *Salmonella* und *Serratia* beschränkt. pK18*mobsacB* besitzt die Mobilisierungsregion des RP4 Plasmides mit der für den Transfer erforderlichen Replikationsstelle (*oriT*), jedoch nicht dessen Transferegene (*tra*-Gene). Zur Selektion trägt das Plasmid eine Kanamycin-Resistenz.

Für die Komplementierungsexperimente von *H. elongata* Mutanten wurde pBBR1MCS verwendet (Kovach *et al.*, 1994). Hierbei handelt es sich um ein Derivat des natürlich vorkommenden Vektors pBBR1, welcher aus *Bordetella bronchiseptica* isoliert wurde (Antoine & Locht, 1992). pBBR1 und seine Derivate haben ein weites Wirtsspektrum und replizieren sich in verschiedenen Gram-negativen Bakterien u.a. *H. elongata* (Schnoor, 2001). Durch das verwendete pBBR1MCS wird ein Chloramphenicol-Resistenzgen kodiert.

Der konjugative Transfer beider Vektoren in eine Vielzahl von Mikroorganismen wird durch *E. coli* S17-1 und *E. coli* SM10 ermöglicht, bei denen die *tra*-Gene für den Transfer von Plasmiden der RK2/RP4-Gruppe (Inkompatibilitätsgruppe P) im Genom integriert sind (Simon *et al.*, 1982). Auch der für den Transfer erforderliche Replikationsursprung (*oriT*) von pBBR1MCS wird von dem entsprechenden *tra*-Genprodukt erkannt (Szpirer *et al.*, 2000), auch wenn im Gegensatz zu pK18*mobsacB* zusätzlich plasmidkodierte Proteine für die Mobilisierung notwendig sind (Antoine & Locht, 1992).

Aufgrund einer Prolin-Auxotrophie kann der Donorstamm *E. coli* S17-1 nicht auf Mineralsalzmedium wachsen. Dies ermöglicht eine Selektion gegen *E. coli* S17-1 nach der erfolgten Konjugation.

Der konjugative Transfer des Plasmides auf *H. elongata* erfolgte in modifizierter Form nach der von Kunte & Galinski (1995) entwickelten Methode.

Durchführung:

- 50 ml AB-1 oder NB-1-Medium (250 ml OD-Kolben) wurden mit *H. elongata* (Rezipient) beimpft. Die Anzucht erfolgt über Nacht bei 30 °C und 180 upm. Der plasmidtragende Donor *E. coli* S17-1 wird auf LB-1 oder AB-1-Agarplatten (mit Antibiotikum) über Nacht bei 37 °C angezogen.
- Der Donor wurde mit einer sterilen Impföse vom Agar abgekratzt und in einem Reagenzglas mit 4 ml NB-1 oder AB-1-Medium (vorgewärmt) resuspendiert, bis eine OD₅₄₀ von ca. 0,8 erreicht ist. Je 0,5 ml Donor und Rezipient wurden zusammen in ein steriles Mikro-Reaktionsgefäß pipettiert und zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 15800 x g, 3 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Rücklauf resuspendiert. Anschließend wurden sterile Nitrocellulosefilter (0,45 µm) auf die Inkubationsplatten (vorgewärmt, NB-1 oder AB-1-Medium) gelegt und die Zellsuspension auf die Filter pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C bebrütet.
- Der Nitrocellulosefilter wurde mit einer sterilen Pinzette von der Agaroberfläche genommen und in ein Mikro-Reaktionsgefäß mit 1 ml NaCl-Lösung (2 % NaCl) überführt. Die Zellen wurden durch Vortexen und Auf- und Abpipettieren vom Filter abgespült. Anschließend wurde die Zellsuspension 10⁻¹ bis 10⁻³ verdünnt, von jeder Verdünnungsstufe je 2 x 50, 100 und 200 µl auf Selektionsmedium (MM63-2 mit Antibiotikum) pipettiert und mit einer sterilen Glaspipette ausplattiert. Von der unverdünnten Zellsuspension wurden 2 x 50 µl ausplattiert.

Die erhaltenen Transkonjuganten wiesen eine plasmidvermittelte Antibiotikaresistenz auf, die ihnen ein Wachstum auf antibiotikahaltigem Medium ermöglicht. In dem für die Selektion verwendete Mineralsalzmedium wächst der Prolin-auxotrophe Donorstamm *E. coli* S17-1 nicht. Der Vektor

pK18*mobsacB* repliziert sich in freier Form nur in *E. coli* und nahe verwandten Gattungen. Kommt es nach der Konjugation zur Ausbildung Kanamycin-resistenter *H. elongata* Kolonien, muss eine Integration des Vektors in das Genom erfolgt sein.

12. Herstellung chromosomaler Mutationen durch homologe Rekombination

12.1 Chromosomale Mutationen in *Halomonas elongata* DSM 2581^T

Für die Herstellung von Mutanten von *H. elongata* wurde der Vektor pK18*mobsacB* verwendet (Schäfer *et al.*, 1994). Ein RP4-abhängiger konjugativer Transfer pK18*mobsacB* auf *H. elongata* wurde zuerst durch Göller (1999) und Grammann (2000) für die Herstellung von Deletionsmutanten verwendet. Als positiven Selektionsmarker besitzt pK18*mobsacB* das Kanamycin-Resistenzgen (Km^R) von Tn5. Als negativen Selektionsmarker trägt der Vektor ein modifiziertes *sacB* Gen aus *Bacillus subtilis*. Dieses kodiert für eine Laevan-Saccharase, ein Enzym, das die Spaltung von Saccharose und Bildung von Laevan ($[Fructose]_n$) katalysiert. Weiterhin überträgt es Fructose auf unterschiedliche Akzeptormoleküle. *Bacillus subtilis* scheidet die Laevan-Saccharase in das Medium aus, bei *E. coli* und anderen Gram-negativen Bakterien wie *Rhizobium*, *Agrobacterium* oder dem Gram-positiven *Corynebacterium* ist sie zum Teil im Periplasma lokalisiert. Dies könnte die ablaufende physiologische Prozesse stören und daher lethal wirken (bei *E. coli* ab 5 % Saccharose im Medium).

12.1.1 Herstellung des für die Mutagenese verwendeten DNA-Konstruktes

Die für die Mutagenese von *H. elongata* verwendeten DNA-Konstrukte bestehen aus dem Vektor pK18*mobsacB* sowie inserierter rekombinanter *H. elongata* DNA. Diese rekombinante DNA wurde mittels unterschiedlicher PCR-Techniken und/oder Restriktionsbehandlungen hergestellt. Mittels Blau/Weiß-Selektion wurden *E. coli* DH5 α Klone identifiziert, die pK18*mobsacB* mit integrierter DNA enthalten. Das gesuchte Konstrukt wurde nach einer Plasmidisolierung jeweils mittels Restriktionsanalyse identifiziert.

12.1.2 Konjugativer Transfer des Konstruktes auf *H. elongata* und Selektion auf den ersten Cross-Over-Prozess

Der konjugative Transfer des Plasmides auf *H. elongata* erfolgte mit *E. coli* S17-1 als Donorstamm in modifizierter Form nach der von Kunte & Galinski (1995) entwickelten Methode. Bei den Kolonien, die nach der Konjugation auf Kanamycin-haltigem (250 μ g/ml) MM63-2 wachsen konnten, handelte es sich um rekombinante *H. elongata* Stämme. Diese haben durch einen ersten Prozess homologer Rekombination pK18*mobsacB* mit der integrierten Fremd-DNA (z.B. PCR-Produkte zur Herstellung von Deletionen oder Insertionen) in das Genom integriert.

12.1.3 Selektion auf zweiten Cross-Over-Prozess

Die Selektionierung auf den zweiten Cross-Over-Prozess erfolgt mit Hilfe des *sacB*-Gens auf dem Vektor pK18*mobsacB*. Dieses sorgt dafür, dass Gram-negative und einige Gram-positive *Bacteria*

sensitiv gegenüber Saccharose sind. Das Verbleiben des Vektors mit dem *sacB*-Gen im Genom von *H. elongata* führt zum Absterben der Zellen bei einer Saccharose-Konzentration von 20 % im Medium (Göller, 1999). Zur Sicherheit wurde die Saccharose-Konzentration hier auf 22 % erhöht. Es können nur Zellen überleben, die zuvor das Plasmid durch einen zweiten Cross-Over-Prozess aus dem Genom entfernt haben. Dieser Prozess stellt entweder den Wildtyp wieder her, oder führt zum Verbleib des rekombinanten DNA-Konstruktes im Genom.

Durchführung:

- Die Km^R Kolonien von *H. elongata*, die durch die Integration des Plasmids in das Genom entstanden sind, wurden in Flüssigmedium (2 Kolben LBG-2, ohne Kanamycin) für 24 h bei 30 °C und 180 upm inkubiert. Jeder Kolben wurde mit einer Einzelkolonie beimpft.
- Die LBG-Kulturen wurden 10⁻¹ bis 10⁻⁶ verdünnt und je 100 µl aller Verdünnungsstufen und der unverdünnten LBG-Kulturen wurden auf Saccharose-Selektionsmedium (LBG-2 + 22 % Saccharose) ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C bebrütet. Auf diesem Medium können nur Zellen wachsen, die durch einen spontanen zweiten Cross-Over-Prozess das Plasmid und damit das *sacB*-Gen aus dem Chromosom verloren haben.
- Zur Kontrolle des Plasmidverlustes wurden Kolonien des Saccharose-Selektionsmedium auf LB-Platten mit Kanamycin (100 µg/ml) und 2 % NaCl überpickt.
- Mutanten von *H. elongata* wurden durch PCR an ganzen Zellen (siehe Abschnitt 8.2.3) identifiziert.

12.2 Chromosomale Mutationen in *E. coli* K-12

Für die Herstellung gezielter Mutationen im Genom von *E. coli* wurde der Vektor pMAK705 ausgewählt (Hamilton *et al.*, 1989). Dieser trägt das Chloramphenicol-Resistenzgen (Cm^R) aus dem Vektor pBR325 zur Selektion von Transformaten und ein *lacZ*'-Fragment für die Blau/Weiß-Selektion mit multipler Klonierungsstelle (MCS). Sein Replikon ist ein temperatursensitives Derivat des Vektors pSC101 und erlaubt eine Replikation nur bei einer Temperatur von ≤30 °C. Bei höheren Temperaturen ist eine freie Replikation des Vektors nicht möglich. Folglich können bei erhöhter Temperatur (43 °C) *E. coli* Stämme, die diesen Vektor tragen, die Chloramphenicol-Resistenz nur ausbilden, wenn eine Integration des Vektors in das Genom über homologe Rekombination erfolgt ist. Diese Eigenschaft nutzt man zur Herstellung von Mutationen im Genom von *E. coli*.

12.2.1 Herstellung des für die Mutagenese verwendeten DNA-Konstruktes

Wie bei *H. elongata* wurden die für die Mutagenese an *E. coli* K-12 benötigten rekombinanten DNA-Abschnitte mittels unterschiedlicher PCR-Techniken und/oder Restriktionsbehandlungen hergestellt. Nach Restriktionsverdau der PCR-Produkte wurden diese in den linearisierten, dephosphorylierten Vektor pMAK705 ligiert und in *E. coli* DH5α transformiert. Aufgrund des hitzesensitiven Replicons von pMAK705 war bei der Transformation ein verlängerter Hitzeschock (5 min) bei geringerer Temperatur (37 °C statt 42 °C) zu beachten. Außerdem verlängerte sich die Regenerationszeit der Zellen auf 90 min. Statt bei 37 °C wurden die Zellen bei 30 °C inkubiert. Die Inkubation der Agarplatten (LB-0,5,

Cm50) erfolgte ebenfalls bei 30 °C. Mittels Blau/Weiß-Selektion wurden *E. coli* DH5 α Klone identifiziert, die pMAK705 mit integrierter DNA enthalten. Das gesuchte Konstrukt wurde nach einer Plasmid-isolierung jeweils mittels Restriktionsanalyse identifiziert.

12.2.2 Transformation von *E. coli* K-12 und Bildung des Cointegrates

Das gesuchte pMAK705-Konstrukt wurde in superkompetente Zellen von *E. coli* K-12 entsprechend der obigen Protokolländerungen transformiert. Die Agarplatten (LB-0,5, Cm50) wurden bei 30 °C bebrütet.

Um im Genom von *E. coli* Deletionen vornehmen zu können, muss der Vektor mit der Deletionsvariante mittels homologer Rekombination in das Genom integrieren. Dabei handelt es sich um einen spontanen Prozess, auf den durch Erhöhung der Inkubationstemperatur (43 °C) selektioniert wird. Unter diesen Bedingungen können die Zellen die für das Wachstum auf Chloramphenicol-haltigem Medium notwendige Chloramphenicol-Resistenz nur ausprägen, wenn das Vektorkonstrukt ins Chromosom integriert wurde.

- 5 x 20 ml LB-0,5-Medium (Cm50) wurden jeweils mit einer transformierten Einzelkolonie von *E. coli* K-12 (Cm^R) angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 180 upm inkubiert.
- Für die Cointegratbildung wurden anschließend je 200 μ l einer 10⁻³ bis 10⁻⁵-Verdünnung dieser Kulturen auf LB-0,5 (Cm50) ausplattiert und bei 43 °C inkubiert.
- Mehrere große Kolonien, die auf diesen Platten angewachsen waren, wurden durch mehrfaches Überpicken auf LB-0,5 (Cm50) und Inkubation bei 43 °C gereinigt.

12.2.3 Auflösen der Cointegrate

Zur Herstellung der Mutation im Genom von *E. coli* K-12 musste der Vektors im nächsten Schritt wieder aus dem Genom entfernt werden. Diesem Vorgang erfolgt wiederum durch homologe Rekombination. Dabei gliedert der Vektor entweder das Wildtypallel oder die Deletionsvariante mit sich aus dem Genom aus. Es entsteht also die Deletionsmutante von *E. coli* K-12 oder wiederum der Wildtyp.

- Morgens wurden 50 ml LB-0,5 (ohne Cm) mit einer Kolonie eines Conintegrat-haltigen Stammes beimpfen und bei 37 °C und 180 upm inkubiert (ca. 8 h Inkubation).
- Abends wurde die Kultur 1 %ig in neues Medium überimpft und weiterhin bei 37 °C und 180 upm inkubiert (ca. 16 h Inkubation).
- Zwei weitere Male wurde morgens und zwei weitere Male abends in identischer Weise überimpft und inkubiert.
- Am vierten Tag wurden von den Verdünnungsstufen 10⁻² bis 10⁻¹⁰ (in LB-0,5) jeweils 2 x 100 μ l auf LB-0,5 ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C bebrütet.
- Am nächsten Morgen wurden Einzelkolonien auf neue Platten LB/AB-0,5 (ohne Cm) und LB-0,5 (Cm50) überpickt und die Platten über Nacht bei 37 °C bebrütet.
- Die Überprüfung auf Vorhandensein der gewünschten Mutation in den Cm^S Kolonien von *E. coli* K-12 erfolgte mittels PCR an ganzen Zellen (siehe Abschnitt 8.2.3).

13. Proteinbiochemische Methoden

13.1 Verwendetes Expressionssystem

Für die heterologe Expression von *yhgI* aus *H. elongata* wurde das pET-System von Stratagene zusammen mit dem Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Das verwendete Plasmid pET22b(+) enthält den Promotor des T7-Phagens und den *lac*-Operator aus *E. coli*. Beide sind dem entsprechenden Zielgen vorgeschaltet. Zusätzlich trägt pET22b(+) ein Carbenicillin-Resistenzgen zur Selektion. Die Expression des Zielgens ist durch IPTG induzierbar. Eine Expression erfolgt jedoch nur, wenn durch den Expressionsstamm die T7-RNA-Polymerase synthetisiert wird. Das entsprechende Gen ist im Genom von *E. coli* BL21 (DE3) integriert und unterliegt der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors. Auch die Induktion dieses Promotors erfolgt unter Zusatz von IPTG. Zusatz von IPTG verhindert in beiden Fällen eine Anbindung des *lac*-Repressors an den *lac*-Operator und ermöglicht so eine Expression der nachgeschalteten Gene.

Amplifiziertes *yhgI* aus *H. elongata* wurde nach Standardmethoden in pET22b(+) inseriert.

13.2 Fraktionierung von Zellen

13.2.1 Anzucht von *E. coli* BL21 (DE3) pETY5

Plasmidtragende *E. coli* BL21 (DE3) Stämmen wurden in LB-0,5-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin angezogen. Zur Induktion wurde dem Medium IPTG zugesetzt. Als Kulturvolumen wurde 0,5 l bzw. 1 l gewählt. Die Anzucht erfolgte in Erlenmeyerkolben mit 1 bzw. 2 l Volumen bei 37 °C und 150 upm.

13.2.2 Zellernte

Die angezogenen *E. coli* BL21 (DE3)-Kulturen wurden in einer Beckmann Kühlzentrifuge geerntet (GS3-Rotor, 4 °C, 8000 x g, 20 min). Jedes einzelne Zellpellet wurden in 50 ml einer NaCl-Lösung (0,5 %) resuspendiert und nach Vereinigung auf 2 GS3 Becher erneut gleichermaßen zentrifugiert. Jedes der Pellets wurde in 10 ml eines geeigneten Puffers (1 x Bindepuffer oder Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0) resuspendiert und dem Zellaufschluss in der „French-Press“ zugeführt.

13.2.3 Zellaufschluss mit einer „French-Press“

Die „French-Press“ (French® Pressure Cell Press, ThermoSpectronic) bietet die Möglichkeit, größere Volumen von Zellsuspension (40 ml in Druckzelle 40 K) innerhalb kurzer Zeit aufzuschließen. Der Aufschluss erfolgt dadurch, dass sich zunächst in der Druckzelle, in der sich die Zellsuspension befindet, ein hoher Druck aufbaut an den sich die Zellen anpassen. Durch das Öffnen eines Auslassventils wird der Außendruck für die ausströmenden Zellen schlagartig abgesenkt, woraufhin sie durch den nun zu hohen Innendruck platzen.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die in Puffer resuspendierten Zellen (ca. 10 – 20 ml) wurden in die auf dem Kopf stehende „French-Press“-Druckzelle (auf 4 °C vorgekühlt)

gefüllt. Anschließend wurde die Druckzelle durch Aufsatz des Bodenteils mit eingesetztem Auslassröhrchen bei geöffnetem Ventil verschlossen. Der Kolben wurde soweit in die Druckzelle geschoben bis restliche Luft vollständig entfernt war. Anschließend wurde das Ventil geschlossen und die Druckzelle mit dem Kolben nach oben in die „French-Press“ eingesetzt. Daraufhin wurde ein Pumpendruck von ca. ca. 8300 kPa (ca. 1200 Psi) angelegt. Dies entspricht einem Innendruck von ca. 124100 kPa (ca. 18000 Psi). Das Auslassventil wurde stoßweise geöffnet und die ausströmenden lysierten Zellen in einem SS34-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Beim Öffnen des Ventils wurde darauf geachtet, das der Pumpendruck möglichst nicht unter ca. 6900 kPa (ca. 1000 Psi) abfiel. Das Verfahren wurde mit einer Zellsuspension 3 bis 4 mal durchgeführt, um einen möglichst vollständigen Lyse der bakteriellen Zellen zu erreichen.

13.2.4 Gewinnung der unlöslichen Fraktion

Für die Proteinaufreinigung ist es erforderlich eine lösliche Zellfraktion zu verwenden, die möglichst wenige Zelltrümmer und andere unlösliche Zellbestandteile, z.B. Zellwandbruchstücke oder „inclusion-bodies“ enthält. Diese lassen sich durch hochtourige Zentrifugation (Beckmann Zentrifuge Avanti J-20XP, JA-25,5-Rotor, 12000 – 20000 x g, 1 h) sedimentieren. Das Pellet wurde für Dokumentationszwecke in 20 ml Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,0) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Der Überstand wurde zur weiteren Bearbeitung in die Ultrazentrifugation eingesetzt.

13.2.5 Ultrazentrifugation zur Gewinnung von löslicher und Membranfraktion

Diese Zentrifugation bei 145000 x g dient dazu, Membranbestandteile von der löslichen Zellfraktion zu trennen. Die Ultrazentrifugation wurde bei 4 °C für 3 h durchgeführt. Resultat war ein klarer, fast farbloser Überstand und ein harziges, klares, orange-braunes Membranpellet. Der klare Überstand wurde nun entweder sofort in der Nickelchelate-Chromatographie aufgearbeitet, oder nach einem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bis zur Aufarbeitung bei –70 °C gelagert. Das Membranpellet wurde mit Hilfe eines Homogenisators in 20 ml Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,0) resuspendiert und anschließend bei –20 °C eingefroren.

13.3 Nickelchelate-Chromatographie

Mit einer Nickelchelate-Chromatographie lassen sich spezifisch Proteine aufreinigen, die eine Abfolge von 6 bis 10 Histidinresten, den sog. „His-tag“, aufweisen. Ni^{2+} wird durch Chelatbildung mit reaktiven Gruppen kovalent an eine feste Matrix gebunden. Dabei werden 4 seiner 6 Bindungsstellen besetzt. Die beiden übrigen stehen für Wechselwirkungen mit Histidinresten von His-tag-Fusionsproteinen zur Verfügung. Die Elution so gebundener Proteine erfolgt durch steigende Konzentrationen Imidazol, das strukturell eng mit Histidin verwandt ist.

Zur Aufreinigung von YhgI-(His)₆ wurde ungeladene IDA-Agarose (His-Bind-Resin, Novagen, Madison/WI, USA) als Säulenmaterial verwendet. IDA (Iminodiessigsäure) dient als reaktive Gruppe, an die Nickelionen kovalent gebunden werden. Die Chromatographie erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit einzelnen Modifikation der Waschpuffer.

Als Probenmaterial wurde die lösliche Fraktion der Zellfraktionierung, die bereits in 1 x Bindepuffer aufgenommen war, eingesetzt. Zunächst wurden kleinere Teilvolumen derselben eingesetzt. Bei den letzten Reinigungen wurden bis zu 20 ml (280 mg Gesamtprotein) der löslichen Fraktion verwendet. Diese entsprach der löslichen Zellfraktion von 2 Litern einer IPTG-induzierten *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 Kultur.

Vor der ersten Chromatographie wurden 2,5 ml aufgewirbeltes Säulenmaterial in eine ca. 10 cm hohe Kunststoffsäule (Qiagen, Hilden) gegeben und sedimentieren gelassen. Zur Erhöhung des Durchlaufs wurde während der Chromatographie eine Schlauchpumpe (Minipuls-2-Pumpe, Fa. Gilson, Villiers-Le-Bel, Frankreich) angeschlossen. Der Durchlauf wurde auf ca. 1 ml Puffer pro min eingestellt. Vor der Nutzung der Säule wurde diese mit 7,5 ml sterilen H₂O_{demin.} gewaschen und anschließend durch 12,5 ml 1 x Ladepuffer mit Nickelionen beladen. Durch die folgenden 7,5 ml 1 x Bindepuffer wurde die optimalen Bedingungen für das Auftragen der Proteinproben geschaffen.

Nach dem Auftragen der Proben wurde die Säule mit Waschpuffern und unterschiedlicher Imidazol-konzentration (30, 40, 50, 60, 70 und 80 mM, je 15 bzw. 25 ml) gewaschen. Es folgte die Elutions des Proteins mit 15 ml 1 x Elutionspuffer. Restliches Protein und die Nickelionen wurden anschließend mit dem 1 x Entladepuffer (10 ml) von der Säule gewaschen. Letzterer Puffer dient auch zur Lagerung der Säule. Alle Fraktionen wurden getrennt aufbewahrt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Kleinere Teilvolumen wurden jeweils für Protein-tests und Dokumentationszwecke gesondert gelagert. In einem Fall erfolgte eine sofortige weitere Verwendung im Insulin-Reduktionstest.

13.4 Pufferwechsel mit Vivaspin 20 ml

Der Pufferwechsel der Waschpufferfraktionen, die in die physiologischen Tests eingesetzt werden sollten, wurde mit Vivaspin-Konzentratoren (20 ml, Ausschlussgrenze 10 kDa) der Fa. Vivascience (Hannover) durchgeführt. Die Durchführung entsprach den Herstellerangaben. Prinzip ist es, den zu entfernenden Puffer durch eine Membran zu zentrifugieren, durch die das gewünschte Protein in einem Restvolumen zurückgehalten wird. Durch mehrmaliges Auftragen eines neuen Puffers und wiederholte Zentrifugation, wurde ein Pufferwechsel erreicht. Die Zentrifugationsschritte wurden in einer Tischzentrifuge (Biofuge 28 RS, Rotor 3751) der Firma Heraeus bei 10 °C und 3956 x g durchgeführt. Die gereinigten Proteinlösungen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

13.5 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) nach der Methode von Smith *et al.* (1985) in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ in alkalischem Milieu. Für die Reduktion sind hauptsächlich die Peptidbindungen verantwortlich (Wiechelman *et al.*, 1988). Die Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin spielen nur eine untergeordnete Rolle. Der Test ist daher relativ unabhängig von der Aminosäurezusammensetzung der Proteine. BCA bildet spezifisch mit Cu⁺ Ionen

einen roten Farbkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm liegt und für eine Quantifizierung herangezogen werden kann, da die Intensität der Farbbildung von der Proteinkonzentration abhängig ist.

Durchführung:

- Die Proteinproben wurden entsprechend der Vorversuche mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ verdünnt.
- In eine Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 25 μl des Proteinstandards oder der Probe mit 200 μl Arbeitsreagenz gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.
- Die Absorption wurde bei 550 nm in einem vollautomatischen Photometer gemessen (ATTC, SLT-Labinstruments, Salzburg).

Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin (0 – 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$) eingesetzt. Das Arbeitsreagenz wurde nach den Angaben des Herstellers aus den mitgelieferten Lösungen hergestellt.

13.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dient der größenabhängigen Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld. Die Proteine wandern durch die Poren des Gels, deren Größe durch den Vernetzungsgrad bestimmt wird. Zudem hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine von ihrer Eigenladung sowie von ihrer Tertiärstruktur ab. Um die Einflüsse letzterer Faktoren zu verringern, kann die PAGE unter denaturierenden (Zusatz von SDS) und/oder reduzierenden (Zusatz von β -Mercaptoethanol) Bedingungen durchgeführt werden. Dieses Verfahren wurde 1970 von Laemmli entwickelt und trägt den Namen SDS-PAGE.

13.6.1 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

Bei Verwendung von SDS in einer PAGE wird die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine von ihrer Eigenladung und Tertiärstruktur vermindert. SDS lagert sich an den hydrophoben Kern der Proteine an und verringert die stabilisierenden Wechselwirkungen, so dass sich die Proteine entfalten. Zusätzlich führt SDS eine Vielzahl negativer Ladungen in das Protein ein und überlagert damit die Eigenladung der Proteine. Die Proteine werden dann abhängig von ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt, da die Höhe der eingeführten Ladung proportional zur Molekülmasse (1 SDS / 2 Aminosäuren) ist. So lässt sich die Laufstrecke im Gel einem Molekulargewicht zuordnen. Es handelt sich dabei jedoch um das sog. apparente Molekulargewicht, da sich manche Proteine nach diesem Protokoll nicht entsprechend ihres Molekulargewichts auftrennen lassen.

Intramolekulare Disulfidbrücken stabilisieren die Tertiärstruktur von Proteinen, intermolekulare Disulfidbrücken verknüpfen Peptidketten zu einem aus mehreren Untereinheiten bestehenden Protein. Beides führt zu einem Laufverhalten der Proteine, das auch in einer SDS-PAGE nicht dem Molekulargewicht entspricht. Um dieses Problem zu umgehen, können durch Einsatz von β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken reaktiv gespalten werden. Im Folgenden wird die unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen durchgeführte PAGE verkürzt als SDS-PAGE bezeichnet.

Eine weitere Verfeinerung der SDS-PAGE stellt die diskontinuierliche SDS-PAGE dar, welche die Möglichkeit bietet, die einzelnen Proteinbanden sehr scharf zu fokussieren. Hierbei werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel bei pH 6,8 und hoher Feldstärke fokussiert und in dem nachfolgenden Trenngel bei pH 8,8 entsprechend ihrer Molekulargewichts aufgetrennt.

Gelzusammensetzung:

Die Gele bestehen aus Acrylamidmolekülen, die durch Einsatz des Radikalbildners Ammoniumpersulfat (APS) eine radikalische Polymerisation zu langen Ketten durchführen. Als Katalysator dieser Reaktion dient TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin). Zur Quervernetzung der Acrylamid-Ketten wird N,N'-Methylen-Bisacrylamid zugesetzt. Die Vernetzung erfolgt über die Methylengruppen. Die Porengröße des Gels wird durch den Gesamtgehalt an Acrylamid und Bisacrylamid (% (w/v) T) und den Anteil des Quervernetzlers am Gesamtgehalt (% (w/v) C) bestimmt. Vor der Herstellung der Gele wurde zunächst der Acrylamid-Mix hergestellt (Tab. 6).

Acrylamid-Mix (T= 20 %, C= 2 %)	
40 % Acrylamid	9,8 ml
2 % Bisacrylamid	4 ml
Aqua demin.	6,2 ml

Tab. 6: Zusammensetzung des verwendeten Acrylamid-Mix

Trenn- und Sammelgel wurden, wie in Tabelle 7 angegeben, angesetzt. APS und TEMED wurden zum Start der Polymerisation zugesetzt. Entsprechend der Angaben des Gelkammer-Herstellers (Owl Scientific, Portsmouth/NH, USA) wurde zuerst das Trenngel bis ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes der kleineren Glasplatte gegossen. Das Gel wurde mit 98 %igem Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation (ca. 30 min) wurde der Ethanol entfernt, das Sammelgel gegossen und der Probenkamm eingesetzt.

Trenngel (T= 13 %)		Sammelgel (T= 4 %)	
Trenngelpuffer	2,5 ml	Sammelgelpuffer	1,25 ml
Acrylamid-Mix	6,5 ml	Acrylamid-Mix	1,0 ml
SDS (10 %)	0,1 ml	SDS (10 %)	0,05 ml
H ₂ O _{demin.}	0,9 ml	Aqua demin.	2,7 ml
für die Polymerisation			
APS (10 %)	0,05 ml		
TEMED	0,005 ml		

Tab. 7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Gelelektrophorese:

Die Gele wurden entsprechend der Herstellerangaben in die Elektrophoresekammer eingebaut (The Penguin, Owl Scientific, Portsmouth/NH, USA). Die Pufferkammer wurde mit Laufpuffer gefüllt und die Proben aufgetragen. Alle Proben wurden zur Vorbereitung mit 1 Volumen reduzierendem und denaturierendem Probenpuffer (2 x RSB) versetzt und für 10 min auf 70 °C erhitzt. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Gelkammer an eine Spannungsquelle (Electrophoresis Power Supply EPS 500/400, Pharmacia, Uppsala/Schweden) und eine Wasserkühlung angeschlossen. Während des Laufs der Proteine im Sammelgel wurde eine Spannung von 60 V angelegt, die später auf bis zu 100 V erhöht wurde.

13.6.2 Diskontinuierliche PAGE unter nativen (nicht denaturierenden und nicht reduzierenden) Bedingungen

Die native PAGE wurde wie unter 13.6.1 beschrieben durchgeführt. Aus allen Lösungen wurde jedoch SDS und β -Mercaptoethanol weggelassen. Die Gelkammer wurde mit vorgekühltem Laufpuffer (ohne SDS, 4 °C) verwendet und die Proben wurden vor dem Auftragen nicht erhitzt.

13.6.3 Coomassie-Färbung

Zum Nachweis der aufgetrennten Proteine wurde das Gel für ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Der Farbstoff bindet unter sauren Bedingungen irreversibel an Proteine und macht diese als blaue Banden sichtbar. Die Nachweisgrenze liegt bei 1,5 μ g Protein. Damit ist die Methode recht unsensitiv, ist jedoch für die vorliegenden Anwendungen ausreichend. Nach der Färbung wurde das Gel dreimal für 15 min und zusätzlich über Nacht in Entfärberlösung unter leichtem Schütteln (IKA Vibrax, VRX, Staufen) inkubiert.

13.6.4 Gel Trocknung

Zur Dokumentation und Konservierung des Acrylamidgels wurde dieses auf Whatmanpapier (Fa. Whatman) liegend mittels eines Vakuumtrockners (Aldo Xer Gelrockner, Firma Schütt, Göttingen) bei 50 °C für 60 min getrocknet. Das Gel ist hinterher in Folien eingeschweißt unbegrenzt lagerbar.

13.7 Western-Blot

Der Western-Blot ist eine sensitive Methode um einzelne Proteine eines Gemisches nach einer PAGE spezifisch nachzuweisen. Die Methode setzt sich aus dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, einer Immunhybridisierung und einem kolorimetrischen Nachweis zusammen. Der Transfer der Proteine nach einer PAGE erfolgt per Elektrobplot. Anschließend bindet ein spezifischer Antikörper das Zielprotein und wird dann selbst von einem zweiten Antikörper gebunden. Letzterer ist mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt. Diese macht bei Zusatz geeigneter Nachweisreagenzien die Lokalisation der spezifisch gebundenen Antikörper sichtbar. In dem vor-

liegenden Fall wird als primärer Antikörper ein gegen den „His-tag“ gerichteter monoklonaler Maus-Antikörper verwendet.

13.7.1 Western-Transfer

Der Western-Transfer wurde nach der Methode von Towbin *et al.* (1979) mittels Elektroblob (Owl Scientific, Portsmouth/NH, USA) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden zwei Gel-Blotting-Papiere (Schleicher und Schuell, Dassel) und ein Stück Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel) auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und für ca. 1 h in Towbin-Puffer inkubiert. Nach der Gelektrophorese wurde auch das Gel für 15 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde das Gel seitenverkehrt (Orientierung markieren) auf ein Stück Blot-Papier gelegt, das luftblasenfrei auf der unterliegenden Kathode platziert worden war. Auf das Gel wurde luftblasenfrei die Membran aufgebracht. Den Abschluss bildete ein weiteres Blot-Papier, das den Kontakt zur Anode herstellt. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern die Proteine zur Anode und bleiben auf der Membran haften. Für den Transfer wurde für 1 h eine Spannung von 15 V bei einer maximalen Stromstärke von 400 mA angelegt (Electrophoresis Power Supply EPS 500/400, Pharmacia, Uppsala/Schweden). Nach dem Transfer wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung angefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen.

13.7.2 Immunhybridisierung

Die Membran wurde über Nacht auf einem Schüttler (IKA Vibrax VXR, Janke und Kunkel, Staufen) in Blockierungslösung inkubiert. Damit wurde eine spätere unspezifische Anbindung des Antikörpers an die Membran verhindert, die zu starken Hintergrundsignalen geführt hätte. Nach der Blockierung wurde die Membran 2 x 10 min mit TBSTT und 1 x 10 min mit TBS gewaschen. Zum Nachweis des Proteins wurde dann 3 µg monoklonaler Maus-Anti-His-tag Antikörper (Novagen) in 25 ml Blockierungsreagenz gegeben und damit die Membran für 1 h inkubiert. Nach der Entfernung des Antikörpers wurde die Membran erneut 2 x 10 min mit TBSTT und 1 x 10 min mit TBS gewaschen. Der sekundäre gegen den ersten Antikörper gerichtete Antikörper (monospezifischer polyklonaler Ziegen-Anti-Maus-Antikörper, Novagen) wurde anschließend 1 : 5000 verdünnt in 25 ml TBS (1 % Casein, 10 % Magermilchpulver) eingesetzt. Darin wurde die Membran 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5 x 10 min mit TBSTT gewaschen. Alle Schritte erfolgten unter langsamem Schütteln bei Raumtemperatur.

13.7.3 Kolorimetrischer Nachweis

Zum Nachweis der Protein-Antikörper-Komplexe wurde die an den sekundären Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase genutzt. Dieser dient zugesetztes BCIP als Substrat, welches nach seiner Dephosphorylierung oxidativ in einen blauen, wasserunlöslichen Indigofarbstoff überführt wird. Als Oxidationsmittel dient NBT, welches bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff reagiert und somit farbverstärkend wirkt.

Die Membran wurde in ein sauberes Färbegefäß überführt. 66 µl einer NBT-Stammlösung (0,33 mg/ml) und 68 µl einer BCIP-Stammlösung (0,17 mg/ml) wurden mit 20 ml AP-Puffer gemischt

und auf die Membran gegeben. So wurde die Membran bei geöffnetem Deckel für ca. 2 min von Hand geschwenkt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Anschließend wurde die Membran mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ gewaschen und in feuchtem Zustand in eine Folie eingeschweißt.

13.8 Insulin-Reduktionstest

Nach Holmgren (1979) kann die Reduktion von Insulin unter Zusatz von DL-Dithiothreitol (DTT) zum Nachweis einer Thioredoxin-ähnlichen Funktion eines Proteins genutzt werden. Die Reduktion von Insulin führt zum Zerfall in die Einzelketten A und B. Diese sind bei neutralem pH-Wert schlecht löslich und führen zu einer Trübung des Reaktionsansatzes. Diese Trübung kann durch Bestimmung der Zunahme der OD_{600} des Reaktionsansatzes verfolgt werden. Somit dient die Trübung als Maß für eine fortschreitende Reduktion von Insulin.

Zur Durchführung wurde zunächst eine Stammlösung von Rinderpankreas-Insulin (10 mg/ml) in einem Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) hergestellt. Dazu wurden 100 mg Insulin zu 8 ml des Puffers gegeben. Vor der Zugabe des Insulins wurde der pH-Wert des Tris-Puffers auf ca. 2 – 3 abgesenkt (3 Tropfen 1 M HCl, Indikatorpapier). Nach der Zugabe von Insulin wurde mit 1 M HCl titriert, bis sich das Insulin vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde das Volumen mit Tris-Puffer auf 10 ml aufgefüllt. Die Stammlösung konnte über Wochen in 1 ml Aliquots bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden. Vor dem Gebrauch wurde die Insulin-Stammlösung frisch mit Reaktionspuffer (Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0) auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt.

Die Reduktionsreaktion von Insulin wurde in einem Gesamtvolumen von 600 μl durchgeführt. Im Reaktionsansatz enthalten waren 1 mM DTT (0,1 M Stammlösung), 0,145 mM Insulin (500 μl der verdünnten Stammlösung), Reaktionspuffer und Thioredoxin (2,5 bzw. 5 μM), BSA (5 μM) oder Yhgl-His₆ (5 μM). Thioredoxin, BSA und Yhgl-His₆ wurden jeweils als 50 μM Stammlösungen angesetzt, die jeweils im Ansatz 1 : 10 verdünnt wurden. Um ein Reaktionsvolumen von 600 μl zu erreichen, wurde der Ansatz mit der entsprechende Menge Reaktionspuffer aufgefüllt. Zusätzlich wurde eine Reduktionsansatz mit Insulin ohne Zusatz von Enzym durchgeführt. Er diente als Vergleich, um die Basisreduktion von Insulin zu dokumentieren. Als Nullwert für die Eichung des Photometers wurde ein Ansatz mit Insulin und Reaktionspuffer ohne Zusatz von DTT verwendet.

14. BacterioMatch[®] Two-Hybrid-System

„Two-Hybrid-Systeme“ sind eine leistungsfähige Methoden für die Identifikation von Bindungspartnern eines Proteins. Das System erlaubt es, Interaktionen zwischen bekannten Proteinpaares *in vivo* zu untersuchen, aber auch uncharakterisierte Proteine einer Genbank mit einem Zielprotein wechselwirken zu lassen. Hierfür werden zwei zu untersuchende Proteine, ein „bait“ (Köder, Protein dessen Partner gefunden werden soll) und ein „target“ (möglicher Bindungspartner) als Fusionsproteine in einem Reporterstamm koexprimiert. In der Regel erfolgt die Fusion mit Untereinheiten von Transkriptionsregulatoren oder anderen an der Expressionsregulation beteiligten Proteinen. Wenn die beiden zu untersuchenden Proteine in der Zelle interagieren, wird ein biochemischer Prozess aktiviert, der die Interaktion erkennen lässt.

Traditionell werden Hefe-basierte Two-Hybrid-Systeme verwendet und bisher waren auch die meisten untersuchten Proteine eukaryontischen Ursprungs. Hier jedoch sollte ein *E. coli* basiertes Two-Hybrid-System (BacterioMatch[®] Two-Hybrid) der Firma Stratagene zur Anwendung kommen, um Wechselwirkungen bakterieller Proteine zu untersuchen. Das System basiert auf einer von Dove *et al.* (1997) entwickelten Methode. Im Vergleich zum Hefe-System können hier die Ergebnisse einfacher und schneller erzielt werden, da u.a. aufwendige Transformationsprozesse mit Hefen entfallen.

Beim BacterioMatch[®] Two-Hybrid-System soll die Interaktion der Partnerproteine durch zwei Reportergene, nachgewiesen werden. Bei dem ersten Reportergen handelt es sich um ein Resistenzgen gegen β -Lactamantibiotika. Genutzt werden sollte Carbenicillin, eine gegen spontane Hydrolyse stabileren Variante des Penicillins. Bei dem zweiten Reportergen handelt es sich um das *lacZ*-Gen, dessen Genprodukt (β -Galaktosidase) bei Umsatz von X-Gal eine Blaufärbung der Kolonien zur Folge hat. Beide Gene sind als Operon auf dem F'-Episom im Genom des Reporterstammes integriert und werden durch einen gemeinsamen Promotor kontrolliert. Eine Expression dieser Gene erfolgt nur bei Interaktion der Proteine. Das System basiert also auf einer Transkriptionsaktivierung (Abb. 2).

Das „Köderprotein“ („bait“) wird in dem pBT-Vektor mit dem λ -Phagen Repressorprotein (λ cl) fusioniert (Abb. 2). Das entsprechende Zielprotein („target“) wird in dem pTRG-Vektor mit der N-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase fusioniert (Abb. 2). Der den Reportergenen vorgeschaltete Promotor ist vom *lac*-Promotor abgeleitet und enthält anstelle der natürlichen CAP-Bindungsstelle eine einzelne λ -Operator-Anbindungsstelle an Position -62. Durch Bindung von λ cl an den Operator wird das „bait“-Protein stromaufwärts des Promotors fixiert. Wenn dann „bait“ und „target“ interagieren, stabilisieren sie die Bindung der RNA-Polymerase nahe des Promotors und aktivieren so die Expression der Reportergene. Die Expression der Fusionsproteine kann durch Zusatz von IPTG gesteigert werden.

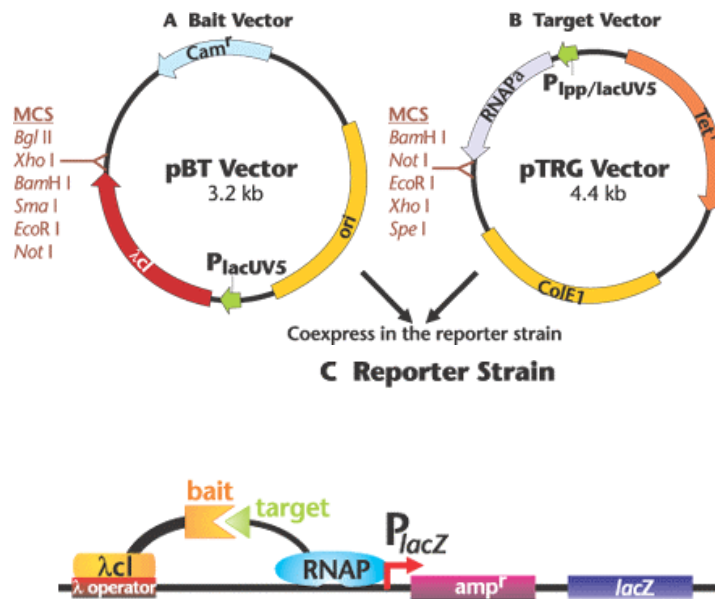


Abb. 2: Übersicht über Komponenten und Funktion des BacterioMatch® Two-Hybrid-Systems

Abgebildet sind die beiden zum Two-Hybrid-System gehörenden Vektoren pBT („bait“-Vektor) und pTRG („target“-Vektor) mit ihren Charakteristika. Zu erkennen sind die multiplen Klonierungsstellen (MCS), in welche die Insertion von „bait“ und „target“-Sequenz erfolgt, und die Genabschnitte λ cl bzw. RNAP α mit denen die jeweilige Fusion erfolgen soll. Im unteren Teil der Abbildung ist der Aufbau einer möglichen Protein-Protein-Wechselwirkungen schematisch dargestellt. „amp^r“ stellt die β -Lactamantibiotika-Resistenz, *lacZ* die β -Galaktosidase kodierende DNA-Sequenz dar. (Quelle: Stratagene)

Für YhgI aus *H. elongata* wurden beide möglichen Versuchsansätze, die Verwendung einer Genbank als „target“ und die Verwendung einer bekannten Zielsequenz als „target“ angewendet. Für YhgI aus *E. coli* wurden Wechselwirkungen mit einer bekannten Zielsequenz untersucht.

14.1 Konstruktion der Vektoren für das Two-Hybrid-System

YhgI aus *H. elongata* DSM 2581^T und *E. coli* K-12 dienten in der vorliegenden Arbeit als „bait“-Proteine, für die Bindungspartner identifiziert werden sollten. Beide *yhgI*-Sequenzen sollten jedoch in beide Vektoren inseriert werden, da sterische Einflüsse eine Wechselwirkung der YhgI-Fusionsproteine mit Partnerproteinen verhindern können.

Für die Klonierungen, die bei der Konstruktion der Vektoren des Two-Hybrid-Systems durchgeführt wurden, wurde *E. coli* XL1-blue MRF' Kan^R verwendet. Dieser Stamm ist geeignet, die Grundexpression der Fusionsproteine zu unterdrücken, um so die Akkumulation eines möglicherweise toxischen Levels derselben zu verhindern. Erreicht wird dies durch einen modifizierten *lac*-Repressor (*lac^R*), der für eine besonders niedrige Grundexpression sorgt.

In einem ersten Versuchsansatz wurde untersucht, ob YhgI aus *H. elongata* bzw. *E. coli* Wechselwirkungen mit dem an Kompetenzmechanismen beteiligten YhgH eingeht. Für die benötigten Genfusionen musste *yhgI* aus *H. elongata* und *E. coli* mit geeigneten Primern amplifiziert und in die Vektoren pBT bzw. pTRG ligiert werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass *yhgI* mit den Sequenzen,

die für die Proteine λ cl bzw. RNAP α kodieren, in dem selben Leseraster als Fusion exprimiert wird. Gleiches galt für *yhgH* aus *E. coli*.

In dem anderen Untersuchungsansatz sollten mögliche Wechselwirkungspartner von YhgI aus *H. elongata* durch „Screening“ einer Genbank aus *H. elongata* DNA identifiziert werden. Vom Hersteller des „Two-Hybrid-Systems“ (Stratagene) ist die Nutzung einer cDNA-Bank vorgesehen. Die Möglichkeit der Herstellung einer vollständigen cDNA-Bank besteht bisher jedoch nur für eukaryontische Organismen, da hier die mRNA an ihrem 3'-Ende einen Poly-A-Extension trägt. Bei Prokaryonten ist diese Modifikation nur sehr selten vertreten (Mycobakterien), daher entfällt die Möglichkeit, eine qualitativ vollständige cDNA-Bank zu erstellen. Als Alternative sollte hydrolysierte Gesamt-DNA von *H. elongata* DSM 2581^T für die Erstellung der Genbank herangezogen werden. Hier erfolgt die Insertion der möglichen Partnerproteine rein zufällig und kann nicht beeinflusst werden.

14.2 Selektion positiver Klone

Für eine Identifizierung der Partnerproteine wurden die Vektorkonstrukte paarweise in den Reporterstamm BacterioMatch[®]I transformiert. Eins der Fusionsproteine wurde jeweils durch pBT das andere durch pTRG exprimiert. *yhgI* bzw. *yhgH* wurden jeweils in beide Vektoren ligiert, um beide Orientierungen einer möglichen Interaktion auszutesten. Auch wurden alle Gene gleichzeitig in beide Vektoren kloniert in den Reporterstamm transformiert, um eine mögliche Bildung von Homooligomeren der entsprechenden Proteine beobachten zu können.

Als Positivkontrolle wurde das Vektorenpaar pBT-LGF2 und pTRG-Gal11^P, als Negativkontrolle das Vektorenpaar pBT und pTRG verwendet. Alle Plasmid wurden jeweils paarweise kotransformiert.

Zum Nachweis einer möglichen Interaktion wurden die plasmidtragenden Stämme auf Selektionsplatten überpickt. Die erste Selektionsplatte (10 ml Medium, LB-0,5) enthielt Chloramphenicol (50 μ g/ml), Tetracyclin (15 μ g/ml), X-Gal (80 μ g/ml) und den β -Galaktosidasehemmer Phenylethyl- β -D-thio-Galaktosid (PETG, 1 mM). PETG wurde als 125 mM Stammlösung in 50 % sterilem H₂O_{demin.} und 50 % DMSO angesetzt. Es dient dazu eine Blaufärbung der Kolonien, die aufgrund einer Grundexpression der Reportergene ohne Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgt, zu verhindern. Die Platten wurden bei 37 °C bebrütet. Eine Blaufärbung deutet auf eine Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine hin.

Als zweites Selektionsmedium wurden LB-Agarplatten (0,5 % NaCl) mit Chloramphenicol (50 μ g/ml), Tetracyclin (15 μ g/ml) und Carbenicillin (bis 300 μ g/ml) verwendet. Diese Platten wurden nach Protokoll bei 30 °C bebrütet. Wachstum auf diesen Carbenicillin-haltigen Platten sollte auf eine Interaktion der Fusionsproteine hindeuten.

15. Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung wurden Plasmidekonstrukte und PCR-Produkte verwendet. Durchgeführt wurde die Sequenzierungen von der Firma SequiServe (Vaterstetten) nach der Didesoxymethode von Sanger *et al.* (1977).

16. Software und Internet-basierte Computeranalysen

- **Agilent:** Biochemical-Analysis Software, Agilent-Technologies
- **Amplify 1.2:** (1999) William Engels, Genetics Department, University of Wisconsin, 445 Henry Mall, Madison, WI 53706
- **Blast:** (Basic Local Alignment Search Tool) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (Altschul *et al.*, 1990)
- **CD-Search:** (Conserved domain Search): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml> (Marchler-Bauer *et al.*, 2003)
- **Clone-Manager 5.0:** Scientific & Educational Software, Durham, USA
- **ClustalW:** <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>; WWW Service at the European Bioinformatics Institute, Rodrigo Lopez, Services Programme (Thompson *et al.*, 1994)
- **COG:** (Cluster of orthologous genes) NCBI-Homepage; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/> (Tatusov *et al.*, 1997; Tatusov *et al.*, 2001)
- **DAS:** (Dense Alignment Surface method) <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/> (Cserzo *et al.*, 1997)
- **DNA-Strider 1.2:** Christian Marck, Service de Biochimie et de Genetique Moleculaire, Bat. 142 Centre d'Etudes de Saclay, 91191 GIF-Sur-Yvette Cedex, France
- **Genepro 6.10:** (1994) Riverside Scientific Enterprises, 15705 Point Monroe, Bainbridge Island WA 98 110
- **MAKELOGO/Weblogo:** <http://weblogo.berkeley.edu/>; (Schneider & Stephens, 1990)
- **Mfold:** <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>; (Zuker, 2003)
- **Neural Network Promotor Prediction:** (NNPP) Berkeley Drosophila Genome Project; http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.htm; (Reese, 2001)
- **LipoP:** <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>; (Juncker *et al.*, 2003)
- **ORF-Finder:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>; National Center for Biotechnology Information, Webseite
- **PROSITE:** us.expasy.org/tools/scanprosite/ (Bairoch *et al.*, 1997; Falquet *et al.*, 2002)
- **ProtParam tool:** <http://us.expasy.org/cgi-bin/protparam/>; ExPASy Molecular Biology Servers
- **PSORT-B:** Version 1.1.2; <http://www.psort.org/psortb/index.html>; (Gardy *et al.*, 2003)
- **PHYLODENDRON:** D.G. Gilbert, Version 0.8d; <http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>
- **Swift:** Pharmacia-Biotech
- **Webcutter 2.0[®]:** (1997) Max Heiman; <http://rna.lundberg.gu.se/cgi-bin/cutter2/cutter>

17. Verwendete Chemikalien

Nährböden/Nährbodenzusätze:

Antibiotic broth medium No. 3	Oxoid (Wesel)
Select Agar	Gibco BRL (Karlsruhe)
Nutrient broth	Merck (Darmstadt)
D-Glucose x H ₂ O	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Difco (Detroit, USA)
Pepton/Trypton/Caseinhydrolysat	Difco (Detroit, USA), Merck (Darmstadt)
Saccharose	Merck (Darmstadt)

Medienzusätze

IPTG	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
X-Gal	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
DMSO	Sigma (Deisenhofen)
Antibiotika	Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen)
Betain	Fluka (Buchs, Schweiz)
Biotin	Merck (Darmstadt)
Methionin	Merck (Darmstadt)

Salze:

CaCl ₂	Merck (Darmstadt)
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	Fluka (Buchs, Schweiz)
KCl	Merck (Darmstadt)
KH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt)
K ₂ HPO ₄	Merck (Darmstadt)
KOH	Merck (Darmstadt)
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck (Darmstadt)
MgSO ₄ x H ₂ O	Fluka (Buchs, Schweiz)
MnCl ₂	Sigma (Deisendorf)
NaCl	Merck(Darmstadt)
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck(Darmstadt)

Molekularbiologie:

λ-DNA	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
1 kb-Leiter	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
100 bp-Leiter	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
dNTP-Mix	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
dATP, dTTP, dCTP, dGTP	Roche (Mannheim)
Dig-11-dUTP	Roche (Mannheim)
Agarose	Appligene
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
Phenol für RNA-Isolierung	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
EDTA	Serva (Heidelberg)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Fluka (Buchs, Schweiz)
PIPES	Sigma (Deisenhofen)

SDS	Serva (Heidelberg)
Tris	Paesel & Lorei (Frankfurt), Roth (Karlsruhe)
Ficoll	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Isopropanol	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosin	Sigma (Deisenhofen)
RNase away	Roth (Karlsruhe)
DEPC	Roth (Karlsruhe)
Anti Digoxigenin AP, Fab-Fragment	Roche (Mannheim)

Proteinchemie:

Acrylamid	Merck (Darmstadt)
Amoniumpersulfat	Biorad (Hercules, CA, USA)
Bisacrylamid	Merck (Darmstadt)
BSA	Serva (Heidelberg)
β -Mercaptoethanol	Biorad (Hercules, CA, USA)
Casein	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Serva (Heidelberg)
Imidazol	Sigma (Deisendorf)
Magemmilchpulver	Uelzena (Uelzen)
SDS	Serva (Heidelberg)
Temed	Biorad (Hercules, CA, USA)
TritonX-100	Fluka (Buchs, Schweiz)
Tween20	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Coomassie-brilliant-blue	Meck (Darmstadt)
Eisessig	Roth (Karlsruhe)
Proteinmarker	Merck (Darmstadt)
BCIP/NBT	Roche (Mannheim)
NiSO ₄	Sigma (Deisendorf)
His-bind-Resin	Novagen (Madison, WI, USA)
Thioredoxin	Promega (Madison, WI, USA),
Insulin	Sigma (Deisendorf)
Monoklonaler Maus anti-His-tag-Antikörper	Novagen (Madison, WI, USA)
Ziege-anti-Maus-IgG-AP-Konjugat	Novagen (Madison, WI, USA)

Enzyme & Proteine:

alkalische Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Restriktionsendonukleasen	Promega (Madison, WI, USA), MBI Fermentas, Roche
RNAse	Qiagen (Hilden)
Taq-Polymerase	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Pwo-Polymerase	Roche (Mannheim)
Terminale Transferase	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
DNase (RNAse-frei)	Roche (Mannheim)

Verwendete Kits:

GC-Rich-PCR-System	Roche (Mannheim)
first-strand cDNA Synthese-Kit	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

BCA-Proteintest	Pierce (BA Oud, Beijerland, Niederlande)
DNA-Isolierung, Plasmidisolierung	
Midi- und Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
RNA-Isolierung + DNase	Qiagen (Hilden)
Microcon	Amicon (Beverly, USA)
Vivaspin (10 K, 20 ml)	Vivascience (Hannover)

III. Ergebnisse

1. Sequenzierungen der genomischen DNA von *Halomonas elongata* DSM 2581^T im Bereich von *yhgl* / *methH*

Zu Beginn der Arbeit war der Sequenzbereich, der den Basen 1024 bis 3083 der *H. elongata* Sequenz im Anhang entspricht, bekannt (Burdziak, 1999). Es handelt sich dabei um den Bereich genomischer DNA, der bei der Identifizierung des Tn1732-Insertionsortes der Mutante *H. elongata* ABU44 in den Vektor pHSG575 kloniert und anschließend sequenziert worden war.

Für eine weitere molekularbiologische und physiologische Charakterisierung der beiden hypothetischen Gene musste zunächst ihre Sequenz vervollständigt werden. Dazu wurde die Methode der Ligase-vermittelten PCR angewendet. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die durch die einzelnen Primer sequenzierten DNA-Bereiche.

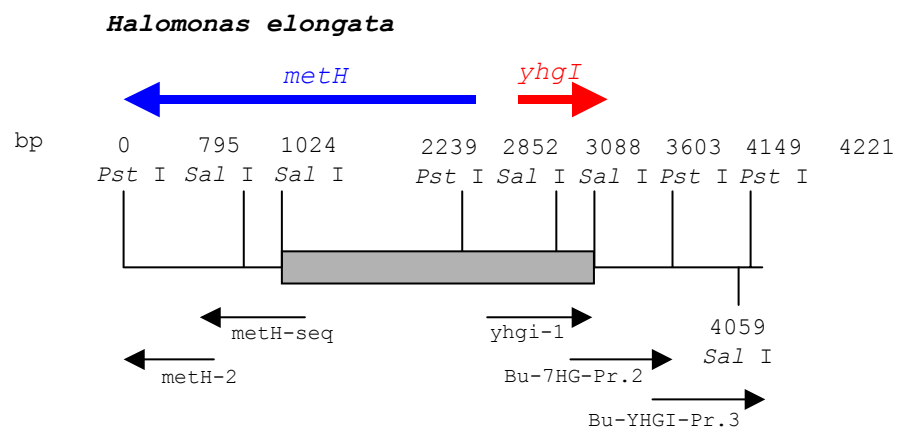


Abb. 3: Übersicht über den sequenzierten Bereich genomischer *H. elongata* DNA

Dargestellt ist die sequenzierte genomische DNA von *H. elongata* aus dem Bereich der hypothetischen Gene *yhgl* und *methH*. In grau gehalten und von *Sal* I-Schnittstellen eingerahmt ist der schon aus den Vorarbeiten bekannte Sequenzbereich (Burdziak, 1999). Die übrigen Bereiche wurden in der vorliegenden Arbeit sequenziert. Die Pfeile stellen die durch den jeweiligen Primer sequenzierten DNA-Bereiche dar. Der mit *yhgi-1* sequenzierte Bereich diente der Absicherung der Sequenz, da dieser Bereich vorher nur einzelsträngig sequenziert worden war. Dieser Bereich ist mittlerweile dreifach sequenziert. Er enthält eine *Sal* I-Schnittstelle (Position 2852), die jedoch nicht geschnitten wird. Grund hierfür könnte ein störendes Methylierungsmuster sein (siehe Diskussion zum BacterioMatch[®] Two-Hybrid-System, Abschnitt 6.1). Zur Verdeutlichung sind zusätzlich die ORFs von *methH* (blau, bekannter Sequenzbereich) und *yhgl* (rot) eingezeichnet.

1.1 Sequenzierung stromaufwärts des bekannten DNA-Bereiches

Für die Sequenzvervollständigung des ORFs *methH* wurde genomische DNA von *Halomonas elongata* DSM 2581^T und der Vektor pUC18 einem Restriktionsverdau mit *Pst* I unterzogen. Hydrolysiertes pUC18 und hydrolysierte genomische DNA wurden mittels Ligation verknüpft. Mit 1 µl dieses Ligationsansatzes und den Primern KnTn1732A/1 und lacZ wurde ($T_a = 59^\circ\text{C}$) ein ca. 2,2 kb großes PCR-Produkt amplifiziert. Nach einer Aufreinigung des PCR-Produktes mit dem Qiagen PCR-

Purification-Protokoll wurde mit der gereinigten DNA und den Primern methH-1 und lacZ eine einseitige nested-PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt war mit 1,9 kb um ca. 300 bp verkürzt ($T_a = 59\text{ °C}$). Nach der Aufreinigung des PCR-Produktes in einem Agarosegel wurde dieses sequenziert. Dafür wurden die Primer methH-seq und methH-2 verwendet. Es wurde bis zum Erreichen der Vektorsequenz sequenziert. Eine weitere Sequenzierung sollte ggf. nach ersten physiologischen Charakterisierungen erfolgen. Der sequenzierte Bereich entspricht den Basen 0 bis 1023 der im Anhang dargestellten *H. elongata* DNA-Sequenz.

1.2 Sequenzierung stromabwärts des bekannten DNA-Bereiches

Da bei der vorherigen Durchführung eine Vielzahl von Nebenprodukten neben dem Hauptprodukt amplifiziert worden waren, sollte für die Sequenzvervollständigung von *yhgI* zunächst die zu erwartende Größe des PCR-Produktes durch ein Southern-Hybridisierungsexperiment abgeschätzt werden. Dazu wurde *Pst* I-hydrolysierte *H. elongata* DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und mittels eines Vakuublots auf eine Nylonmembran übertragen. Nach der anschließenden Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten PCR-Sonde, die mit den Primern *yhgI*-1 und *yhgI*-rev amplifiziert worden war, konnte ein 1,0 bis 1,5 kb großes *Pst* I-Restriktionsfragment nachgewiesen werden. Für die Ligasevermittelte PCR wurde die genomische DNA von *H. elongata* sowie pUC18 erneut mit *Pst* I hydrolysiert und ligiert. Mit den Primern *yhgI*-1 und lacZ wurde anschließend ein 1,5 kb großes PCR-Produkt amplifiziert ($T_a = 59\text{ °C}$). Dieses wurde nach einer Aufreinigung im Agarosegel mit den Primer *yhgI*-1 und Bu-7HG/-Pr.2 sequenziert.

Zur weiteren Sequenzierung stromabwärts von *yhgI* wurde die DNA von *H. elongata* mit *Hin* dIII, pUC18 mit *Hin* dIII und zusätzlich mit *Eco* RI hydrolysiert. Durch Doppelverdau des Vektors konnte die Zahl der möglichen Ligationsprodukte und so die Zahl unspezifischer Nebenprodukte verringert werden. Nach der Ligation wurde mit den Primern *yhgI*-2 und lacZ ein 1,5 kb großes PCR-Produkt amplifiziert. Eine einseitige nested-PCR mit dem eingerückten Primer Bu-YHGI-Pr.3 ergab ein ca. 1,25 kb großes PCR-Produkt, das nach einer Aufreinigung im Agarosegel mit dem Primer Bu-YHGI-Pr.3 ansequenziert wurde.

Der sequenzierte Bereich entspricht den Basen 3089 bis 4221 der im Anhang dargestellten *H. elongata* DNA-Sequenz.

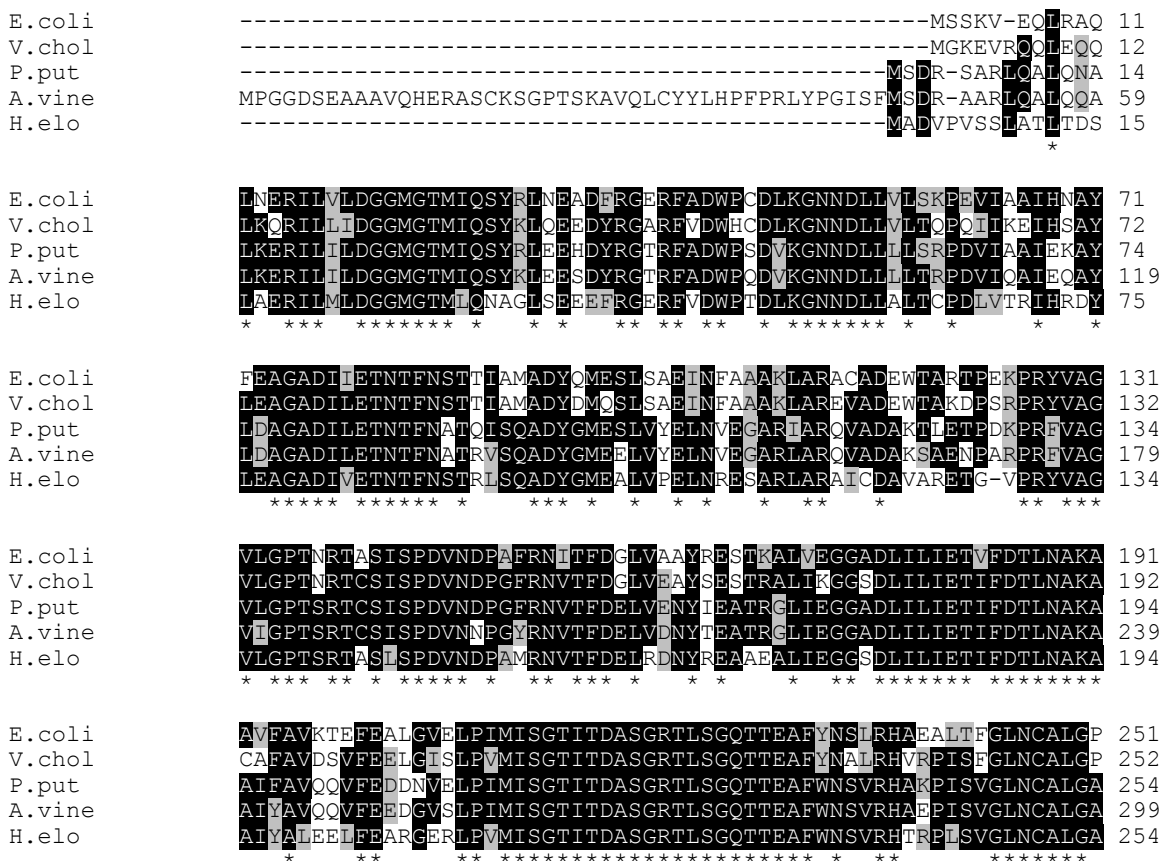
2. Analyse von DNA und abgeleiteter Aminosäuresequenz

Mit dem Programm ORF-Finder (NCBI-Homepage) wurde die gesamte *H. elongata* DNA-Sequenz auf offene Leserahmen hin untersucht. Es ergaben sich eine Vielzahl von möglichen Leserahmen unterschiedlicher Länge, von denen jedoch nur die beiden schon aus den Vorarbeiten (Burdziak, 1999) bekannten signifikante Ähnlichkeiten ergaben (BLAST; (Altschul *et al.*, 1990)). Eine *bioH*-Homolog, wie es bei *E. coli* im Bereich von *yhgI* lokalisiert ist, konnte nicht identifiziert werden (siehe Diskussion Abschnitt 1 und 2). Damit bestätigte sich eine der in den Vorarbeiten gemachten Thesen nicht.

2.1 Die abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF1 zeigt Sequenzähnlichkeiten zu der Methionin-Synthase MethH

Trotz der fortgesetzten Sequenzierung wurde die Sequenz von ORF1 nicht endgültig vervollständigt. Dennoch ließen sich die Ergebnisse der Diplomarbeit mittels Datenbankrecherchen (BLAST; (Altschul *et al.*, 1990)) bestätigen, aber auch ergänzen. So zeigt ORF1 Ähnlichkeiten zu *metH*, einem Gen, das für ein Cobalamin (Vitamin-B₁₂)-abhängiges Enzym (MetH) kodiert, welches bei *E. coli* und anderen Organismen an der Methionin-Synthase beteiligt ist (Alaminos & Ramos, 2001; Banerjee *et al.*, 1989) (siehe Diskussion Abschnitt 3.1).

Laut Datenbankvergleichen ist nach der vollständigen Sequenzierung eine Gesamtaminosäuresequenz mit einer ungefähren Länge zwischen 1226 Aminosäureresten (*Vibrio cholerae*, NC_002505) und 1278 Aminosäure(As)-resten (*Azotobacter vinelandii*, NZ_AAAU02000002) zu erwarten. Laut ORF-Finder (NCBI-Homepage) gibt es mehrere Möglichkeiten für den Beginn des offenen Leserahmens (Pos. 2481, Pos. 2448 oder Pos. 2334 der Sequenz im Anhang). Die Ähnlichkeiten der Proteinsequenz beginnen jedoch erst mit dem letzten möglichen Startcodon (Pos. 2334). Damit sind mit den 778 Aminosäureresten des abgeleiteten *H. elongata* Proteins ca. zwei Drittel der Sequenz bekannt. Auffällig ist die hochgradige Konservierung der abgeleiteten Proteinsequenz, die bei einer Vielzahl von Gattungen zu finden ist. So werden im Vergleich zu *Pseudomonas putida* 74 % Identität bzw. 85 % Ähnlichkeit gefunden und auch bei *E. coli* K-12 liegt die Identität bei 70 % und die Ähnlichkeit bei 83 % (Needleman & Wunsch, 1970). Ein Sequenzvergleich ausgewählter Proteinsequenzen zeigt daher auch lange hochkonservierte Bereiche (Abb. 4).



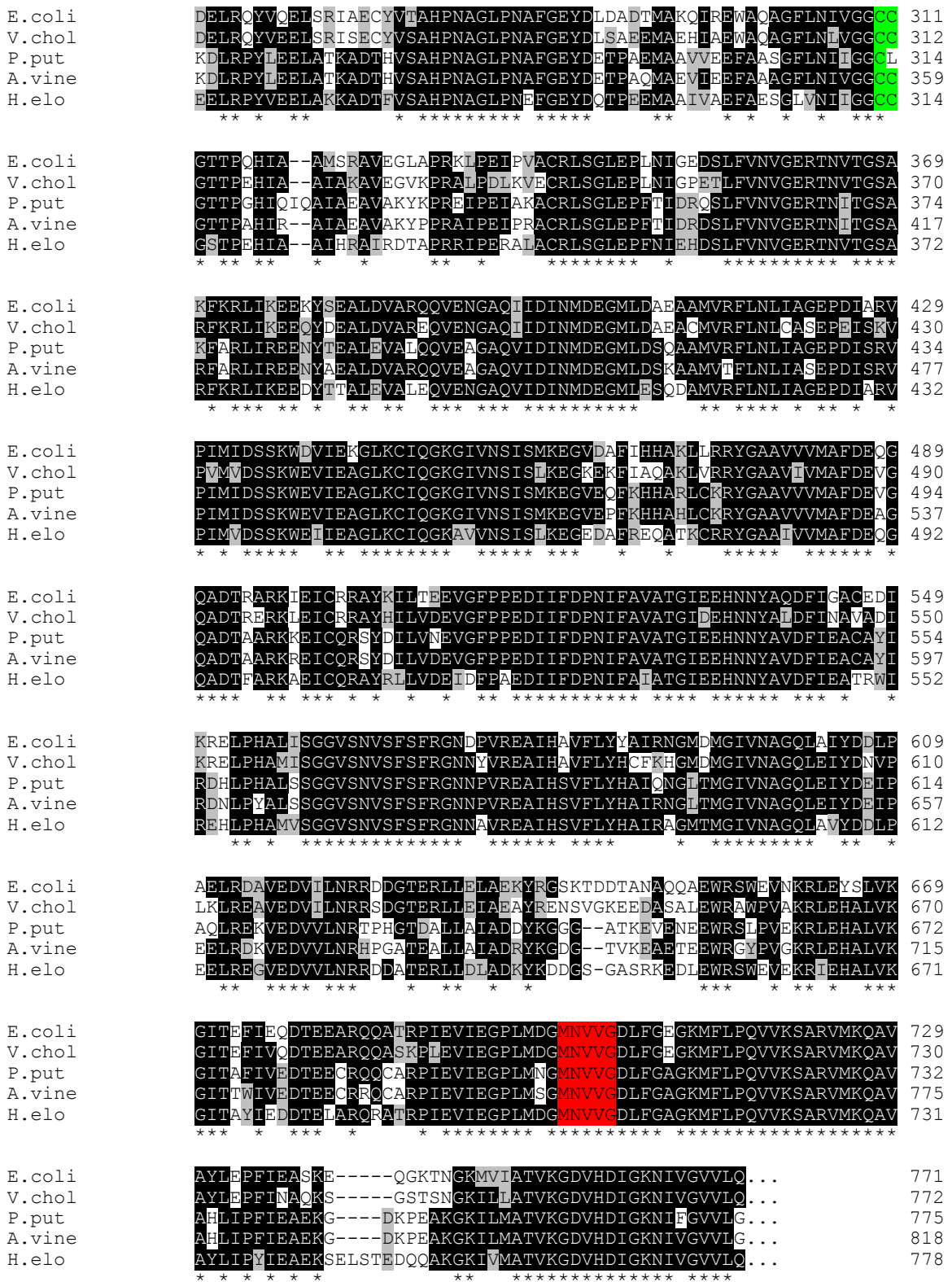


Abb. 4: Sequenzvergleich ausgesuchter MetH-ähnlicher Proteinsequenzen

Dargestellt ist der Vergleich des bekannten Teils der Proteinsequenz von MetH aus *Halomonas elongata* (H.elo) mit ähnlichen Sequenzen von ausgesuchten Organismen unterschiedlicher Gattungen: *Escherichia coli* (E.coli; NC_000913; 1227 As), *Vibrio cholerae* (V.chol; NC_002505; 1226 As), *Pseudomonas putida* (P.put; AF363276; 1237 As), *Azotobacter vinelandii* (A.vine; NZ_AAAU02000002; 1278 As). Identische Aminosäuren (mindestens drei) sind schwarz unterlegt. Konservative Aminosäureaustausche sind grau unterlegt. Als konservativ wurden nach Needleman & Wunsch (1970) folgende Austausche definiert: G-A, I-L-V-M, S-T, R-K-H, D-E, N-Q, F-Y-W. In

allen Sequenzen identische Aminosäuren sind zusätzlich mit einem Sternchen (*) markiert. Die Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe des Programms CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt. Rot unterlegt sind einige der an der Cobalamin-Bindung beteiligte Aminosäuren (Drennan *et al.*, 1994). Unbedingt für die Enzymaktivität erforderliche, konservierte Cysteinreste sind grün hervorgehoben (Goulding *et al.*, 1997). Einer dieser Cysteinreste ist bei *P. putida* nicht konserviert, jedoch bei *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* und *P. syringae*. Die Proteinsequenz von *A. vinelandii* weist eine N-terminale Extension auf. Ob diese *in vivo* translatiert wird oder ob die eigentliche Translation erst an der Stelle der beginnenden Ähnlichkeiten einsetzt, ist nicht bekannt.

Eine genaue Untersuchung der Sequenz in Hinblick auf konservierte Domänen (CDD: konservierte Domänen Datenbank, (Marchler-Bauer *et al.*, 2003)) macht deutlich, dass das *H. elongata* Protein, wie auch die übrigen Proteine, entsprechend den vielfältigen Aufgaben, modular aus mehreren Domänen aufgebaut ist. So lassen sich in dem aus *H. elongata* bekannten Sequenzbereich zwei Hauptdomänen, eine Methyltransferase- bzw. Homocystein-Bindungsdomäne (COG0646, bei *E. coli* As 2-353) und eine Vitamin-B₁₂-Bindungsdomäne (COG1410) identifizieren. Letzte kann noch in eine Methyl-Tetra-hydrofolat-Bindungs (As 354 - 649), eine Vitamin-B₁₂-Bindungs- (As 650 - 897) und eine Adenosyl-methionin-Bindungs- bzw. Aktivierungsdomäne (As 897 - 1227) unterteilt werden (Goulding & Matthews, 1997; Goulding *et al.*, 1997). Abbildung 5 gibt einen Überblick über die identifizierten Domänen und Bindungsmotive. Diese sind in der CD-Datenbank (CD-Search) hinterlegt. Sie gehören unterschiedlichen sog. COGs (Cluster of orthologous genes; (Tatusov *et al.*, 1997)) an.

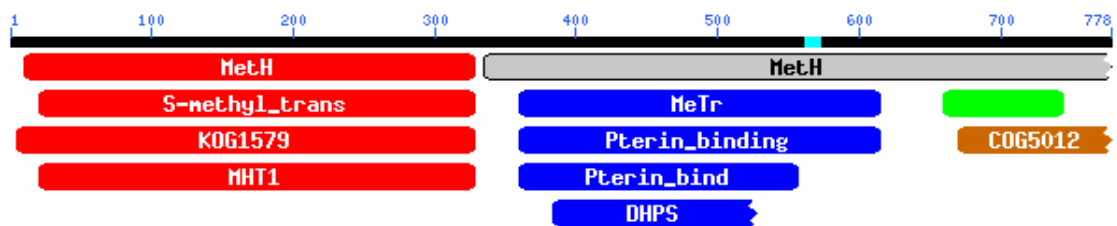


Abb. 5: Untersuchung der MetH-Sequenz aus *H. elongata* im Hinblick auf konservierte Domänen (CD-Search) Der obere Teil der Abbildung stellt den bekannten Aminosäuresequenzbereich (778 As) von MetH aus *H. elongata* dar. Darunter ist ein graphischer Überblick über die Vielzahl konservierter Proteindomänen, die Ähnlichkeiten zu Teilsequenzen von MetH aufweisen, gegeben.

2.2 Die abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF2 zeigt Sequenzähnlichkeiten zu einer Gruppe von hypothetischen Proteinen

Die Sequenz des hypothetischen Gens *yhgI* konnte durch die Sequenzierung vervollständigt werden. Die abgeleitete Proteinsequenz weist eine Länge von 196 Aminosäuren auf. Das Programm ORF-Finder (NCBI-Homepage) identifiziert für *yhgI* neben dem schon vorhergesagten Translationsstart (Pos. 2609) einen weiteren Startpunkt an Position 2447 der *H. elongata* Sequenz im Anhang. Somit würde das Protein eine Länge von 250 Aminosäuren aufweisen. Die Sequenzähnlichkeiten der BLAST-Recherchen (Altschul *et al.*, 1990) beginnen jedoch erst ab dem Startpunkt an Position 2609. Es ergaben eine Vielzahl ähnlicher Sequenzen hypothetischer Proteine, die in der Mehrzahl aus der Gruppe der γ -Proteobacteria stammen. So wurden ähnliche Sequenzen u.a. in den Gattungen *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Haemophilus*, *Buchnera*, *Wigglesworthia*, *Pasteurella*, *Shewanella*, *Azotobacter*, *Blochmannia* gefunden. Viele dieser Sequenzen wurden erst in letzter Zeit

veröffentlicht und resultieren mehrheitlich aus Genomsequenzierungsprojekten. *yhgl*-spezifische physiologische Charakterisierungen der Gene oder entsprechenden Proteine wurden nicht durchgeführt. Die gefundenen Sequenzen zeigen Ähnlichkeiten und Identitäten über die gesamte Sequenzlänge. Die Sequenzidentitäten auf Proteinebene im Vergleich zu der vorliegenden *H. elongata* Sequenz variieren zwischen 63 % bei *Pseudomonas putida* (AAN67991, NCBI) und 34 % bei *Buchnera aphidicola* str. APS (BAB13236, NCBI) (für eine Übersicht siehe Ergebnisse Abschnitt 11.1).

Erste Analysen in Proteinsequenzvergleichen zeigten, dass sich diese Sequenzen vermutlich in mehrere Gruppen unterteilen, die sich in der Konservierung einzelner Bereiche unterscheiden. Daher sollten zunächst diejenigen Proteinsequenzen miteinander verglichen werden, welche größere Ähnlichkeiten zur Sequenz von *H. elongata* aufweisen (Abb. 6).

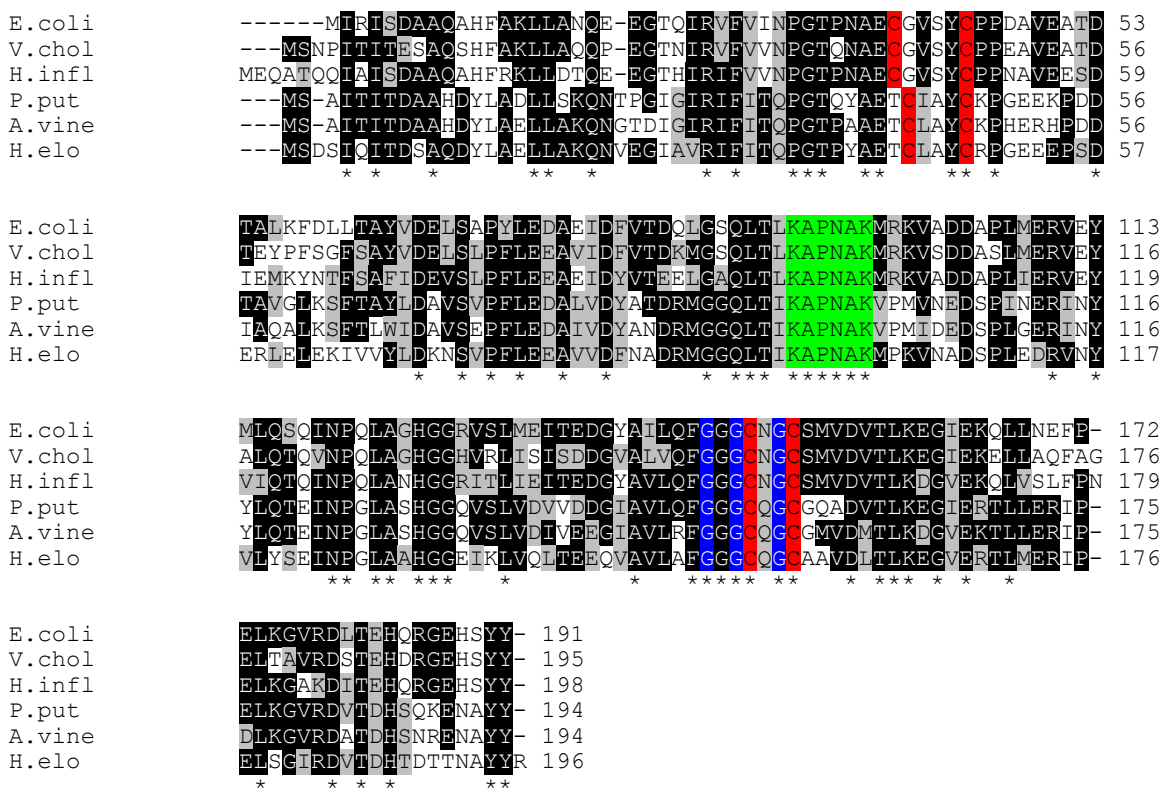


Abb. 6: Sequenzvergleich ausgesuchter Yhg1-ähnlicher Proteinsequenzen

Dargestellt ist der Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenz von Yhg1 aus *Halomonas elongata* (H.elo) mit ähnlichen Sequenzen von ausgesuchten Organismen unterschiedlicher Gattungen: *Escherichia coli* (E.coli; A65137), *Vibrio cholerae* (V.chol; AAF95860), *Haemophilus influenzae* (H.infl; P31774), *Pseudomonas putida* (P.put; AAN67991), *Azotobacter vinelandii* (A.vine; ZP_00091853). Identische Aminosäuren (mindestens drei) sind schwarz unterlegt. Konservative Aminosäureaustausche sind grau unterlegt. Als konservativ wurden nach (Needleman & Wunsch, 1970) folgende Austausche definiert: G-A, I-L-V-M, S-T, R-K-H, D-E, N-Q, F-Y-W. In allen Sequenzen identische Aminosäuren sind zusätzlich mit einem Sternchen (*) markiert. Die Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe des Programms CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt. Rot dargestellt sind konservierte Cysteinreste. In grün hervorgehoben ist ein unbekanntes konserviertes Sequenzmotiv (K-A-P-N-A-K). In blau sind an einer möglichen FADH₂- bzw NAD(P)H-Bindung beteiligt Glycinreste markiert.

Der Proteinsequenzvergleich zeigt mehrere Bereiche, die hochgradig konserviert sind. Hervorzuheben sind vor allem die konservierten Glycinreste mit benachbarten Cysteinresten (F-G-G-

G-C-Q/N-G-C) und das unbekannte Motiv K-A-P-N-A-K. Übereinstimmungen mit bekannten Sequenzmotiven wurden mittels PROSITE (Falquet *et al.*, 2002) nicht gefunden. Konservierte Cysteinreste (CxxC) sind ein häufig auftretendes Motiv in Thioredoxinen. Thioredoxine werden reversibel oxidiert und reduziert und stellen Elektronen für verschiedene Redoxreaktionen im Stoffwechsel bereit (Review: (Arner & Holmgren, 2000; Gleason & Holmgren, 1988; Holmgren, 1985)). Das Proteinhomolog von *Salmonella typhimurium* LT2 (NP_462414) ist als Thioredoxin-ähnliches Protein annotiert (McClelland *et al.*, 2001). Ein Beleg dieser Annotation erfolgt jedoch nicht.

Konservierte Glycinreste treten als konservierte (GxGxxG)-Sequenzen in $\beta\alpha\beta$ -Motiven auf und dienen als Dinukleotid-Bindungsstelle. Es handelt sich um ein häufiges Motiv von FADH₂ oder NAD(P)H abhängigen Oxidoreduktasen (Wierenga *et al.*, 1986). Yhgl weist eine derartige Aminosäurefolge in unmittelbarer Nachbarschaft zu obigen konservierten Cysteinresten auf (Abb. 6). Beide Motive sind auch bei den andern Vertretern der jeweiligen Gattung konserviert.

Eingehende Vergleiche mit weniger ähnlichen Sequenzen zeigten, dass sich die Proteinsequenzen aufgrund der Unterschiede in mehrere Gruppen unterteilen müssen. Zwar sind auch in den endosymbiontischen (*Buchnera aphidicola*: Läuse; *Blochmannia floridiana*: Ameise; *Wigglesworthia glossinidia*: TseTse Fliege) oder phytopathogenen (*Xanthomonas*, *Xylella*) Bakteriengruppen Sequenz-identitäten von ca. 34 % bis 37 % im Vergleich zum *H. elongata* Protein zu finden, jedoch fällt die Konservierung obiger Motive weniger deutlich aus. So weist das hypothetische Protein von *B. floridiana* eine Extension im Bereich des Motivs (KAPNAK) auf und auch bei *W. glossinidia* ist das Motiv nicht konserviert. Bei den *Buchnera* Stämmen, nahen Verwandten von *E. coli*, und bei den unterschiedlichen *Xylella* und *Xanthomonas* Stämmen treten ebenfalls Veränderungen im KAPNAK-Motiv auf. Auch bleibt das Motiv GxGxxG bei *B. aphidicola*, *W. glossinidia* und *B. floridiana* nicht konserviert. Konserviert bleiben jedoch jeweils die benachbarten Cysteinreste (CxxC).

Erstellt man mittels CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) und PHYLODENDRON einen Stammbaum der Proteine, kann man deren Ähnlichkeiten und ihre Gruppenbildung besser erkennen als in einem direkten Sequenzvergleich (Abb. 7).

Das *H. elongata* Protein weist eine recht große Distanz zu den nächstähnlichen Proteinen der *Pseudomonas/Azotobacter*-Gruppe auf. Diese bilden aufgrund der hohen Sequenzidentitäten eine eng gefasste Gruppe. Eine weitere Gruppe bildet *E. coli* mit *Vibrio cholerae* und *Yersinia pestis*. *Buchnera aphidicola* str. APS, *Wigglesworthia glossinidia* und *Blochmannia floridiana* weisen untereinander und zu den übrigen Proteinen recht große Unterschiede auf. *Xylella fastidiosa* und *Xanthomonas axonopodis* bilden mit den übrigen Vertretern der Gattungen eine eigene kleine Gruppe.

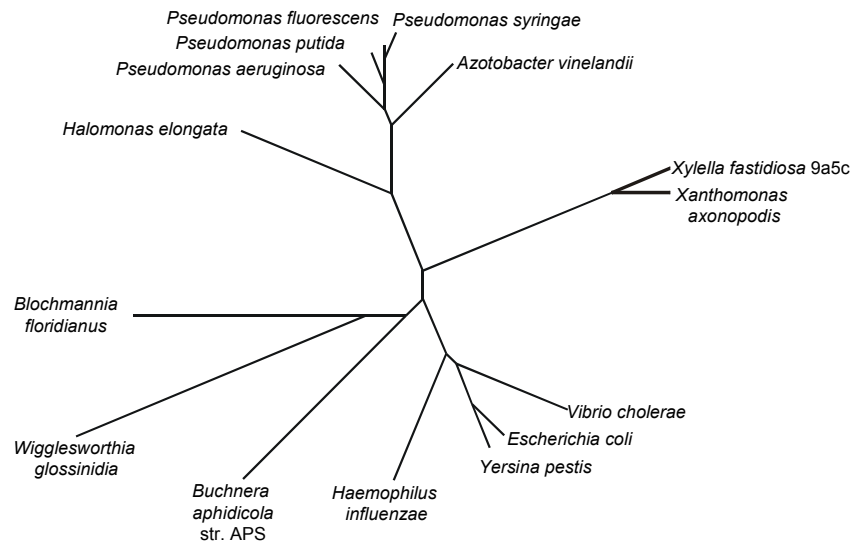


Abb. 7: Stammbaum YhgI-ähnlicher Proteine

Dargestellt ist die phylogenetische Verwandtschaft von YhgI aus *H. elongata* und ähnlicher Sequenzen. Die phylogenetische Verwandtschaft wurde mit den CLUSTAL W bestimmt, der phylogenetische Baum wurde mit PHYLODENDRON erstellt. Die Datenbankeinträge (accession-number) der Proteine sind Tabelle 18 (Abschnitt 11.1 Ergebnisse) zu entnehmen.

Betrachtet man statt der Proteinsequenz die DNA-Sequenz, ergibt sich ein ähnliches Bild, was *H. elongata* und die *Pseudomonas*/*Azotobacter* Stämme betrifft (Abb. 8).

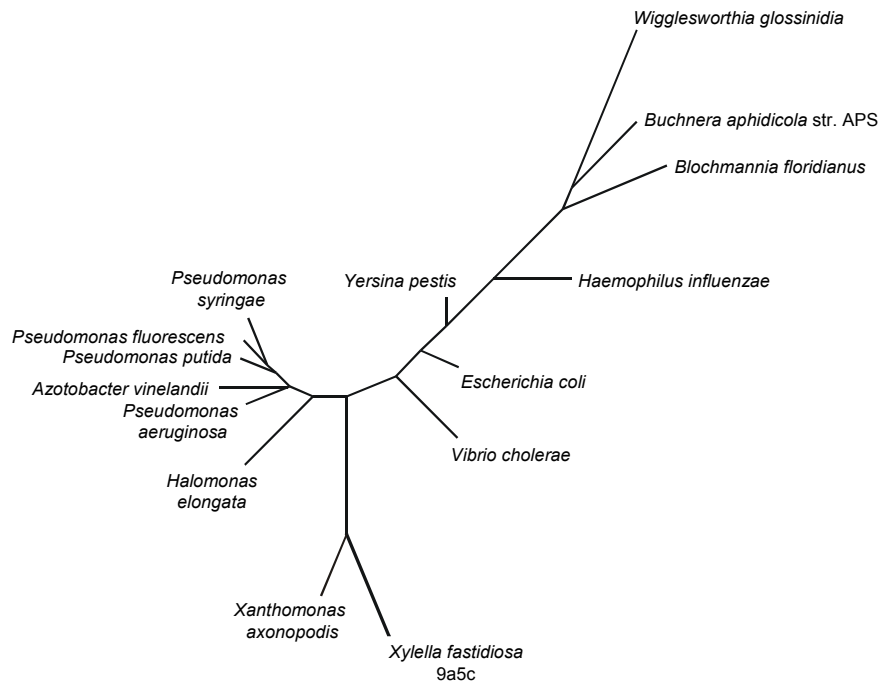


Abb. 8: Stammbaum yhgI-ähnlicher DNA-Sequenzen

Dargestellt ist die phylogenetische Verwandtschaft von *yhgI* aus *H. elongata* und ähnlicher Sequenzen. Die phylogenetische Verwandtschaft wurde mit den CLUSTAL W bestimmt, der phylogenetische Baum wurde mit PHYLODENDRON erstellt. Die Datenbankeinträge (accession-number) der Sequenzen sind Tabelle 18 (Abschnitt 11.1 Ergebnisse) zu entnehmen.

Die Unterschiede der Sequenzen von *W. glossinidia*, *B. aphidicola* str. APS und *B. floridiana* zu den Sequenzen anderer Bakteriengruppen sind noch deutlich angewachsen. Begründet ist dies vermutlich

in einer Verschiebung zu AT-reichen Sequenzen bei der Genomreduzierung dieser symbiontischen Organismen. Insgesamt sind die Ähnlichkeiten geringer.

Anders als bei *metH*/MetH konnte bei *yhgI*/YhgI durch die Sequenzvergleiche keine mögliche Funktion zugewiesen werden, da die meisten ähnlichen Sequenzen als hypothetische Proteine ohne zuge-wiesene physiologisch Funktion annotiert sind. Die Annotierung erfolgte rein durch Sequenzvergleich oder Analyse der Domänenstruktur. Daher bot es sich an, eine Untersuchung der Proteinsequenz im Hinblick auf konservierte Domänen (CD-Search; (Marchler-Bauer *et al.*, 2003)) durchzuführen (Abb. 9).



Abb. 9: Vergleich der Consensus-Sequenz konservierter Proteindomänen mit Teilbereichen der vorliegenden YhgI-Sequenz aus *H. elongata*

A: Im oberen Teil der Abbildung ist schematisch die Proteinsequenz von YhgI (196 Aminosäuren) aus *H. elongata* dargestellt. Darunter sind die Teilbereiche hervorgehoben, die Ähnlichkeiten zu Domänen anderer Proteine (z.B. HesB, IscA und NifU) aufweisen.

B: Die abgeleitete Proteinsequenz von YhgI (Query) aus *H. elongata* wird den Consensus-Sequenzen (Sbjct) unterschiedlicher konservierter Domänen gegenübergestellt. Quelle für diese Daten ist die CD-Datenbank. Angegeben ist die Länge des jeweils verglichenen Sequenzbereiches sowie die Wahrscheinlichkeit (Expect) für eine falsche Annahme. Je größer der Wert ist, desto unwahrscheinlicher ist die Annahme. Rot sind identische Aminosäuren hervorgehoben, in blau sind konservierte Aminosäuren markiert (Needleman & Wunsch, 1970).

Die Analyse ergab Ähnlichkeiten zu Thioredoxin-ähnlichen Proteinen und Domänen (COG0694) und zu unterschiedlichen FeS-Cluster tragenden Proteinen, wie IscA (COG0316), NifU und HesB.

COG0694 enthält 39 Proteinsequenzen von 33 Species, die aus den drei Domänen *Eukarya*, *Bacteria* und *Archaea* stammen. Die Mehrzahl der enthaltenen Sequenzen stammt aus der Gruppe der γ -Proteobacteria. In dem COG sind viele zu Yhgl ähnliche Sequenzen eingeschlossen, die schon vorher für die Sequenzvergleiche herangezogen wurden. Sequenzvergleiche der vorliegenden Yhgl-Sequenz mit Thioredoxin-Sequenzen (TrxA und TrxC von *E. coli*) ergaben keine nennenswerte Ähnlichkeit.

Die übrigen Domänen gehören zu Proteinen, die an der FeS-Cluster-Bildung beteiligt sind oder selbst FeS-Cluster beinhalten. IscA-ähnliche Sequenzen sind zu COG0316 zusammengefasst. COG0316 enthält 80 Proteinsequenzen aus 35 Species, wobei die Mehrzahl aus der großen Gruppe der Proteobacteria stammt. IscA von *E. coli* und anderen Organismen ist mit einer Vielzahl anderer Proteine an der Nitrogenase-unabhängigen Bildung von FeS-Clustern in Proteinen beteiligt (Ding & Clark, 2004; Takahashi & Nakamura, 1999; Zheng *et al.*, 1998). Bei NifU von *Azotobacter vinelandii* handelt es sich um ein Protein, das Nitrogenase-assoziiert vorkommt und für deren vollständige Aktivität erforderlich ist. NifU weist eine modulare Struktur auf und enthält FeS-Cluster (Agar *et al.*, 2000). Der C-terminale Bereich von NifU weist gewisse Merkmale Thioredoxin-ähnlicher Domänen auf (Frazzon *et al.*, 2002). In Teilen ähnliche Proteine (z.B. IscU) sind jedoch auch bei vielen nicht N₂-fixierenden Organismen konserviert. IscU liegt in einem gemeinsamen Operon mit IscA und ist ebenfalls an der Ausbildung von FeS-Clustern beteiligt. Weitere Einzelheiten zu den genannten Proteinen sind der Diskussion (Abschnitt 5.2) zu entnehmen.

Zusammengefasst ergaben sich aus den Analysen Hinweise auf die Funktion eines Thioredoxins und somit auch konkrete Anhaltspunkte für eventuelle enzymatische Reaktionen. Die Zuordnung zur funktionellen Gruppe „posttranslational Modifikation, Proteinturnover“ (COG0694) lässt außerdem eine Funktion oder Beteiligung bei der Proteinfaltung vermuten. Eine genauere Lokalisation von Yhgl im zellulären Ablauf ließ sich aus diesen Annotierungen jedoch nicht ableiten. Dies war jedoch zunächst auch nicht erforderlich, da in den nächsten Experimenten zunächst geklärt werden musste, welches der Gene für das Wachstumsverhalten der *H. elongata* ABU44 (Tn1732-Mutante) verantwortlich ist.

3. Molekularbiologischen Arbeiten an *H. elongata* DSM 2581^T zur Identifizierung des durch die Tn1732-Insertion in *H. elongata* ABU44 betroffenen Gens

Durch die vorgenannten Sequenzierungen wurden die Voraussetzungen für die folgenden molekularen biologischen Arbeiten geschaffen. Diese Arbeiten sollten klären, welches der beiden Gene, *yhgl* oder *metH*, für die Anpassung an erhöhte Salinität erforderlich ist.

3.1 Unterbrechung der Expression von *methH* durch Insertionsmutagenese

Durch homologe Rekombination wurde eine Ω -Kassette in den ORF von *methH* aus *H. elongata* eingebracht und so dessen Expression unterbrochen (Abb. 10). Bei der verwendeten Ω -Kassette handelt es sich um ein konstruiertes 2 kb Interposon (Prentki & Krisch, 1984). Dieses trägt ein Resistenzgen (Sm^R und $Spec^R$) und ist von kurzen, invertierten Sequenzwiederholungen flankiert, die Transkriptionsterminationssignale sowie Translationsstopps in allen drei Leserahmen enthalten. Weiterhin ist die Ω -Kassette an ihren Enden mit synthetischen Linkern ausgestattet, die Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme (u.a. *Sma* I) tragen. Die Ω -Kassette wird auf dem Vektor pHP45 bereitgestellt. In unterschiedlichen Gram-negativen Mikroorganismen konnte eine durch die Insertion des Interposons verursachte Unterbindung von Transkription und Translation stromabwärts gelegenen Gene nachgewiesen werden (Frey & Krisch, 1985). In *H. elongata* wurde es zuerst durch Göller (1999) erfolgreich eingesetzt.

Für die Insertion wurde ein rekombinantes DNA-Fragment konstruiert, das aus genomischer DNA sowie inseriertem Interposon besteht. Als Insertionsstelle für das Interposon wurde eine *Sma* I-Schnittstelle ausgewählt, die ca. 380 bp (Pos. 1962) stromabwärts des Translationsstartpunktes von *methH* lokalisiert ist. Diese Insertionsstelle liegt stromaufwärts von der Region, die für zwei konservierte Cysteinreste (*E. coli* As 310 & 311, *H. elongata* As 313 & 314) kodiert, welche für die katalytische Aktivität des Enzyms erforderlich sind. Der Austausch dieser Cysteine gegen Alanin führt bei *E. coli* zu einem völligen Ausbleiben des Methyltransfers von Methylcobalamin zu Homocystein, beeinflusst aber nicht den Methylgruppentransfer von Methyl-THF zu Cobalamin (Goulding *et al.*, 1997).

Für die Amplifikation des PCR-Produktes wurden die Primer yhgI-rev und methH-rev verwendet. Das ca. 2,956 kb PCR-Produkt wurde unter Zusatz von 5 % DMSO und 3 mM $MgCl_2$ ($T_a = 59$ °C) mit der *Pwo*-Polymerase amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit *Sal* I und *Bst* XI hydrolysiert, die resultierenden überhängenden DNA-Enden wurden mit T4-DNA-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt. Anschließend wurde das DNA-Fragment in die MCS des *Sma* I-hydrolysierten, konjugativen Vektors pK18*mobsacB* ligiert. Das Plasmidkonstrukt pK18KB4 wurde durch *Sma* I linearisiert und die *Sma* I-verdaute Ω -Kassette inseriert. Das resultierende Plasmidkonstrukt (pK18KB4:: Ω) wurde anschließend mittels Konjugation von *E. coli* S17-1 auf *H. elongata* übertragen. Der weitere Ablauf Mutagenese erfolgte entsprechend Material & Methoden, Abschnitt 11. In Änderung zu diesem Protokoll wurden den Medien zur Selektion auf die Ω -Kassette 200 $\mu g/ml$ Streptomycin zugesetzt.

Durch Kolonie-PCR mit den Primern Kn-rev/1 und KnTn1732A/1 konnten die *methH*-Insertionsmutante *H. elongata* KB4 (Abb. 10) vom Wildtyp *H. elongata* DSM 2581^T anhand der Größe des PCR-Produktes (ca. 2,4 kb für die Mutante, ca. 0,5 kb für den Wildtyp) unterschieden werden.

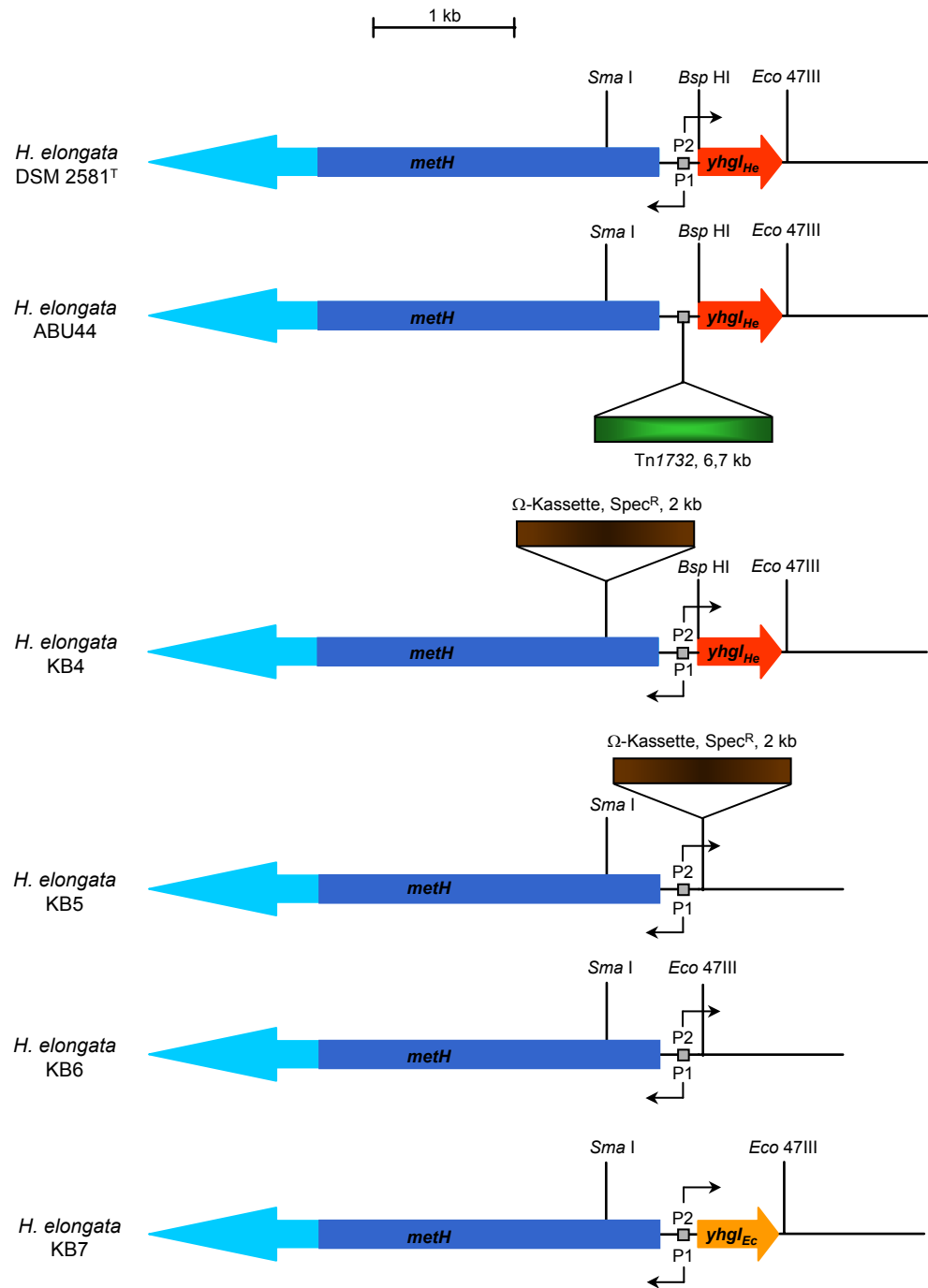


Abb. 10: Genetische Organisation der *yhgI*-Region der unterschiedlichen Stämme von *H. elongata*

Dargestellt ist die genetische Organisation der *yhgI*-Region von *H. elongata* DSM 2581^T, ABU44 (Tn1732-Mutante), KB4 (*methH*::Ω), den *yhgI*-Deletionsmutanten KB5 ($\Delta yhgI$) und KB6 ($\Delta yhgI$::Ω) sowie der „Replacement“-Mutante KB7 ($\Delta yhgI$::*yhgI_{Ec}*), bei der *yhgI* aus *H. elongata* gegen *yhgI* aus *E. coli* K-12 ausgetauscht wurde. Zur Orientierung sind wichtige Restriktionsschnittstellen angegeben. Die angegebenen Promotoren (P1 und P2) sind mittels Computeranalysen vorhergesagt (Burdziak, 1999). **rot:** *yhgI_{He}*: *yhgI* aus *H. elongata*; **gelb:** *yhgI_{Ec}*: *yhgI* aus *E. coli* K-12; **blau:** *methH* aus *H. elongata* mit dunkelblauer, bekannter Sequenz und hellblauer, unbekannter Sequenz. Die Größe von *methH* wurde aufgrund von Sequenzvergleichen abgeschätzt.

3.2 Molekularbiologische Arbeiten zur Charakterisierung von *yhgl* aus *H. elongata*

3.2.1 Herstellung der *yhgl*-Deletionsmutanten *H. elongata* KB5 und KB6

Um die Expression von *yhgl* zu unterbinden, wurden von *H. elongata* DSM 2581^T zwei unterschiedliche *yhgl*-Deletionsmutanten hergestellt. Im ersten Fall wurde der ORF des *yhgl*-Gens vollständig aus dem Genom von *H. elongata* DSM 2581^T deletiert und gleichzeitig stromabwärts des Stoppcodons eine Ω -Kassette in eine *Eco* 47III-Schnittstelle inseriert (KB5, Abb. 10). In der zweiten Mutante erfolgte eine reine Deletion von *yhgl* (KB6, Abb. 10). So sollte unterschieden werden, ob *yhgl* oder ein mögliches stromabwärts gelegenes Gen für das Wachstumsverhalten von ABU44 verantwortlich ist.

Das beiden Deletionen gemeinsame PCR-Produkt wurde mittels SOE-PCR hergestellt (Tab. 8).

<i>H. elongata</i> Stamm	Primerpaar	Produkt- größe kb	PCR-Bedingung		Plasmid- bezeichnung
			T _a (°C)	MgCl ₂ (mM)	
KB5 ($\Delta yhgl::\Omega$)	SOE1b & SOE2	0,957	56	2	pK18KB5
	SOE3 & SOE4b	0,952	56	2	pK18KB5:: Ω
	Fusionsprodukt: SOE1b & SOE4b	1,875	56	2	
KB6 ($\Delta yhgl$)					pK18KB5

Tab. 8: PCR-Produkte und Vektorkonstrukte zur Erstellung der *yhgl*-Deletionsmutanten von *H. elongata*

In der Tabelle sind die Primer und Amplifikationsbedingungen, die für die Herstellung der erforderlichen PCR-Produkte benötigt wurden, aufgeführt. In der ersten Spalte ist die Bezeichnung der entsprechenden Mutante vermerkt. In der letzten Spalte der Tabelle sind die für die Herstellung der Mutanten verwendeten Plasmide angegeben. Das Grundkonstrukt für die Herstellung von KB5 und KB6 wurden mittels SOE-PCR-Technik amplifiziert. Primer SOE2 und SOE3 weisen dafür komplementäre Sequenzen auf. Nach der Insertion des Fusions-PCR-Produktes in den Vektor pK18*mobsacB* wurde für die Herstellung von *H. elongata* KB5 die Ω -Kassette in das bestehende Vektorkonstrukt (pK18KB5) ligiert. Die Insertion der Ω -Kassette erfolgte in eine *Eco* 47III-Schnittstelle innerhalb des PCR-Produktes, die stromabwärts von *yhgl* liegt (pK18KB5:: Ω). Für eine Klonierung tragen die Primer SOE1b und SOE4b *Hin* dIII-Schnittstellen.

Zur Konstruktion des Vektors (pK18KB5:: Ω) für die Herstellung von KB5 wurde pK18KB5 einer partiellen Hydrolyse mit *Eco* 47III unterzogen. Diese Enzym schneidet einmal innerhalb des PCR-Produktes (37 bp stromabwärts von *yhgl*) und einmal innerhalb von pK18*mobsacB*. Die *Sma* I-hydrolysierte Ω -Kassette wurde in den einfach geschnittenen Vektor ligiert. Dabei war zu beachten, dass das Ω -Fragment innerhalb des PCR-Produktes integriert war.

Zur Herstellung von KB5 wurde pK18KB5:: Ω von *E. coli* S17-1 auf *H. elongata* DSM 2581^T übertragen. Die nachfolgenden Schritte entsprachen der Vorgehensweise bei der zuvor beschriebenen Herstellung von *H. elongata* KB4 (*metH*:: Ω). Für die Herstellung von KB6 wurde pK18KB5 von *E. coli* S17-1 auf KB5 übertragen und so die Ω -Kassette im Genom deletiert. Im Unterschied zur Herstellung von KB4 und KB5 wurde dieser LBG-Kultur kein Streptomycin zugesetzt, da keine Selektion auf die Ω -Kassette erfolgen sollte.

Beide Mutanten wurden mittels PCR an ganzen Zellen verifiziert (Primer *yhgi-nested* und *yhgi-rev2*; $T_a = 56\text{ °C}$; 1,5 mM MgCl_2). Dabei wurde für KB5 ein ca. 2,5 kb großes PCR-Produkt, für KB6 ein ca. 0,5 kb großes PCR-Produkt und für den Wildtyp ein ca. 1,1 kb großes Produkt amplifiziert.

3.2.2 Klonierung von *yhgl* aus *H. elongata* DSM 2581^T und *E. coli* K-12 in pBBR1MCS

Mit Hilfe klonierter *yhgl*-Gene aus *H. elongata* und *E. coli* sollte überprüft werden, ob der nachgewiesene Wachstumsdefekt (siehe Ergebnisse Abschnitt 4.2) komplementierbar ist. Durch dieses Experiment kann gleichzeitig festgestellt werden, ob es sich bei der *yhgl*-DNA um eine *cis-aktive* regulatorische Sequenz (z.B. Promotor oder Enhancer) handelt oder ein von *yhgl* kodiertes Protein eine Funktion ausübt. Eine *cis-aktive* regulatorische Funktion der *yhgl*-DNA auf stromabwärtsgelegenen Gene kann ausgeschlossen werden, wenn die DNA-Sequenzen plasmidkodiert propagiert werden und zu einem positiven Verlauf eines Komplementierungsexperiments führen.

Für die Komplementierungsexperimente der *H. elongata* Mutanten KB5 und KB6 sollte pBBR1MCS verwendet werden (Kovach *et al.*, 1994). Es handelt sich bei diesem um ein Derivat des natürlich vorkommenden Vektors pBBR1, welcher aus *Bordetella bronchiseptica* isoliert wurde (Antoine & Locht, 1992). Plasmid pBBR1 und seine Derivate besitzen eine weite Wirtsspezifität und replizieren sich in verschiedenen Gram-negativen Bakterien u.a. *H. elongata* (Schnoor, 2001). Für eine positive Selektion trägt pBBR1MCS eine Chloramphenicol-Resistenz (Cm^R).

In Tabelle 9 sind Details für die Amplifikation der PCR-Produkte angegeben. Abbildung 11 gibt einen graphischen Überblick über die resultierenden Plasmidkonstrukte.

Gen	Primerpaar	Produktgröße kb	PCR-Bedingung		Plasmidbezeichnung
			T_a (°C)	MgCl_2 (mM)	
<i>yhgl_{Ec}</i>	<i>yhglEc1</i> & <i>yhglEc2</i>	1,059	56	2	pBB _{yhglEc}
<i>yhgl_{He}</i>	<i>yhgl-nested</i> & <i>yhgl-rev2</i>	1,131	56	2	pBB _{yhglHe}

Tab. 9: Konstrukte zur funktionellen Komplementierung von *H. elongata* KB5 und KB6

In der Tabelle sind die Primer und Amplifikationsbedingungen, die für die Herstellung der beiden *yhgl*-PCR-Produkte benötigt wurden, aufgeführt. In der ersten Spalte ist das entsprechende Gen vermerkt: *yhgl_{Ec}*: *yhgl* von *E. coli* K-12; *yhgl_{He}*: *yhgl* aus *H. elongata*. Im Fall von *yhgl_{He}* waren beide Primer nicht mit Schnittstellen versehen und trugen synthesebedingt keine 5'-Phosphat-Enden. Daher musste eine „blunt-end“-Ligation mit phosphoryliertem *Sma*I-linearisiertem pBBR1MCS durchgeführt werden. Die übrigen Primer tragen *Hin* dIII-Schnittstellen zur Klonierung. In der letzten Spalte der Tabelle sind die entsprechenden Plasmidbezeichnungen angegeben. In beiden verwendeten Vektoren ist *yhgl* entgegen des *lacZ'*-Fragments des Vektors orientiert.

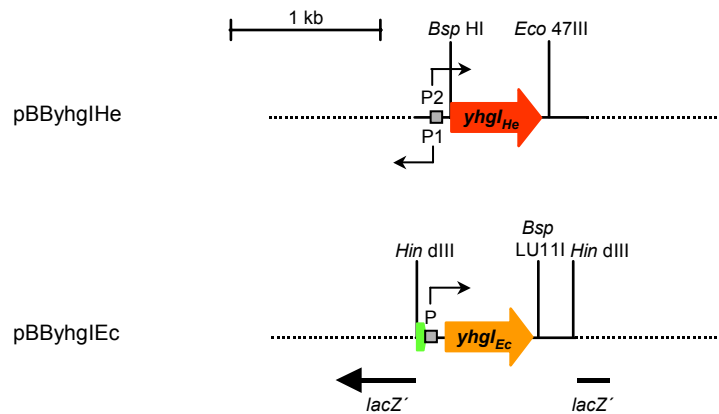


Abb. 11: Plasmidkonstrukte für die Komplementierung von *H. elongata* KB5 und KB6

Abgebildet sind die Vektoren, die für die funktionelle Komplementierung von *H. elongata* KB5 ($\Delta yhgI::\Omega$) und KB6 ($\Delta yhgI$) verwendet wurden. Die Auswahl der Farben erfolgte entsprechend der Abbildungen der genetischen Organisation der *H. elongata* und *E. coli* Stämme: **rot:** $yhgI_{He}$: $yhgI$ aus *H. elongata*; **orange:** $yhgI_{Ec}$: $yhgI$ aus *E. coli* K-12. Der Vektor pBBR1MCS ist jeweils verkürzt und gestrichelt dargestellt. Wichtige Restriktionsschnittstellen sind zur Verdeutlichung eingezeichnet. $yhgI$ aus *H. elongata* wurde „blunt-end“ in phosphorylierten pBBR1MCS ligiert. Daher trägt das PCR-Produkt keine endständigen Restriktionsschnittstellen. Die Promotoren (P1 und P2) aus *H. elongata* wurden mittels Computeranalysen vorhergesagt (Burdziak, 1999). Gleiches gilt für Promotor P aus *E. coli*.

Die Plasmide pBBR1MCS, pBByhgIHe und pBByhgIEc wurden mittels Konjugation von *E. coli* S17-1 auf *H. elongata* DSM 2581^T, *H. elongata* KB5 und *H. elongata* KB6 übertragen.

3.2.3 Herstellung von *H. elongata* KB7

Aufgrund der erfolgreichen Komplementierungsexperimente (siehe Ergebnisse 4.2) mit plasmidkodierten $yhgI$ -Genen aus *H. elongata* und *E. coli* K-12, wurde der Stamm *H. elongata* KB7 konstruiert, bei dem $yhgI$ aus *E. coli* K-12 im Genom integriert ist (Abb. 10). Dafür musste ein PCR-Produkt hergestellt werden, das sich aus den Flanken von $yhgI$ aus *H. elongata* und dem ORF von $yhgI$ aus *E. coli* zusammensetzt. Für die Konstruktion dieses PCR-Produktes sind drei Primerpaare erforderlich, die mit einer SOE-PCR fusioniert werden (Tab. 10).

Das Gesamtprodukt mit einer Länge von 2,451 kb wurde in pK18*mobsacB* inseriert und das Plasmidkonstrukt (pK18KB7) durch *E. coli* S17-1 auf *H. elongata* KB6 übertragen. Der weitere Ablauf entsprach dem bei der Herstellung von *H. elongata* KB6. Nach der Selektion auf den zweiten Cross-Over-Prozess wurde *H. elongata* KB7 mittels Kolonie-PCR verifiziert (Primer $yhgi$ -nested und $yhgi$ -rev2, $T_a = 56^\circ\text{C}$). Für KB7 ergab sich ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 1,1 kb, was auch der zu erwartenden Größe des Wildtyp-Produktes entspricht. Daher wurde das gereinigte PCR-Produkte einem Restriktionsverdau mit *Pst*I unterzogen. Eine *Pst*I-Schnittstelle ist nur innerhalb von $yhgI$ aus *E. coli* vorhanden. Im einem 1,5 %igen Agarosegel ließen sich zwei DNA-Banden mit nahezu identischer Fragmentgröße (ca. 0,563 und 0,551 kb) nachweisen, was die Insertion der *E. coli* DNA bestätigte.

<i>H. elongata</i> Stamm	Primerpaar	verwendete DNA	Produkt- größe kb	PCR-Bedingung		Plasmid- bezeichnung
				T _a (°C)	MgCl ₂ (mM)	
KB7 ($\Delta yhgI :: yhgI_{Ec}$)	SOE1b & INSEY1 (Flanke1)	<i>H. elongata</i>	0,955	54	3	pK18KB7
	INSEY2 & INSEY3 (<i>yhgI_{Ec}</i>)	<i>E. coli</i>	0,608	56	3	
	INSEY4 & SOE4b (Flanke2)	<i>H. elongata</i>	0,952	54	3	
	<u>Fusionsprodukt 1:</u> SOE1b & INSEY3	Flanke1 & <i>yhgI_{Ec}</i>	1,531	56	3	
	<u>Fusionsprodukt 2:</u> SOE1b & SOE4b	Fus.-prod.1 & Flanke2	2,451	56	3	

Tab. 10: PCR-Produkte und Vektorkonstrukt zur Erstellung von *H. elongata* KB7

In der Tabelle sind die Primer und Amplifikationsbedingungen der PCR-Produkte, die zur Herstellung von *H. elongata* KB7 benötigt wurden, aufgeführt. In der letzten Spalte der Tabelle ist die Bezeichnung des entsprechenden Plasmidkonstruktes (pK18KB7) angegeben. Zunächst wurden die benötigten 3 Einzel-PCR-Produkte mit den entsprechenden Primern auf genomischer DNA von *H. elongata* bzw. *E. coli* amplifiziert. Anschließend wurden zunächst Flanke1 mit *yhgI_{Ec}* aus *E. coli* fusioniert (Fusionsprodukt 1) und schließlich damit Flanke 2 verknüpft (Fusionsprodukt 2). Für diese Fusionen tragen INSEY1 und INSEY2 bzw. INSEY3 und INSEY4 komplementäre Sequenzen. Für die erleichterte Ligation tragen die Primer SOE1b und SOE4b *Hin* dIII-Schnittstellen.

4. Salinitätsabhängiges Wachstumsverhalten der *H. elongata* Stämme

H. elongata ABU44 war in den Vorarbeiten (Burdziak, 1999) als salzsensitive Mutante identifiziert worden. Daher sollte diese Art der Untersuchung als ersten mit den *H. elongata* Insertions- und Deletionsmutanten vorgenommen werden.

4.1 Wachstumverhalten der nicht plasmidtragenden Stämme von *H. elongata*

Das Wachstumverhalten von *H. elongata* DSM 2581^T, *H. elongata* ABU44 (Tn1732-Mutante), *H. elongata* KB4 (*meth::Ω*), *H. elongata* KB5 ($\Delta yhgI :: \Omega$), *H. elongata* KB6 ($\Delta yhgI$) und *H. elongata* KB7 ($\Delta yhgI :: yhgI_{Ec}$) auf Mineralsalzmedium mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen sollte miteinander verglichen werden. Dazu wurden die Stämme nach einer Anzucht auf Komplexmedium (AB-3) auf Mineralsalzplatten steigender Salinität überpickt und über die Dauer von 8 Tagen bei 30 °C im Brut-schrank inkubiert. Der Wachstumsverlauf wurde täglich mittels Digitalkamera dokumentiert (Abb. 12).

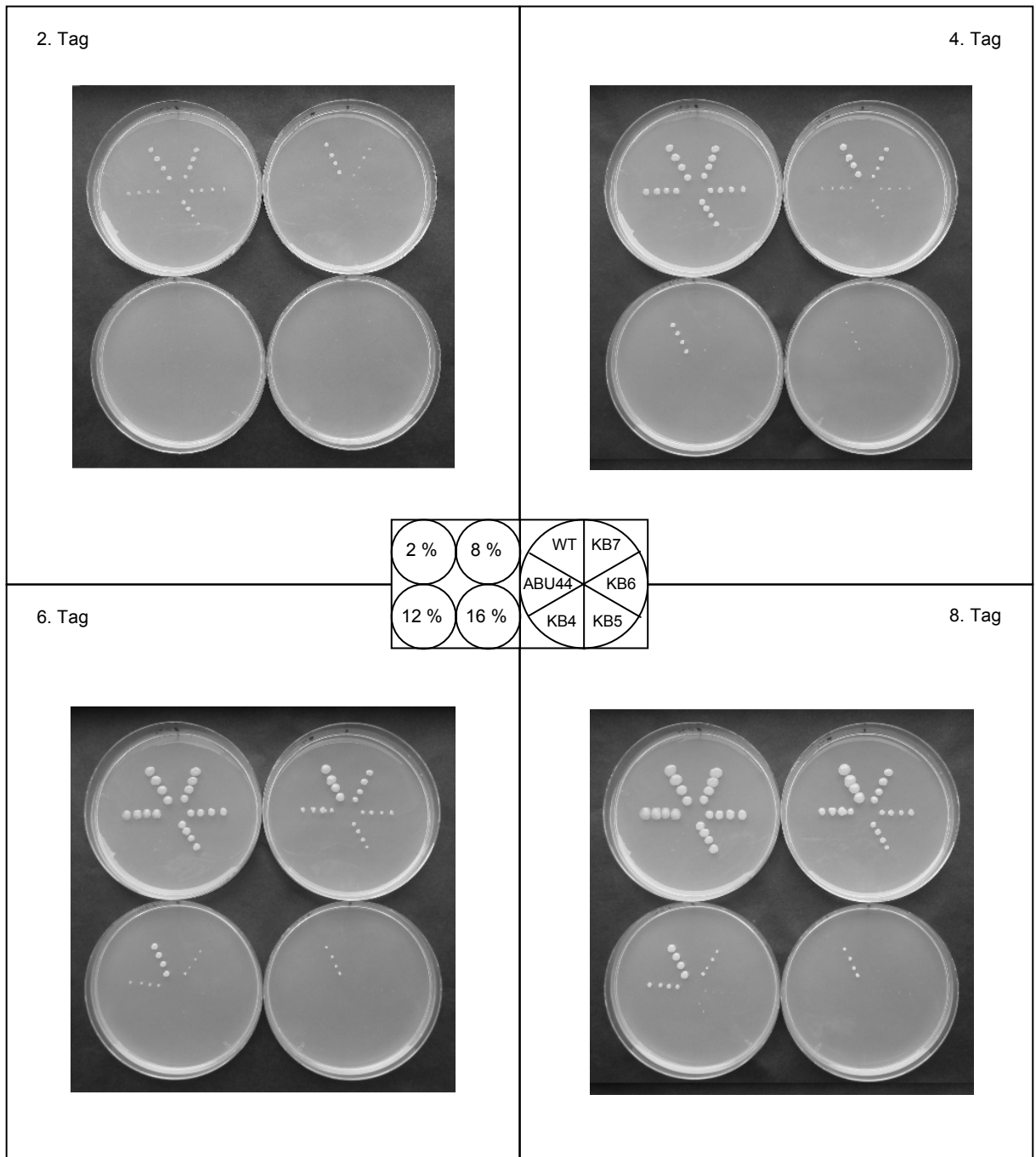


Abb. 12: Wachstum der *Halomonas elongata* Mutanten auf Mineralsalzmedium steigender Salinität

Dargestellt ist das Wachstum der *H. elongata* Mutanten ABU44 (Tn1732-Mutante), KB4 (*metH::Ω*), KB5 ($\Delta yhgI::\Omega$), KB6 ($\Delta yhgI$) und KB7 ($\Delta yhgI::yhgI_{Ec}$) auf MM63-Agarplatten mit 2 %, 8 %, 12 % und 16 % NaCl im Vergleich zum *H. elongata* DSM 2581^T (WT). In der Mitte der Abbildung ist die Anordnung der MM63-Platten verschiedener Salzkonzentration sowie die Reihenfolge, in der die Stämme auf die Platten überpickt wurden, zu erkennen. Die Prozentangaben beziehen sich auf den NaCl-Gehalt des Mediums, die Zeitangaben (2. Tag – 8. Tag) auf Tage nach dem Beimpfen der Platten. KB5 und KB6 weisen ein salzsensitiveres Wachstumsverhalten als ABU44 auf. Alle drei zeigen bei 16 % NaCl einen Ausfall des Wachstums auf dem Mineralsalzmedium. KB7 zeigt bis zu einer Salinität von 8 % NaCl ein im Vergleich zu ABU44 verbessertes Wachstum. Bei 16 % NaCl ist ebenfalls kein Wachstum zu verzeichnen. KB4 ist auxotroph und daher nicht zu einem Wachstum auf dem verwendeten Medium fähig. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

H. elongata KB4 (*meth::Ω*) wächst nicht auf Mineralsalzmedium. Dieser auxotrophe Phänotyp konnte auch nicht durch Zusatz von 1 – 20 mM Methionin komplementiert werden. Die *yhgI*-Deletionsmutanten *H. elongata* KB5 und KB6 zeigen ein salzsensitives Wachstumsverhalten, das noch stärker als bei der Tn1732-Mutante ABU44 ausgeprägt ist. Über den Beobachtungszeitraum zeigen beide kein Wachstum oberhalb von 8 % NaCl. ABU44 und KB7 ($\Delta yhgI::yhgI_{Ec}$) wachsen im Gegensatz zum Wildtyp nicht bei 16 % NaCl. Bei 12 % NaCl fällt das Wachstum von ABU44 geringfügig stärker aus als das von KB7, bei 8 % NaCl verhält es sich umgekehrt. Dennoch deutet sich in KB7 durch die *yhgI_{EC}*-vermittelte, teilweise Komplementierung der Salzsensitivität von KB6 eine gleichgelagerte Funktion beider *yhgI*-Sequenzen an.

Wachstumsratenbestimmungen mit den *yhgI*-Deletionsmutanten *H. elongata* KB5 und KB6 in MM63-Medium mit 2 % und 4 % NaCl zeigten ein deutlich verlangsamtes Wachstum verglichen mit *H. elongata* DSM 2581^T und ABU44 (Abb. 13).

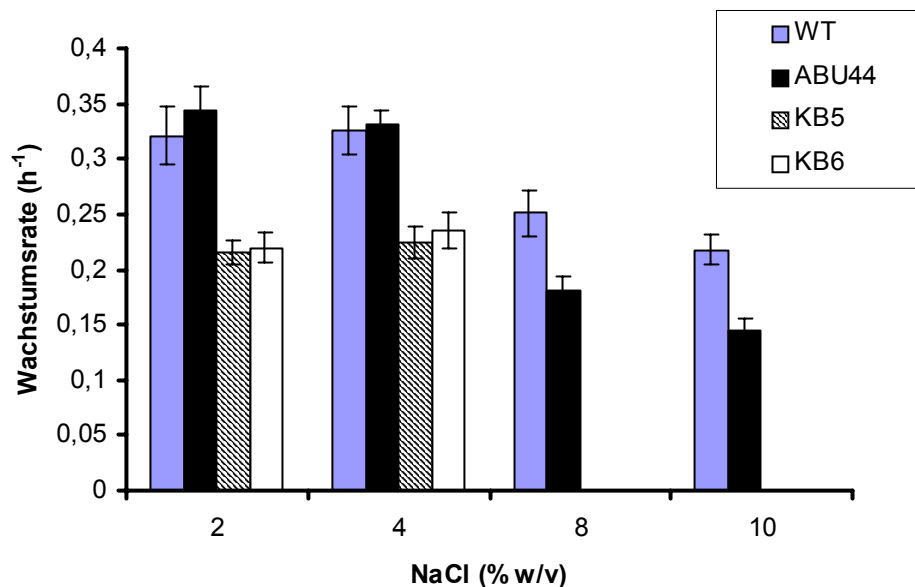


Abb. 13: Abhängigkeit der Wachstumsrate verschiedener *H. elongata* Stämme von der MM63-Medien-salinität

Abgebildet sind die Wachstumsraten von *H. elongata* DSM 2581^T, ABU44 (Tn1732-Mutante), KB5 ($\Delta yhgI::\Omega$) und KB6 ($\Delta yhgI$) in MM63-Medium steigender Salinität. Die Anzucht erfolgte bei 30 °C und 180 upm im OD-Kolben. Für den Wildtyp und ABU44 wurde die Bestimmung bei 2 %, 4 %, 8 % und 10 % NaCl durchgeführt, für KB5 und KB6 aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit nur bei 2 % und 4 % NaCl. In die Mittelwerte von Wildtyp und ABU44 fließen Werte der Diplomarbeit (Burdziak, 1999), ergänzt um neu bestimmte Werte, ein (insgesamt 6 Werte). Die Mittelwerte von KB5 und KB6 stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten. Für alle Mittelwerte ist die Standardabweichung angegeben.

Die Bestimmung der Wachstumsrate von *H. elongata* KB5 und KB6 in Mineralsalzmedium erfolgte nur bei 2 % und 4 % NaCl, da darüber hinaus das Wachstum nicht mehr reproduzierbar und so eine Wachstumsratenbestimmung nicht sinnvoll war.

Nachdem für *H. elongata* KB5 und KB6 ein identisches Wachstumsverhalten in MM63-Flüssig- und Festmedium festgestellt worden war, sollte das Wachstum in LB-Medium mit dem von *H. elongata* Wildtyp und ABU44 verglichen werden (Abb. 14). So sollte eine generelle Beeinträchtigung der

Fitness der Mutanten ausgeschlossen werden. Von den *yhgI*-Deletionsmutanten wurde nur KB6 ($\Delta yhgI$) verwendet, da auch hier von einem mit KB5 vergleichbaren Wachstum auszugehen ist.

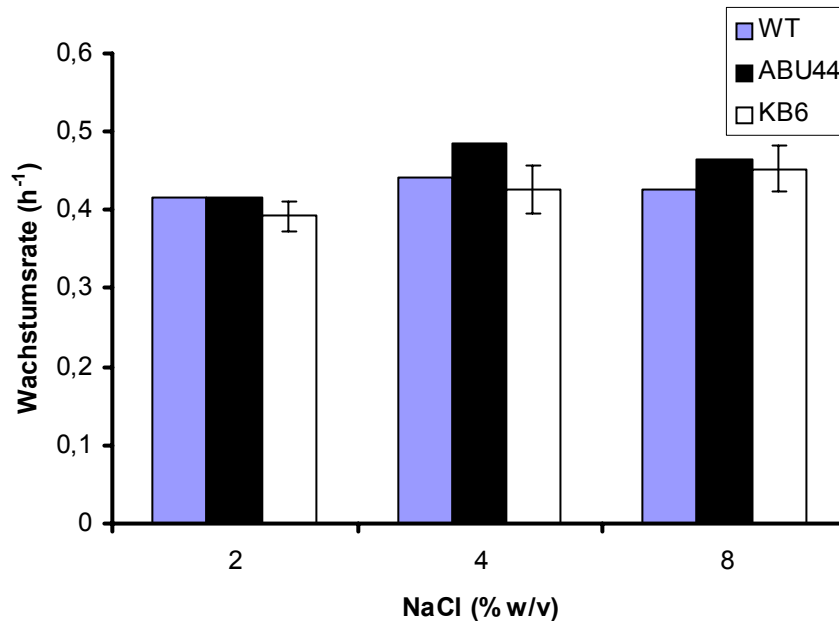


Abb. 14: Abhängigkeit der Wachstumsrate von Wildtyp, ABU44 und KB6 von der LB-Mediensalinität

Dargestellt sind die Wachstumsraten von *H. elongata* Wildtyp (WT), ABU44 (*metH::Ω*) und KB6 ($\Delta yhgI$) in LB-Medium steigender Salinität. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 180 upm im OD-Kolben. Für den Wildtyp und ABU44 handelt es sich um Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen (Burdziak, 1999), für KB6 um Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (6 Werte). Für KB6 ist die Standardabweichung angegeben. Die Deletion von *yhgI* lässt bis 8 % NaCl keine Beeinträchtigung des Wachstums in LB-Medium erkennen, hat also keinen Einfluss auf die allgemeine Fitness von KB6.

Bei einem Vergleich von *H. elongata* Wildtyp und ABU44 war festgestellt worden, dass die Wachstumsrate von ABU44 bei steigender Salinität über der des Wildtyps liegt (Burdziak, 1999). Die Wachstumsraten von KB6 liegen bis 4 % NaCl knapp unter denen des Wildtyps, bei 8 % knapp darüber. Unter Einbeziehung der Fehlerbalken der KB6-Mittelwerte lassen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen *H. elongata* Wildtyp und KB6 erkennen. So kann bei KB6 auch nicht von einer Einschränkung der generellen Fitness durch die *yhgI*-Deletion gesprochen werden.

4.2 Plasmidvermittelte funktionelle Komplementierung der *yhgI*-Deletionsmutanten *H. elongata* KB5 und KB6

Komplementierungsexperimente mit *H. elongata* KB5 ($\Delta yhgI::Ω$) und KB6 ($\Delta yhgI$) und in pBBR1MCS-kodierten *yhgI*-Genen (*H. elongata* und *E. coli* K-12) mit vorgelagertem natürlichem Promotor stellten in Minimalmedium bis 8 % NaCl den Phänotyp des Wildtyps *H. elongata* DSM 2581^T her (Abb. 15).

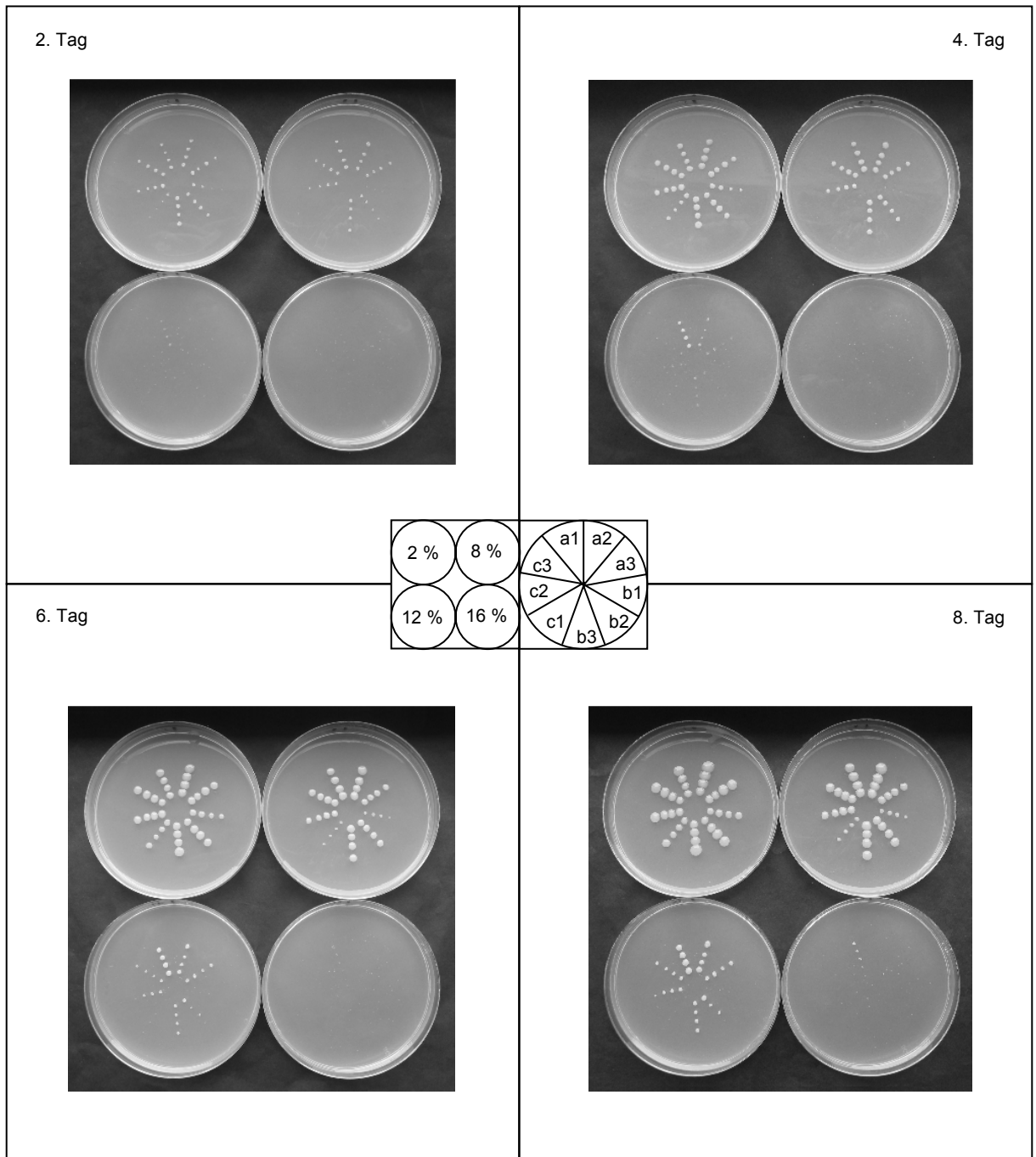


Abb. 15: Funktionelle Komplementierung von *H. elongata* KB5 und KB6

Dargestellt ist das Wachstum der plasmidtragenden *H. elongata* Mutanten KB5 ($\Delta yhgI::\Omega$) und KB6 ($\Delta yhgI$) auf MM63-Agarplatten mit 2 %, 8 %, 12 % und 16 % NaCl im Vergleich zum *H. elongata* Wildtyp. In der Mitte der Abbildung ist die Anordnung der MM63-Platten verschiedener Salzkonzentration, sowie die Reihenfolge, in der die Stämme auf die Platten überpickt wurden, zu erkennen: **a**: *H. elongata* DSM 2581^T; **b**: *H. elongata* KB5; **c**: *H. elongata* KB6; **1**: pBBR1MCS (unkomplementierte Stämme); **2**: pBByhglHe (inserteries *yhgI_{He}*); **3**: pBByhglEc (inserteries *yhgI_{Ec}*). Die Prozentangaben beziehen sich auf den NaCl-Gehalt des Mediums, die Zeitangaben (2. Tag – 8. Tag) auf Tage nach dem Beimpfen der Platten. Sowohl *yhgI* aus *H. elongata* als auch *yhgI* aus *E. coli* K-12 komplementieren teilweise den salzsensitiven Phänotyp von *H. elongata* KB5 und KB6. Eine Wiederherstellung des Wildtyps ist jedoch nur bis 8 % NaCl möglich. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Bei 12 % NaCl ist den komplementierten Stämmen von *H. elongata* KB5 und KB6 im Vergleich zum Wildtyp nur ein verlangsamtes Wachstum möglich, das jedoch über dem der unkomplementierten

Stämmen liegt. Auch nach acht Tagen ist allen Stämmen von KB5 und KB6 kein Wachstum bei 16 % NaCl möglich. Die Stämme von *H. elongata* DSM 2581^T, die plasmidkodierte Allele von *yhgl* aus *H. elongata* bzw. *E. coli* tragen, weisen ebenfalls ein verlangsamtes Wachstum auf. Auch nach 8 Tagen ist keine Wachstum bei 16 % NaCl erkennbar. Wie bei der chromosomalen Integration von *yhgl_{Ec}* (*H. elongata* KB7) deutet sich auch hier eine gleichgelagerte Funktion von *yhgl* aus *H. elongata* und *E. coli* an.

5. Molekularbiologische Arbeiten zur Deletion von *yhgl* aus *E. coli* K-12

An *H. elongata* war gezeigt worden, dass eine *yhgl*-Deletion Auswirkungen auf die Fähigkeit zur Osmoadaptation hat. Entsprechende Untersuchungen sollten auch an *E. coli* K-12 durchgeführt werden, da kloniertes *yhgl* von *E. coli* zu einer teilweisen Komplementierung des Wachstumsdefekts salzsensitiver *H. elongata* Mutanten geführt hatte. Außerdem erschien es wahrscheinlich, durch eine Deletion des entsprechenden Gens in *E. coli*, Hinweise auf eine Funktion von Yhgl erhalten zu können. So sollte das salinitätsabhängige Wachstumsverhalten der *yhgl*-Deletionsmutante von *E. coli* K-12 ermittelt werden und überprüft werden, ob sich, wie bei *H. elongata* ABU44, KB5 und KB6, ein salzsensitiven Phänotyp ergibt oder nicht. So könnte die Salzsensitivität der *H. elongata* Mutanten auch eine Nebeneffekt eines anderen Defektes sein.

5.1 Herstellung der *yhgl*-Deletionsmutante *E. coli* BK1

Wie *yhgl* von *H. elongata* wurde auch *yhgl* von *E. coli* K-12 durch Doppel-Cross-Over deletiert. Dazu wurde zunächst eine Deletionsvariante des *yhgl*-Gens aus *E. coli* über SOE-PCR amplifiziert (Tab. 11).

<i>E. coli</i> Stamm	Primerpaar	Produktgröße kb	PCR-Bedingung		Plasmidbezeichnung
			T _a (°C)	MgCl ₂ (mM)	
BK1 ($\Delta yhgl$)	EYDel1 & EYDel2	1,04	56	2	pMAKBK1
	EYDel3 & EYDel4	1,057	56	2	
	Fusionsprodukt: EYDel1 & EYDel4	2,065	56	2	

Tab. 11: PCR-Produkte und Vektorkonstrukte zur Erstellung der *yhgl*-Mutante *E. coli* BK1

In der Tabelle sind die Primer und Amplifikationsbedingungen der PCR-Produkte, die zur Herstellung von *E. coli* BK1 benötigt wurden, aufgeführt. Das Konstrukt wurde mittels SOE-PCR auf *E. coli* K-12 DNA amplifiziert. In der letzten Spalte der Tabelle ist die entsprechenden Plasmidbezeichnungen angegeben. Das fertige Fusions-PCR-Produkt wurde in pMAK705 (Hamilton *et al.*, 1989) ligiert. Dazu tragen die Primer EYDel1 bzw. EYDel4 *Hin* dIII bzw. *Bam* HI-Schnittstellen. EYDel2 und EYDel3 weisen die für die Fusion komplementären Sequenzen auf.

Der Vektor pMAKBK1 wurde in *E. coli* K-12 transformiert. Aufgrund des hitzesensitiven Replikons von pMAK705 wurde dabei in Abänderung zum Standardprotokoll (Material & Methoden, Abschnitt 5) ein Hitzeschock von 5 min bei 37 °C sowie eine Regeneration der Zellen bei 30 °C für 90 min durchgeführt. Die Agarplatten mit den ausplattierten Zellen wurden ebenfalls bei 30 °C inkubiert.

Um im Genom eine Deletion des *yhgl*-Gens vornehmen zu können, musste der Vektor, wie bei *H. elongata*, zunächst mittels homologer Rekombination in das Genom integrieren. Daher wurden von mehreren Cm^R *E. coli* K-12 Klonen 200 µl verdünnter Übernachtskulturen ($10^{-3} - 10^{-5}$) (LB-0,5, Cm50, 180 upm, 30 °C) auf LB-0,5 (Cm50) ausplattiert und bei 43 °C bebrütet. Die Cm^R Kolonien wurden mittels Plasmidisolierung auf das Vorhandensein frei replizierender Vektoren hin untersucht. War kein freies Plasmid nachweisbar, wurde von einer Integration des pMAK705-Derivates in die genomische DNA ausgegangen. Für die Deletion von *yhgl* musste der Vektors anschließend durch einen zweiten Cross-Over-Prozess (homologe Rekombination) aus dem Genom von *E. coli* K-12 entfernt werden. Dazu wurde ein Cm^R Stamm in LB-Medium ohne Chloramphenicol bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C (180 upm) angezogen und dabei 5x überimpft (Schüttelkulturen mit je 50 ml Volumen). Von den Verdünnungsstufen $10^{-2} - 10^{-10}$ der letzten Schüttelkultur wurden jeweils 2 x 100 µl auf LB-Agarplatten (0,5 % NaCl, ohne Cm) ausplattiert. Die Kolonien wurden auf neue Platten überpickt (AB-0,5 mit bzw. ohne Cm), um sie auf das Vorhandensein einer Cm^R hin zu untersuchen. Um die Deletionsmutanten vom Wildtyp zu unterscheiden, wurden Cm^S Kolonien in eine Kolonie-PCR mit den Primern EYDe11 und EYDe14 ($T_a = 56$ °C) eingesetzt. Bei der Mutante *E. coli* BK1 ist ein 2,065 kb großes Produkt zu erwarten, beim Wildtyp ein ca. 2,65 kb großes Produkt (Abb. 16).

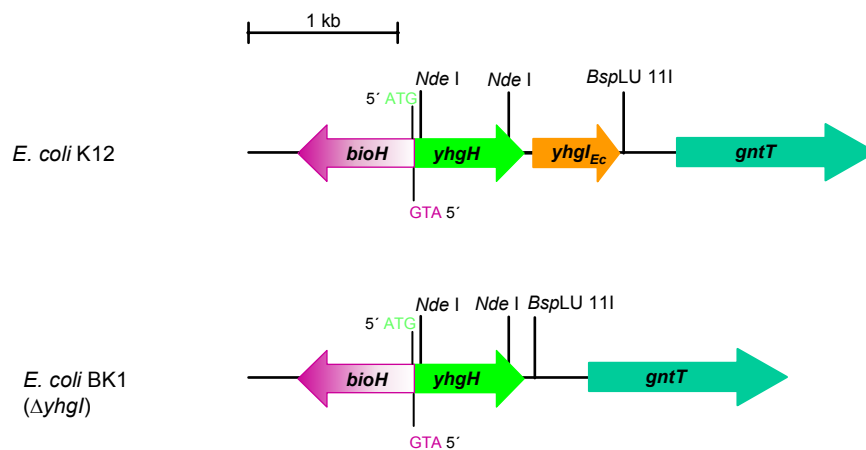


Abb. 16: Genetische Organisation der *yhgl*-Region von *E. coli* K-12 und *E. coli* BK1

Dargestellt ist die genetische Organisation der *yhgl*-Region von *E. coli* K-12 und der *yhgl*-Deletionsmutante *E. coli* BK1: **orange:** *yhgI_{Ec}*: *yhgI* aus *E. coli*. Eingezeichnet sind die wichtigsten benachbarten Gene. *bioH* (**violett**) ist an einem unbekanntem Schritt der Biotin-Synthese beteiligt (Tomczyk *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Nachbarschaft waren Zusammenhänge von *yhgI* und der Biotin-Synthese vermutet worden ((Burdziak, 1999); siehe Diskussion Abschnitt 1 & 2). Bei *yhgH* (**grün**) handelt es sich um ein Gen, das an Kompetenz-mechanismen beteiligt ist. Seine Deletion führt zu einem Ausbleiben der Aufnahme freier DNA (Tomb *et al.*, 1989; Tomb *et al.*, 1991). Bei *gntT* (**türkis**) handelt es sich um einen Gluconat-Transporter, der an der Verwertung von Gluconat als Kohlenstoffquelle beteiligt ist (Yamada *et al.*, 1996). Die ORFs von *bioH* und *yhgH* überlappen um 11 bp.

5.2 Funktionelle Komplementierung von *E. coli* BK1

Die geplanten Untersuchungen zur Salzsensitivität von *E. coli* BK1 sollten mit plasmidtragenden Stämmen durchgeführt werden. So sollte gleichzeitig die Komplementierbarkeit eines möglichen Wachstumsdefekts überprüft werden. Es wurde sowohl *yhgI* von *E. coli* als auch zwei Varianten des homologen *yhgI*-Gens aus *H. elongata* verwendet. Die Gene wurden mit ausreichend stromaufwärts und stromabwärts gelegener Sequenz amplifiziert. In Tabelle 12 sind Details für die Amplifikation der PCR-Produkte angegeben. Abbildung 17 gibt einen graphischen Überblick über die resultierenden Plasmidkonstrukte. Als Vektor wurde pHSG575 verwendet (Takeshita *et al.*, 1987). Dabei handelt sich um eine Plasmid mit geringer Kopienzahl. Er trägt eine *lacZ'*-Fragment mit multipler Klonierungsstelle und ein Chloramphenicol-Resistenzgen zur Selektion.

Gen	Primerpaar	Produktgröße kb	PCR-Bedingung		Plasmidbezeichnung
			T _a (°C)	MgCl ₂ (mM)	
<i>yhgI_{Ec}</i>	YhgIEc1 & yhgIEc2	1,059	56	2	pHSGyhgIEcF
<i>yhgI_{He}</i>	yhgI-nestedBamHI & yhgI-rev2BamHI	1,156	56	2	pHSGyhgIHe
<i>yhgI_{He}-his</i>	yhgI-nestedBamHI & yhgI-His-up	0,858	56	2	pHSGyhgIHe-His
	yhgI-rev2BamHI & yhgI-His-down	0,37	56	2	
	<u>Fus.-prod.</u> : yhgI-nestedBamHI & yhgI-rev2BamHI	1,189	56	2	

Tab. 12: Konstruktion der Plasmide zur funktionellen Komplementierung von *E. coli* BK1

In der Tabelle sind die Primer und Amplifikationsbedingungen, die für die Herstellung der unterschiedlichen *yhgI*-PCR-Produkte benötigt wurden, aufgeführt. In der ersten Spalte ist das entsprechende Gen vermerkt: *yhgI_{Ec}*: *yhgI* von *E. coli* K-12; *yhgI_{He}*: *yhgI* aus *H. elongata*; *yhgI_{He}-his*: *yhgI* aus *H. elongata* mit angehängter (His)₆-tag kodierender Sequenz. *yhgI_{He}-his* wurde mittels SOE-PCR-Technik amplifiziert. In der letzten Spalte der Tabelle sind die entsprechenden Plasmidbezeichnungen angegeben. In allen Vektoren ist *yhgI* gleich dem *lacZ'*-Fragment des Vektor orientiert.

Die Amplifikation von *yhgI* aus *H. elongata* bzw. *E. coli* (Vektoren pHSGyhgIEcF und pHSGyhgIHe) verlief in Standard-PCR-Reaktionen.

Die spätere Aufreinigung von YhgI aus *H. elongata* (YhgI_{He}) wurde mit Hilfe einer Nickelchelate-Chromatographie durchgeführt. Da bei diesem Verfahren jedoch zusätzliche Aminosäuren an die Proteinsequenz angehängt werden, ist die Funktionalität des Proteins ungewiss. Um die Wahrscheinlichkeit der Aufreinigung eines inaktiven Proteins zu verringern, wurde ein durch (His)₆-tag modifiziertes Protein für die Komplementierung von *E. coli* BK1 verwendet (Abb. 18). Sollte die Komplementierung erfolgreich verlaufen, konnte von der Funktionalität des Proteins ausgegangen werden. Verwendet wurde ein *yhgI_{He}*-Gen, an das die (His)₆-tag kodierende Sequenz angehängt worden war. Diese Variante wurde mittels SOE-PCR amplifiziert. Die beiden für die Fusion der PCR-Produkte benötigten komplementären Primer (yhgIHis-up & yhgIHis-down; Tab. 12) tragen an ihrem 5'-Ende die zu integrierende (His)₆-tag kodierende Sequenz. Diese entspricht der DNA-Sequenz, die bei der späteren Klonierung von *yhgI* aus *H. elongata* in pET22b(+) angehängt wurde. Das gesuchte SOE-

PCR-Produkt ist anhand einer *Not* I-Schnittstelle, die nicht im Genom enthalten ist, zu erkennen (Abb. 18).

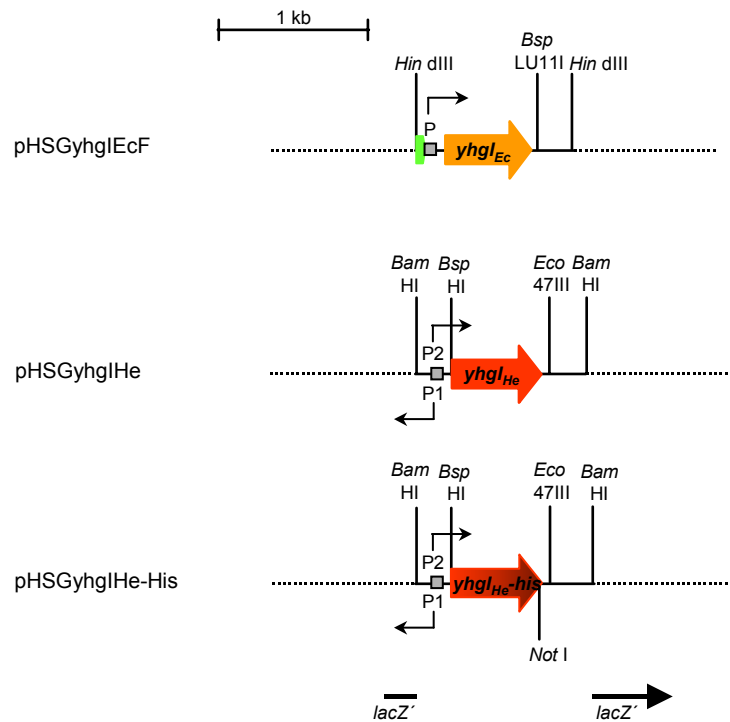


Abb. 17: Konstrukte für die funktionelle Komplementierung von *E. coli* BK1

Abgebildet sind die Vektoren, die für die funktionelle Komplementierung von *E. coli* BK1 konstruiert wurden. Die Auswahl der Farben erfolgte entsprechend den Abbildungen der genetischen Organisation der unterschiedlichen *H. elongata* und *E. coli* Stämme: **orange**: *yhgI_{Ec}*: *yhgI* aus *E. coli* K-12, **rot**: *yhgI_{He}*: *yhgI* aus *H. elongata*, **rot-grau**: *yhgI_{He}-his*: *yhgI* aus *H. elongata* mit angehängter (His)₆-tag kodierender Sequenz. Wichtige Schnittstellen sind zur Verdeutlichung eingezeichnet. Alle klonierten PCR-Produkte schließen mittels Computeranalysen vorhergesagte hypothetische Promotorsequenzen ein (für *yhgI* aus *H. elongata*: (Burdziak, 1999)). Stromabwärts von *yhgI* ist ausreichend genomische Sequenz vorhanden, um eine Termination der Transkription zu ermöglichen. Alle *yhgI*-Sequenzen sind entsprechend des *lacZ'*-Fragments des Vektors orientiert.

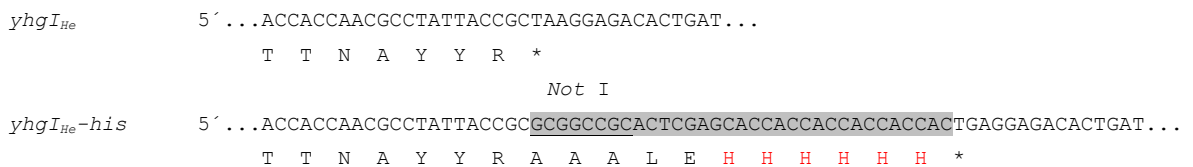


Abb. 18: Verlängerte DNA- und Aminosäuresequenz von *yhgI* aus *H. elongata*

Dargestellt ist die modifizierte DNA-Sequenz *yhgI_{He}-his* im Vergleich zu der ursprünglichen DNA-Sequenz von *yhgI_{He}* aus *H. elongata*. Ebenfalls angegeben ist die entsprechende um 11 Aminosäuren verlängerte Aminosäuresequenz von YhgI-(His)₆ aus *H. elongata*. Diese verlängerte Sequenz wurde für die funktionelle Komplementierung von *E. coli* BK1 ($\Delta yhgI$) und später für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins (kloniert in pET22b(+)) verwendet. In **grau** dargestellt sind die zusätzlich angehängten Aminosäuren, **rot** markiert sind die Histidinreste des (His)₆-tags. Das Stoppcodon wurde von TAA in TGA verändert, wie es auch bei der Klonierung in pET22b(+) geschieht. Die integrierte *Not* I-Schnittstelle ist unterstrichen dargestellt.

6. Salinitätsabhängiges Wachstumsverhalten der plasmidtragenden Stämme von *E. coli* BK1

Die plasmidtragenden Stämme von *E. coli* K-12 und BK1 wurden von AB-Medium (0,5 % NaCl) auf MM63-Agarplatten steigender Salinität überpickt und das Wachstum bei 37 °C über 6 Tage mittels Digitalkamera dokumentiert. Verwendet wurde MM63-Agarplatten ohne und mit Zusatz von Betain (5 mM). Nach Literaturangaben (Larsen *et al.*, 1987) wächst *E. coli* K-12 in Mineralsalzmedium bis zu einer Salinität von 3,8 % NaCl (650 mM), der Wert ist nach eigenen Ergebnissen jedoch mit 4 % NaCl geringfügig höher anzusetzen. Durch Zusatz von kompatiblen Soluten zum Medium kann die Salztoleranz bis auf über 5 % NaCl erhöht werden. Es wurde daher Agarplatten mit 0,5 %, 1,5 %, 3,5 % und 4 % NaCl ohne Zusatz von Betain verwendet, bei Zusatz von Betain (5 mM) wurde statt 4 % NaCl dann 5 % NaCl verwendet.

Wie die *yhgI*-Mutanten KB5 und KB6 von *H. elongata* zeigt die unkomplementierte (pHSG575 ohne *yhgI*) *yhgI*-Deletionsmutante von *E. coli* K-12 einen salzsensitiven Phänotyp. Das Wachstum der Mutante fällt sowohl mit als auch ohne zugesetztes Betain langsamer aus. Der unkomplementierte BK1 zeigt im Gegensatz zu den *E. coli* K-12 Stämmen auf MM63-Medium mit zugesetztem Betain bei 5 % NaCl einen Ausfall des Wachstums (Abb. 19), ohne zugesetztes Betain schon bei 4 % NaCl (Abb. 20). In einem unabhängigen Plattenexperiment wurde festgestellt, dass bei 4 % NaCl diesem Stamm mit Zusatz von Betain noch ein Wachstum möglich ist. Auch bei 3,5 % NaCl zeigt BK1 über den Beobachtungszeitraum mit und ohne zugesetztes Betain einen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp, bei 1,5 % NaCl jedoch noch nicht.

Mit kloniertem *yhgI* aus *E. coli* und *H. elongata* war eine vollständige funktionelle Komplementierungen des Wachstumsdefekts von *E. coli* BK1 ($\Delta yhgI$) möglich. Dies deutete, wie in den Experimenten mit *H. elongata*, darauf hin, dass beide Gene/Proteine eine ähnliche Funktion erfüllen müssen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch mit angehängtem (His)₆-tag das Protein seine Funktion entfaltet. Der mit diesem Konstrukt komplementierte BK1 Stamm zeigte im Vergleich zum Wildtyp und den übrigen komplementierten Stämmen keine auffällige Wachstumseinschränkung.

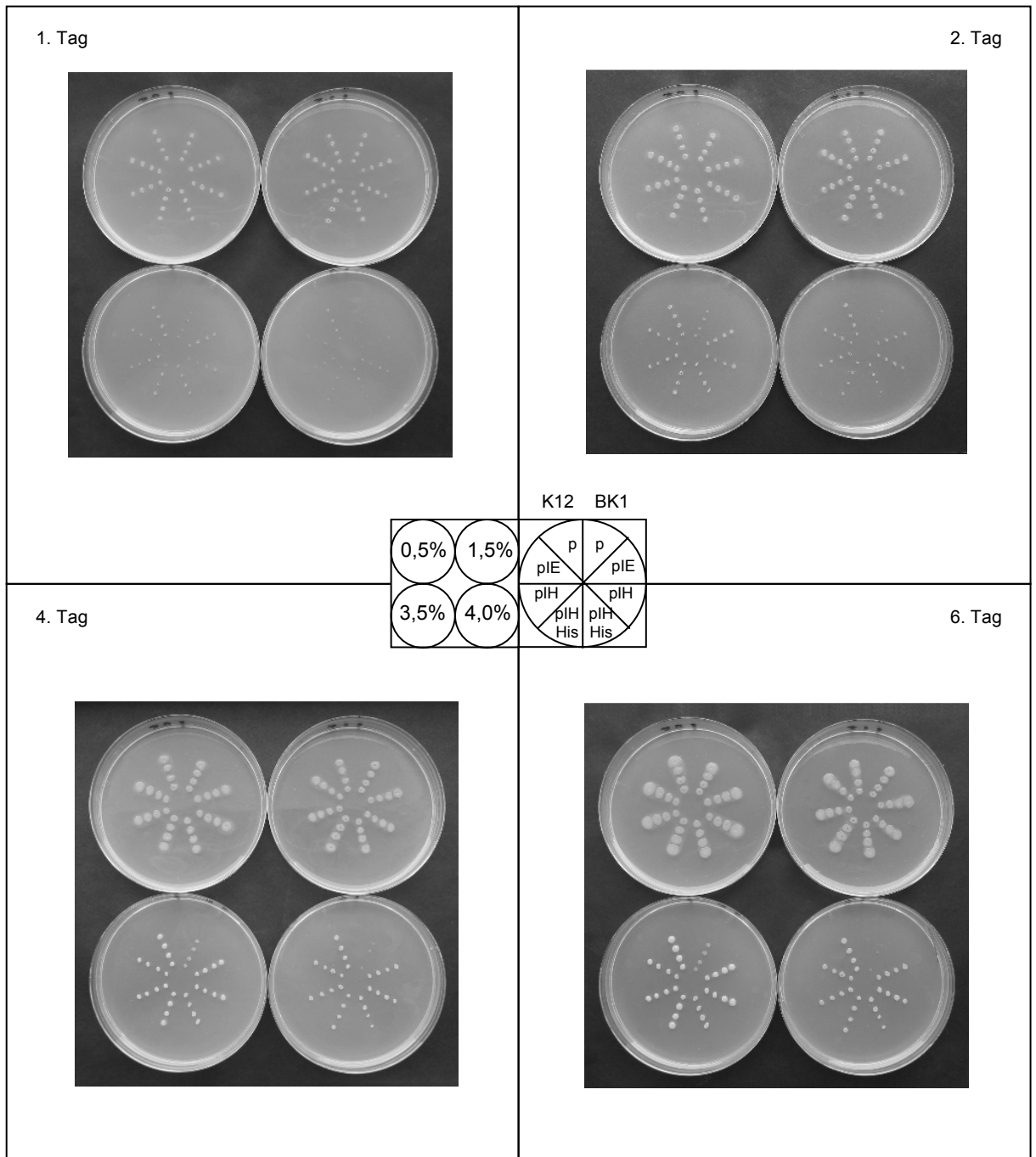


Abb. 19: Plattenwachstum der *E. coli* Mutante BK1 in Mineralsalzmedium mit steigender Salinität

Dargestellt ist das Wachstum der unkomplementierten *yhgl*-Deletionsmutante *E. coli* BK1 und ihrer komplementierten Stämme auf MM63-Agarplatten mit 0,5 %, 1,5 %, 3,5 % bzw. 4,0 % NaCl ohne Betain im Vergleich zu den entsprechenden *E. coli* K-12 Stämmen. In der Mitte der Abbildung ist die Anordnung der MM63-Platten sowie die Reihenfolge in der Stämme auf die Platten überpickt wurden dargestellt: **K12**: *E. coli* K-12; **BK1**: *E. coli* BK1; **p**: pHSG575 (unkomplementierte Stämme); **pIE**: pHSGyhglEc (*yhgl* aus *E. coli*); **pIH**: pHSGyhglHe (*yhgl* aus *H. elongata*); **pIHHis**: pHSGyhglHe-His (*yhgl* aus *H. elongata* mit angehängter (His)₆-tag kodierender Sequenz). Die Prozentangaben beziehen sich auf den NaCl-Gehalt des Mediums, die Zeitangaben (1. Tag – 6. Tag) auf Tage nach dem Beimpfen der Platten. Der nicht komplementierte Stamm von *E. coli* BK1 zeigt bei 4 % NaCl einen Ausfall des Wachstums auf MM63-Medium ohne kompatible Solute. Durch kloniertes *yhgl* aus *E. coli* K-12, *yhgl* aus *H. elongata* und *yhgl* aus *H. elongata* mit angehängter (His)₆-tag kodierender Sequenz wird diese Salzsensitivität von *E. coli* BK1 vollständig komplementiert. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

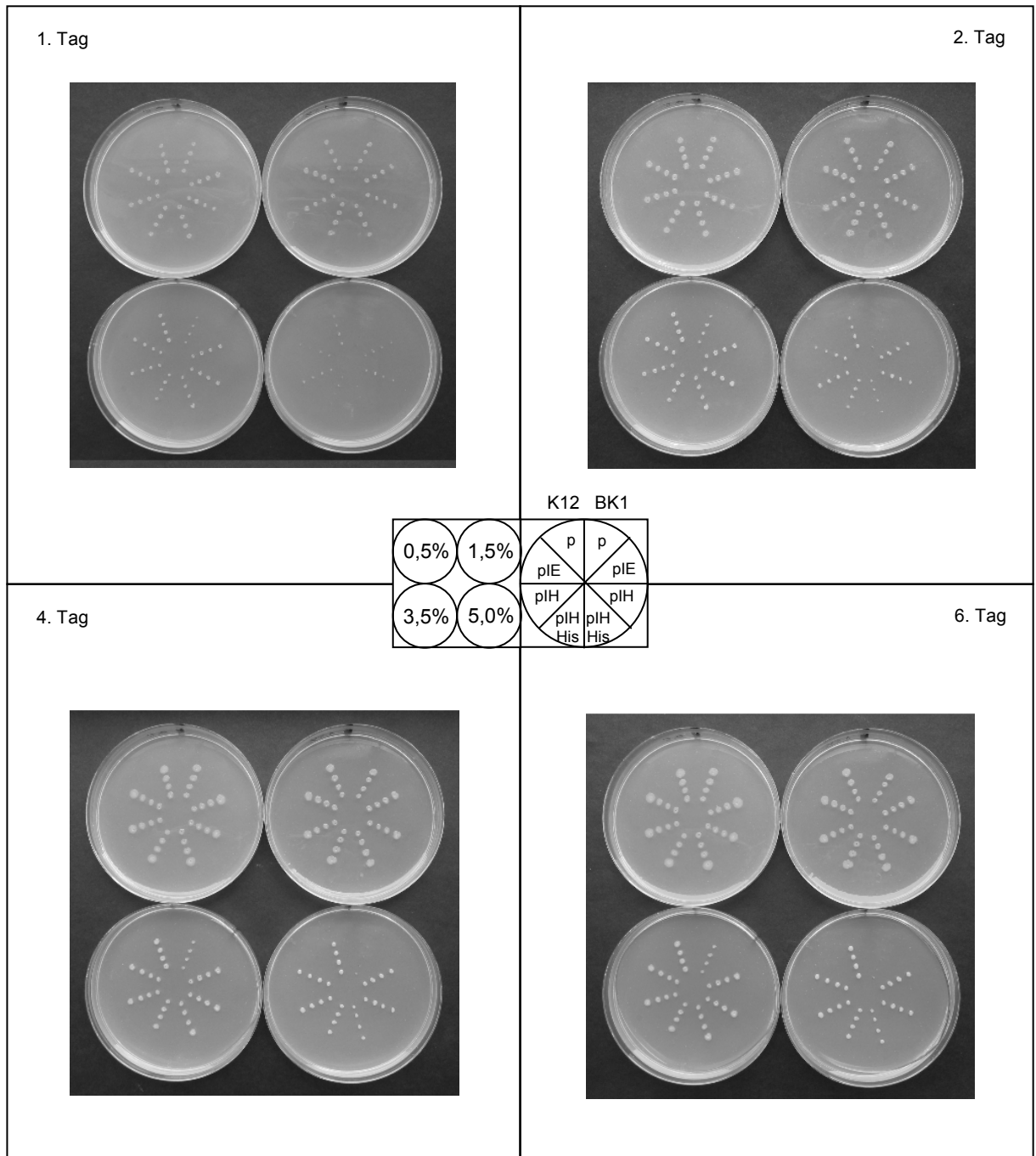


Abb. 20: Plattenwachstum der *E. coli* Mutante BK1 in Mineralsalzmedium mit 5 mM Betain und steigender Salinität

Dargestellt ist das Wachstum der unkomplementierten *yhgI*-Deletionsmutante *E. coli* BK1 und ihrer komplementierten Stämme auf MM63-Agarplatten mit 0,5 %, 1,5 %, 3,5 % bzw. 5,0 % NaCl und 5 mM Betain im Vergleich zu den entsprechenden *E. coli* K-12-Stämmen. In der Mitte der Abbildung ist die Anordnung der MM63-Platten sowie die Reihenfolge in der Stämme auf die Platten überpickt wurden dargestellt: **K12:** *E. coli* K-12; **BK1:** *E. coli* BK1; **p:** pHSG575 (unkomplementierte Stämme); **pIE:** pHSGyhgIEc (*yhgI* aus *E. coli*); **pIH:** pHSGyhgIHe (*yhgI* aus *H. elongata*); **pIHHis:** pHSGyhgIHe-His (*yhgI* aus *H. elongata* mit angehängter (His)₆-tag kodierender Sequenz). Die Prozentangaben beziehen sich auf den NaCl-Gehalt des Mediums, die Zeitangaben (1. Tag – 6. Tag) auf Tage nach dem Beimpfen der Platten. Der nicht komplementierte Stamm von *E. coli* BK1 zeigt bei 5 % NaCl einen Ausfall des Wachstums auf MM63-Medium mit Betain (5 mM). Durch kloniertes *yhgI* aus *E. coli* K-12, *yhgI* aus *H. elongata* und *yhgI* aus *H. elongata* mit angehängter (His)₆-tag kodierender Sequenz wird diese Salzsensitivität von *E. coli* BK1 vollständig komplementiert. (Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt).

7. Suche nach Wechselwirkungspartner von Yhgl mittels eines *E. coli* basierten Two-Hybrid-Systems (BacterioMatch® Two-Hybrid)

„Two-Hybrid-Systeme“ sind eine der bedeutendsten Methoden für die Identifikation von Bindungspartnern eines Proteins. Das System erlaubt es Interaktionen zwischen bekannten Proteinpaaren *in vivo* zu untersuchen, aber auch uncharakterisierte Proteine einer Genbank mit einem Zielprotein wechselwirken zu lassen. Im Allgemeinen werden zwei Fusionsproteine, ein „bait“ (Köder, Protein dessen Partner gefunden werden soll) und ein „target“ (möglicher Bindungspartner) koexprimiert. Wenn beide in der Zelle des Reporterstamms interagieren, wird ein biochemischer Prozess aktiviert, der die Interaktion erkennen lässt (Reportergene). Im BacterioMatch® Two-Hybrid dient der Vektor pBT als „bait“-Vektor, pTRG als „target“-Vektor. Eins der zu untersuchenden Proteine wird mit dem λ -Repressorprotein (λ cl, pBT-Vektor) fusioniert, das andere mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase (RNAP α , pTRG-Vektor). Im Reporterstamm bindet das λ cl-Fusionsprotein an eine λ -Operatorsequenz stromaufwärts der Reportergene. Kommt es zu einer Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine, wird dadurch die RNA-Polymerase so vor den Reportergenen positioniert, dass diese exprimiert werden können. Für Yhgl aus *H. elongata* sollten zwei mögliche Versuchsansätze, die Verwendung einer Genbank und die Verwendung einer bekannten Sequenz (YhgH, siehe unten) als „target“ angewendet werden. Für Yhgl aus *E. coli* K-12 sollte eine Wechselwirkungen mit YhgH untersucht werden.

7.1 Versuchte Erstellung einer plasmidkodierte Genbank für das Two-Hybrid-System

Vom Hersteller des „BacterioMatch® Two-Hybrid-Systems“ (Stratagene) ist die Nutzung einer pTRG-kodierten cDNA-Bank vorgesehen. Bei Prokaryonten besteht die Möglichkeit zur Erstellung einer vollständigen cDNA-Bank bisher jedoch nicht. Als Alternative sollte hydrolysierte Gesamt-DNA von *H. elongata* DSM 2581^T für die Erstellung der Genbank verwendet werden. Zur Durchführung wurde daher die Gesamt-DNA einer partiellen Hydrolyse mit *Sau* 3A unterzogen. Die Größe der Hydrolyseprodukte wurde auf eine durchschnittliche Sequenzlänge von ca. 2 kb eingestellt. Die Ligation der Hydrolyseprodukte mit *Bam* HI-geschnittenen pTRG-Vektor (*Sau* 3A und *Bam* HI bilden komplementäre Enden) ergab auch nach häufigen Wiederholungen und Optimierungsversuchen in der Transformation nur sehr wenige *E. coli* XL1-blueMRF^RKan^R-Klone. Eine Restriktionsanalyse der in den wenigen Klonen enthaltenen Plasmide ergab nahezu immer ein identisches Restriktionsmuster, so dass von der Insertion identischer DNA-Fragmente ausgegangen wurde. Es bestand der Verdacht einer Unverträglichkeit von *E. coli* XL1-blue MRF^RKan^R und der *H. elongata* DNA, da schon in der Vergangenheit Probleme bei der Erstellung plasmidkodierter *H. elongata* Genbanken in anderen *E. coli* XL1-blue Stämmen bestanden hatten (siehe Diskussion Abschnitt 6.1). Für die Verwendung eines alternativen *E. coli* Klonierungsstammes bestand nicht die Möglichkeit, da nur der verwendete Stamm den erforderlichen genetischen Hintergrund (z.B. *lacI^f*) aufwies. Versuche die nicht rekombinanten Plasmide pBT und pTRG in den alternativen Klonierungsstamm *E. coli* DH5 α zu transformieren schlugen aufgrund dieser Tatsache ebenfalls fehl.

7.2 YhgH als mögliches Zielprotein im BacterioMatch® Two-Hybrid-System

In einigen Organismen, die zur Gruppe der γ -Proteobakterien gehören, z.B. *E. coli* und *Haemophilus influenzae*, ist das Gen *yhgH* direkt stromaufwärts von *yhgI* lokalisiert (siehe Diskussion Abb. 54). Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *yhgH* weist Ähnlichkeiten zu Phosphoribosyl-Transferasen auf. Für *yhgH* waren experimentelle Beweise für die Beteiligung an bakterieller Kompetenz zur DNA-Aufnahme gefunden worden ((Tomb *et al.*, 1989; Tomb *et al.*, 1991) siehe Diskussion Abschnitt 5.1). Aufgrund der räumlichen Nähe beider Gene schließen einigen Autoren *yhgI* in die Kompetenz-gene ein (Finkel & Kolter, 2001). Sie mutmaßen eine gemeinsame Expression von *yhgH* und *yhgI* in einem Operon und somit auch ein Mitwirken an einem gemeinsamen Stoffwechselweg oder anderen zellulären Prozessen. Dies führte zu der Überlegung, dass bei einer Beteiligung an einem gemeinsamen Prozess möglicherweise Protein-Protein-Wechselwirkungen erforderlich sein könnten, die mittels eines Two-Hybrid-Systems nachgewiesen werden können. Es wurde daher beschlossen *yhgI* von *H. elongata* und *E. coli* und *yhgH* aus *E. coli* mittels PCR zu amplifizieren und in die Vektoren des Two-Hybrid-Systems zu klonieren (Tab. 13), um dann in dem Reporterstamm (BacterioMatch® I) eine mögliche Interaktion nachzuweisen.

pBTyhgIHe: *yhgI* aus *H. elongata* in pBT: yhgipBTfor (*Eco* RI) & yhgipBTrev (*Bam* HI)

5'...GAA GAG ACG TTT GGC GCG GCC GCA TCG AAT TCC ATG AGC GAC...
3'...CTT CTC TGC AAA CCG CGC CGG CGT AGC TTA AGG TAC TCG CTG...

pTRGyhgIHe: *yhgI* aus *H. elongata* in pTRG: pTRGyhgIHefor (*Not* I) & pTRGyhgIHerev (*Eco* RI)

5'...AAA CCA GAG GCG GCC GGA TCC GCG GCC GCC ATG AGC GAC...
3'...TTT GGT CTC CGC CGG CCT AGG CGC CGG CGG TAC TCG CTG...

pBTyhgIEc: *yhgI* aus *E. coli* in pBT: pBTyhgIEcfor (*Not* I) & pBTyhgIEcrev (*Bam* HI)

5'...GAA GAG ACG TTT GGC GCG GCC GCT GCT ATG ATC CGT...
3'...CTT CTC TGC AAA CCG CGC CGG CGA CGA TAC TAG GCA...

pTRGyhgIEc: *yhgI* aus *E. coli* in pTRG: pBTyhgIEcfor (*Not* I) & pTRGyhgIEcrev (*Xho* I)

5'...AAA CCA GAG GCG GCC GGA TCC GCG GCC GCT GCT ATG ATC CGT...
3'...TTT GGT CTC CGC CGG CCT AGG CGC CGG CGA CGA TAC TAG GCA...

pTRGyhgH: *yhgH* aus *E. coli* in pTRG: pTRGyhgHEcfor (*Not* I) & pTRGyhgHEcrev (*Eco* RI)

5'...AAA CCA GAG GCG GCC GGA TCC GCG GCC GCG ATG TTA TTC...
3'...TTT GGT CTC CGC CGG CCT AGG CGC CGG CGC TAC AAT AAG...

pBTyhgH: *yhgH* aus *E. coli* in pBT: pTRGyhgHEcfor (*Not* I) & pTRGyhgHEcrev (*Eco* RI)

5'...GAA GAG ACG TTT GGC GCG GCC GCG ATG TTA TTC...
3'...CTT CTC TGC AAA CCG CGC CGG CGC TAC AAT AAG...

Tab. 13: Sequenzfusionen von *yhgI* und *yhgH* aus *E. coli* und *yhgI* aus *H. elongata* mit den für λ cl bzw. RNAP α kodierenden Sequenzen

Abgebildet sind die Sequenzfusionen von *yhgI* und *yhgH* in den Vektoren des Two-Hybrid-Systems. Die Sequenz von *yhgI* aus *H. elongata* ist blau, *yhgI* aus *E. coli* in grün hervorgehoben. Dargestellt ist jeweils nur der 5'-Bereich der Gene, da dieser für die Fusion der Gene mit λ cl (pBT) bzw. α RNA-Polymerase (pTRG) ausschlaggebend ist. Angegeben sind die für die Amplifikation verwendeten Primer und die für die Ligation verwendete Schnittstelle im 5'-Primer (unterstrichen dargestellt). Die Amplifikation der inserierten PCR-Produkte erfolgte jeweils mit der Pwo-Polymerase unter Zusatz von 2 mM MgCl₂ (T_a=56 °C). Im 3'-Bereich umfassen die PCR-Produkte die Stoppcodon von *yhgI* bzw. *yhgH*.

Beide *yhgI*-Gene und auch *yhgH* wurden sowohl in pBT als auch in pTRG inseriert (Tab. 13). Anschließend wurden die verschiedenen Vektorkombinationen in den Reporterstamm BacterioMatch® I transformiert (Tab. 14).

Funktion	Vektorkombination	Kennung im Test
Oligomerbildung von Yhgl bzw. YhgI	pBTyhgIHe & pTRGyhgIHe	1
	pBTyhgIEc & pTRGyhgIEc	2
	pBTyhgH & pTRGyhgH	3
Yhgl/YhgH-Wechselwirkung	pBTyhgIHe & pTRGyhgH	4
	pTRGyhgIHe & pBTyhgH	5
	pBTyhgIEc & pTRGyhgH	6
	pTRGyhgIEc & pBTyhgH	7
Positivkontrolle	pBT-LGF2 & pTRG-Gal11 ^P	+
Negativkontrolle	pBT & pTRG	-

Tab. 15: Kotransformierte Vektorkombinationen

So konnte überprüft werden, ob Yhgl und YhgH Wechselwirkungen eingehen, aber auch, ob die Einzelproteine Oligomere ausbilden. Zum Nachweis einer möglichen Interaktion wurden die Stämme auf zwei Typen von Selektionsplatten überpickt. Den ersten Hinweis sollte das Vorhandensein einer β -Galaktosidaseaktivität liefern. Daher enthielt die erste Selektionsplatte (10 ml LB-0,5) Chloramphenicol (50 μ g/ml), Tetracyclin (15 μ g/ml), X-Gal (80 μ g/ml) und den β -Galaktosidasehemmer Phenylethyl- β -D-thio-Galaktosid (PETG, 1 mM). PETG dient dazu eine Blaufärbung der Kolonien, die aufgrund einer Grundexpression der Reportergene ohne Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgt, zu verhindern. Die Platten wurden für zwei Tage bei 37 °C bebrütet und die Koloniefärbung mittels Digitalkamera dokumentiert (Abb. 21).

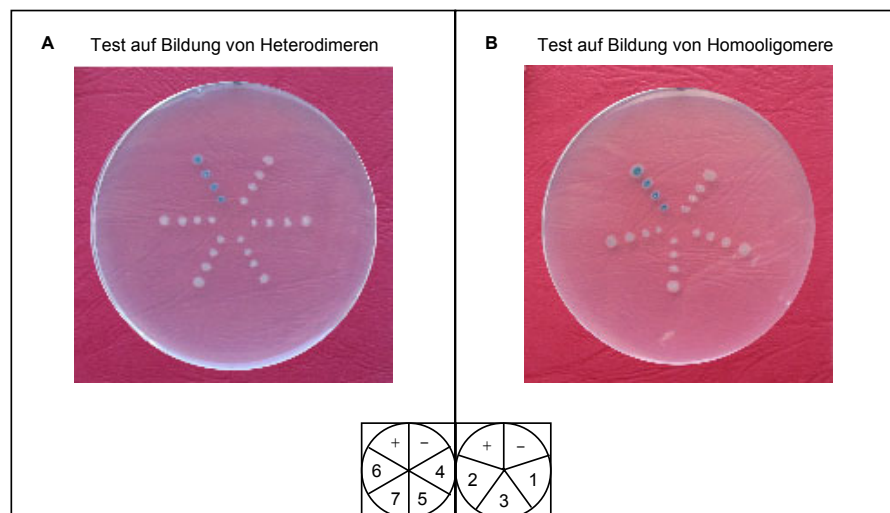


Abb. 21: Untersuchungen möglicher Interaktionen von Yhgl und YhgH mittels BacterioMatch® Two-Hybrid **A:** β -Galaktosidasetest mit den Vektorkombinationen zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Yhgl und YhgH. **B:** β -Galaktosidasetest mit den Vektorkombinationen zur Untersuchung der Wechselwirkungen der einzelnen Proteine. Die Zahlenangaben in der Legende der Abbildung beziehen sich auf die Vektorkombinationen in Tabelle 15. Sowohl der Test auf eine Wechselwirkung von Yhgl und YhgH, als auch der Test auf eine Oligomerbildung von Yhgl bzw. YhgH verliefen negativ.

Der Verlauf des β -Galaktosidase-Nachweises verlief für beide experimentellen Ausrichtungen negativ. Sowohl die Untersuchung auf Interaktionen von Yhgl und YhgH zeigte ein negatives Ergebnis als auch der Test auf Oligomerbildung. In beiden Fällen war für alle getesteten Vektorkombinationen nur eine mit der Negativkontrolle vergleichbare Färbung zu erkennen. Die Blaufärbung der Positivkontrolle fiel deutlich stärker aus.

Der zweite Nachweis einer Interaktion sollte über die Ausprägung einer Carbenicillin-Resistenz erfolgen. Daher enthielten die zweiten Selektionsplatten (LB-0,5) Chloramphenicol (50 $\mu\text{g/ml}$), Tetracyclin (15 $\mu\text{g/ml}$) und 100 bis 300 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin. Diese Platten wurden nach Protokoll für zwei Tage bei 30 °C bebrütet. Aufgrund einer zu hohen Hintergrundresistenz der Negativkontrolle gegen Carbenicillin wurde das Wachstum der Stämme auf dieser zweiten Selektionsplatte nicht dokumentiert.

Das negative Ergebnis des Two-Hybrid-Experimentes macht keine Aussage darüber, ob eine Interaktion stattfindet oder nicht, da verschiedenste Faktoren zu einem negativen Verlauf führen können (siehe Diskussion Abschnitt 6.1).

8. Charakterisierung einer *yhgH*-Deletionsmutante von *E. coli* K-12

Wie schon dargestellt, ist bei *E. coli* K-12 und einigen anderen γ -Proteobakterien stromaufwärts von *yhgI* das Kompetenzgen *yhgH* lokalisiert. Die These einer gemeinsamen Funktion in einem Stoffwechsel- oder Regulationsweg konnte mittels des verwendeten BacterioMatch® Two-Hybrid-Systems nicht erhärtet werden, da eine direkte Interaktion beider Proteine nicht nachgewiesen werden konnte. Trotz dieses negativen Verlaufes der Versuche wurde entschieden *yhgH* von *E. coli* K-12 zu deletieren. So konnte überprüft werden, ob die Deletion zu einem *E. coli* BK1-ähnlichen Phänotyp führt und so auf eine gemeinsame Funktion geschlossen werden kann.

8.1 Molekularbiologische Arbeiten zur Deletion von *yhgH* in *E. coli* K-12

Zur Herstellung des Konstruktes für die vollständige Deletion von *yhgH* in *E. coli* K-12 (Stamm *E. coli* BK2, Abb. 22) wurde die SOE-PCR angewendet (Tab. 16). Das fertiggestellte PCR-Produkt wurde in pMAK705 ligiert und schließlich mittels Transformation auf *E. coli* K-12 übertragen.

Wie sich später in physiologischen Experimenten (siehe Ergebnisse Abschnitt 8.2) herausstellte, führte die vollständige Deletion von *yhgH* (*E. coli* BK2) zu einer salzsensitiven Mutante, die denselben Phänotyp wie *E. coli* BK1 aufweist. Datenbankrecherchen auf der NCBI-Homepage ergaben jedoch, dass durch die Deletion von *yhgH* gleichzeitig ein Teil des auf dem Gegenstrang liegenden *bioH*-Gens (Basen 1-11) deletiert wurde. So war ein negativer Effekt auf das Wachstum denkbar, weshalb bei Wachstumsexperimenten dem Medium Biotin (0,15 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt wurde.

Um Auswirkungen der Deletion auf die Expression zu verhindern, wurden zwei Teildeletionen von *yhgH* durchgeführt, die zu den Mutanten *E. coli* BK3 und BK4 führten (Abb. 22). In BK3 wurde das zentrale *Nde* I-Fragment (Basen 1394-1960 der *E. coli* Sequenz im Anhang) deletiert, in BK4 der Teil

des Gens, der für den Phosphoribosyl-Transferase-ähnlichen Teil kodiert (Basen 1871-2077 der *E. coli* Sequenz im Anhang). Durch beide Deletionen kommt es nicht zu einer Verschiebung des Leserasters und auch das Stoppcodon bleibt intakt, so dass mit einer Expression der Restsequenz von *yhgH* zu rechnen ist. Die PCR-Bedingungen für die Amplifikationen der entsprechenden PCR-Produkte und die Bezeichnung der resultierenden Vektorkonstrukte sind Tabelle 16 zu entnehmen.

<i>E. coli</i> Stamm	Primerpaar	Produktgröße kb	PCR-Bedingung		Plasmidbezeichnung
			T _a (°C)	MgCl ₂ (mM)	
BK2 <i>ΔyhgH</i> <i>ΔbioH</i> 1-11	SOEyhgH1Ec & SOEyhgH2Ec	1,053	56	1,5	pMAKBK2
	SOEyhgH3Ec & SOEyhgH4Ec	1,054	56	1,5	
	<u>Fusionsprodukt:</u> SOEyhgH1Ec & SOEyhgH4Ec	2,067	56	GC-Rich-Kit	
BK3 <i>ΔyhgH</i> 52-618	SOEyhgH1Ec & SOEyhgH4Ec	2,799	56	GC-Rich-Kit	pK18BK3, pK18BK3ΔNdeI, pMAKBK3ΔNdeI
BK4 <i>ΔyhgH</i> 522-729	DelSOE1yhgHEc & DelSOE2yhgHEc	1,055	56	1,5	pMAKBK4
	DelSOE3yhgHEc & SOEyhgH4Ec	1,059	56	1,5	
	<u>Fusionsprodukt:</u> DelSOE1yhgHEc & SOEyhgH4Ec	2,070	56	GC-Rich-Kit	

Tab. 16: PCR-Produkte und Vektorkonstrukte zur Erstellung der *yhgH*-Mutanten von *E. coli* K-12

In der Tabelle sind die Primer und Amplifikationsbedingungen, die für die Herstellung der unterschiedlichen PCR-Produkte benötigt wurden, aufgeführt. In der ersten Spalte ist die Bezeichnung der entsprechenden Mutante vermerkt. Die Zahlenwerte in der Bezeichnung der Deletionen beziehen sich auf das Startcodons des entsprechenden Gens. Die Konstrukte für die Herstellung von BK2 und BK4 wurden mittels SOE-PCR-Technik amplifiziert. Die Primer SOEyhgH2Ec und SOEyhgH3Ec bzw. DelSOE2yhgHEc und DelSOE3yhgHEc tragen für die Fusion komplementäre Sequenzen. Das PCR-Produkt für die Herstellung von BK3 wurde mittels Standard-PCR amplifiziert, nach der Klonierung in pK18*mobsacB* verkürzt und schließlich in pMAK705 inseriert. Die Anmerkung „GC-Rich-Kit“ deutet auf eine Durchführung der PCR mit Hilfe des gleichnamigen Roche-PCR-Kits hin, ohne Zugabe von zusätzlichem MgCl₂ und „Resolution solution“. In der letzten Spalte der Tabelle sind die entsprechenden Plasmidbezeichnungen angegeben. Bei der Konstruktion des Vektor zur Herstellung von BK3 entstanden die Vektoren pK18BK3 und pK18BK3ΔNdeI als Zwischenschritte. Für die Deletion selbst wurde pMAKBK3ΔNdeI verwendet.

Für die Herstellung von BK3 wurde das *Sal*I-verdaute Fusions-PCR-Produkt zunächst in pK18*mobsacB* ligiert. Dieser Vektor enthält keine *Nde*I-Schnittstelle und ist somit geeignet, das zentrale *Nde*I-Fragment aus dem klonierten PCR-Produkt zu scheiden. Daher wurde pK18BK3 mit *Nde*I hydrolysiert und nach einer Aufreinigung religiert. Das verkürzte Vektorkonstrukt (pK18BK3ΔNdeI) wurde einem präparativen *Sal*I-Verdau unterzogen und das isolierte, verkürzte PCR-Produkt in pMAK705 inseriert (pMAKBK3ΔNdeI). Das PCR-Produkt für die Herstellung von *E. coli* BK4 wurde mittels SOE-PCR hergestellt (Tab. 16).

Die Konstrukte für die Herstellung von *E. coli* BK2, BK3 und BK4 (pMAKBK2, pMAKBK3ΔNdeI und pMAKBK4) wurden mittels Transformation auf *E. coli* K-12 übertragen. Die Herstellung der Mutanten erfolgte wie bei *E. coli* BK1. Um die Deletionsmutanten vom Wildtyp zu unterscheiden, wurden Cm^S Kolonien in eine Kolonie-PCR mit den Primern EYDel1 und SOEyhgH4Ec (T_a= 56 °C) eingesetzt. Bei

BK2 ist ein 1,268 kb großes, in BK3 ein 1,389 kb großes, in BK4 ein 1,791 kb großes und in *E. coli* K-12 ein 2,001 kb großes PCR-Produkt zu erwarten.

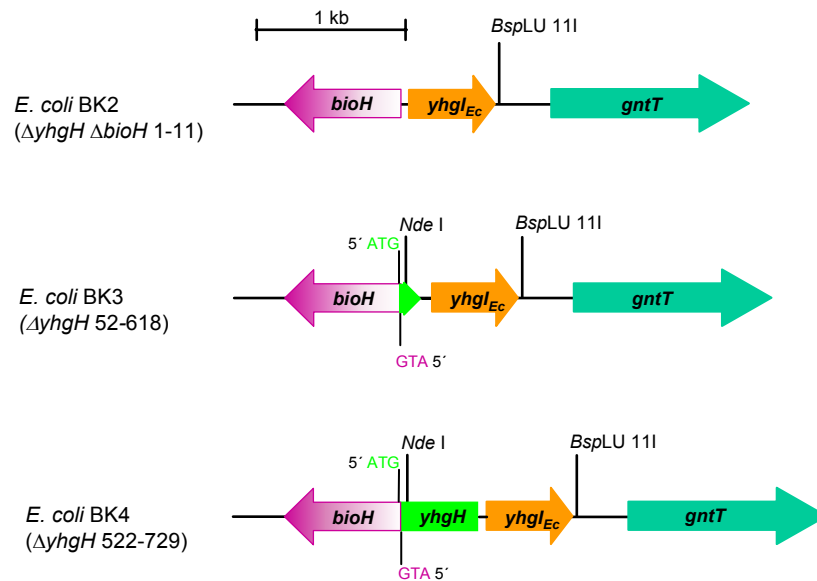


Abb. 22: Genetische Organisation der *yhgH*-Deletionsmutanten von *E. coli* K-12

Dargestellt ist die genetische Organisation der *E. coli* K-12 *yhgH*-Mutanten BK2 ($\Delta yhgH \Delta bioH$ 1-11), BK3 ($\Delta yhgH$ 52-618) und BK4 ($\Delta yhgH$ 522-729). Die Farbauswahl entspricht der vorherigen Abbildung mit der genetischen Organisation von *E. coli* K-12 und BK1 ($\Delta yhgI$). Da die ORFs von *yhgH* und *bioH*, die auf Gegensträngen der DNA liegen, teilweise überlappen, sind in *E. coli* BK2 die Basen 1-11 des *bioH*-Gens deletiert. Um negative Effekte dieser zusätzlichen Deletion auf das Wachstum zu vermeiden, wurden die *yhgH*-Mutanten *E. coli* BK3 und BK4 hergestellt. Diese enthalten jeweils Teildeletionen von *yhgH*. Als Zahlenwerte sind daher jeweils die deletierten Basen des entsprechenden Gens angegeben. Als Bezugspunkt dient jeweils die erste Base des ORFs eines Gens. Angegeben sind auch für die Konstruktion der Mutanten wichtige Restriktions-schnittstellen.

8.2 Wachstumsverhalten von *E. coli* BK2, BK3 und BK4

E. coli K-12, BK1 ($\Delta yhgI$), BK2 ($\Delta yhgH \Delta bioH$ 1-11), BK3 ($\Delta yhgH$ 52-618) und BK4 ($\Delta yhgH$ 522-729) wurden auf AB-Medium (0,5 % NaCl) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden Einzelkolonien auf MM63-Medium mit 0,5 %, 1,5 %, 3,5 % und 5,25 % NaCl (0,15 µg/ml Biotin) überpickt. Für den Ausfall des Wachstums war in Betain-haltigem Mineralsalzmedium eine gering-fügige Erhöhung der Mediensalinität auf 5,25 % NaCl erforderlich, da die Salztoleranz durch Biotin-zusatz gesteigert worden war. Die Agarplatten wurden über 6 Tage bei 37 °C bebrütet. Während dieser Zeit wurde das Wachstum der Stämme mittels einer Digitalkamera dokumentiert (Abb. 23).

Es wird deutlich, dass *E. coli* BK1 und *E. coli* BK2 einen vergleichbaren salzsensitiven Phänotyp aufweisen, während die übrigen Stämme dem Wildtyp vergleichbar sind. Bei 5,25 % NaCl im Mineralsalzmedium zeigen *E. coli* BK1 und BK2 nur noch vernachlässigbares Wachstum.

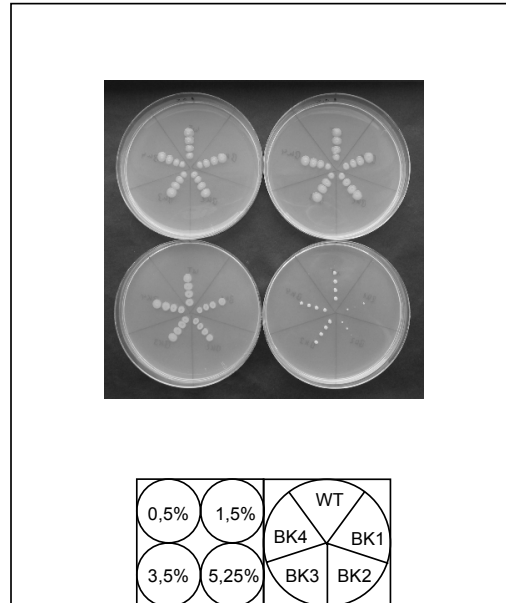


Abb. 23: Wachstum der *E. coli yhgH*-Mutanten BK2, BK3 und BK4 auf Mineralsalzmedium steigender Salinität

Dargestellt ist das Wachstum von *E. coli* BK2 ($\Delta yhgH \Delta bioH$ 1-11), BK3 ($\Delta yhgH$ 52-618) und BK4 ($\Delta yhgH$ 522-729) auf MM63-Agarplatten steigender Salinität (0,5 %, 1,5 %, 3,5 % und 5,25 % NaCl; 0,15 $\mu\text{g/ml}$ Biotin; 5 mM Betain) im Vergleich zu *E. coli* K-12 und BK1 ($\Delta yhgI$). In der Legende ist die Anordnung der überpickten Stämme sowie die Anordnung der Agarplatten unterschiedlicher Salinität angegeben. Die Abbildung zeigt das Wachstum 6 Tage nach dem Beimpfen der Platten. *E. coli* BK2 zeigt ein mit *E. coli* BK1 identisches, salz-sensitives Wachstumsverhalten. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

8.3 Funktionelle Komplementierung von *E. coli* BK2

Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in den Wachstumsexperimenten mit den *yhgH*-Mutante von *E. coli* sollte anhand einer funktionellen Komplementierung von *E. coli* BK2 geprüft werden, ob die Salzsensitivität von *E. coli* BK2 im Ausfall von *yhgH* oder im Ausfall von *yhgI* begründet ist. Wie schon bei *E. coli* BK1 wurden auch bei *E. coli* BK2 die Komplementierungsexperimente mit in pHSG575 inserierten Genen durchgeführt. *yhgI* aus *E. coli* K-12 lag bereits kloniert aus den Komplementierungsexperimente mit *E. coli* BK1 vor (pHSGyhgIEcF, Abb. 24). Für die Amplifikation von *yhgH* aus *E. coli* K-12 wurden die Primer EyDel 1 und yhgHEcrev verwendet (Tab. 17).

Gen	Primerpaar	Produktgröße kb	PCR-Bedingung		Plasmidbezeichnung
			T _a (°C)	MgCl ₂ (mM)	
<i>yhgH</i>	EYDel1 & yhgHEcrev	1,238	56	1,5	pHSGyhgH

Tab. 17: Konstrukt zur funktionellen Komplementierung von *E. coli* BK2

In der Tabelle sind die Primer und Amplifikationsbedingungen zur Herstellung des *yhgH*-PCR-Produktes aufgeführt. Das PCR-Produkt umfasst ausreichend stromaufwärts und stromabwärts gelegene Sequenz um mögliche Promotoren bzw. Terminatoren einzuschließen. In der letzten Spalte der Tabelle ist die Plasmidbezeichnungen angegeben. In pHSGyhgH ist *yhgH* entgegen des *lacZ'*-Fragments orientiert. Die Primer tragen *Hin* dIII-Schnittstellen.

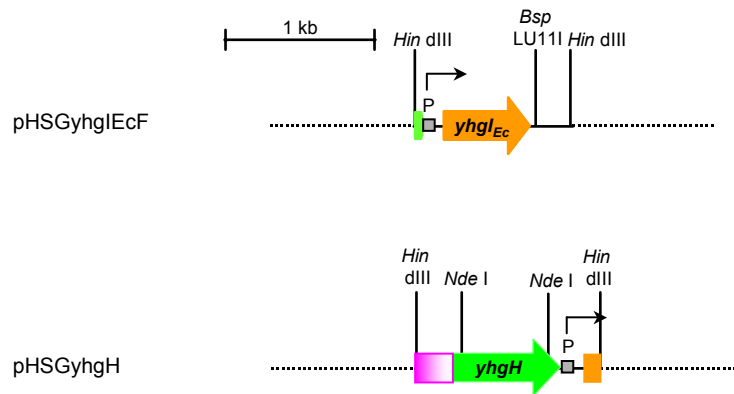


Abb. 24: Konstrukte für die Komplementierung von *E. coli* BK2

Abgebildet sind die Vektoren, die für die funktionelle Komplementierung von *E. coli* BK2 ($\Delta yhgH \Delta bioH$ 1-11) verwendet wurden. Im Detail sind jeweils die klonierten PCR-Produkte abgebildet. Die Auswahl der Farben erfolgte entsprechend den Abbildungen der genetischen Organisation der *E. coli* Stämme. *yhgI* ist gleich, *yhgH* entgegen des *lacZ*-Fragments von pHSG575 inseriert. Wichtige Schnittstellen sind zur Verdeutlichung eingezeichnet.

Sowohl pHSGyhgIEcF als auch pHSGyhgH (Abb. 24) wurden anschließend in superkompetente Zellen von *E. coli* K-12 und *E. coli* BK2 transformiert.

Alle plasmidtragenden Stämme wurden auf AB-Medium (0,5 % NaCl, Cm50) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Morgen wurden Einzelkolonien auf MM63-Agarplatten mit 0,5 %, 1,5 %, 3,5 % bzw. 5,25 % NaCl (5 mM Betain und 0,15 µg/ml Biotin) überpickt und über 6 Tage bei 37 °C bebrütet. Während dieser Zeit wurde das Wachstum der Stämme mittels einer Digitalkamera dokumentiert (Abb. 25).

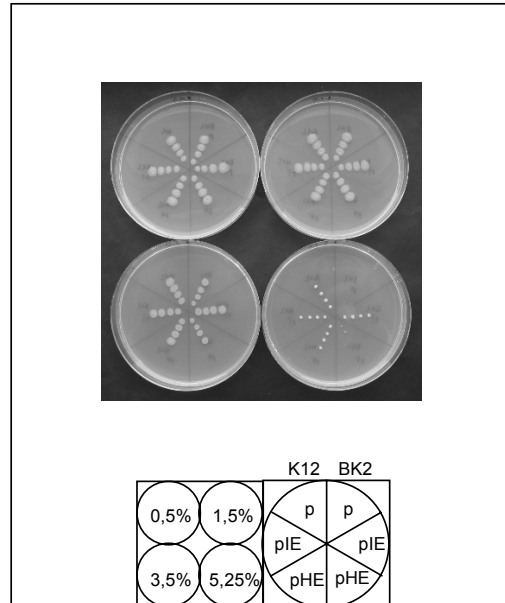


Abb. 25: Salinitätsabhängiges Wachstum der *E. coli* BK2 Transformanten

Dargestellt ist das Wachstum der unkomplementierten *yhgH*-Deletionsmutante *E. coli* BK2 und ihrer komplementierten Stämme auf MM63-Agarplatten steigender Salinität (0,5 %, 1,5 %, 3,5 % und 5,25 % NaCl; 0,15 µg/ml Biotin; 5 mM Betain) im Vergleich zu den entsprechenden *E. coli* K-12 Stämmen. In der Legende ist die Anordnung der überpickten Stämme sowie die Anordnung der Agarplatten unterschiedlicher Salinität angegeben: **K12**: *E. coli* K-12; **BK2**: *E. coli* BK2; **p**: pHSG575 (unkomplementierte Stämme); **pIE**: pHSGyhgIEcF; **pIH**: pHSGyhgIHe. Die Abbildung zeigt das Wachstum 6 Tage nach dem Beimpfen der Platten. Die Salzsensitivität von *E. coli* BK2 lässt sich durch kloniertes *yhgI* aus *E. coli* K-12 komplementieren. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Komplementierung des Wachstumsdefekts erfolgte durch kloniertes *yhgI* und nicht durch kloniertes *yhgH*. Im Umkehrschluss heißt dies, dass eine Deletion von *yhgH* zu einem Ausfall von *yhgI* führt. Es lag daher die Vermutung nahe, dass innerhalb von *yhgH* mehrere regulatorische Sequenzen oder Promotorbereiche von *yhgI* lokalisiert sein müssen (siehe Diskussion Abschnitt 7). Gleichzeitig ließ sich durch diese Experiment jedoch die These einer Funktion von *yhgI* und *yhgH* in einem gemeinsamen Prozess (z.B. zellulären Kompetenz zur DNA-Aufnahme) nicht bestätigen.

9. Untersuchungen zur Expression von *yhgI*

Da YhgI offensichtlich für die salinitätsabhängige Stressanpassungen von *E. coli* und *H. elongata* erforderlich ist, sollte die Expression von *yhgI* beider Organismen analysiert werden. Vorgesehen waren Untersuchungen zur Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte und der zugehörigen Promotorsequenzen. Durch die Festlegung von Transkriptionsstartpunkten kann der DNA-Bereich für die Vorhersage von Promotoren deutlich eingeschränkt werden. Gleichzeitig sollte auch untersucht werden, ob eine gemeinsame Expression von *yhgI* und *yhgH* bei *E. coli* K-12 wahrscheinlich ist. Dann wäre eine weitere Untersuchung der *yhgH*-Deletionsmutanten mit der Identifizierung eines Phänotyps sinnvoll.

9.1 Identifizierung transkriptionsregulatorischer Elemente in *E. coli* K-12

9.1.1 RACE-PCR an *E. coli* K-12 zur Identifizierung von Transkriptionsstartpunkten und vorgelagerter potentieller Promotorsequenzen

Nachdem unterschiedliche *yhgH*-Mutanten von *E. coli* K-12 hergestellt worden waren (BK2, BK3 und BK4) und ihr unterschiedliches Wachstumsverhalten in Bezug auf den Salzgehalt des Mineralsalzmediums getestet worden war, sollten die Transkriptionsstartpunkte für die Expression von *yhgI* in *E. coli* K-12 ermittelt werden. Dazu wurde die spezielle Technik der RACE-PCR angewendet.

Von *E. coli* K-12 wurde aus MM63-Kulturen mit 1,5 % und 3,5 % NaCl (5 mM Betain) bei einer OD_{600} von 0,7 die Gesamt-RNA entsprechend des Protokolls isoliert und gereinigt. Nach der Kontrolle der RNA auf Verunreinigungen mit DNA (mittels PCR) erfolgte die cDNA-Synthese mit dem Primer Race1Ec (Abb. 28). Nach dem Anhängen des C-Überhanges („C-tail“) wurde die RACE-PCR mit den Primern Race2Ec (Abb. 28) und AAP (gegen „C-tail“ gerichtet) durchgeführt ($T_a = 55^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2). Dabei ergaben sich für beide Salinitäten drei PCR-Produkte mit deutlichem Längenunterschied (0,92 kb, 0,65 kb und 0,52 kb) (Abb. 26).

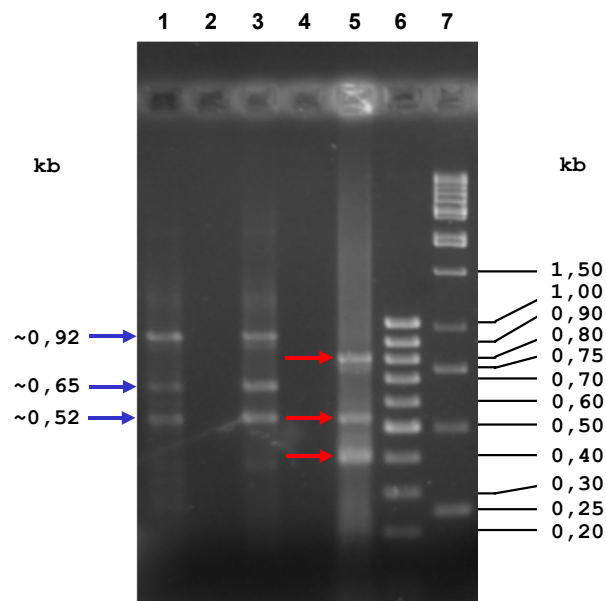


Abb. 26: Agarosegelelektrophorese der *E. coli* K-12 RACE-PCR-Produkte

Abgebildet ist das Agarosegel zur Dokumentation der Ergebnisse der RACE-PCR an *E. coli* K-12 RNA. In den Bahnen 1-5 sind die Produkte der RACE-PCR aufgetrennt: **1**: RACE-PCR (1,5 % NaCl); **2**: Negativkontrolle zu 1; **3**: RACE-PCR (3,5 % NaCl); **4**: Negativkontrolle zu 3; **5**: nested-RACE-PCR (1,5 % NaCl); **6**: 100 bp DNA-Marker; **7**: 1 kb DNA-Marker. Die RACE-PCR wurde jeweils mit „C-tailed“ cDNA und den Primern AAP und Race2Ec angesetzt, die Negativkontrolle mit cDNA, die kein „C-tail“ trägt. Die nested-RACE-PCR wurde mit gereinigtem RACE-PCR-Produkt (aus **1**) und den Primern AUAP und Race3EcEco durchgeführt. Die blauen Pfeile markieren die drei RACE-PCR-Produkte, die roten Pfeile die Produkte der nested-RACE-PCR.

Die RACE-PCR wurde nach dem QIAquick-PCR-Purification-Protokoll gereinigt und in eine nested-PCR mit dem eingerückten Primer Race3EcEco (Abb. 28) und dem Primer AUAP, der gegen den Primer AAP gerichtet ist, eingesetzt ($T_a = 61^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2). Es bildeten sich PCR-Produkte, die jeweils ca. 150 bp kürzer als die ursprünglichen Produkte waren (Abb. 26). Für die Gewinnung einer ausreichend großen Menge dieser verkürzten Produkte wurde die RACE-PCR-Produkte in einem

präparativen Agarosegel aufgetrennt und anschließend die drei PCR-Produkte unabhängig voneinander aus dem Gel gereinigt. Die gereinigten Einzel-PCR-Produkte wurden in neue PCR-Reaktionen mit den Primern Race3EcEco und AUAP (gegen AAP gerichtet) eingesetzt (nested-RACE-PCR). Es bildeten sich die verkürzten PCR-Produkte, die wiederum im Gel gereinigt und schließlich sequenziert wurden. Für die Sequenzierung des kurzen (EcN1) und mittleren (EcN2) Produktes wurde der Primer Race3EcEco, für das lange Produkt (EcN3) der Primer pTRGyhgHEcrev verwendet. Die Sequenzierung der nested-RACE-PCR-Produkte ergab drei unterschiedliche genomische DNA-Sequenzen im Bereich des „C-tails“ und somit auch drei auf dem komplementären DNA-Strang liegende Transkriptionsstartpunkte (Abb. 27).

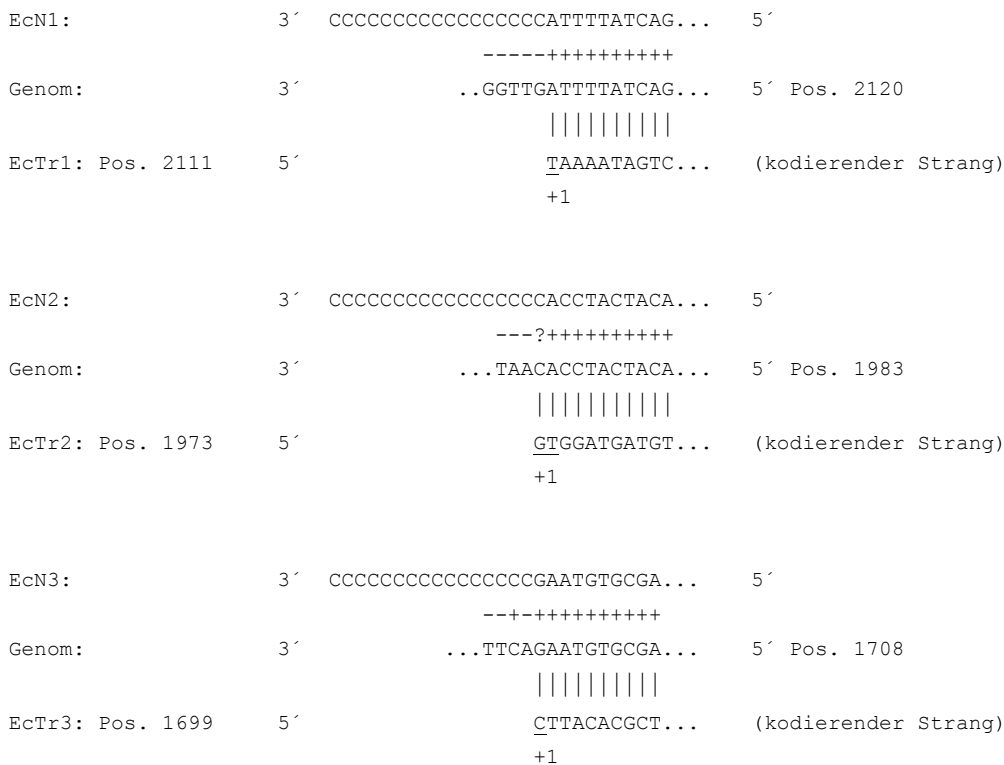


Abb. 27: Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte von *yhgI* in *E. coli* K-12

Dargestellt ist jeweils die DNA-Sequenz der unterschiedlichen RACE-PCR-Produkte EcN1 (kurzes), EcN2 (mittleres) und EcN3 (langes RACE-Produkt) im Bereich des „C-tails“. Zum Vergleich ist die entsprechende genomische DNA-Sequenz angegeben. Die Positionsangaben beziehen sich auf die *E. coli* K-12 DNA-Sequenz im Anhang der Arbeit und in Abbildung 28. „+“ deutet auf Übereinstimmungen, „-“ auf Abweichungen von der genomischen Sequenz hin. „?“ markiert Unsicherheiten. Im vorliegenden Fall lässt sich für EcN2 der Beginn des „C-tail“ nicht exakt vorhersagen, da nicht zwischen einem C als Bestandteil der genomischen Sequenz oder des „C-tails“ unterschieden werden kann. Für alle drei RACE-PCR-Produkte sind die zugehörigen auf dem kodierenden Gegenstrang der DNA liegenden Transkriptionsstartpunkte angegeben (EcTr1, EcTr2 bzw. EcTr3, siehe auch Abb. 28). Dieser ist jeweils durch „+1“ markiert. „|“ verdeutlicht die Komplementarität der DNA-Stränge. Da der Beginn des „C-tails“ für EcN2 nicht exakt vorhergesagt werden konnte, ergaben sich für EcTr2 zwei benachbarte Basen als mögliche Transkriptionsstartpunkte.

Das kürzeste PCR-Produkt ergab einen Startpunkt, der 28 bp (Pos. 2111) vor dem Startcodon von *yhgI* (Pos. 2139) liegt. Der zweite Startpunkt liegt ca. 165 bp (Pos. 1973 oder 1974) vor der Startcodon von *yhgI*. Eine genaue Identifizierung des Startpunktes ist nicht möglich, da der Beginn des „C-tails“ nicht exakt bestimmt werden konnte. Folglich kann es sich bei dem Transkriptionsstartpunkt

(EcTr2) um ein Guanin oder Thymin handeln (Abb. 27). Die Ungenauigkeit der Bestimmung umfasst eine Base. Das längste RACE-PCR-Produkt (EcN3) deutet auf einen Startpunkt 440 bp (Pos. 1699) vor dem Translationsstart hin. Hier ist wiederum eine genaue Zuordnung des Transkriptionsstartes (EcTr3) möglich.

Weitere RACE-PCR-Produkte ließen sich auch mit eingerückten PCR-Primern nicht amplifizieren. Daher ergaben sich für *yhgI* aus *E. coli* K-12 auch keine weiteren Transkriptionsstartpunkte.

Die DNA-Bereiche stromaufwärts der drei identifizierten Transkriptionsstartpunkte wurden mittels Computeranalyse (Neural network, (Reese, 2001)) und direkten Sequenzvergleich auf mögliche Promotorsequenzen hin untersucht. So konnten drei, zu unterschiedlichen Gruppen gehörige, mögliche Promotorsequenzen identifiziert werden (Abb. 28). Im Bereich des ersten Transkriptionsstartpunktes gibt es Bereiche, die σ^{70} -abhängigen Promotoren ähneln. Diese regulieren die Transkription der meisten Gene, die während des exponentiellen Wachstums exprimiert werden. Der Bereich stromaufwärts des mittleren Transkriptionsstartpunktes ähnelt σ^{32} -abhängigen Promotoren. Diese regulieren die Expression von Genen, die als Antwort auf Stressfaktoren wie z.B. Hitze exprimiert werden. Dem am weitesten von *yhgI* entfernten Transkriptionsstartpunkt ist eine Sequenz vorgelagert, die Ähnlichkeiten zu σ^{54} -abhängigen Promotoren aufweist. Diese sind häufig vor Genen, die im Zusammenhang mit Stickstoffassimilation stehen, lokalisiert.

Stromaufwärts des Startcodons von *yhgI* konnte eine mögliche Ribosomenanbindungstelle durch Sequenzvergleich (CLUSTAL W; (Thompson *et al.*, 1994)) mit dem 3'-Ende der 16S rRNA aus *E. coli* (Hillen, 1999) identifiziert werden.

9.1.2 Reverse Transkriptase-vermittelte PCR zur Überprüfung einer Koexpression von *yhgH* und *yhgI*

Alle identifizierten Transkriptionsstartpunkte liegen innerhalb oder stromabwärts von *yhgH*. Eine gemeinsame Expression von *yhgI* und *yhgH* aus *E. coli* scheint daher ausgeschlossen. Zur Bestätigung dieser Vermutung sollte jedoch mittels RT-PCR die maximale 5'-Ausdehnung möglicher weiterer Transkripte überprüft werden. So konnte auf der cDNA, die mit RNA der bei 3,5 % NaCl angezogenen Kultur hergestellt worden war, mit dem Primer Race3EcEco und dem Primer RaceEcKon4, der unmittelbar stromaufwärts des möglichen σ^{54} -abhängigen Promotors liegt, kein PCR-Produkt amplifiziert werden (Abb. 28 und 29). Bei einer Anzucht mit 1,5 % NaCl im Medium konnte mit dem Primern RaceEcKon3 und Race3EcEco noch ein Produkt nachgewiesen werden, mit den Primern EYDel1 und Race3EcEco nicht mehr (Abb. 28 und 29).

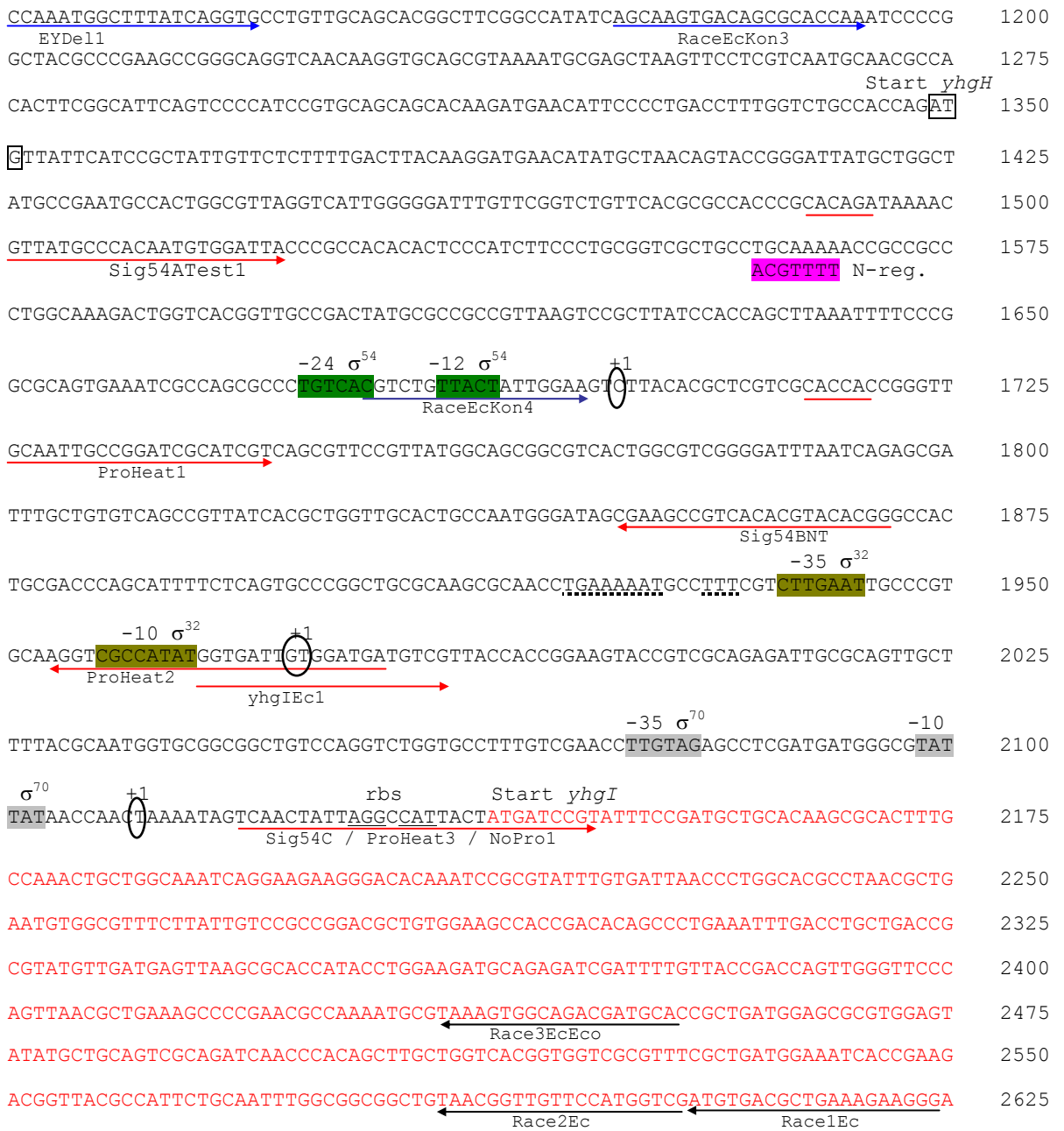


Abb. 28: Transkriptionsstartpunkte und daraus abgeleitete Promotoren von yhgI in E. coli K-12

Dargestellt ist der kodierende DNA-Strang aus der yhgI-Region von E. coli K-12. Angegeben sind die mittels RACE-PCR identifizierten Transkriptionsstartpunkte (+1) und die zugehörigen möglichen Promotoren unterschiedlicher Klassen: σ^{54} -, σ^{32} - bzw. σ^{70} -abhängig. Eingezeichnet sind jeweils die charakteristischen konservierten Regionen (-35 und -10 bzw. -24 und -12). Doppelt unterstrichen dargestellt ist die mögliche Ribosomenanbindungsstelle (rbs) stromaufwärts des Startcodons von yhgI. Unterbrochen unterstrichen ist eine AT-reiche Region stromaufwärts des σ^{32} -abhängigen Promotors hervorgehoben. AT-reiche Regionen sind Bestandteile sog. „UP-elements“ oder „a-tracts“. Diese interagieren mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase, aktivieren die Transkription deutlich und führen so zu einer „Verstärkung“ des Promotors. Auch eine Funktion in der Biegung von DNA wird diskutiert (Aiyar *et al.*, 1998; Estrem *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1998). **N-reg.** markiert eine mögliche Bindungsstelle der Regulatorproteine GlnG/NtrC bzw. NifA für σ^{54} -abhängigen Promotoren (Ow *et al.*, 1983). Die Angaben der Sequenzposition am rechten Rand bezieht sich auf die E. coli K-12 Sequenz im Anhang der Arbeit. Als schwarze Pfeile sind die für die RACE-PCR eingesetzten Primer eingezeichnet, als blaue Pfeile die wichtigen in der reverse Transkriptase-vermittelte PCR verwendeten Primer und als rote Pfeile die für die später Herstellung der Promotorfusionen verwendeten Primer.

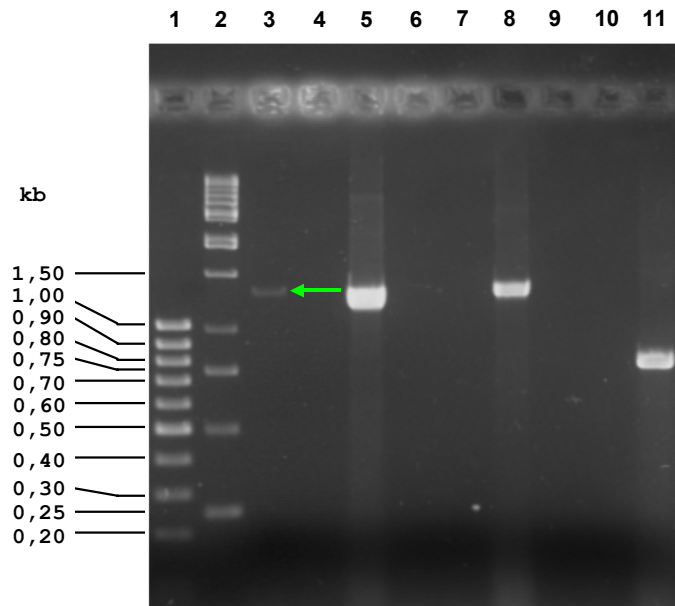


Abb. 29: Reverse Transkriptase-vermittelte PCR auf *E. coli* K-12 cDNA zum Nachweis längerer Transkripte
 Abgebildet ist die elektrophoretische Auftrennung der Produkte der reverse Transkriptase-vermittelten PCR auf *E. coli* K-12 cDNA. In den Bahnen 1 bzw. 2 sind 100 bp- bzw. 1 kb-Marker aufgetrennt. In den Bahnen 3-11 sind die PCR-Produkte der reverse Transkriptase-vermittelten PCR aufgetrennt: **3**: PCR mit Race3EcEco & RaceEcKon3 auf cDNA (1,5 % NaCl); **4**: Negativkontrolle zu 3; **5**: Reaktion 3 mit genomischer DNA; **6**: PCR mit Race3EcEco & EYDel1 auf cDNA (1,5 % NaCl); **7**: Negativkontrolle zu 6; **8**: Reaktion 6 mit genomischer DNA; **9**: PCR mit Race3EcEco & RaceEcKon4 auf cDNA (3,5 % NaCl); **10**: Negativkontrolle zu 9; **11**: Reaktion 9 mit genomischer DNA. Die Negativkontrollen der reverse Transkriptase-vermittelten PCR wurden jeweils mit den Negativkontrollen der cDNA-Synthese angesetzt. Hier wurde in die cDNA-Synthese keine reverse Transkriptase eingesetzt, es darf daher keine cDNA vorhanden sein und auch kein PCR-Produkt entstehen. Der angegebene NaCl-Gehalt bezieht sich jeweils auf die Anzuchtbedingungen von *E. coli* K-12 in MM63-Medium. Mit einem **grünen** Pfeil hervorgehoben ist dasjenige PCR-Produkt, das auf ein Transkript, welches stromaufwärts von *yhgH* beginnt, hindeutet.

Es konnte so ein Transkript nachgewiesen werden, das vor dem Startcodon von *yhgH* beginnt. Seine physiologische Relevanz ist jedoch zu bezweifeln, zumal keine entsprechendes RACE-PCR-Produkt amplifiziert worden war.

9.1.3 Identifizierung eines möglichen Transkriptionsterminationssignals in *E. coli*

Stromabwärts des Stoppcodon von *yhgI* lässt sich eine palindromische Sequenz identifizieren, die möglicherweise eine Schleifenstruktur ausbildet. Nur wenige Basen entfernt lässt sich eine AT-Region identifizieren (Abb. 30). Möglicherweise handelt es sich bei diesen benachbarten Motiven um den Terminationsbereich von *yhgI*, wie er bei einer Rho-Faktor unabhängigen Termination auftritt. Die Identifizierung der Schleifenstrukturen erfolgte, nach Voruntersuchungen der DNA-Sequenz mit dem Programm DNA-Strider, mit dem Programm „mfold“ (Zuker, 2003). Die freie Enthalpie dieser möglichen Terminationsschleife beträgt nach dem „mfold“-Server $\Delta G^0 = -100,5$ kJ/mol (Mathews *et al.*, 1999).

...TAAGTTATCCCCTCTTTTGTAGATTGCCCGATGCGACGCTAAAGCGTCATTCGGGCCTACGTTGAACATGT...

Abb. 30: Möglicher Terminationsbereich von *yhgI* aus *E. coli* K-12

Abgebildet ist die DNA-Sequenz ausgehend des Stoppcodons von *yhgI* (TAA). Einfach unterstrichen dargestellt ist die palindromische Sequenz, doppelt unterstrichen die AT-reiche Region, die bei einer Rho-Faktor unabhängigen Termination auf die palindromische Sequenz folgt. (Parameter für „mfold“: 25 °C, 1 M NaCl, keine bivalenten Ionen)

9.1.4 Analyse der möglichen *E. coli* Promotoren

Die mit Hilfe der RACE-PCR identifizierten hypothetischen Promotorsequenzen sollten auf ihre Funktionalität hin untersucht werden. Die Aktivität des σ^{70} -abhängigen Promotors war bereits durch das Wachstum der *E. coli* Mutante BK3 ($\Delta yhgH$ 52-618) nachgewiesen worden (siehe Diskussion Abschnitt 7). Hier war dies der einzige noch intakte Promotor. Für die anderen Promotoren war die Funktionalität noch nicht erwiesen. So zeigte *E. coli* BK4 ($\Delta yhgH$ 522-729) einen dem Wildtyp vergleichbaren Phänotyp, obwohl die Region der „Heat-Shock“-Promotor ähnlichen Sequenz entfernt worden war. Hier konnte nun der σ^{54} -abhängige Promotor aktiv sein oder es blieb trotz teilweiser Deletion des σ^{70} -abhängige Promotors eine Restaktivität vorhanden.

Es mussten daher die einzelnen Promotoren durch geschickte Primerauswahl über PCR mit dem ORF von *yhgI_{Ec}* kombiniert werden. Die wichtigsten dafür verwendeten Primer sind in Abbildung 28 eingezeichnet. Geplant waren als erste Experimente ein Nachweis der Promotoraktivität durch Komplementierungsexperimente mit der salzsensitiven Mutante *E. coli* BK1. Die einzelner Konstrukte sollten in pHSG575 kloniert und in *E. coli* BK1 transformiert werden. Wachstum von *E. coli* BK1 bei hoher Salinität deutet auf erfolgte Expression von *yhgI* und damit Promotoraktivität hin.

Die Konstrukte zur Überprüfung des σ^{32} -abhängigen und des σ^{54} -abhängigen Promotors wurden mittels SOE-PCR-Technik amplifiziert. Die übrigen Konstrukte wurden mittels Standard-PCR-Reaktionen hergestellt. Bis auf das Konstrukt zur Kontrolle der Promotoren in BK4 wurden alle PCR-Reaktionen mit *E. coli* K-12 DNA durchgeführt. Als Negativkontrolle diente *yhgI_{Ec}* ohne vorgelagerten Promotor. Die näheren Angaben zur Herstellung der PCR-Produkte und Vektoren sind dem Material und Methoden Teil zu entnehmen (Abschnitt 8.3).

Für die Komplementierung verwendet wurden sowohl die Konstrukte, in denen *yhgI_{Ec}* gleich *lacZ'* orientiert ist, als auch die, in denen *lacZ'* und *yhgI_{Ec}* entgegengesetzt orientiert sind. Nach der Transformation in *E. coli* BK1 und *E. coli* K-12 wurden die Stämme auf die Mineralsalzplatten überpickt. Es stellte sich jedoch heraus, dass alle Stämme bei 4 % NaCl auf MM63-Agarplatten anwuchsen, obwohl mindestens bei der Negativkontrolle ein Ausbleiben des Wachstums zu erwarten gewesen wäre (Abb. 31). In beiden Fällen mussten Promotorsequenzen innerhalb des Vektors vorhanden sein, die zur Expression von *yhgI_{Ec}* geführt haben (siehe Diskussion Abschnitt 7.6).

9.2 Identifizierung transkriptionsregulatorischer Elemente in *H. elongata*

9.2.1 RACE-PCR an *H. elongata* zur Identifizierung von Transkriptionsstartpunkten und vorgelagerter potentieller Promotorsequenzen

Wie *E. coli* K-12 wurde auch *H. elongata* DSM 2581^T bei zwei unterschiedlichen Salinitäten (4 % und 8 % NaCl) im Mineralsalzmedium angezogen. Unter beiden Anzuchtbedingungen wurde Gesamt-RNA isoliert und anschließend gereinigt. Zur Synthese der cDNA wurde der Primer Race1He verwendet (Abb. 33). Die RACE-PCR wurde nach dem Anhängen des „C-Überhanges“ mit den Primern Race2He (Abb. 33) und AAP durchgeführt ($T_a = 55\text{ °C}$, 1,5 mM $MgCl_2$), wobei für beide NaCl-Konzentrationen ein ca. 350 bp großes PCR-Produkt amplifiziert wurde (Abb. 31). Das Produkt bildete keine klare Bande wie bei *E. coli* K-12, was in einer schlechteren RNA-Qualität begründet sein könnte.

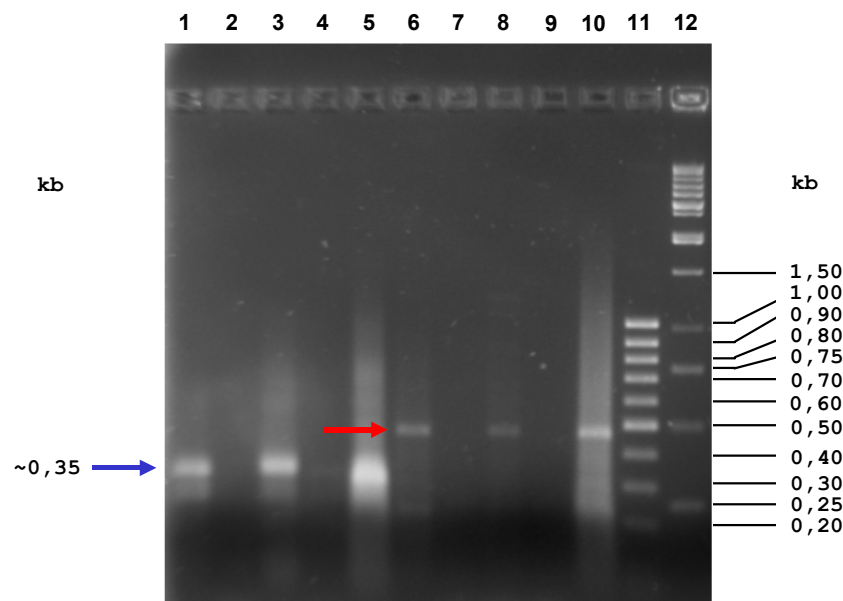


Abb. 31: Agarosegelelektrophorese der *H. elongata* RACE-PCR-Produkte

Abgebildet ist das Agarosegel für die Dokumentation der Ergebnisse der RACE-PCR an *H. elongata* RNA. In den Bahnen 1-5 sind die Produkte der RACE-PCR aufgetrennt: **1**: RACE-PCR (Primer Race2He & AAP, 4 % NaCl); **2**: Negativkontrolle zu 1; **3**: RACE-PCR (Primer Race2He & AAP, 8 % NaCl); **4**: Negativkontrolle zu 3; **5**: nested-RACE-PCR (Primer Race2He & AUAP, 4 % NaCl); **6**: RACE-PCR (Primer methH-1 & AAP, 4 % NaCl); **7**: Negativkontrolle zu 6; **8**: RACE-PCR (Primer methH-1 & AAP, 8 % NaCl); **9**: Negativkontrolle zu 8; **10**: nested-RACE-PCR (Primer methH-1 & AUAP, 4 % NaCl); **11**: 100 bp DNA-Marker; **12**: 1 kb DNA-Marker. Die RACE-PCR wurde jeweils mit „c-tailed“ cDNA, die Negativkontrolle mit cDNA, die kein „C-tail“ trägt, durchgeführt. Die nested-RACE-PCR wurde jeweils mit gereinigtem RACE-PCR-Produkt durchgeführt. Der **blaue** Pfeil markiert das RACE-PCR-Produkt der Primer Race2He & AAP, der **rote** Pfeil das Produkt der Primer methH-1 und AAP.

Nach einer Aufreinigung nach dem QIAquick-Protokoll wurde diese erste PCR-Produkt in eine erneute PCR mit den Primern Race2He und AUAP eingesetzt (nested-RACE-PCR). Das Produkt wies eine nahezu identische Größe auf (Abb. 31) und wurde nach einer Reinigung in einem präparativen Agarosegel (2 % Agarose in TB-Puffer) sequenziert. Die DNA-Sequenz enthielt in ihrem Endbereich einige Unsicherheiten und wurde nach der Position des „C-Überhanges“ abgesucht (Abb. 32).

```

HeN1:          3'  CCCCCCCCCCYYYYYYYYSSCYAATAAGGCCGG... 5'
                ??????????+?+++++++
Genom:         3'  ...CCCTTTGTGGCTAATAAGGCCGG... 5'  Pos. 2561
                |||||
HeTr1: Pos.2551 5'  TTATTCCGGCC... (kodierender Strang)
                +1

```

Abb. 32: Identifizierung des ersten Transkriptionsstartpunktes von *yhgl* aus *H. elongata*

Dargestellt ist die Ableitung des ersten Transkriptionsstartpunktes von *yhgl* aus *H. elongata*. Die genomische DNA-Sequenz (Genom) ist der Sequenz des RACE-PCR-Produktes (HeN1) gegenübergestellt, um die Problematik einer exakten Identifizierung des Transkriptionsstartes zu verdeutlichen. Die Positionsangaben beziehen sich auf die *H. elongata* DNA-Sequenz im Anhang und in Abbildung 33. „+“ stellt die Übereinstimmung der Sequenzen dar, „?“ markiert den unsicheren Bereich. „Y“ deutet auf eine Überlagerung der Pyrimidinbasen C oder T hin, „S“ auf eine Überlagerung der Basen G oder C. Diese Sequenzüberlagerung deutet auf das Vorhandensein zweier unterschiedlich langer RACE-PCR-Produkte hin. HeTr1 (siehe Abb. 33) gibt den vermutlichen auf dem kodierenden Gegenstrang liegenden ersten Transkriptionsstartpunkt an. Dieser ist durch „+1“ markiert. „|“ verdeutlicht die Komplementarität der DNA-Stränge.

Die Sequenz des „C-Überhanges“ scheint von genomischer DNA-Sequenz überlagert zu sein. Dies deutet darauf hin, dass unterschiedlich lange cDNA-Populationen synthetisiert worden sein müssen und daher auch unterschiedliche Transkripte vorhanden sein müssen. Durch die Sequenzunsicherheiten wies der entsprechende Transkriptionsstartpunkt ebenfalls gewisse Unsicherheiten auf. Alles deutete jedoch auf eine DNA-Region hin (Pos. 2551), die von der computergestützten Promotorvorhersage (Pos. 2541; (Burdziak, 1999)) abweicht (Abb. 33). Als zugehöriger Promotor ließ sich den-noch nur der schon zuvor vorhergesagte σ^{70} -abhängige Promotor identifizieren (Abb. 33). Damit weist der Transkriptionsstartpunkt mit 15 bp einen ungewöhnlich großen Abstand zur nächstgelegenen Promotorsequenz auf. Dies machte eine Bestätigung der Ergebnisse erforderlich. Dazu wurde die Klonierung des RACE-PCR-Produktes als neue Strategie ausgesucht. Das Produkt der RACE-PCR mit Race2He und AAP wurde nach einer Reinigung in eine weitere PCR mit den Primern Race2HeEco und AUAP eingesetzt ($T_a = 61^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2) und nach einer *Eco* RI und *Sal* I Hydrolyse in pK18*mobsacB* kloniert. Das inserierte PCR-Produkt des Vektorkonstrukts wurde sequenziert. Die Auswertung der erhaltenen DNA-Sequenz bestätigte den Transkriptionsstartpunkt der ersten Bestimmung. Längere Transkripte konnten mit dieser Klonierungsstrategie nicht nachgewiesen werden.

Ausgehend des Primers Race2He waren keine weiteren RACE-PCR-Produkte und daher auch keine weiteren Transkriptionsstartpunkte nachweisbar. Dennoch wurde nach den Ergebnissen der RACE-PCR an *E. coli* K-12 von weiteren Transkriptionsstartpunkten ausgegangen. Daher wurde nach einer cDNA-Synthese mit dem Primer Race1He unterschiedliche Primer für die Amplifikation eines RACE-PCR-Produktes getestet. Eine RACE-PCR mit den Primern AAP und methH-1 (Abb. 33) ergab für beide Salinitäten ein Produkt mit einer Länge von ca. 480 bp (Abb. 32, $T_a = 55^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2). Nach einer Reinigung des Produktes und einer weiteren Amplifikation mit den Primern methH-1 und AUAP ($T_a = 59^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2) wurde es zur Sequenzierung verschickt (Abb. 34).

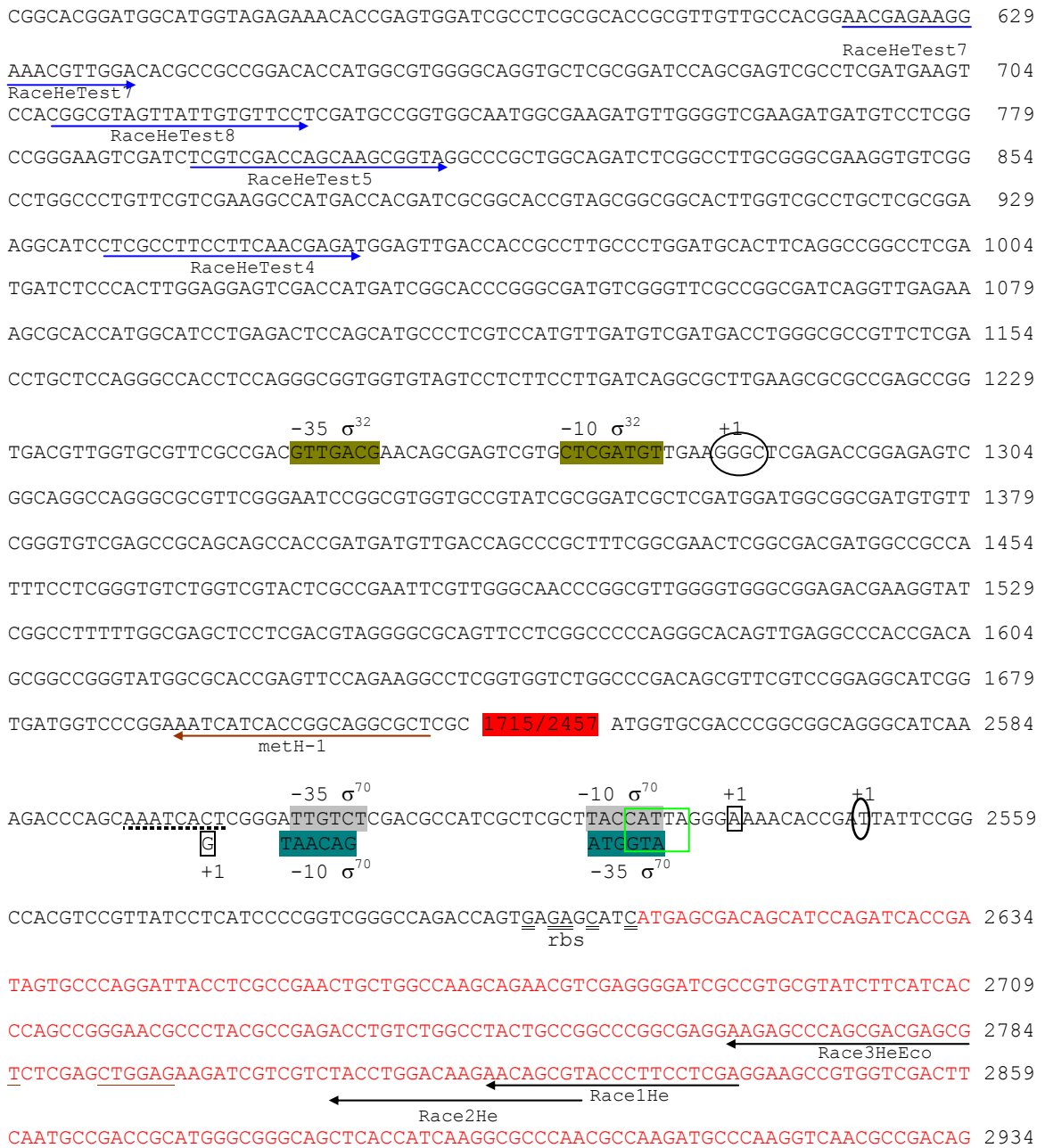


Abb. 33: Identifizierte Promotoren von *yhgI* in *H. elongata* DSM 2581^T

Dargestellt ist der kodierende DNA-Strang aus der *yhgI*-Region von *H. elongata*. Die DNA-Sequenz ist verkürzt abgebildet, die Lücke ist hervorgehoben. Oval eingekreist und mit +1 gekennzeichnet sind die mittels RACE-PCR identifizierte Transkriptionsstartpunkte von *yhgI*. Die zugehörigen Promotorbereiche (-35 und -10 Region) sind farbig hervorgehoben: σ^{32} - und σ^{70} -abhängig. Der mittels Computervorhersage ermittelte Transkriptionsstartpunkt von *yhgI* ist eckig eingerahmt und mit +1 gekennzeichnet dargestellt (Burdziak, 1999). Eingezeichnet ist ebenfalls der mittels Computervorhersagen ermittelte σ^{70} -abhängige Promotor von *methH* und sein vorhergesagter Transkriptionsstartpunkt (+1). Doppelt unterstrichen dargestellt ist die mögliche Ribosomenanbindungsstelle stromaufwärts des Startcodons von *yhgI*. Grün umrahmt ist die Insertionsstelle von Tn1732 in *H. elongata* ABU44. Unterbrochen unterstrichen ist eine AT-reiche Region stromaufwärts des σ^{70} -abhängigen Promotors hervorgehoben, die zu einer möglichen Verstärkung führt. Die Angaben der Sequenzposition am rechten Rand bezieht sich auf die *H. elongata* Sequenz im Anhang der Arbeit. Als schwarze Pfeile sind die für die RACE-PCR eingesetzten Primer eingezeichnet, als blaue Pfeile die wichtigen in der reverse Transkriptase-vermittelte PCR verwendeten Primer.



Abb. 34: Identifizierung eines möglichen zweiten Transkriptionsstartpunktes von *yhgI* aus *H. elongata*

Dargestellt ist die Ableitung eines möglichen zweiten Transkriptionsstartpunktes von *yhgI* aus *H. elongata*. Die genomische DNA-Sequenz (Genom) ist der Sequenz des RACE-PCR-Produktes (HeN2) gegenübergestellt, um die Problematik einer exakten Identifizierung zu verdeutlichen. Die Positionsangaben beziehen sich auf die *H. elongata* DNA-Sequenz im Anhang und in Abbildung 33. „+“ stellt die Übereinstimmung der Sequenz dar, „-“ die Abweichungen und „?“ markiert den unsicheren Bereich. Unklar ist, ob es sich bei den ersten drei Cytosinresten hinter dem Guanin um genomische DNA-Sequenz handelt oder bereits um einen Teil des angehängten „C-Überhanges“. HeTr2 (siehe Abb. 33) stellt den Bereich des möglichen auf dem kodierenden Gegenstrang liegenden Transkriptionsstartpunktes dar. Die dafür in Frage kommenden Basen sind unterstrichen dargestellt (+1).

Der resultierende mögliche zweite Transkriptionsstartpunkt liegt zwischen Position 1285 und 1288 und hat damit einem Abstand von ca. 1,32 kb zum Startcodon von *yhgI* (Pos. 2609). Die vorgelagerte DNA-Sequenz weist Ähnlichkeiten zu σ^{32} -abhängigen Promotoren auf (Abb. 33).

Stromaufwärts des Startcodons von *yhgI* konnte eine mögliche Ribosomenanbindungsstelle durch Sequenzvergleich (CLUSTAL W; (Thompson *et al.*, 1994)) mit dem 3'-Ende der 16S rRNA von *H. elongata* DSM 2581^T (M93355; (Dobson *et al.*, 1993)) identifiziert werden.

9.2.2 Reverse Transkriptase-vermittelte PCR zur Identifizierung längerer Transkripte in *H. elongata*

Weitere RACE-PCR-Produkte als die vorher gezeigten konnten in *H. elongata* nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe der RT-PCR (methH-1 mit den Primern RaceHeTest4/5/7/8, Abb. 33) konnte jedoch gezeigt werden, dass längere Transkripte vorhanden sein müssen. Diese reichen für beide untersuchten Salinitäten mindestens bis Primer RaceHeTest7 (Abb. 35). Weitere Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

9.2.3 Identifizierung möglicher Transkriptionsterminationssignale in *H. elongata*

Stromabwärts des Stoppcodons von *yhgI* lässt sich mit dem Programm DNA-Strider eine palindromische Sequenz identifizieren, die möglicherweise eine Schleifenstruktur ausbildet. Nur wenige Basen entfernt lässt sich eine wenig stark ausgebildete AT-Region identifizieren (Abb. 36). Möglicherweise handelt es sich bei diesen benachbarten Motiven um den Terminationsbereich von *yhgI*, wie er bei einer Rho-Faktor unabhängigen Termination auftritt. Nähere Untersuchungen mit dem „mfold“-Server (Zuker, 2003) ergaben eine freie Enthalpie für diese mögliche Terminationsschleife in Höhe von $\Delta G^0 = -44,4$ kJ/mol (Mathews *et al.*, 1999).

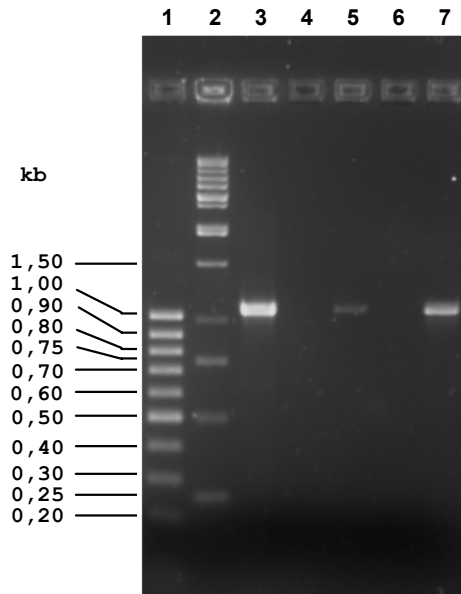


Abb. 35: Reverse Transkriptase-vermittelte PCR auf *H. elongata* cDNA zum Nachweis längerer Transkripte
Abgebildet ist die elektrophoretische Auftrennung der Produkte der reverse Transkriptase-vermittelten PCR auf *H. elongata* cDNA. In den Bahnen **1** bzw. **2** sind 100 bp bzw. 1 kb DNA-Marker aufgetrennt. In den Bahnen **3-7** sind die PCR-Produkte der reverse Transkriptase-vermittelten PCR aufgetrennt: **3**: PCR mit methH-1 & RaceHeTest7 auf cDNA (4 % NaCl); **4**: Negativkontrolle zu 3; **5**: PCR mit methH-1 & RaceHeTest7 auf cDNA (8 % NaCl); **6**: Negativkontrolle zu 5; **7**: PCR mit methH-1 & RaceHeTest7 auf genomischer DNA. Die Negativkontrollen der reverse Transkriptase-vermittelten PCR wurden jeweils mit den Negativkontrollen der cDNA-Synthese angesetzt. Hier wurde in die cDNA-Synthese keine reverse Transkriptase eingesetzt, es daher darf keine cDNA vorhanden sein und auch kein PCR-Produkt entstehen. Der angegebene NaCl-Gehalt bezieht sich jeweils auf die Anzuchtbedingungen von *H. elongata* in MM63-Medium.

...TAAGGAGACACTGATTTATTGCTGCGCTCGACATAAAATCAGCGCTCCTTTAAAGTCTGTGTAA...

Abb. 36: Möglicher Terminationsbereich von *yhgI* aus *H. elongata*

Abgebildet ist die DNA-Sequenz ausgehend des Stoppcodons von *yhgI* (TAA). Einfach unterstrichen dargestellt ist die palindromische Sequenz, doppelt unterstrichen die AT-reiche Region, die bei einer Rho-Faktor unabhängigen Termination auf die palindromische Sequenz folgt. (Parameter für „mfold“: 25 °C, 1 M NaCl, keine bivalenten Ionen)

9.2.4 Sequenzierungen an des Tn1732-Insertionsortes von *H. elongata* ABG31

Es war gezeigt worden, dass Tn1732 in der Transposonmutante *H. elongata* ABG31 (Burdziak, 1999) innerhalb eines *Sal* I-Fragmentes inseriert hatte, das die gleiche Sequenzlänge aufwies, wie das *Sal* I-Fragment des Tn1732-Insertionsortes von *H. elongata* ABU44. Es lag daher nahe, dass die Tn1732-Insertionen benachbart erfolgt waren. Da die RACE-PCR an *H. elongata* unsichere Ergebnisse hervor-gebracht hatte, wurde beschlossen den Tn1732-Insertionsort von *H. elongata* ABG31 zu sequenzieren. Dieser Stamm hatte in den physiologischen Experimenten der Vorarbeiten auch eine Salz-sensitivität gezeigt, jedoch, was das Wachstum auf Mineralsalzplatten anging, ein leicht von ABU44 differierendes Wachstumsverhalten aufgewiesen. Geplant war ein PCR-Produkt mit einem in

Tn1732 und einem in der genomischen DNA lokalisierten Primer zu amplifizieren. Da jedoch die Orientierung des Transposons im Genom unbekannt war, mussten für die Amplifikation unterschiedliche Primer-kombinationen getestet werden. So wurde der Primer Tn1732-A mit den Primern RaceHeTest1 bzw. yhgi-rev kombiniert. Mit der Kombination Tn1732-A / RaceHeTest1 wurde sowohl auf ABG31- als auch auf ABU44-DNA ein ca. 0,75 kb großes PCR-Produkt amplifiziert (1,5 mM MgCl₂, T_a= 59 °C) (Abb. 37).

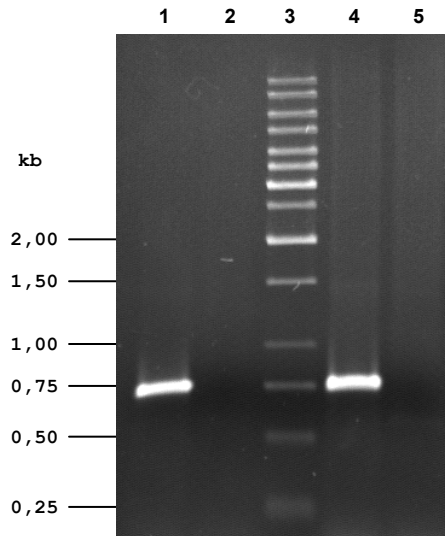


Abb. 37: Lokalisation der Tn1732-Insertion in *H. elongata* ABG31

Abgebildet ist die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus *H. elongata* ABU44 und ABG31: **1**: PCR mit Primern Tn1732/A & RaceHeTest1 (ABG31-DNA); **2**: PCR mit Primern Tn1732/A & yhgi-rev (ABG31-DNA); **3**: 1 kb DNA-Marker; **4**: PCR mit Primern Tn1732/A & RaceHeTest1 (ABU44-DNA); **5**: PCR mit Primern Tn1732/A & RaceHeTest1 (ABU44-DNA). Erkennbar sind zwei gleich große PCR-Produkte (Bahn **1** und **4**; ca. 0,75 kb), die zeigen, dass bei ABU44 und ABG31 die Insertion von Tn1732 im gleichen DNA-Bereich, bei gleicher Orientierung des Transposons erfolgt sein musste.

Die Sequenzierung des gereinigten PCR-Produktes ergab einen Insertionsort, der mit dem von *H. elongata* ABU44 identisch ist (Abb. 38).

```

ATCGCTCGCTTACCATTAGGGGAGCCCGCAGA
... genom. DNA          Tn1732          ...
TAGCGAGCGAATGTAATCCCCCTCGGGCGTCT

```

Abb. 38: Tn1732-Insertionsort in *H. elongata* ABG31

Die Identifizierung des Insertionsorts erfolgte nach (Ubben & Schmitt, 1986; Ubben & Schmitt, 1987) und entsprechend der Analysen von *H. elongata* ABU44 (Burdziak, 1999). Hiernach weisen Tn1721 und seine Derivate (z.B. Tn1732) 5 G an ihrem 5'-gelegenen Sequenzende auf. Im übrigen stimmt die Insertionsstelle (grau unterlegt) exakt mit dem Insertionsort von Tn1732 in *H. elongata* ABU44 überein.

10. Untersuchung der Auswirkungen von salinitätsunabhängigem Stress auf die *yhgl*-Mutanten von *H. elongata* und *E. coli*

Hinweise auf einen Zusammenhang von *yhgl* und zellulärer Kompetenz hatten sich nicht erhärtet (siehe auch Diskussion Abschnitt 6.3). Stattdessen hatten sich sowohl in der Literatur als auch den vorliegenden Ergebnissen (Salzsensitivität, Identifizierung der Promotoren) deutliche Hinweise auf eine Beteiligung von *yhgl* an der Stressanpassung gezeigt. Zelluläre Abläufe sind oft eng miteinander verknüpft, so dass auch die Antworten und Reaktionen auf unterschiedliche Stresseinflüsse durch dieselben Moleküle oder Mechanismen in Gang gesetzt werden könnten. Da sich Hinweise auf Zusammenhänge von *yhgl*/*Yhgl* mit Proteinfaltung ergeben hatten ((Lesley *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2003) siehe Diskussion Abschnitt 5.1), sollten physiologische Bedingungen ausgetestet werden, die Einfluss auf Protein Stabilität und –faltung haben. Dabei boten sich Hitze und erhöhte Harnstoffkonzentration an. Hitze führt zu Denaturierung von Proteinen, Harnstoff diffundiert über die Membran in die Zelle und denaturiert Proteine ebenfalls (siehe Einleitung Abschnitt 3). Beide physiologischen Bedingungen können zum Vorhandensein falschgefalteter und aggregierter Proteine im Cytoplasma führen. Wichtig war es nun, zu erkennen, ob die Deletion von *yhgl* auch einen Einfluss auf die Anpassung an diese beiden Faktoren hat.

10.1 Hitzeabhängiges Wachstum

10.1.1 Untersuchungen zum Hitzestress bei *E. coli*

Das Wachstum von *E. coli* K-12 und BK1 in AB-Medium mit 0,5 % NaCl bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen wurde anhand der Messung der OD₆₀₀ nach 12 h Inkubation verfolgt (Abb. 39).

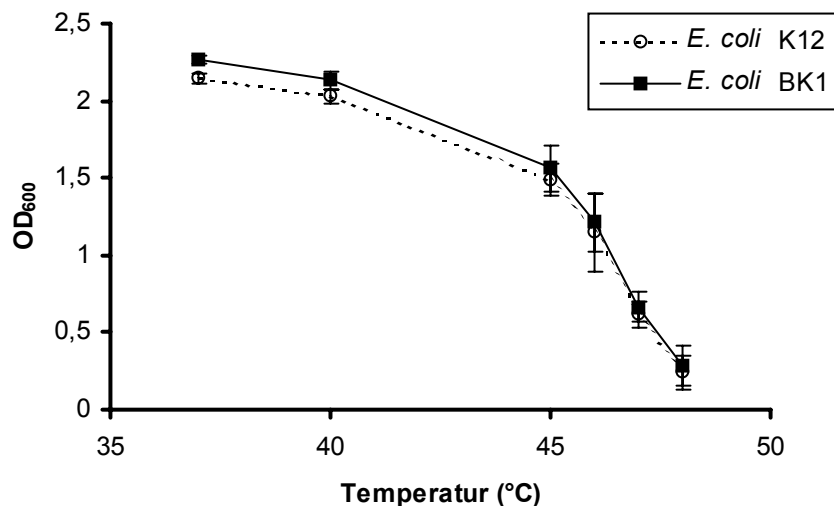


Abb. 39: Hitzeabhängiges Wachstum von *E. coli* in AB-Medium

Dargestellt ist die erreichte optische Dichte (OD₆₀₀) der Kulturen von *E. coli* K-12 und *E. coli* BK1 (Δ *yhgl*) nach 12 h Inkubation bei Temperaturen zwischen 37 °C und 48 °C. Die Anzucht erfolgte in AB-Medium mit 0,5 % NaCl bei 180 upm. Bei den Messpunkten handelt es sich um den Mittelwert aus 6 Werten aus drei unabhängigen Experimenten. Für die Mittelwerte sind die Standardabweichungen eingezeichnet. Zwischen *E. coli* K-12 und *E. coli* BK1 sind keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten erkennbar.

Zur Durchführung wurden mit einer dicht angewachsenen Vorkultur gleichen Mediums die Hauptkulturen (25 ml Kulturvolumen) für die Messung der End-OD₆₀₀ angeimpft. Dabei wurden unterschiedliche OD₆₀₀-Werte der Vorkulturen in höhere oder niedrigere Animpfvolumen umgerechnet. Bei einer OD₆₀₀ = 1,84 wurde die Hauptkultur 1 %ig angeimpft. Die Inkubation der Kolben erfolgte bei 180 upm und 37 °C, 40 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C bzw. 48 °C (Abb. 39).

Zwischen *E. coli* K-12 und BK1 sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Für beide Stämme ist in dem verwendeten AB-Medium zunächst ein nur geringfügiges Abfallen der End-OD₆₀₀ nach 12 h Inkubation zu beobachten, wenn man die Werte bei 37 °C und 40 °C vergleicht. Bei höheren Temperaturen wird der Abfall der End-OD₆₀₀ dann stärker, jedoch ist auch bei 48 °C immer noch messbares Wachstum zu beobachten.

10.1.2 Untersuchungen zum Hitzestress bei *H. elongata*

Auch bei den unterschiedlichen *H. elongata* Stämmen sollte das Wachstumsverhalten in AB-Medium (3 % NaCl) in Abhängigkeit steigender Inkubationstemperaturen verfolgt werden. Hier jedoch wurde die Messung der OD₆₀₀ nach 16 h Inkubation durchgeführt, zudem wurden andere Temperaturen (30 °C, 37,5 °C, 40 °C, 42,5 °C, 45 °C und 47,5 °C) ausgewählt (Abb. 40). Die übrige Durchführung entsprach dem Experiment mit *E. coli*.

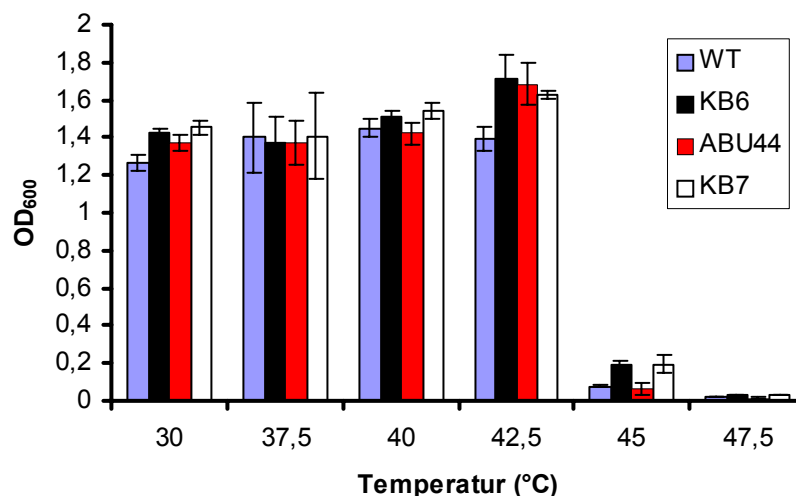


Abb. 40: Hitzeabhängiges Wachstum von *H. elongata* in AB-Medium

Dargestellt ist die erreichte optische Dichte (OD₆₀₀) der Kulturen von *H. elongata* DSM 2581^T (WT), *H. elongata* ABU44 (Tn1732-Mutante), *H. elongata* KB6 ($\Delta yhgI$) und *H. elongata* KB7 nach 16 h Inkubation bei Temperaturen zwischen 30 °C und 47,5 °C. Die Anzucht erfolgte in AB-Medium mit 3 % NaCl (180 upm). Bei den Messpunkten handelt es sich um den Mittelwert aus 6 Werten von drei unabhängigen Experimenten. Für die Mittelwerte sind die Standardabweichungen eingezeichnet. Zwischen den einzelnen *yhgI*-Mutanten von *H. elongata* lassen sich keine signifikanten Wachstumsunterschiede erkennen. Einzig der Wildtyp weist ein geringfügig schlechteres Wachstum bei 42,5 °C auf.

Das Experiment mit den *H. elongata* Stämmen war weniger gut reproduzierbar als das Experiment mit *E. coli*. Es treten größere Schwankungen der Messwerte auf. Eine große Rolle spielte hierbei auch die

Lokalisation des Kulturkolbens im Inkubationsschüttler (Infors), da der Schüttler einen Temperaturgradienten aufweist. Berücksichtigt man die großen Fehlerbalken der Messwerte lässt sich zwischen den *H. elongata* Mutanten kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten ausmachen. Einzig der Wildtyp zeigt ein geringfügig schlechteres Wachstum als die Mutanten.

10.2 Harnstoffabhängiges Wachstum

Da bei den Untersuchungen zur Hitzesensitivität von *H. elongata* und *E. coli* in AB-Medium keine signifikanten Unterschiede zwischen den *yhgI*-Mutanten und den Wildtypstämmen aufgetreten waren (siehe Diskussion Abschnitt 8.1), wurde für die Experimente zur Harnstoffsensitivität Mineralsalzmedium (MM63) verwendet. Ähnliche Experimente zur Harnstoffsensitivität waren auch durch Peddie *et al.* (1999) an *E. coli* und *Staphylococcus aureus* durchgeführt worden.

10.2.1 Untersuchungen zur Harnstoffsensitivität von *E. coli*

Zur Durchführung wurde morgens eine LB-Vorkultur (0,5 % NaCl) von *E. coli* K-12 bzw. BK1 2 %ig in eine MM63-Vorkultur (0,5 % NaCl) überimpft und bei 180 upm und 37 °C für ca. 12 h inkubiert. Anschließend wurde diese entsprechend der obigen Vorgaben in die MM63-Hauptkulturen überimpft. Diese MM63-Kulturen enthielten steigende Harnstoffkonzentrationen (0 M, 0,05 M, 0,2 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M bzw. 0,8 M). Nach 12 h Inkubation bei 180 upm und 37 °C erfolgte die Messung der OD₆₀₀ in der Küvette (Abb. 41).

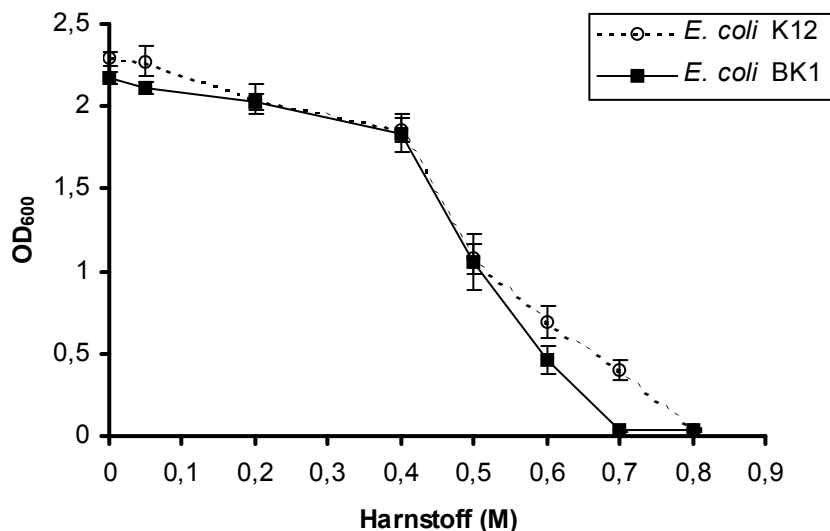


Abb. 41: Harnstoffabhängiges Wachstum von *E. coli* in MM63-Medium

Dargestellt ist die erreichte OD₆₀₀ der Kulturen von *E. coli* K-12 und *E. coli* BK1 der ($\Delta yhgI$) nach 12 h Inkubation mit Harnstoffkonzentrationen zwischen 0 M und 0,8 M. Die Anzucht der Kulturen erfolgte in MM63-Medium mit 0,5 % NaCl bei 37 °C und 180 upm. Bei den Messpunkten handelt es sich um den Mittelwert aus 6 Werten von drei unabhängigen Experimenten. Für die Mittelwerte wurde die Standardabweichung eingezeichnet. Für *E. coli* BK1 zeigt sich im Vergleich zu *E. coli* K-12 eine erhöhte Sensitivität gegenüber steigenden Harnstoffkonzentrationen.

Bei geringerem (0,05 M) bis mittlerem (0,5 M) Harnstoffgehalt des MM63-Medium ist zwischen *E. coli* K-12 und seiner Deletionsmutante *E. coli* BK1 kein Unterschied zu erkennen. Weiter gesteigerte Harnstoffkonzentrationen haben jedoch auf den Wildtyp einen weniger großen Effekt als auf die Mutante. Bei 0,6 M und 0,7 M Harnstoff zeigen sich signifikante Unterschiede in der nach 12 h erreichten OD₆₀₀.

Zur Bestätigung des beobachteten Wachstumseffektes wurde das Experiment auf MM63-Agarplatten (0,5 % NaCl) wiederholt. Hier wurden 0 M, 0,05 M, 0,4 M, 0,6 M, 0,7 M und 0,8 M Harnstoff eingesetzt (Abb. 42).

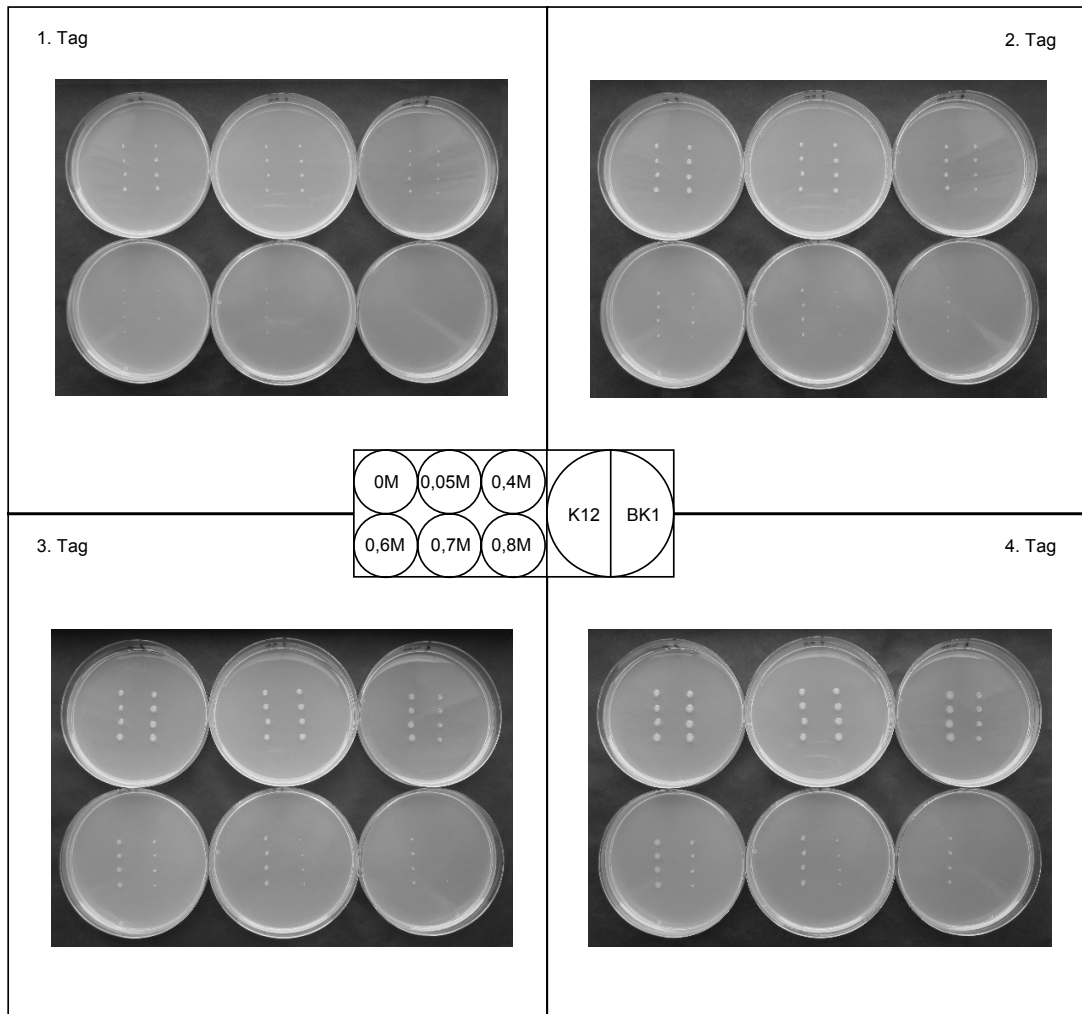


Abb. 42: Wachstum von *E. coli* auf Mineralsalzmedium steigender Harnstoffkonzentration

Dargestellt ist das Wachstum von *E. coli* K-12 und *E. coli* BK1 ($\Delta yhgI$) auf MM63-Agarplatten (0,5 % NaCl) mit steigenden Harnstoffkonzentrationen. In der Mitte der Abbildung ist die Anordnung der Agarplatten unterschiedlicher Harnstoffkonzentration sowie die Reihenfolge, in der die Stämme auf die Platten überpickt wurden, dargestellt. Es wurden 0 M, 0,05 M, 0,2 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M und 0,8 M Harnstoff eingesetzt. Das Wachstum der Stämme wurde über 4 Tage beobachtet und mittels Digitalkamera dokumentiert. Die *yhgI*-Deletion führt zu einem harnstoffsensitiveren Wachstumsverhalten bei *E. coli*, wie aus dem Vergleich des Wachstums von *E. coli* K-12 und BK1 ersichtlich ist. Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Auch beim Wachstum auf MM63-Agarplatten wird das Wachstumsdefizit der *yhgI*-Deletionsmutante *E. coli* BK1 sichtbar. Bis 0,4 M Harnstoff ist ihr Wachstum mit dem des Wildtyps vergleichbar. Darüber

hinaus wächst sie langsamer als *E. coli* K-12 und bei einer Harnstoffkonzentration von 0,8 M gar nicht mehr. Bei 0,8 M Harnstoff waren in Flüssigmedium nach einer Inkubationsdauer von 12 h keine Unterschiede erkennbar gewesen, doch auf Agarplatten zeigt *E. coli* K-12 hier schon nach 2 Tagen geringfügiges Wachstum.

10.2.2. Untersuchungen zur Harnstoffsensitivität von *H. elongata*

Wie schon das Wachstum auf MM63-Agarplatten unterschiedlicher Salinität deutlich gemacht hatte, zeigen die *yhgI*-Deletionsmutanten von *H. elongata* schon bei geringer Salinität (optimaler NaCl-Gehalt liegt laut Severin (1993) bei ca. 3 NaCl) ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Wachstumsratenbestimmungen für KB5 und KB6 hatten bei 2 % und 4 % NaCl in MM63-Medium deutlich geringere Wachstumsraten als für den Wildtyp und ABU44 ergeben. Dementsprechend ergaben Vorversuche für Wachstumsexperimente in MM63-Flüssigmedium (3 % NaCl) steigender Harnstoffkonzentrationen keine aussagekräftigen Ergebnisse. Schon die Vorkulturen ohne zuge-setzten Harnstoff zeigten im Vergleich zum Wildtyp ein verlangsamtes und nicht reproduzierbares Wachstum. Daher wurde beschlossen den Test der *H. elongata* Mutanten auf Harnstoffsensitivität nur auf Agarplatten durchzuführen. Eingesetzt wurden unterschiedliche NaCl-Konzentrationen (1 %, 1,5 %, 2 % und 3 % NaCl) in Kombination mit steigenden Harnstoffkonzentrationen (0 M, 0,05 M, 0,4 M, 0,6 M, 0,7 M und 0,8 M Harnstoff) (Abb. 43).

Das wesentliche Ergebnis dieses Versuches ist eine Erhöhung der Harnstoffverträglichkeit aller Stämme mit steigender NaCl-Konzentration im Mineralsalzmedium. So wachsen alle Stämme bei 1 % NaCl bis zu einem Harnstoffgehalt von 0,05 M. Bei 0,4 M Harnstoff zeigen die Stämme nur noch begrenztes Wachstum. Dieses ist bei KB6 am schwächsten und beim Wildtyp am stärksten ausgeprägt. Bei 1,5 % NaCl wird von allen Stämmen ein Harnstoffgehalt von 0,4 M toleriert. Darüber hinaus ist wiederum nur sehr begrenztes Wachstum zu beobachten. Bei weiter erhöhter Mediensalinität (2 % NaCl) wird von allen Stämmen ein Harnstoffgehalt von mindestens 0,6 M verkraftet und bei einer Salinität von 3 % NaCl wachsen allen Stämmen sogar noch mit 0,8 M Harnstoff im Medium.

Bei genauerer Beobachtung des Plattenwachstums zeigt sich, dass die *yhgI*-Mutante KB6 unabhängig von Harnstoffkonzentrationen und Mediensalinität jeweils geringfügig kleinere Kolonien aufweist. Dies stimmt mit den Untersuchungen zur Salzsensitivität überein.

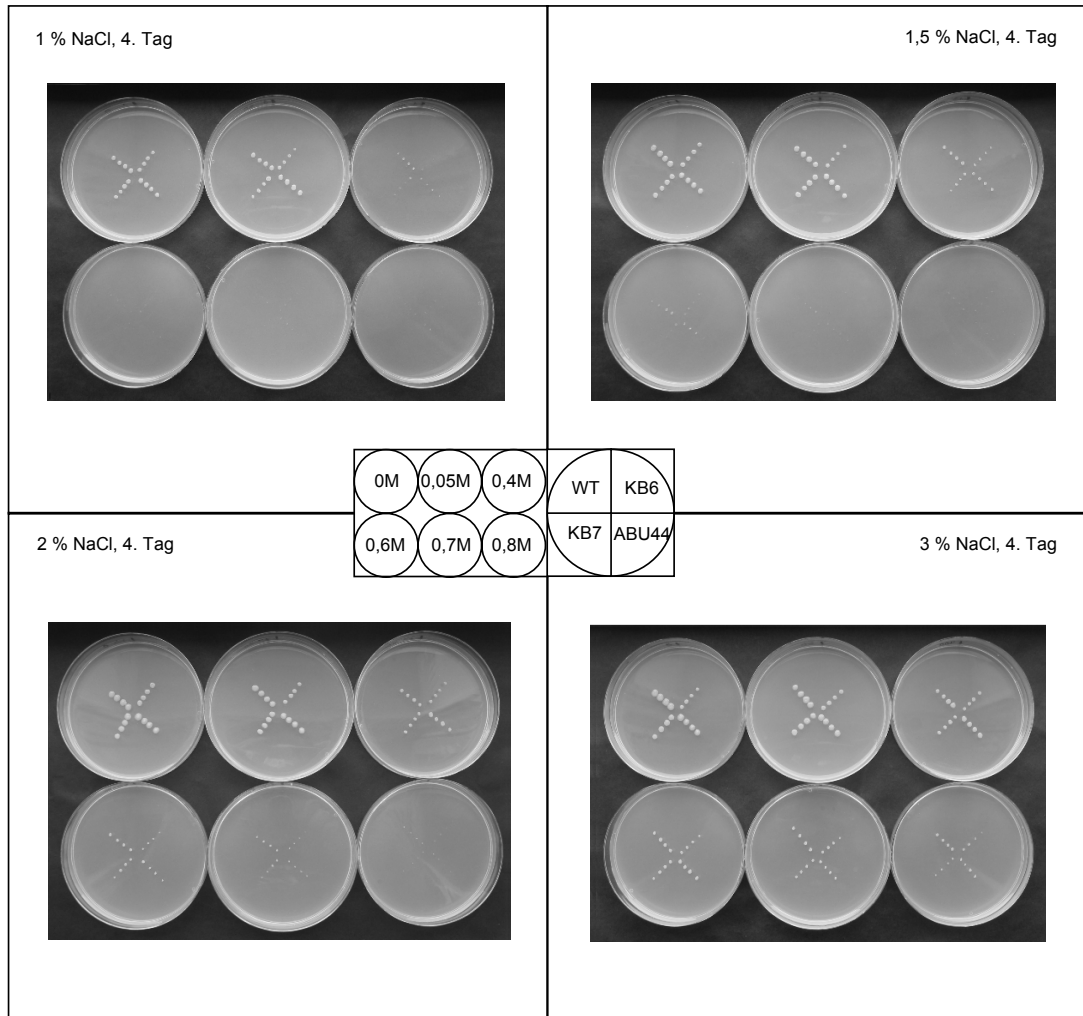


Abb. 43: Harnstoffabhängiges Wachstum von *H. elongata* auf Mineralsalzmedium

Dargestellt ist das Wachstum von *H. elongata* DSM 2581^T (WT), *H. elongata* ABU44 (Tn1732-Mutante), *H. elongata* KB6 ($\Delta yhgI$) und *H. elongata* KB7 ($\Delta yhgI::yhgI_{EC}$) auf MM63-Agarplatten unterschiedlicher Salinität (1 %, 1,5 %, 2 % und 3 % NaCl) und steigender Harnstoffkonzentration (0 M, 0,05 M, 0,4 M, 0,6 M, 0,7 M und 0,8 M) nach jeweils 4 Tagen. In der Mitte der Abbildung ist die Anordnung der Agarplatten unterschiedlicher Harnstoffkonzentration sowie die Reihenfolge in der Stämme auf die Platten überpickt wurden dargestellt. Mit steigender NaCl-Konzentration tolerieren alle *H. elongata* Stämme höhere Harnstoffkonzentrationen. Eine Harnstoffsensitivität der *yhgI*-Mutanten von *H. elongata* ist nicht erkennbar. Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

11. Charakterisierung und Reinigung von YhgI aus *H. elongata*

In computergestützten Analysen der Sequenz von YhgI aus *H. elongata* und anderen Organismen hatten sich Hinweise auf die Funktion eines Thioredoxins ergeben. Diese und andere hypothetische Funktionen und Merkmale sollte mittels proteinbiochemischer Analysen anhand von YhgI aus *H. elongata* überprüft werden.

11.1 Computergestützte Analyse von Yhgl aus *H. elongata* und ähnlicher Sequenzen

Zunächst wurde die Aminosäuresequenz von Yhgl aus *H. elongata* und ähnliche Sequenzen anderer Organismen auf ihre Charakteristika hin untersucht. Merkmale sind die Zahl der Aminosäuren und das resultierende theoretische Molekulargewicht, der aus der Primärsequenz vorhergesagte isoelektrische Punkt und die Zahl der identischen bzw. ähnlichen Aminosäuren im Vergleich zum *H. elongata* Protein (Tab. 18). Durchgeführt wurde diese Charakterisierung mit dem Programm „ProtParam“ der ExPASy-Homepage.

	Zahl der As	pI	iden./ähnl. (%)	MW (Da)	NCBI Acc.-Nr. / Referenz
<i>Halomonas elongata</i>	196	4,44	100/100	21511,26	(Burdziak, 1999)
<i>Pseudomonas putida</i>	194	4,49	63/77	20955,57	AE016783
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	194	4,47	62/77	21135,93	AE004611
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	194	4,5	62/77	21007,6	NZ_AAAT02000015
<i>Pseudomonas syringae</i>	197	4,51	62/76	21472,12	NZ_AABP02000010
<i>Azotobacter vinelandii</i>	194	4,6	61/77	21134,87	NZ_AAAU02000002
<i>Microbulbifer degradans</i>	203	4,82	59/74	22248,03	ZP_00065247
<i>Shewanella oneidensis</i>	192	4,41	50/67	20516,09	AAN57579
<i>Yersinia pestis</i>	191	4,59	49/70	21003,77	AJ414141
<i>Photorhabdus luminescens</i>	191	4,48	49/69	20910,5	CAE12493
<i>Escherichia coli</i>	191	4,52	48/69	20997,7	U18997
<i>Shigella flexneri</i>	191	4,52	48/69	20997,7	AAN44898
<i>Salmonella typhimurium</i>	191	4,52	48/68	20937,59	AAL22373
<i>Salmonella enterica</i>	191	4,63	48/68	20936,65	CAD08103
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	194	4,39	47/68	20949,41	BAC58409
<i>Vibrio cholerae</i>	195	4,56	46/68	21106,6	AE004338
<i>Vibrio vulnificus</i>	207	4,56	45/67	22511,27	AAO09367
<i>Pasteurella multocida</i>	194	4,53	46/66	21379,08	AAK03641
<i>Haemophilus influenzae</i>	198	4,54	46/65	21906,59	U32726
<i>Haemophilus somnus</i>	193	4,69	43/65	21369,04	ZP_00122960
<i>Haemophilus ducreyi</i>	199	4,61	42/66	22075,83	AAP95348
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	199	4,44	44/67	22249,8	ZP_00134699
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	191	4,48	41/61	21004,6	AAK51354
<i>Xylella fastidiosa Ann-1</i>	199	4,89	37/59	21331,2	ZP_00040519
<i>Xylella fastidiosa Dixon</i>	199	4,89	37/59	21331,2	ZP_00039557
<i>Xylella fastidiosa Temecula</i>	199	4,88	37/59	21317,18	AAO29808
<i>Xylella fastidiosa 9a5c</i>	176	4,77	37/57	18799,25	AE004067
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	199	4,83	37/57	21171,91	NC_003919
<i>Xanthomonas campestris</i>	199	4,83	37/56	21169,98	AAM41368
<i>Buchnera aphidicola</i> (str. Sg)	192	6,7	36/57	21665,65	AAM68067
<i>Buchnera aphidicola</i> (str. Bp)	191	9,25	35/54	21872,21	AAO27191
<i>Buchnera aphidicola</i> (str. APS)	192	6,59	34/56	21438,52	AP001119
<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	207	9,73	35/63	24697,41	AB063522
<i>Blochmannia floridianus</i>	205	9,34	35/59	23198,68	NC_005061

Tab. 18: Eigenschaften von Yhgl aus *H. elongata* und ähnlicher Proteinsequenzen

In der ersten Spalte ist der Organismus, in dem das Protein homolog identifiziert wurde, angegeben. In der letzten Spalte sind die „Accession“-Nummern der betreffenden Proteine für die NCBI-Homepage aufgeführt. Viele dieser Sequenzen tragen entweder die Bezeichnung Yhgl oder andere computergenerierte Bezeichnungen. Als Eigenschaften sind die Sequenzlänge (Zahl der Aminosäuren, As), der theoretische isoelektrische Punkt (pI), die prozentualen Identitäten bzw. Ähnlichkeiten (ident./ähn.) im Vergleich zum *H. elongata* Protein und das errechnete Molekulargewicht angegeben.

Auffällig sind die überwiegend im sauren pH-Bereich liegenden isoelektrischen Punkte der Yhgl-ähnlichen Proteine. Ausnahmen sind dabei die deutlich abweichenden pI-Werte bei den Proteinen der *Buchnera*, *Wigglesworthia* und *Blochmannia* Stämme. Diese Proteine sind durchgehend basischer.

Wichtig für eine weitere Charakterisierung eines Proteins ist seine subzelluläre Lokalisation. Diese spielt vor allem bei einer Aufreinigung des Proteins nach einer heterologen Expression eine wichtige

Rolle. Für die heterologe Expression muss entschieden werden, ob das Protein im Cytoplasma exprimiert und dann exportiert wird oder im Cytoplasma verbleibt. Periplasmatische Proteine können bei einer zu starken cytoplasmatischen Expression aufgrund eines zu langsamen Exports zur Bildung von „inclusion-bodies“ führen.

Eine Analyse der Yhgl-Sequenz von *H. elongata* mit dem DAS-Server (Cserzo *et al.*, 1997) auf das Vorhandensein möglicher Transmembranhelices ergab keine derartigen hydrophoben Sequenzbereiche. Bestätigt wurde dies auch durch die Hydrophatit-Untersuchungen nach (Kyte & Doolittle, 1982). Auch hier waren keine signifikant hydrophoben Segmente erkennbar (Abb. 44).

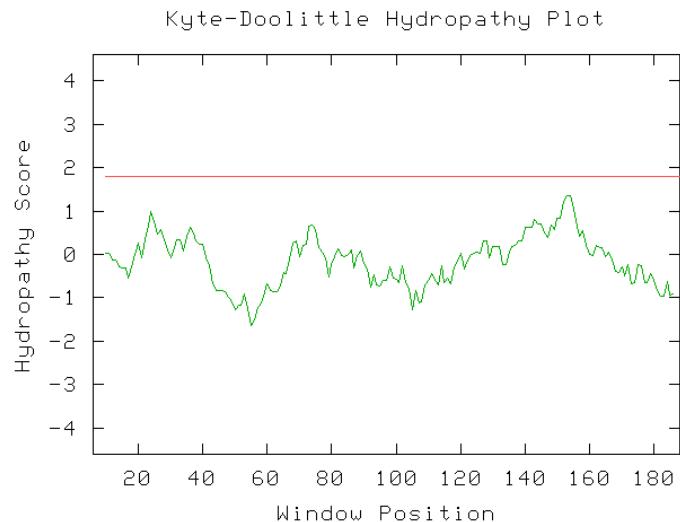


Abb. 44: Hydrophatit-Plot von Yhgl aus *H. elongata*

Dargestellt ist ein Hydrophatit-Plot von Yhgl aus *H. elongata* nach Kyte & Doolittle (1982). Für den Plot wurde ein Fenster von 19 Aminosäureresten eingestellt. Würden hier Sequenzbereiche mit einem Hydrophatit-Wert von über 1,8 auftreten, wäre von einer Transmembranhelix auszugehen. Derartige Bereiche sind jedoch nicht vorhanden.

Eine Psort-B-Recherche (Gardy *et al.*, 2003) ergab als wahrscheinlichen zellulären Lokalisationspunkt des Proteins das Cytoplasma an:

Localization Scores:	
Cytoplasmic	7.31
Periplasmic	0.98
InnerMembrane	0.67
OuterMembrane	0.54
Extracellular	0.51

Weitere Untersuchungen mit dem PROSITE-Server (Bairoch *et al.*, 1997; Falquet *et al.*, 2002) ergaben keine bekannten Motive. Das Protein von *Yersinia pestis* ist auf der Homepage des Sanger Instituts (www.sanger.ac.uk/Projects/Y_pestis/CDS/YPO0127.shtml) als prokaryontisches Lipoprotein (PROSITE Pattern: PS00013) annotiert. Diese Annotierung konnte im Jahr 2000 auch mit dem *H. elongata* Protein nachvollzogen werden, mittlerweile jedoch nicht mehr. Der LipoP-Server (Juncker *et al.*, 2003) ist auf die Identifizierung von Lipoproteinen und Signalpeptiden Gram-negativer Bakterien spezialisiert. Aber auch hier konnten in der Aminosäuresequenz von *H. elongata* und anderen Stämmen keine Signalpeptide nachgewiesen werden, so dass nicht von einem Proteinexport und einer periplasmatischen Lokalisation auszugehen war. Alle sequenzähnlichen Proteine wurden als

einfache cytoplasmatische Proteine klassifiziert. Eine Differenzierung von cytoplasmatischen, membran-assoziierten Proteinen erfolgt nicht.

11.2 Herstellung eines *E. coli* BL21 (DE3) Klonen zur Expression von *yhgI* aus *H. elongata*

Als Expressionssystem, mit dem *yhgI* von *H. elongata* exprimiert werden sollte, wurde der Vektor pET22b(+) mit *E. coli* BL21(DE3) als Expressionsstamm ausgewählt. Nach den computergestützten Recherchen war von einer cytoplasmatischen Lokalisation auszugehen, unabhängig davon, ob eine Kopplung an die Membran erfolgt oder nicht. Daher wurde eine cytoplasmatische Expression ohne einen Export in das Periplasma geplant. Entsprechend wurden für die Amplifikation von *yhgI* aus *H. elongata* die Primer *yhgi-upNdeI* und *yhgi-downNotI* abgeleitet. Diese sind mit *Nde I* bzw. *Not I*-Schnittstellen versehen. Sie sind so gewählt, dass *yhgI* nach einer Integration in den Vektor im gleichen Leseraster wie die (His)₆-tag kodierende Sequenz exprimiert wird. Dazu musste, durch geeignete Wahl des Primers *yhgi-downNotI*, das Stoppcodon von *yhgI* entfernt werden. Gleichzeitig wurde durch die *Nde I* - *Not I*-Doppelhydrolyse des Vektors die für das *peIB*-Leaderpeptid kodierende Sequenz, die zu einem Sec-abhängigen Export des synthetisierten Proteins in das Periplasma geführt hätte, entfernt. Zwischen (His)₆-tag und YhgI werden 5 weitere Aminosäuren exprimiert, so dass YhgI-(His)₆ über eine um 11 Aminosäuren verlängerte Sequenz verfügt. Die Funktionalität des Proteins jedoch war durch die Komplementierungsexperimente mit *E. coli* BK1 bestätigt worden (siehe Ergebnisse Abschnitt 6).

Nach der Amplifikation von *yhgI* aus *H. elongata* und dem anschließenden Restriktionsverdau wurde das PCR-Produkt in pET22b(+) inseriert (Abb. 45) und in *E. coli* DH5 α transformiert. Nach der Identifizierung des gesuchten Klonen wurde das Plasmid pETY5 in superkompetente Zellen von *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und das inserierte PCR-Produkt sequenziert, um die Expression und Aufreinigung eines fehlerhaften Proteins zu verhindern.

11.3 Vorversuche zur Expression von YhgI-(His)₆

Zu Beginn der Expressionsexperimente musste zunächst festgestellt werden, welche IPTG-Konzentration für die Expression am geeignetsten ist. Dazu wurden 280 ml LB-Medium (0,5 % NaCl, Carb100) mit 8 ml einer über Nacht angewachsenen Kultur von *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 (LB-0,5, Carb 100) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = ca. 0,7 angezogen (180 upm, 37 °C). Dann wurden 10 x 25 ml der Kultur in neue Nasenkolben überführt und für die Induktion der Expression steigenden Konzentrationen IPTG (0 mM, 0,025 mM, 0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) zugegeben. Jede Induktion wurde als Doppelwert durchgeführt. Die Zunahme der OD₆₀₀ wurde unverdünnt mit dem Photometer verfolgt (Abb. 46).

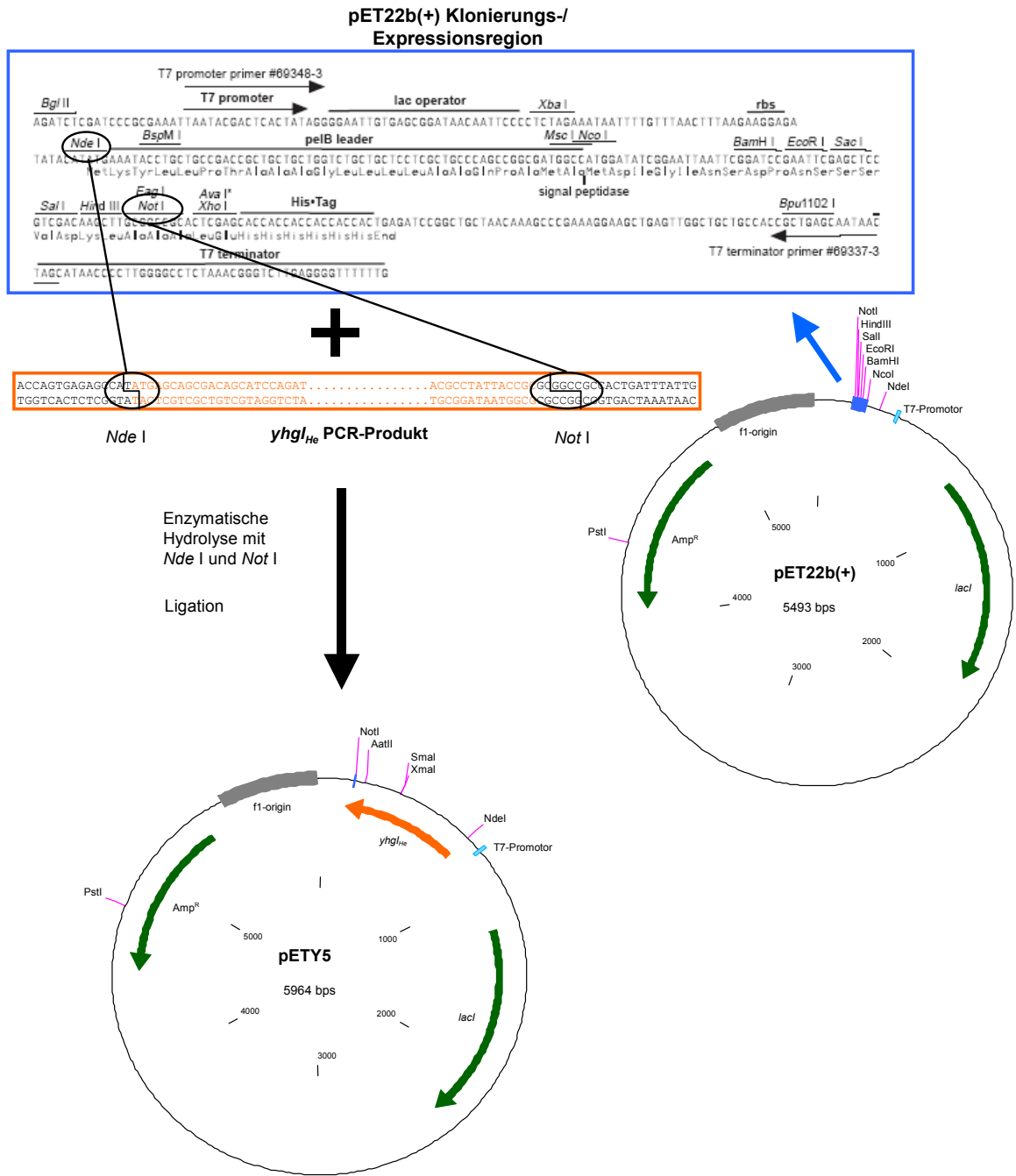


Abb. 45: Klonierungsstrategie zur Herstellung des Expressionskonstruktes pETY5

Dargestellt ist die Klonierungsstrategie zur Herstellung des Vektorkonstruktes (pETY5) für die heterologen Expression von YhgI-(His)₆. Abgebildet ist der nicht rekombinante Vektor pET22b(+) mit seiner Klonierungs/Expressions-Region (blau umrahmt). Ebenfalls abgebildet ist das PCR-Produkt von *yhgI* aus *H. elongata* mit seinen endständigen DNA-Sequenzen, welche die verwendeten Primersequenzen enthalten. Hervorgehoben sind die für die Insertion herangezogenen Restriktionsschnittstellen (*Nde* I & *Not* I).

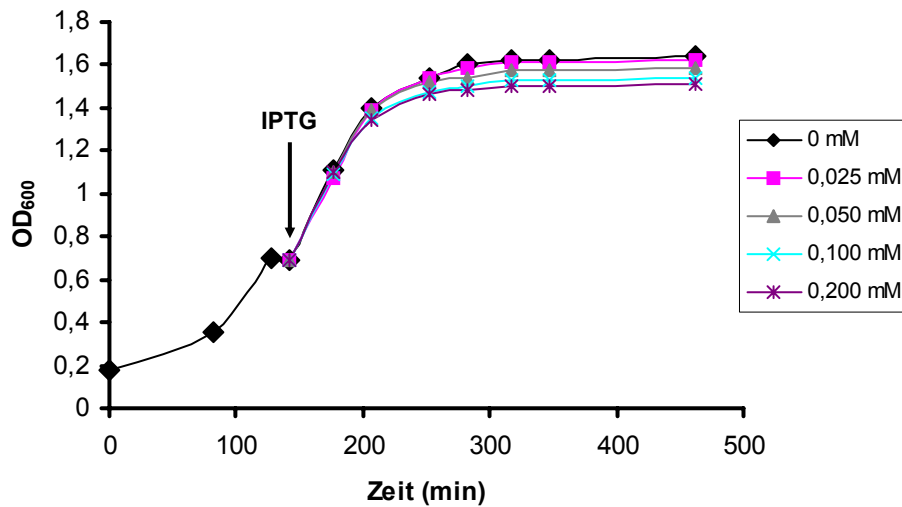


Abb. 46: Induktion von *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 zur Identifizierung einer geeigneten IPTG-Konzentration
 Aufgetragen ist das Wachstum einer uninduzierten Kultur von *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 (0 mM) im Vergleich zu unterschiedlich stark induzierten Kulturen von *E. coli* BL21 (DE3) pETY5. Die Konzentrationsangaben beziehen sich jeweils auf die zur Induktion verwendete IPTG-Konzentration im Medium. Der Zeitpunkt der Induktion ist durch einen Pfeil markiert. Die aufgetragenen Messpunkte sind Mittelwerte aus Doppelwerten eines Experiments.

Es wird deutlich, dass die Kultur ohne IPTG am besten wächst. Die Unterschiede im Vergleich zu den IPTG-induzierten Kulturen sind jedoch nur sehr geringfügig. Auch bei einer Induktion mit 0,2 mM IPTG kann nicht von einem Einbruch des Wachstums gesprochen werden. In mikroskopischen Untersuchungen konnten keine stark lichtbrechenden „inclusion-bodies“ beobachtet werden. Genauso waren in der Zellmorphologie keine Auffälligkeiten erkennbar.

Für die spätere Expression wurde eine IPTG-Konzentration von 0,1 mM ausgewählt, weil hier von einer ausreichend hohen Expression bei sehr gutem Wachstum auszugehen war. In Abänderung zu dieser Durchführung wurde mit der IPTG-Induktion sofort nach der Verdünnung der Vorkultur begonnen, da nach dem Wachstumsverlauf aller Kulturen nicht mit größeren Beeinträchtigungen des Wachstums gerechnet wurde.

11.4 Erste Fraktionierung des Zellmaterials zur Überprüfung einer Expression von Yhgl-(His)₆

Um zu überprüfen, ob sich bei einer Induktion mit 0,1 mM IPTG der Hauptteil des exprimierten Yhgl-(His)₆ in der löslichen Zellfraktion befindet, wurde eine Fraktionierung des Zellmaterials durchgeführt. Dabei wurden *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+) und *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 über Nacht in 500 ml LB-Medium (0,5 % NaCl, Carb100) angezogen (150 upm, 37 °C). Am nächsten Morgen wurden die Kulturen mit gleichem Medium auf eine OD₆₀₀ = 0,3 verdünnt (0,5 l Kulturvolumen). Mit *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 wurden zwei Kolben angezogen, einmal IPTG-induziert (0,1 mM), einmal uninduziert. Alle drei Kulturen wurden bei 150 upm und 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ = 1,2 (verdünnt in Küvette gemessen) erfolgte die Zellernte mittels Zentrifugation. Nach dem Waschen der

Zellen wurden diese in 10 ml Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,2) aufgenommen und in einer „French-Press“ aufgeschlossen. Anschließend wurde das Zellysate in unlösliche Fraktion (SS34-Pellet mit Zelltrümmern), lösliche Fraktion (lösliche Zellbestandteile) und Membranfraktion aufgeteilt. Nach der Quantifizierung des in den einzelner Fraktionen enthaltenen Proteingehaltes wurden ca. 20 µg Protein jeder Fraktion in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 47).

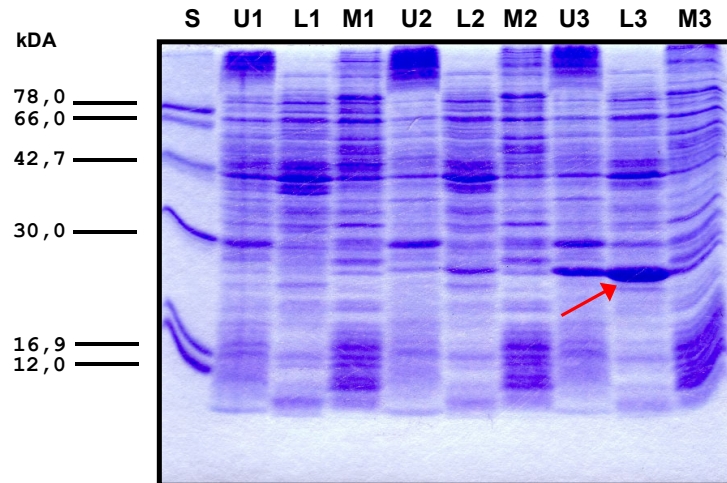


Abb. 47: SDS-PAGE der Zellfraktionen von *E. coli* BL21 (DE3) zur Bestimmung der Lokalisation des exprimierten Yhgl-(His)₆

E. coli BL21 (DE3) pETY5 wurde in LB-Medium (0,5 % NaCl, Carb100) angezogen und die *yhgl*-Expression durch die Zugabe von IPTG (0,1 mM finale Konzentration) induziert. Als Kontrollen wurde *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 (uninduziert) und *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+) (uninduziert) angezogen: **S:** Protein-Marker; **U1:** unlösliche Fraktion *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+); **L1:** lösliche Fraktion *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+); **M1:** Membranfraktion *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+); **U2:** unlösliche Fraktion *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 (uninduziert); **L2:** lösliche Fraktion *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 (uninduziert); **M2:** Membranfraktion *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 (uninduziert); **U3:** unlösliche Fraktion *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 induziert (0,1 mM IPTG); **L3:** lösliche Fraktion *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 (0,1 mM IPTG); **M3:** Membranfraktion *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 (0,1 mM IPTG). Der rote Pfeil deutet auf die starke Proteinbande in der löslichen Fraktion des induzierten *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 hin, bei der es sich um das überexprimierte Yhgl-(His)₆ handelt.

Ein Vergleich der einzelner Fraktionen, Stämme sowie Anzuchtbedingungen lässt erkennen, dass in der löslichen Fraktion der induzierten Kultur eine sehr starke Proteinbande zu erkennen ist, die in der nicht-induzierten Kultur nur sehr schwach vertreten ist. *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+) zeigt keine auffällige Proteinbande in diesem Bereich. Auch in der unlöslichen Fraktion des induzierten Stammes ist eine Bande erkennbar, die von einer nur unvollständigen Zellyse herrührt. „Inclusion-bodies“ waren in einer mikroskopischen Überprüfung der Kultur nicht feststellbar gewesen. Auch hier ist bei dem nicht induzierten Stamm eine nur sehr schwache Proteinbande erkennbar. Es wurde deutlich, dass der Grossteil des exprimierten Proteins in der löslichen Fraktion lokalisiert und daher für eine Aufreinigung geeignet war.

11.5 Expression von Yhgl-(His)₆ für eine Aufreinigung

Für eine spätere Aufreinigung von Yhgl-(His)₆ musste eine ausreichend große Menge Protein bereitgestellt werden. Das Kulturvolumen für diese Anzucht des Expressionsstammes wurde daher auf 1 Liter (im 2 l Erlenmeyerkolben ohne Schikane) angehoben. Zur Durchführung wurde eine über Nacht angewachsene Vorkultur (0,5 l LB-0,5; Carb100; 150 upm, 37 °C) mit frischem Medium auf eine OD₆₀₀ = 0,3 (2 - 4 x 1 l Kulturvolumen) verdünnt. Die Kulturen wurde sofort mit 0,1 mM IPTG induziert und bis zu einer OD₆₀₀ = 1,2 (Küvette) angezogen. Schließlich wurden die Kulturen mittels Zentrifuge abge-erntet und das Zellpellet gewaschen. Dieses wurde nun über Nacht möglichst trocken auf Eis gelagert oder sofort aufgearbeitet. Die Lagerung auf Eis erfolgte nur dann, wenn eine Aufarbeitung der Protein-fractionen ohne Einfrierschritte geplant war. Für die weitere Aufarbeitung wurde das Pellet von 2 Liter Kultur jeweils in 20 ml 1 x Bindungspuffer aufgenommen und die Zellen in einer „French-Press“ aufgeschossen. Das Zelllysate wurde anschließend mittels Zentrifugation fraktioniert. Die lösliche Fraktion wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70 °C gelagert. War eine Aufreinigung ohne Einfrierschritte geplant, wurde die lösliche Fraktion sofort in die Nickelchelate-Chromatographie eingesetzt.

Ein Teilvolumen (20 – 25 µg Protein) der löslichen Fraktion wurde jeweils in einer SDS-PAGE aufgetrennt, um den jeweiligen Erfolg der Expression und Fraktionierung zu überprüfen (Abb. 48).

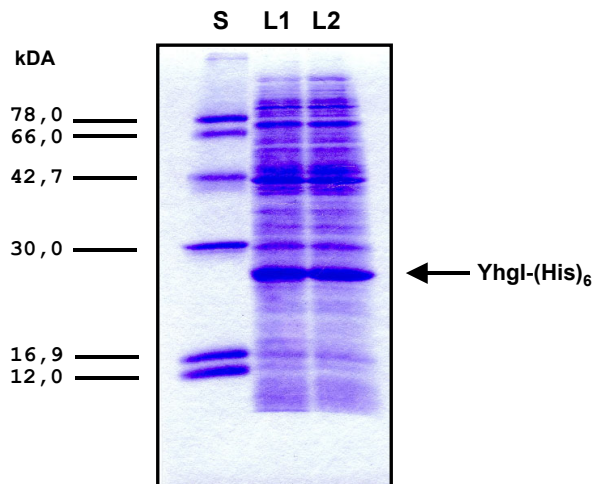


Abb. 48: SDS-PAGE zur Kontrolle der löslichen Fraktion

S: Protein-Marker; **L1** und **L2:** lösliche Fraktionen zweier Kulturen von *E. coli* BL21 (DE3) pETY5, induziert mit 0,1 mM IPTG. Die Proteinbande von Yhgl-(His)₆ ist durch einen Pfeil hervorgehoben.

11.6 Aufreinigung von Yhgl-(His)₆ mittels Nickelchelate-Chromatographie

Für die Aufreinigung eines (His)₆-tag-Fusionsproteins ist ein Standardprotokoll vom Hersteller Säulenmatrix (Novagen) vorgegeben. Dieses musste jedoch durch Variation der Imidazolkonzentration im Waschpuffer optimiert werden. Im ersten Reinigungsexperiment wurde nach der Äquilibrierung der Säulenmatrix ein Teilvolumen (10 ml = ca. 160 mg Protein) der löslichen Zellfraktion auf die Säule gegeben. Der für die Reinigung verwendete Waschpuffer enthielt 60 mM Imidazol und die Elution des

säulengebundenen Proteins erfolgte mit Elutionspuffer, der 1 M Imidazol enthielt. Eine Überprüfung des Reinigungserfolges in einer SDS-PAGE zeigte, dass durch einen Waschpuffer, der 60 mM Imidazol enthält, schon ein Großteil von Yhgl-(His)₆ neben starken Proteinverunreinigungen von der Säule eluiert wird. Im Probendurchlauf und Bindepufferdurchlauf war keine derartige Proteinbande erkennbar. Es war schien daher sinnvoll, die Säulematrix mit mehr Protein zu beladen (Volumen der löslichen Fraktion erhöhen), um die unspezifische Anbindung von Proteinverunreinigungen an die Säulenmatrix zu verringern. Gleichzeitig musste die Imidazolkonzentration des Waschpuffers variiert werden, um diejenige Konzentration zu bestimmen, bei der Verunreinigungen jedoch nicht Yhgl-(His)₆ von der Säule gewaschen wird.

Bei den nächsten Reinigungsexperimenten wurde nach der Äquilibration der Nickel-NTA-Säule 15 ml der löslichen Zellfraktion (ca. 210 mg Protein) auf die Säule gegeben. Dann wurde die Säule mit 1 x Bindepuffer und anschließend jeweils mit 15 ml von Waschpuffern unterschiedlicher Imidazolkonzentrationen (30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM und 80 mM) gewaschen. Schließend wurden 15 ml Elutionspuffer (1 M Imidazol) und 10 ml Entladepuffer aufgetragen. Die Analyse der Durchlauf-fractionen in einer SDS-PAGE ergab, dass erneut keine vollständige Absättigung der Säulenmatrix erfolgt war, denn im Probendurchlauf war wiederum keine Proteinbande von Yhgl-(His)₆ erkennbar. Auch schon bei 30 mM Imidazol wurde ein Teil von Yhgl-(His)₆ von der Säule gewaschen, auch war der Reinigungserfolg der aufsteigenden Imidazolkonzentrationen in den Waschpuffern deutlich besser als bei der Verwendung nur einer Imidazolkonzentration. Zurück blieben Verunreinigungen im hoch-molekularen Bereich.

Bei den weiteren Aufreinigungen wurde noch größere Mengen Protein aufgetragen (ca. 280 mg). Zudem wurden die Waschschrte weiter variiert. So wurde nach dem Waschschrte mit 25 ml 1 x Bindepuffer ein Waschschrte mit 25 ml Waschpuffer (50 mM Imidazol) durchgeführt, der in zwei Teilvolumen (10 ml und 15 ml) unterteilt wurde. Anschließend folgten Waschschrte mit je 15 ml Volumen (60 mM und 70 mM Imidazol) und schließlich ein Waschschrte mit 25 ml Waschpuffer (80 mM Imidazol), der in ein 15 ml und ein 10 ml Teilvolumen unterteilt wurde. Zuletzt wurde restliches auf der Säule gebundenes Protein mit Elutionspuffer (1 M Imidazol) von der Säule gespült. Die Analyse von 2 µl Fraktionsvolumen von Proben- und Bindepufferdurchlauf sowie 10 µl Fraktionsvolumen der Waschpuffer- und Elutionspufferdurchläufe in SDS-PAGE ergab einen guten Reinigungserfolg (Abb. 49).

Nach der Coomassie-Färbung ließen sich in der SDS-PAGE keine Proteinverunreinigungen in den Waschraktionen ab 70 mM Imidazol mehr erkennen. Außerdem ist im Probendurchlauf und Bindepufferdurchlauf eine Yhgl-(His)₆-Proteinbande erkennbar, die auf eine vollständige Absättigung der Säulenmatrix hindeutet. Diese Variante der Aufreinigung wurde sowohl mit schockgefrorener löslicher Fraktion als auch mit nicht eingefrorener löslicher Fraktion mit gleichem Reinigungserfolg durchgeführt. Der Ablauf wurde daher für alle folgenden Aufreinigungen von Yhgl-(His)₆ angewendet. Im Falle der schockgefrorenen löslichen Fraktion wurden die einzelnen Waschraktionen erneut mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Im anderen Fall wurde das Protein sofort der weiteren Verwendung zugeführt.

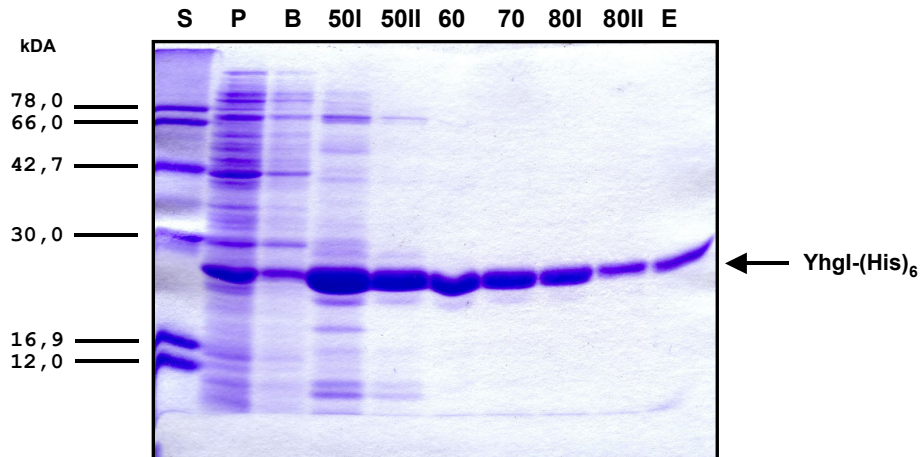


Abb. 49: SDS-PAGE zur Überprüfung der Nickelchelate-Chromatographie

S: Protein-Marker; **P:** Probendurchlauf; **B:** Bindepufferdurchlauf; **50I:** Waschpufferdurchlauf (50 mM Imidazol, Fraktion 1); **50II:** Waschpuffer (50 mM Imidazol, Fraktion 2); **60:** Waschpuffer (60 mM Imidazol); **70:** Waschpuffer (70 mM Imidazol); **80I:** Waschpuffer (80 mM Imidazol, Fraktion 1); **80II:** Waschpuffer (80 mM Imidazol, Fraktion 2); **E:** Elutionspufferdurchlauf. In den Waschfraktionen ab 70 mM Imidazol lässt sich der gute Reinigungserfolg erkennen.

11.7 Aktivitätstests und Charakterisierung des gereinigten Proteins

11.7.1 Pufferwechsel und Konzentrierung von Yhgl-(His)₆

Nach der Reinigung des Proteins musste für die geplanten physiologischen Untersuchungen das Protein in dem gewünschten Reaktionspuffer (Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,0) aufgenommen werden. Dazu wurde die gewünschte Waschfraktion auf eine Vivaspin-Säule (20 ml, 10000 MWCO) aufgetragen und bei 3956 x g und 10 °C für ca. 30 min zentrifugiert, so dass ein minimales Restvolumen (ca. 0,5 ml) erreicht wurde. Anschließend wurden 10 ml Reaktionspuffer aufgetragen und die Säule erneut bis zum Erreichen des minimalen Restvolumens zentrifugiert (ca. 25 min). Zwei weitere Male wurde 10 ml Puffer aufgetragen und zentrifugiert. Nach dem letzten Schritt wurde das Restvolumen in der Säule auf ca. 1,5 ml Proteinlösung erhöht und diese in ein neues Gefäß überführt. Mittels BCA-Proteintest wurde die enthaltene Proteinkonzentration in der konzentrierten Fraktion bestimmt und anschließend die Yhgl-(His)₆-Lösung so verdünnt, dass eine 50 µM Lösung erreicht wurde. Dabei wurde das theoretische Molekulargewicht von Yhgl-(His)₆ (22789,6 g/mol) für die Berechnung herangezogen.

11.7.2 Reduktion von Insulin zum Nachweis einer Thioredoxin-Aktivität

Nach (Holmgren, 1979) kann die Reduktion von Insulin unter Zusatz von DTT zum Nachweis einer Thioredoxin-ähnlichen Funktion eines Proteins genutzt werden. Die Reduktion von Insulin führt zum Zerfall in die Einzelketten. Diese sind bei neutralem pH-Wert schlecht löslich und führen zu einer

Trübung des Reaktionsansatzes. Diese Trübung kann durch Bestimmung der Zunahme der optischen Dichte (600 nm) des Reaktionsansatzes verfolgt werden. Somit dient die Trübung als Maß für eine fortschreitende Reduktion von Insulin.

Die Reaktion wurde unter Zugabe von Thioredoxin (TrxA) aus *E. coli* (2,5 bzw. 5 μM , Promega), Zugabe von BSA (5 μM), Zugabe von gereinigtem Yhgl-(His)₆ (5 μM , eingefroren bzw. nicht eingefroren) und ohne Zugabe weiterer Proteine durchgeführt. Im Ansatz waren jeweils 1 mM DTT und 0,83 mg/ml Rinderpankreas-Insulin (0,145 mM, Sigma) enthalten. Als Eichwert wurde der jeweilige Reaktionsansatz ohne zugesetztes DTT verwendet. Die Zunahme der OD₆₀₀ wurde über einen Zeit-raum von bis zu 90 min mit dem Spectrophotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia-Biotech) verfolgt und mit der Software Swift-Kinetics (Pharmacia-Biotech) aufgezeichnet (Abb. 50).

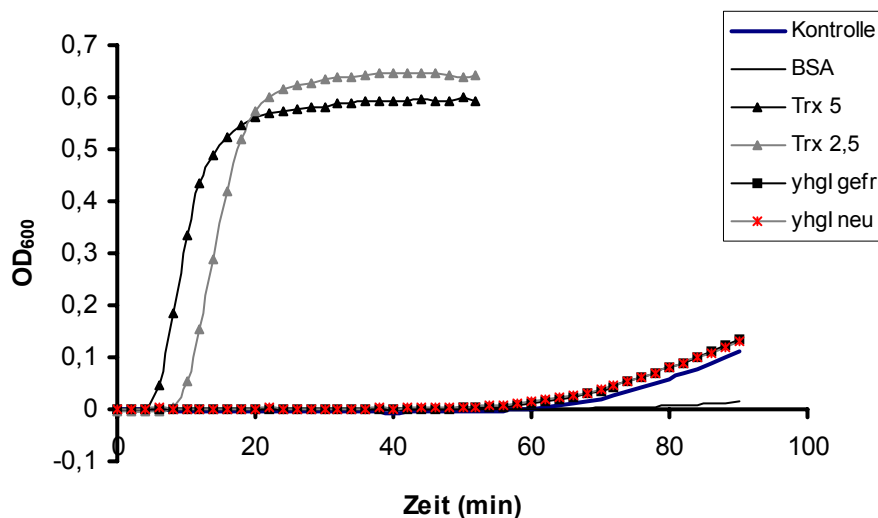


Abb. 50: Reduktion von Insulin durch Thioredoxin

Dargestellt ist die aus der Reduktion von Insulin resultierende Zunahme der OD₆₀₀ in Abhängigkeit von der Zeit. Die OD₆₀₀ ist ein Maß für den Reduzierungsgrad von Insulin, wird jedoch wie bei der Bestimmung der OD₆₀₀ von Bakterienkulturen bei höheren Werten stark fehlerbelastet sein. Alle Reaktionsansätze wiesen ein Gesamtvolumen von 600 μl auf und enthielten 1 mM DTT, 0,145 mM Insulin sowie Reaktionspuffer. Die übrigen Versuchsbedingungen sind der Legende zu entnehmen: **Kontrolle:** ohne Enzym; **BSA:** Reaktionsansatz mit 5 μM BSA; **Trx5:** Reaktionsansatz mit 5 μM TrxA aus *E. coli*; **Trx2,5:** Reaktionsansatz mit 2,5 μM TrxA aus *E. coli*; **yhgl gefr.:** Reaktionsansatz mit Yhgl-(His)₆, gereinigt mit Einfrierschritten; **yhgl neu:** Reaktionsansatz mit Yhgl-(His)₆, gereinigt ohne Einfrierschritte. Für Yhgl-(His)₆ konnte keine Thioredoxin-ähnliche Funktion nachgewiesen werden.

In dem Kontrollansatz, der nur DTT ohne zugesetzte katalytisch aktive Enzyme enthält, ist erst nach ca. 64 min eine langsame Zunahme der optischen Dichte bei 600 nm zu beobachten. Mit zugesetztem Thioredoxin nimmt die OD₆₀₀ schon nach kurzer Zeit zu, mit 2,5 μM Thioredoxin nach 10 min und mit 5 μM schon nach 6 min. Die erreichte End-OD₆₀₀ liegt mit geringerer Thioredoxin-Konzentration (2,5 μM) mit ca. 0,65 jedoch höher als mit 5 μM zugesetztem Thioredoxin (End-OD₆₀₀ = ca. 0,6). Die Reaktionsansätze mit eingefrorenem bzw. nicht gefrorenem Yhgl-(His)₆ zeigen erst nach ca. 54 bzw. 60 min eine Zunahme der optischen Dichte. Damit liegt diese Zunahme nur unwesentlich über der Zunahme der OD₆₀₀ ohne Enzymzusatz. Mit BSA ist erst nach über 70 min eine Zunahme der OD₆₀₀

zu verzeichnen und der Kurvenverlauf ist zudem wesentlich flacher als bei allen anderen Reaktionsansätzen.

11.7.3 Absorptionsspektrum von Yhgl-(His)₆

Prosthetische Gruppen oder Coenzyme (z.B. NADPH/NADH) sind meist anhand ihres charakteristischen Absorptionsspektrums nachweisbar. Gleiches gilt FeS-Cluster von Proteinen wie NifU oder IscU. Nach dem Ergebnis des Insulin-Reduktionstests sollte das Vorhandensein derartiger Gruppen untersucht werden, um mögliche Anhaltspunkte für eine Funktion von Yhgl zu erlangen und so mögliche alternative Untersuchungsansätze zu finden.

Gereinigtes Yhgl-(His)₆ wurde im Reaktionspuffer des Insulin-Reduktionstests in einer Konzentration von 5 µM vermessen. Für die Aufnahme des Absorptionsspektrums wurde das Dioden-Array-Photometer (Agilent ChemStation, 8453) der Firma Agilent Technologies verwendet. Die Absorption wurde zwischen 210 nm und 600 nm aufgezeichnet (Abb. 51).

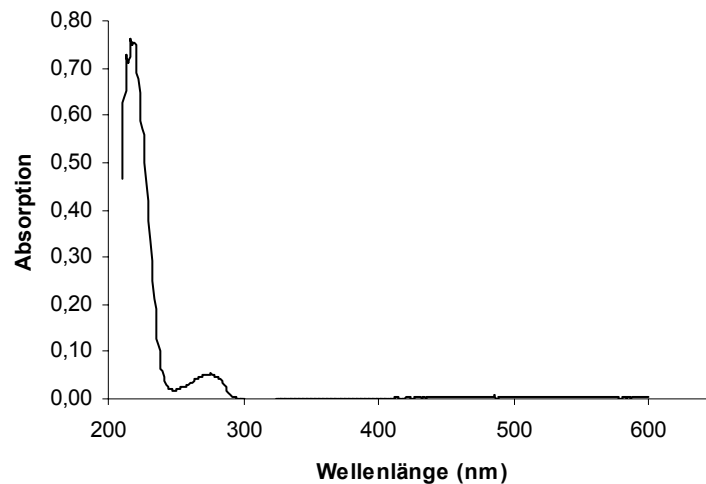


Abb. 51: Absorptionsspektrum von gereinigtem Yhgl-(His)₆

Abgebildet ist das Absorptionsspektrum von gereinigtem Yhgl-(His)₆ zwischen 210 nm und 600 nm. Neben den Absorptionsmaxima von Peptidbindung (215 – 218 nm) und aromatischen Aminosäuren (280 nm) sind keine weiteren nachweisbar.

Es ergaben sich keine nennenswerten Absorptionsmaxima neben den Maxima bei 215 – 218 nm (Peptidbindung) und bei ca. 280 nm (aromatische Aminosäuren). Kofaktoren wie NAD(P)⁺/NAD(P)H (255 nm / 255 und 340 nm) konnten nicht nachgewiesen werden. Auch zeigt das Protein keine Charakteristika, die mit denen eines FeS-Proteins vergleichbar wären (siehe Diskussion Abschnitt 9.3.2).

11.8 Analyse von Yhgl-(His)₆ im Western-Blot

11.8.1 Analyse der Zellfraktionen von *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 im Western-Blot

Nach den Ergebnissen des Insulin-Reduktionstestes war zu überprüfen, wie der negative Verlauf zu deuten war. Es stellte sich die Frage, ob Yhgl nicht die Funktion eines Thioredoxin ausübt, oder möglicherweise andere Komponenten für die Aktivität von Yhgl notwendig sind. Eine Identifizierung möglicher Partnerproteine mittels des BacterioMatch[®] Two-Hybrid-Systems war an der Undurchführbarkeit gescheitert, jedoch kommen auch andere Zellbestandteile, z.B. die Membran in Frage. Diese ist für die Aktivität von Membranproteinen oder membranassoziierten Proteinen erforderlich. Yhgl war in computergestützten Analysen als lösliches cytoplasmatisches Protein klassifiziert worden. In den ersten Fraktionierungsexperimenten war der Hauptteil des exprimierten Yhgl-(His)₆ in der löslichen Fraktion von *E. coli* BL21 pETY5 zu finden gewesen. In der unlöslichen Fraktion waren nur geringere Anteile zu beobachten gewesen, die Membranfraktion war nicht weiter beachtet worden. Geplant war daher eine erneute Fraktionierung von Zellmaterial durchzuführen. Nach der Auftrennung dieser Fraktionen in einer SDS-PAGE, sollte Yhgl-(His)₆ in einem Western-Blot spezifisch mittels anti-His-tag-Antikörper und gekoppelter Farbreaktion detektiert werden.

Für die erneute Fraktionierung wurde Zellpellets von *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+) und *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 (induziert mit 0,1 mM IPTG) verwendet, die in LB-0,5 (Carb100) (1 Liter Kulturvolumen, 37 °C, 150 upm) angezogen waren. Im Unterschied zu der vorigen Fraktionierung wurde bei dieser Gewinnung der unlöslichen Fraktion die Drehzahl auf 20400 x g erhöht (1 h, Rotor JA-25.5, Avanti J-20XP, Beckmann). Nach einer ersten Entnahme des Überstandes wurde das Lysat (lösliche Fraktion) erneut mit 20400 x g zentrifugiert (0,5 h). Das Pellet der ersten Zentrifugation (unlösliche Fraktion) wurde zweimal mit 20 ml Kalium-Phosphat-Puffer gewaschen, um anhaftende Reste der löslichen Fraktion zu entfernen, schließlich in 10 ml gleichen Puffers resuspendiert und eingefroren. Der Überstand der zweiten Zentrifugation (lösliche Fraktion) wurde in die Ultrazentrifugation eingesetzt und hier bei 145000 x g für 3 h bei 4 °C zentrifugiert (Rotor Ti60, Optima LE-80K, Beckmann). Nach der Zentrifugation wurde die lösliche Fraktion, ohne Bestandteile der Membranfraktion zu verschleppen, abgenommen und eingefroren. Die Membranfraktion bildete ein klares, harziges, orange-braunes Pellet. Dieses wurde zweimal mit Puffer gewaschen, um restliche anhaftende Bestandteile der löslichen Fraktion und nicht vollständig sedimentierte Membrananteile abzuwaschen, und schließlich nach der Resuspendierung in 10 ml Kalium-Phosphat-Puffer eingefroren.

Der Proteingehalt aller Fraktionen wurde mittels BCA-Proteintest bestimmt. Anschließend wurden 12,5 µg jeder Fraktion in einer reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden zwei identische Gele beladen, von denen eins im Western-Blot untersucht wurde. Nach Hybridisierung mit dem primären Maus Anti-His-tag-Antikörper und dem sekundären, mit einer alkalische Phosphatase gekoppelten, Ziegen Anti-Maus-Antikörper wurde Yhgl-(His)₆ mittels Farbreaktion detektiert (Abb. 52).

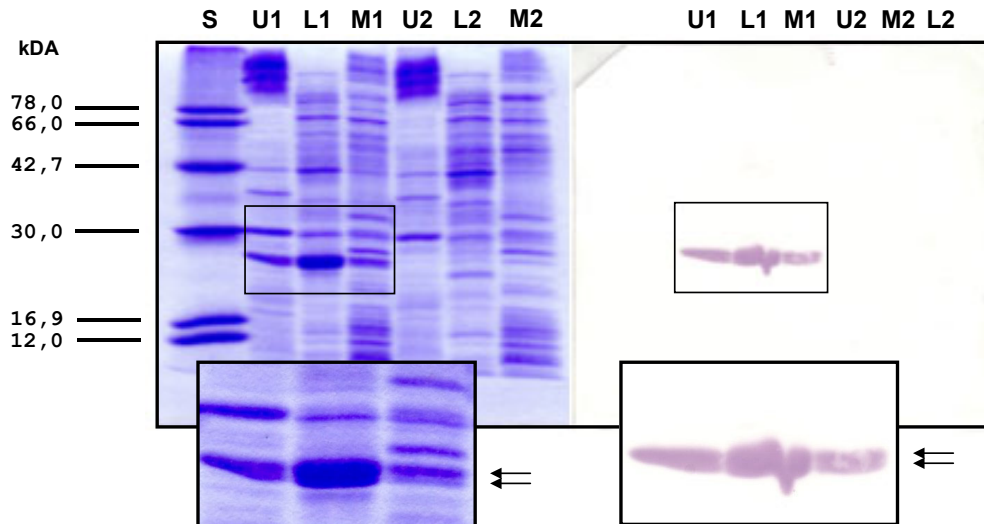


Abb. 52: Lokalisation von Yhgl-(His)₆ in den Zellen von *E. coli* BL21 (DE3) pETY5

S: Protein-Marker; **U1:** unlösliche Fraktion *E. coli* BL21 (DE3) pETY5; **L1:** lösliche Fraktion *E. coli* BL21 (DE3) pETY5; **M1:** Membranfraktion *E. coli* BL21 (DE3) pETY5; **U2:** unlösliche Fraktion *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+); **L2:** lösliche Fraktion *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+); **M2:** Membranfraktion *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+). In den drei Fraktionen von *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 wurde jeweils Yhgl-(His)₆ detektiert, in den Fraktionen von *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+) (Negativ-Kontrolle) nicht. In dem vergrößerten Bereich der SDS-PAGE lassen sich die dicht übereinanderlaufenden Proteinbanden (Pfeile) der Membranfraktion erkennen, die bei der Detektion im Western-Blot nur sehr schlecht getrennt wurden.

In allem drei Fraktionen von *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 wurde Yhgl-(His)₆ detektiert. Die stärkste Bande ist in der löslichen Fraktion zu erkennen, schwächere Banden sind aber auch in der Membranfraktion und der unlöslichen Fraktion zu finden. Das Signal in der unlöslichen Fraktion ist auf unvollständige Zellyse zurückzuführen. Die Detektion von Yhgl-(His)₆ in der Membranfraktion zeigen eine Membrananbindung bzw. assoziation von Yhgl an. Genauere Auswertungen des Western-Blots deuteten darauf hin, dass in der Membranfraktion von *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 zwei nur sehr schlecht getrennte Proteinbanden detektiert wurden. Dies würde auf zwei Yhgl-(His)₆-Populationen mit nur sehr geringem Größenunterschied hinweisen. Vergleich man unter diesem Aspekt den Western-Blot mit der SDS-PAGE lassen sich auch dort in der Membranfraktion zwei nur sehr schlecht getrennte, direkt übereinander liegende Proteinbanden erkennen.

In den Fraktionen von *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+) wurde kein Yhgl-(His)₆ detektiert, was bestätigt, dass es sich bei den übrigen Banden nicht um unspezifische Kreuzreaktionen handelt.

11.8.2 Native PAGE mit gereinigtem Yhgl-(His)₆ zur Untersuchung des Oligomerisierungszustandes

Auch der Oligomerisierungszustand eines Proteins kann die Reaktivität eines Proteins bestimmen. Um weitere Gründe für den negativen Verlauf des Insulin-Reduktionstests zu finden, sollte das gereinigte Protein dahingehend näher charakterisiert werden. Erste Hinweise auf einen Oligomerisierungszustand eines Proteins können sich in einer nativen PAGE ohne Zusatz von SDS ergeben. Hier wird ein Protein nicht, wie in einer SDS-PAGE, entsprechend seines Molekulargewichtes aufgetrennt, sondern es spielen Nettoladung und auch die Tertiärstruktur des Moleküls eine bedeutende Rolle. So laufen saure (bei neutralem pH negative) oder sehr kompakt gefaltete Proteine schnell. Der Verzicht auf einen Einsatz von β -Mercaptoethanol im Probenpuffer sorgt zusätzlich dafür, dass über Disulfidbrücken vernetzte Oligomere nicht in die Monomere getrennt werde. Dies spielt jedoch bei prokaryontischen cytoplasmatischen Proteinen eine untergeordnete Rolle, da diese aufgrund der reduzierenden Verhältnisse sowieso nicht stabil wären, und daher nicht von physiologischer Bedeutung sind. Disulfidbrücken treten als ein Effekt von oxidativem Stress auf.

In einer nativen PAGE wurden 12,5 μ g von gereinigtem Yhgl-(His)₆ aufgetragen. Wiederum wurden zwei identische Gele beladen, von denen eins im Western-Blot untersucht wurde (Abb. 53). Verwendet wurde Yhgl-(His)₆ der gleichen Fraktion, die auch für die Durchführung des Insulin-Reduktionstests und für die Bestimmung des Absorptionsspektrums genutzt wurde. Ebenfalls aufgetragen wurde in der nativen PAGE der Protein-Marker (Protein-Standardmischung IV, Merck), der aus einer Vielzahl von Proteinen unterschiedlicher Größen und physikalischer Eigenschaften besteht (Tab. 19).

Protein	Organismus	MW (Da)	Isoelektrischer Punkt
Cytochrom C	Pferd	12384	
Myoglobin	Pferd	16951,48	7,36
Carboanhydrase		30000	
Ovalbumin	Huhn	42881,24	5,19
Albumin		66250	
Ovotransferrin	Huhn	75632,87	6,19
Yhgl	<i>H. elongata</i> DSM 2581 ¹	21511,26	4,44

Tab. 19: Charakteristika der Komponenten des Protein-Markers (Protein-Standardmischung IV, Merck) und von Yhgl aus *H. elongata*

In der Tabelle sind die im Protein-Marker enthaltenen Protein und deren Herkunft, sofern feststellbar, aufgeführt. Angegeben ist außerdem das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt. Beides sind Charakteristika, die das Laufverhalten von Proteinen in einer nativen PAGE beeinflussen. Geringes Molekulargewicht, bei gleichzeitiger globulärer Struktur, sowie negative Ladung (saurer isoelektrischer Punkt) führen zu einer schnellen Auftrennung in einer nativen PAGE. Zum Vergleich sind die entsprechenden Charakteristika von Yhgl aus *H. elongata* (Yhgl) angegeben.

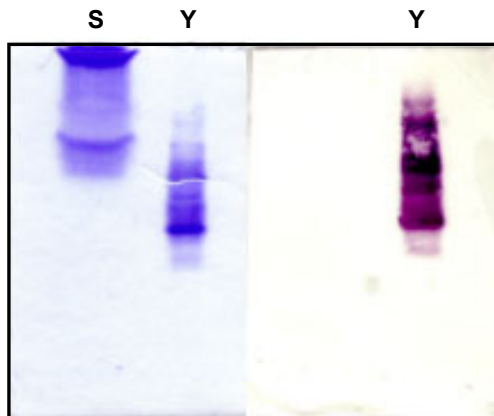


Abb. 53: Native PAGE und Western-Blot von gereinigtem Yhgl-(His)₆

Abgebildet ist eine native PAGE und ein Western-Blot von gereinigtem Yhgl-(His)₆: **S**: Protein-Marker; **Y**: gereinigtes Yhgl-(His)₆. In der PAGE deutet sich das Vorhandensein mehrerer Oligomere von Yhgl-(His)₆ an. Bestätigt wird dies durch die spezifische Detektion der Proteinbanden mit einem Anti-His-tag-Antikörper. Möglich ist jedoch auch eine unspezifische Interaktion denaturierter Proteine. Durch das Laufverhalten in der nativen PAGE wird auch der saure Charakter von Yhgl bestätigt. Yhgl-(His)₆ ist in der nativen PAGE deutlich weiter als alle Marker-Proteine gelaufen (S), die im Vergleich zu Yhgl entweder kleiner aber nicht so sauer, oder sauer aber größer sind.

In der nativen PAGE deuten sich durch das Vorhandensein multipler Proteinbanden mehrerer Oligomere von gereinigtem Yhgl-(His)₆ an. Dies wird auch durch die spezifische Detektion der entsprechenden Proteinbanden durch den Anti-His-tag-Antikörper bestätigt. Möglich ist jedoch auch eine unspezifische Interaktion denaturierter Proteine, die zur Bildung von Aggregaten führt. Auffällig ist die starke Färbung der Proteinbanden des Western-Blots im höhermolekularen Bereich. Der (His)₆-tag scheint hier besser für den Antikörper zugänglich zu sein und daher besser detektiert zu werden. Außerdem wurde Yhgl-(His)₆ in dem Oligomerisierungszustand mit dem geringsten Molekulargewicht schneller als alle Proteine des Markers aufgetrennt. Sogar das Pferde-Myoglobin mit einer Größe von nur 16,95 kDa ist langsamer gelaufen. Begründet werden kann dies mit dem sehr sauren Charakter von Yhgl. Yhgl-(His)₆ (22,79 kDa, pI= 4,74) weist in dem verwendeten Laufpuffer (pH 8,5) eine negative Ladung auf und läuft in einer nativen PAGE daher recht schnell. Auch Pferde-Myoglobin ist negativ geladen (pI= 7,36), jedoch weniger stark. Daher läuft es trotz seines geringeren Molekulargewichts langsamer. Ovalbumin, das ähnlich sauer wie Yhgl-(His)₆ ist (pI= 5,1), läuft aufgrund seines höheren Molekulargewichts (ca. 42,7 kDa) langsamer als Yhgl-(His)₆. Somit bestätigen sich durch das Laufverhalten von Yhgl-(His)₆ die aus der Proteinsequenz bestimmten Charakteristika.

IV. Diskussion

1. Vorgegangene Arbeiten und Anhaltspunkte

Zur Identifizierung neuer Mechanismen der Osmoadaptation, die unabhängig von Solutetransport und Solutesyntese sind, wurde zunächst eine Mutagenese mit dem transposablen Element Tn1732 an *H. elongata* DSM 2581^T (Wildtyp) durchgeführt (Burdziak, 1999). Aus der großen Zahl der erhaltenen Mutanten wurde der salzsensitive Stamm ABU44 für die Sequenzierung des Tn1732-Insertionsortes ausgewählt. Diese Mutante zeigte bei geringer Salinität in Mineralsalzmedium ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstumsverhalten und bei hoher Salinität (oberhalb 12 % NaCl) einen Ausfall des Wachstums in Mineralsalzmedium. Zu einer Auxotrophie, die auch bei geringer Salinität erkennbar wäre, führte die Mutation nicht und auch der Gehalt an den Soluten Ectoin und Hydroxyectoin der Mutante ist mit dem des Wildtyps vergleichbar.

Die Sequenzierung des Tn1732-Insertionsortes zeigte, dass Tn1732 in der Region zweier entgegengesetzt orientierter offener Leserahmen (ORF) inseriert hatte. Bei der Analyse der DNA-Sequenz ergab sich der Verdacht, dass durch die Tn1732-Insertion mögliche vorgelagerte, überlappenden Promotorsequenzen beider ORFs unterbrochen wurden. Die Insertion könnte so zu einem Ausfall beider hypothetischen Gene geführt haben.

Die DNA-Sequenz der beiden ORFs sowie die Ableitung der Aminosäuresequenz zeigten Ähnlichkeiten zu bekannten DNA-Sequenzen und ihren Genprodukten. So gab es Ähnlichkeiten zum *metH*-Gen aus *E. coli* und *Pseudomonas putida* sowie zum *yhgI*-Genprodukt aus *E. coli*. MetH, ein Vitamin-B₁₂-abhängiges Enzym, katalysiert in beiden Mikroorganismen den letzten Schritt der Methioninsynthese (Alaminos & Ramos, 2001; Banerjee *et al.*, 1989). Das Produkt des hypothetischen *yhgI*-Gens hat keine bekannte Funktion. Trotzdem war für die Ausschaltung beider Gene zunächst ein Effekt auf die Osmoadaptation denkbar.

Bei Defekten der Methioninsynthese wurde bei *Pseudomonas syringae* eine Abnahme der epiphytischen Fitness gefunden, woraus eine Verbindung zwischen Methionin-Prototrophy und Toleranz gegenüber physikalischem und chemischem Stress gemutmaßt wurde (Andersen *et al.*, 1998). ABU44 ist nicht Methionin-auxotroph. Der Ausfall dürfte erst durch eine salinitätsabhängige Expression von *metH* Auswirkungen zeigen. Schon vorher wurden auch bei *Saccharomyces cerevisiae* Zusammenhänge zwischen Methioninsynthese und Osmotoleranz gefunden (Gläser *et al.*, 1993).

Für *yhgI* wurden Zusammenhänge mit der Biotinsynthese gemutmaßt, zumal in *E. coli* *yhgI* in einer Region lokalisiert ist, in der auch *bioH* angeordnet ist (Blattner *et al.*, 1997). *bioH* und *yhgI* sind in *E. coli* auf Gegensträngen der DNA angeordnet. BioH ist an einem nicht vollständig geklärten Schritt der Biotinsynthese beteiligt (Tomczyk *et al.*, 2002). Die Lokalisation von *bioH* in *H. elongata* war unbekannt, jedoch wurde ein Einfluss der Tn1732-Insertion auf transkriptionsregulatorische Elemente eines möglichen *bioH*-Gens nicht ausgeschlossen. Bei einer Beeinträchtigung der Biotinsynthese wären vielfältige Auswirkungen denkbar. Diese dürften jedoch nicht die Biotin-Prototrophie betreffen, da ABU44 auf Mineralsalzmedium wachsen kann. Die Auswirkungen dürften nur bei erhöhter Salinität

eine Rolle spielen. So könnte sich ein Biotinmangel auf eine Anpassung der Membranlipide bei gesteigerter Salinität auswirken. Andererseits wurden eine Beteiligung von Decarboxylierungsreaktion an osmoregulatorischen Transportprozessen gemutmaßt. In Betracht gezogen wurde in diesem Zusammenhang ein Na^+ -Export, der auch durch Decarboxylierungsreaktionen angetrieben werden kann (Dimroth, 1987).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die DNA-Sequenz mittels Ligase-vermittelter PCR vervollständigt. Basierend darauf wurden die aufgestellten Vermutungen der Vorarbeit durch molekularbiologische und physiologische Untersuchungen überprüft und neue Ansatzpunkte für eine Interpretation gefunden.

2. Auswertung der DNA-Sequenzierung in Bezug auf die Vorarbeiten

Die fortgesetzte Sequenzierung im Bereich des Tn1732-Insertionsortes führte zur Sequenzvervollständigung des hypothetischen *yhgI*-Gens. Ca. 1 kb zusätzlicher Sequenz wurden stromabwärts von *yhgI* sequenziert. In diesem Bereich konnten jedoch keine offenen Leserahmen mit nennenswerten Homologien zu bekannten Genen/Proteinen identifiziert werden. Es ergab sich so auch keine Hinweis auf eine *bioH*-Gen stromabwärts von *yhgI*. Daher stellte sich die Vermutung einer Auswirkung der Transposoninsertion auf die Biotinsynthese als nicht haltbar dar. Neue Anhaltspunkte für eine Funktion von *yhgI* lagen zunächst nicht vor, sollten jedoch gesucht werden, falls *yhgI* sich als das durch die Tn1732-Insertion betroffene Gen erweist.

Die Sequenzierung führte außerdem zu einer Ergänzung der Sequenz des hypothetischen *methH*-Gens. Aufgrund der Länge der zu erwartenden Gesamtsequenz von ca. 3,6 kb sollte die vollständige Sequenzierung nur dann erfolgen, wenn sich herausstellt, dass *methH* an der Osmoadaptation beteiligt und durch die Transposoninsertion in ABU44 betroffen ist. Da eine Mutagenese mittels Interposoninsertion geplant war, war die vollständige Sequenzierung auch nicht erforderlich. In dem sequenzierten Teilbereich von *methH* konnte jedoch die modulare Struktur von MetH nachvollzogen werden (Goulding & Matthews, 1997; Goulding *et al.*, 1997).

3. Charakterisierung der Mutanten von *H. elongata*

3.1 Methionin-auxotrophes Wachstumsverhalten von *H. elongata* KB4

Die Insertion der Ω -Kassette in den Leserahmen von *methH* sollte die Expression desselben unterbrechen. Das Resultat war eine auxotrophe Mutante, deren Phänotyp nicht durch Methioninzusatz komplementiert werden konnte. Damit unterscheidet sich der Phänotyp erheblich von dem der Transposonmutante *H. elongata* ABU44. Diese ist zum Wachstum auf Mineralsalzmedium bis zu einer Salinität von 12 % NaCl fähig. Ein vollständiger Ausfall von *methH* in ABU44 scheint daher unwahrscheinlich.

MetH ist bei *E. coli* und anderen Organismen an der Methioninsynthese beteiligt und katalysiert den Transfer einer Methylgruppe vom enzymgebundenem Methylcobalamin zu Homocystein, wobei Methionin und Cob-(I)-alamin entsteht. Das enzymgebundene Cob-(I)-alamin wird durch Methyl-Tetrahydrofolat remethyliert wobei Methylcobalamin und Tetrahydrofolat entstehen. Zeitweise wird der Cob-(I)-alamin-Cofaktor zur inaktiven Cob-(II)-alamin-Form oxidiert (alle 100-2000 Zyklen) und muss dann mittels reduktiver Methylierung durch reduziertes Flavodoxin (Elektronendonator) und S-Adenosylmethionin (Methylgruppendonator) reaktiviert werden. Auch diese regenerative Methylierung wird von MetH selbst katalysiert. MetH katalysiert daher drei unterschiedliche Methylierungsreaktionen (Goulding *et al.*, 1997).

Bei *E. coli* kann die Aktivität von MetH durch die Vitamin-B₁₂-unabhängige Methionin-Synthase MetE ersetzt werden, so dass *metH*-Mutanten keinen auxotrophen Phänotyp aufweisen (Thanbichler *et al.*, 1999). Auch bei *Pseudomonas putida* benötigen *metH*-Mutanten kein Methionin zum Wachstum auf Mineralsalzmedium (Holtwick *et al.*, 1997), so dass es auch hier ein *metE*-homologes Gen geben musste. Zwischenzeitlich wurde dieses auch identifiziert (Alaminos & Ramos, 2001). Für eine *metH*-Mutante von *H. elongata* wäre, wenn *metH* von ABU44 durch die Transposoninsertion betroffen und an der Osmoadaptation beteiligt ist, ein möglicherweise schlechteres, jedoch nicht-auxotrophes Wachstum zu erwarten gewesen. Anders wäre dies, wenn in *H. elongata* kein *metE*-Homolog vorhanden ist, oder, organisiert in einem Operon, andere essentielle Gene zusammen mit *metH* exprimiert werden. Dann jedoch dürfte in ABU44 der Ausfall von *metH* nur unvollständig gewesen sein. Die Restexpression hätte ausreichen müssen, um die Aktivität von *metH* und/oder der koexprimierten Gene ausreichend auszuprägen.

Nach dem Wachstumsverhalten von *H. elongata* KB4 schien es unwahrscheinlich, dass ein wesentlicher Einfluss der Transposoninsertion auf die Expression von *metH* stattgefunden haben konnte. Daher wurde auch keine weitere Sequenzierung von *metH* durchgeführt.

3.2 Salinitätsabhängiges Wachstumsverhalten der *yhgI*-Mutanten *H. elongata* KB5, KB6 und KB7

Es galt nach den Ergebnissen der Sequenzierung und dem Wachstumsverhalten von *H. elongata* KB4 (*metH*:: Ω) als wahrscheinlich, dass eine Beeinträchtigung von *yhgI* oder eines möglichen unbekanntem stromabwärts gelegenen Gens für das Wachstumsverhalten von ABU44 (Tn1732-Mutante) verantwortlich ist. Diese beiden Möglichkeiten mussten voneinander unterschieden werden. Daher wurde eine reine Deletion von *yhgI* hergestellt (*H. elongata* KB6) und zusätzlich eine Deletion von *yhgI* mit gleichzeitiger Ausschaltung möglicher stromabwärtsgelegener Gene (*H. elongata* KB5). KB5 und KB6 zeigten einen identischen, salzsensitiven Phänotyp, der stärker als bei ABU44 ausgeprägt ist. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem betroffenen Gen um *yhgI* und nicht um ein anderes stromabwärts gelegenes handeln musste. Beide Mutanten zeigten in Mineralsalzmedium schon bei 2 und 4 % NaCl deutlich niedrigere Wachstumsraten als Wildtyp und ABU44, darüber hinaus war die Wachstumsrate nicht bestimmbar. Beim Wachstum auf Mineralsalzplatten war auch nach 8 Tagen nur Wachstum bis 8 % NaCl möglich, während zu diesem Zeitpunkt ABU44 sogar bei 12 % NaCl angewachsen war. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass in ABU44 noch eine Restaktivität

von *yhgI* vorhanden sein musste. Außerdem stellte sich die Frage, ob in *H. elongata* KB5 und KB6 die allgemeine Fitness betroffen war, da das Wachstum schon bei geringer Salinität in Mineralsalzmedium deutlich verschlechtert war. Ein Vergleich der Wachstumsraten von *H. elongata* KB6 ($\Delta yhgI$), Wildtyp und ABU44 (Tn1732-Mutante) in LB-Komplexmedium steigender Salinität ergaben jedoch für die *yhgI*-Deletionsmutante Werte, die keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen. Die gleichzeitig für ABU44 bestimmten, im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Wachstumsraten sind vor diesen Hintergrund fraglich, zudem müssten sie statistisch abgesichert werden. Die allgemeine Fitness ist in KB6 und vermutlich somit auch in KB5 nicht betroffen. Durch die Charakterisierung des Wachstums in Mineralsalzmedium kommt jedoch die Vermutung auf, dass auch geringe Salinität einen Stressfaktor darstellen kann. So weist *H. elongata* ein Wachstumsoptimum von 3 % NaCl auf (Severin, 1993). Unterhalb dieser 3 % NaCl könnte es durch fehlende positive Ladungen zu einer Destabilisierung der Membran kommen, die aus einem Grossteil anionischer Lipide, wie Phosphatidylglycerol (Vreeland *et al.*, 1984) zusammengesetzt ist. Betroffenen sein könnten in gleicher Weise auch Proteine, da diese bei *H. elongata* mehr saure Aminosäuren enthalten als bei nicht halophilen Organismen (Gandbhir *et al.*, 1995). Somit scheint *yhgI* von *H. elongata* bei der Anpassung an hohe aber gleichzeitig auch niedrige Salinität eine wichtige Rolle spielen.

Die funktionelle Komplementierung mit kloniertem *yhgI* aus *H. elongata* führten zu einer Abschwächung des salzsensitiven Phänotyps beider *yhgI*-Mutanten von *H. elongata* (Wachstum bei 12 % NaCl), was wiederum die Verantwortung von *yhgI* für den Phänotyp von ABU44 bestätigte. Mit *yhgI* von *E. coli* K-12 war ebenfalls eine vergleichbare Komplementierung möglich. Dies machte zudem deutlich, dass es sich bei *yhgI* um ein Gen handeln muss, dessen Produkt als Protein aktiv ist. Als *cis*-aktive regulatorische DNA-Sequenz ist eine *in trans* wirkende Funktion, ausgehend von einem Plasmid, auszuschließen. Außerdem weisen die *H. elongata* und die *E. coli* DNA-Sequenzen keine nennenswerten Ähnlichkeiten auf, so dass auch von daher eine in gleicher Weise ausgeübte regulatorische Funktion nicht anzunehmen ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei *yhgI/YhgI* aus *H. elongata* und *E. coli* nicht nur um ähnliche Sequenzen handelt, sondern, dass beide Gene/Proteine als Homologe, d.h. ähnliche Gene/Proteine gleicher Funktion, zu betrachten sind.

Nach der erfolgreichen Komplementierung der *H. elongata yhgI*-Mutanten mit kloniertem *yhgI* aus *E. coli* sollte die Auswirkung der Integration des *E. coli* Gens (*yhgI_{Ec}*) anstelle des *H. elongata* Gens im Genom bestimmt werden (*H. elongata* KB7 ($\Delta yhgI::yhgI_{Ec}$). So konnten störende Einflüsse einer erforderliche Vektorreplikation oder einer erhöhte Kopienzahl von *yhgI_{Ec}*, verursacht durch multiple Vektorkopien, auf die Aktivität von *yhgI_{Ec}* ausgeschlossen werden. Die Regulation der Expression von *yhgI_{Ec}* erfolgt unter der Kontrolle der *H. elongata* eigenen Promotoren, die zu diesem Zeitpunkt jedoch unbekannt oder zumindest nicht experimentell bestätigt waren. Einzig ein möglicher σ^{70} -abhängiger Promotor war stromaufwärts durch computergestützte Analyse vorhergesagt worden (Burdziak, 1999). Die Insertion führte zu einem im Vergleich zu den Deletionsmutanten verbesserten Wachstum. Bis 8 % NaCl war das Wachstum in Mineralsalzmedium (Agarplatten) auch schneller als das von ABU44, darüber hinaus ähnelte sich das Wachstum beider Stämme. Es erfolgte also eine teilweise Komplementierung, der Wildtyp konnte jedoch nicht wieder hergestellt werden. Denkbar ist, dass das Protein von *E. coli* für einen anderen Salinitätsbereich ausgelegt ist oder die Wechselwirkungen mit möglichen Zielproteinen aufgrund struktureller Unterschiede nicht sehr effektiv erfolgen. Zusammen-

gefasst kann jedoch eine ähnliche oder sogar gleiche Funktion von *yhgl* in beiden Organismen angenommen werden.

4. Salinitätsabhängiges Wachstum der *yhgl*-Mutante von *E. coli* K-12

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass der Ausfall von *yhgl* bei *H. elongata* zu einem salzsensitiven Phänotyp führt und sich in den Komplementierungsexperimenten eine gleichartige Funktion des *E. coli* Gens angedeutet hatte, sollte diese Vermutung durch die Deletion von *yhgl* aus *E. coli* K-12 bestätigt werden. Zu erwarten war, bei gleicher Funktion, ein salzsensitiver Phänotyp. Sollte dieser nicht entstehen, konnte von einem sekundären Effekt der *yhgl*-Deletion in *H. elongata* ausgegangen werden (der z.B. die Membranintegrität betrifft; siehe Diskussion Abschnitt 6.1 zur Beteiligung an Kompetenzmechanismen).

Mit der *E. coli* *yhgl*-Deletionsmutante wurden Wachstumsexperimente auf MM63-Agarplatten steigender Salinität durchgeführt. Da jedoch der Ausfall des Wachstums bei *H. elongata* erst bei hoher Salinität erfolgte (16 % NaCl) wurde beschlossen mit *E. coli*, dessen Toleranzbereich wesentlich niedriger anzusetzen ist, das Experiment mit und ohne zugesetztes Betain (5 mM) durchzuführen. Nach Larsen *et al.* (1987) kann *E. coli* mit der eigens synthetisierten Trehalose nicht mehr in Mineralsalzmedium mit 650 mM NaCl (entspricht ca. 3,8 % NaCl) wachsen, wenn keine anderen Solute dem Medium zugesetzt sind. Nach eigenen Erfahrungen ist dieser Wert höher anzusetzen, da *E. coli* K-12 in eigenen Experimenten bei 4 % NaCl im Mineralsalzmedium ohne zugesetzte kompatible Solute noch Wachstum zeigt. Trehalose ist das einzige kompatible Solut, dass durch *E. coli de novo* synthetisiert werden kann. Sobald andere kompatible Solute oder ihre Vorläufer z.B. Betain oder Cholin aus dem Medium aufgenommen werden können, wird keine Trehalose mehr akkumuliert (Cayley *et al.*, 1992; Larsen *et al.*, 1987). Durch diese zugesetzten Solute kann die Salztoleranz von *E. coli* auf über 5 % NaCl angehoben werden (5,2 %; (Gouesbet *et al.*, 1994)). Bei der Versuchsplanung wurde vermutet, dass das Wachstumsdefizit erst in diesem oberen Salinitätsbereich erkennbar wird. Es zeigte sich, dass die *yhgl*-Deletionsmutante *E. coli* BK1 ohne Solute keine Wachstum auf MM63-Medium mit 4 % NaCl zeigt, während das Wachstum mit zugesetztem Betain (5 mM) erst bei 5 % NaCl ausfällt. Mit zugesetztem Betain war bei 4 % NaCl noch Wachstum möglich. In beiden Fällen war das Wachstum bei 3,5 % NaCl im Vergleich zum Wildtyp schon verlangsamt. Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte, neben der Bestätigung der Ergebnisse aus *H. elongata*, mit Gewissheit ausgeschlossen werden, dass Solutetransport oder Solutesynthese bei *E. coli* BK1 ($\Delta yhgl$) durch die Deletion betroffen sind. Ein defekter Transport wäre ohne zugesetzte Solute nicht bemerkbar gewesen, eine defekte Trehalose-Synthese nicht bei Zusatz des extern zugesetzten und von *E. coli* bevorzugten Betains. So war auch bei der *H. elongata* Mutante KB2 trotz eines defekten Ectoin-Transporters (TeaABC) kein Wachstumsnachteil in Mineralsalzmedium im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten gewesen (Volke, 2001). Die funktionellen Komplementierungsexperimente mit klonierten *yhgl*-Genen und *E. coli* BK1 ($\Delta yhgl$) waren erfolgreich und bestätigten die mit *H. elongata* KB5 ($\Delta yhgl::\Omega$) und KB6 ($\Delta yhgl$) gemachten Ergebnisse. Die Komplementierung verlief jedoch im Gegensatz zu den Experimenten mit KB5 und KB6 vollständig. Das Wachstum der komplementierten *E. coli* BK1 Stämme auf Agarplatten stei-

gender Salinität war nicht von dem der entsprechenden *E. coli* K-12 Stämme zu unterscheiden. Außerdem konnte eine funktionelle Komplementierung durch Yhgl-(His)₆ oder das dafür kodierende Gen erreicht werden. Damit konnte gezeigt werden, dass das für die spätere heterologe Expression gewählte Konstrukt seine unbekannte Aktivität *in vivo* trotz angehängter zusätzlicher Aminosäuren entfaltet.

5. Auswertung von Anhaltspunkten in Literatur und Sequenz zur Planung der weiteren Experimente

Die bisherigen Untersuchungen im Hinblick auf Salzsensitivität dienten vor allem dazu dasjenige Gen zu identifizieren, dass für das Wachstumsverhalten von *H. elongata* ABU44 verantwortlich ist. Als Ergebnis dieser Experimente konnte ein Ausfall oder eine verringerte Expression von *yhgI* als Ursache ausgemacht werden. Damit konnte jedoch keine Funktionszuordnung erfolgen, was im Falle von *metH* leichter gefallen wäre. Einzig die Salzsensitivität der *yhgI*-Deletionsmutanten konnte bestätigt werden. Es musste daher in Literatur und Datenbanken nach Anhaltspunkten für weitere physiologische und molekularbiologische Charakterisierungen sowie die Relevanz des Proteins geforscht werden. Es ergaben sich drei unterschiedlich gerichtete Arten von Hinweisen auf eine Funktion oder Beteiligung von Yhgl, – bakterielle Kompetenz zur DNA-Aufnahme, – Reaktion auf oxidativen Stress und die Reaktion auf falschgefaltete Proteine.

5.1 Hinweise aus der Literatur

yhgI findet nur selten in konkreter Form Erwähnung in Literatur und Datenbanken. Meist handelt es sich um Annotierungen als hypothetisches Gen/Protein, das einzig durch Sequenzvergleiche identifiziert wurde. Porco *et al.* (1998) und Isturiz *et al.* (2001) mutmaßen in *yhgI* (*gntY*) aus *E. coli* eine Komponente eines TRAP-Transportsystems (Forward *et al.*, 1997). Sie schließen in dieses System ein stromaufwärts von *yhgI* gelegenes Gen, *yhgH* (*gntX*), und eine stromabwärts von *yhgI* gelegenes Gluconat-Transportergen (*gntT*, (Yamada *et al.*, 1996)) ein. Ein derartiger Zusammenhang wird jedoch von anderen Autoren (Conway, persönliche Mitteilung)(Kelly & Thomas, 2001) ausgeschlossen, zumal keine schlüssigen Beweise vorliegen und auch keinerlei Sequenzähnlichkeiten zwischen *yhgI/yhgH* oder den abgeleiteten Aminosäuresequenzen und Komponenten von TRAP-Transportsystemen bestehen. Diesbezügliche physiologische oder molekularbiologische Untersuchungen wurden daher nicht getätigt.

yhgI-ähnliche Sequenzen von *Haemophilus influenzae* und anderen Organismen finden in der Literatur Erwähnung im Zusammenhang mit Kompetenzgenen (Finkel & Kolter, 2001; Tomb *et al.*, 1991) (Abb. 54). Wie bei *E. coli* liegt bei *H. influenzae* *yhgH* (hier *comF*) stromaufwärts von *yhgI* (hier *comG* oder OrfG). Eine Unterbrechung von *comF* mittels Transposonmutagenese (mini-Tn10) hatte zu einer verschlechterten DNA-Aufnahme bei normaler DNA-Bindefähigkeit geführt (Tomb *et al.*, 1989; Tomb *et al.*, 1991). Vermutlich aufgrund der räumlichen Nähe zu *comF* (75 bp Distanz bei

H. influenzae) schließen diese Autoren *comG* in die Kompetenzgene ein. Finkel & Kolter (2001) vermuten in den Genen *comABCDEFG* von *H. influenzae* und in den Genen *yhgHI* von *E. coli* jeweils ein Operon. Damit wäre von einer gemeinsamen Expression auszugehen. Als neue Funktion der Kompetenzgene identifizierten sie den Eintransport von DNA-Bruchstücken zur Nährstoffversorgung. Eine gemeinsame Expression oder Funktion wurde durch Finkel & Kolter (2001) nicht nachgewiesen, bot jedoch einen konkreten Anhaltspunkt für experimentelle Untersuchungen.

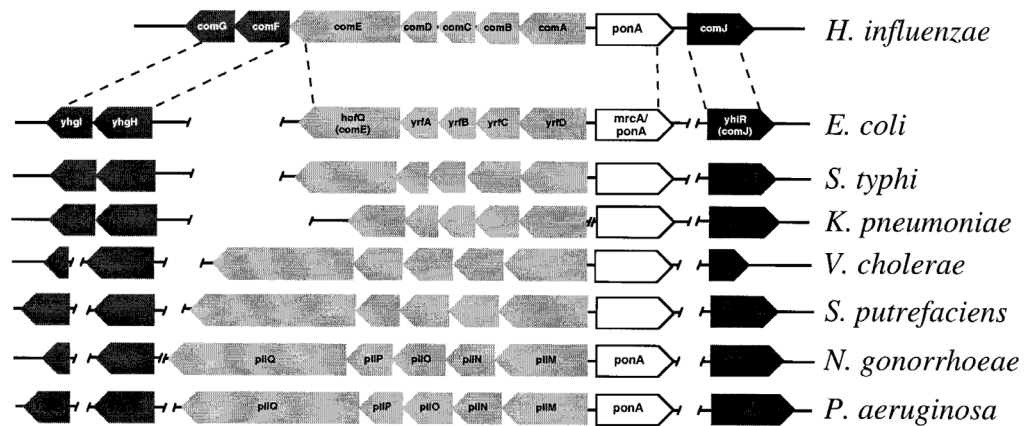


Abb. 54: Verteilung von Kompetenzgenen in unterschiedlichen Mikroorganismen

Dargestellt ist die Anordnung der Kompetenzgene von *Haemophilus influenzae* und die Anordnung homologer Sequenzen anderer γ -Proteobakterien: *E. coli*: *Escherichia coli*; *S. typhi*: *Salmonella typhi*; *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*; *V. cholerae*: *Vibrio cholerae*; *S. putrefaciens*: *Shewanella putrefaciens*; *N. gonorrhoeae*: *Neisseria gonorrhoeae*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*. Abbildung: (Finkel & Kolter, 2001).

Untersuchungen an Mäusen hatten gezeigt, dass bei einer Infektion durch *Klebsiella pneumoniae* CG43 neben anderen Genen auch *yhgI* verstärkt exprimiert wird (Lai *et al.*, 2001). *K. pneumoniae* ist fähig eine Vielzahl von Erkrankungen u.a. Lungenentzündungen, Sepsis und Harnwegsinfektionen hervorzurufen. Die Autoren hatten durch Injektion einer Dosis *K. pneumoniae* in den Bereich des Bauchfells eine systemische Infektion hervorgerufen. Mittels der IVET-Technologie (*in vivo* expression technology; (Angelichio & Camilli, 2002; Mahan *et al.*, 1993)) identifizierten sie anschließend in *K. pneumoniae* Kolonien, die aus Milzgewebe angezogen worden waren, signifikant induzierte Promotoren und deren zugehörige Gene. Unter anderem verstärkte sich die Expression von *yhgI*. Eine Zuordnung einer speziellen Funktion konnte jedoch für *yhgI* nicht erfolgen. Allgemein wurde jedoch auf Stress bei der Infektion, verursacht durch Eisenmangel oder reaktive Sauerstoffspezies, wie sie durch Immunzellen gebildet werden, verwiesen. Der spezifische Nachweis einer erhöhten Expression als Antwort auf diese beiden Stressfaktoren konnte für *yhgI* jedoch nicht erfolgen. Allerdings gibt es vermutlich vielfältige andere Stressfaktoren, die bisher noch gar nicht erkannt sind.

Shaw *et al.* (2003) untersuchten die genomweite Expression von *E. coli* MG1655 Genen als Reaktion auf die vier bakteriziden Agenzien Kanamycin, Rifampin, Ampicillin und Norfloxacin. Als Antwort auf das Aminoglycosidantibiotikum Kanamycin wurden eine Vielzahl „Heat-shock“-induzierbarer Proteine

gebildet. Zu finden war eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Expression von *yhgI* als Antwort auf die Einwirkung von Kanamycin. Kanamycin bindet irreversibel an die 30S Untereinheit (spezifisch an die Region der 16S rRNA) der Ribosomen, inhibiert die Proteinsynthese und führt zu Lesefehlern bei der Translation der mRNA. Kanamycin prägt eine konzentrationsabhängige bakterizide Wirkung aus. Der lethale Mechanismus von Aminoglycosidantibiotika ist nicht entgültig bekannt, vermutet werden Veränderungen in der Membran, Proteine mit Lesefehlern und sekundäre Effekte (Hancock, 1981). Zu überlegen bleibt, welchen Effekt Proteine mit Lesefehlern auf eine Zelle ausüben. Denkbar wäre Ablagerung der Proteine in „inclusion-bodies“. Bei einer Inkubation von *E. coli* Zellen mit dem Aminoglycosidantibiotikum Streptomycin wurde eine erhöhte Aktivität des *ibpAB*-Promotors beobachtet (Bianchi & Baneyx, 1999a). Bei IbpAB handelt es sich um Chaperone, die mit „inclusion-bodies“ assoziiert sind und eine Aggregation von hitzedenaturierten Proteinen mit den „inclusion-bodies“ verhindern (Narberhaus, 2002). Ursprünglich entdeckt wurden sie als „inclusion-body“-assoziierte Proteine bei der heterologen Expression von Proteinen (Allen *et al.*, 1992). Denkbar ist, dass auch andere Proteine, z.B. YhgI, an derartigen Aufgaben beteiligt sind.

Lesley *et al.* (2002) untersuchten in *E. coli* die Expressionsveränderungen als Antwort auf translationale Falschfaltung von Proteinen und identifizierten u.a. einen *rpoH*-abhängigen (σ^{32}) Anstieg der *yhgI*-Expression. Ein Stamm mit mutiertem *rpoH* zeigte eine geringere Zunahme der Expression. Neben *yhgI* und *ibpAB* zeigten jedoch auch andere kleine, saure Proteine eine erhöhte Expression. Die Autoren spekulierten für diese Proteine und YhgI eine IbpAB-ähnliche Funktion in der Erkennung und Trennung falschgefalteter Proteine. IbpAB werden jedoch am stärksten exprimiert und wurden bisher als einzigste assoziiert mit aggregierten, falschgefalteten Proteinen nachgewiesen (Allen *et al.*, 1992). Lesley & Knuth (2003) haben bezüglich dieser Untersuchungen ein Patent angemeldet (US patent application: 20030119094). Darin sind die identifizierten Promotoren zum Nachweis der Löslichkeit bzw. Unlöslichkeit eines exprimierten Proteins festgeschrieben. Die Autoren planen u.a. die erhöhte Expression des *yhgI*-Promotors als Reporter für die Falschfaltung von Proteinen zu verwenden. Die Methode soll z.B. beim „Screening“ einer Expressionsbank zur Identifizierung von Klonen angewendet werden, die eine lösliche Form eines gewünschten Proteins exprimieren. Weiterhin schließt sie Patentschrift eine neue Methode zur Identifizierung antibiotischer Verbindungen, welche die Proteinfaltung betreffen, ein. Eine Falschfaltung von Proteinen würde zu einer verstärkten Expression besagter Promotoren führen. Damit weist die Methode parallelen zu den Untersuchungen von Shaw *et al.* (2003) auf.

5.2 Hinweise aus der Proteinsequenz und Datenbanken

Die Literaturrecherchen hatte unterschiedliche Hinweise für eine mögliche Beteiligung von *yhgI* ergeben. Nach der CD-Datenbank (konservierte Domänen; (Marchler-Bauer *et al.*, 2003)) weist YhgI Ähnlichkeiten zu Thioredoxin-verwandten Proteinen/Domänen und anderen redoxaktiven Proteinen auf. Zudem ist das Sequenzhomolog von *Salmonella typhimurium* LT2 (NP_462414) als Thioredoxin-ähnliches Protein annotiert (McClelland *et al.*, 2001). Eine genauere Belegung dieser Annahme liegt

jedoch nicht vor und auch Sequenzvergleiche zwischen Yhgl aus *H. elongata* und TrxA aus *E. coli* K-12 hatten keine Ähnlichkeiten ergeben.

Allgemein sind Thioredoxine ubiquitär vorkommende, kleine, stark konservierte Proteine, die sich durch das Vorhandensein von Paaren konservierter Cysteinreste auszeichnen (Arner & Holmgren, 2000; Gleason & Holmgren, 1988). Als Oxidoreduktase katalysieren sie die Reduktion von Disulfiden und werden dabei oxidiert. Thioredoxin selbst wird durch die Thioredoxin-Reduktase reduziert. Dabei stellt NADPH die Elektronen zur Verfügung, die über FAD, das kovalent an die Thioredoxin-Reduktase gebunden ist, auf Thioredoxin übertragen werden.

In *E. coli* sind zwei cytoplasmatische Thioredoxine, TrxA (Holmgren, 1968) und TrxC (Miranda-Vizueté *et al.*, 1997) bekannt, obwohl im Genom nach oberflächlichen Recherchen ca. 10 Gene, die für Thioredoxin-ähnliche Proteine kodieren könnten, vorliegen (Ritz *et al.*, 2000). Zusätzlich gibt es noch Glutaredoxine, die strukturelle Ähnlichkeiten jedoch keine Sequenzähnlichkeiten aufweisen.

Zielproteine von TrxA sind die Ribonukleotid-Reduktase, die Methioninsulfoxid-Reduktase und die 3'-Phosphoadenylylsulfat (PAPS)-Reduktase des Sulfatassimilationswegs. TrxA ist an der Abwehr von oxidativem Stress beteiligt. Strukturelle Disulfidbrücken sind im Cytoplasma von Prokaryonten nicht bekannt, wären aufgrund der reduzierenden Verhältnisse auch instabil. Bei oxidativem Stress jedoch können durch reaktive Sauerstoffspezies spontan Disulfidbrücken entstehen. Diese und ebenfalls durch oxidativen Stress entstandenes Methioninsulfoxid können zur Inaktivierung von cytoplasmatischen Proteinen führen und werden unter Beteiligung von Thioredoxin entgiftet (Arner & Holmgren, 2000). Außerdem stellt TrxA die Elektronen für die periplasmatische Protein-Disulfid-Isomerase (DsbC) bereit (Rietsch *et al.*, 1997). TrxC kann einige dieser Funktionen ersetzen. *trxC* wird bei Einfluss von H₂O₂ unter Kontrolle des Aktivatorproteins OxyR verstärkt exprimiert, spielt also auch eine mögliche wichtige Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress (Ritz *et al.*, 2000).

Thioredoxin (TrxA) ist für *Bacillus subtilis* ein essentielles Protein, das bei verschiedenen Stress-situationen, u.a. bei Temperatur-, Salz- und Ethanolstress in unterschiedlichem hohem Maße induziert wird (Scharf *et al.*, 1998).

Nach einem hypoosmotischen Schock entlässt *E. coli* neben den akkumulierten kompatiblen Soluten auch 90 – 100 % des Thioredoxins über die großen mechanosensitiven Kanäle (MscL) in das Periplasma (Ajouz *et al.*, 1998; Berrier *et al.*, 2000). Dies könnte nur ein Nebeneffekt der geöffneten MscL sein, fraglich wäre dann jedoch, warum für ein Ausströmen von Soluten eine solch große Pore erforderlich ist. Berrier *et al.* (2000) mutmaßen in diesem Zusammenhang eine mögliche schädigende Wirkung einer hohen cytoplasmatischen Thioredoxin-Konzentration bei geringer Salinität oder eine physiologische Funktion im Periplasma.

Neben der Identifizierung einer Thioredoxin-ähnlichen Domäne, ließen sich Ähnlichkeiten zu NifU-Proteinen und anderen FeS-Cluster tragenden Proteinen ausmachen. Das Nitrogenase-assoziierte Protein NifU lässt sich in einer Vielzahl N₂-fixierender Bakterien, u.a. *Azotobacter vinelandii* identifizieren (Jacobson *et al.*, 1989; Kennedy & Dean, 1992). Es lassen sich aber auch in Teilen ähnliche, Nitrogenase-unabhängige Sequenzen (z.B. IscU) in *A. vinelandii* (Zheng *et al.*, 1998) und anderen Organismen, wie *E. coli* und *Haemophilus influenzae* finden. NifU bildet einen Homodimer. Jeder Monomer besteht aus drei Modulen, von denen jedes konservierte Cysteinreste aufweist (Frazzon *et*

al., 2002). Das N-terminale Modul enthält drei Cysteinreste, die vorübergehend FeS-Cluster ausbilden und diese an andere Proteine (Nitrogenase-Komponenten) weitergeben. Das zweite Modul enthält vier weitere Cysteine, die dauerhaft ein $[2Fe_2S]^{2+}$ -Cluster ausprägen (Agar *et al.*, 2000). Ein drittes Modul enthält zwei weitere Cysteine (CXXC) und zeigt Thioredoxin-ähnliche Merkmale (Frazzon *et al.*, 2002).

IscU weist eine zum N-terminalen Modul von NifU ähnliche Sequenz auf und ist an der FeS-Clusterbildung anderer zellulärer Prozesse beteiligt. Es weist jedoch kein Modul mit permanentem FeS-Cluster und auch keine Thioredoxin-ähnliche Domäne auf. Die Aktivität des ersten Moduls wird durch ein Ferredoxin kompensiert und für die Thioredoxin-ähnliche Domäne wird es vermutlich an unbekannter Stelle auch ein Ersatzprotein geben (Frazzon *et al.*, 2002). Benachbart zu der IscU-Region liegen die koexprimierten molekularen Chaperone (HscA und HscB), die große Sequenzähnlichkeiten mit DnaK und DnaJ aufweisen. IscU interagiert mit diesen (Hoff *et al.*, 2000; Tokumoto *et al.*, 2002) und fördert ihre ATPase-Aktivität. Möglicherweise assistieren diese Chaperone beim Einbau von FeS-Clustern in Proteine, während diese gefaltet werden (Frazzon *et al.*, 2002).

5.3 Ausrichtung der geplanten Experimente

Nach den Literaturrecherchen ergaben sich eine Vielzahl von Hinweisen auf mögliche Funktionen von *yhgI/Yhgl*. Die Hinweise auf Kompetenzgene, Thioredoxin und Proteinfaltung waren dabei am konkretesten. Daher sollten diesen Hinweisen in den experimentellen Untersuchungen nachgegangen werden.

6. Untersuchung einer Beteiligung von Yhgl an Kompetenzmechanismen

6.1 Nutzung des BacterioMatch® Two-Hybrid-Systems zur Identifizierung möglicher Bindungspartner von Yhgl

Die Literatur hatte Hinweise auf eine Verbindungen von *yhgI* und Kompetenzgenen ergeben (Finkel & Kolter, 2001). Die Autoren hatten in diesem Zusammenhang die Verknüpfung der Kompetenzgene und der Versorgung mit Nährstoffen nachgewiesen. Völlig ausgeschlossen werden konnte dieser Denkansatz nicht, da eine behinderte Nährstoffversorgung zu einem Wachstumsdefizit führen würde. Außerdem könnten bei einem Membranprozess, wie ihn die bakterielle Kompetenz darstellt, Defekte zu einem Integritätsverlust der Membran führen. Beide Effekte könnten dann auch bei so unterschiedlichen Mikroorganismen wie dem halophilen *H. elongata* und dem nicht-halotoleranten *E. coli* zu einem ähnlichen Phänotyp führen.

Es gab daher die Idee, dass bei einer Beteiligung an einem gemeinsamen zellulären Prozess eine direkte Wechselwirkung beteiligter Komponenten erforderlich sein könnte. So handelt es sich bei dem Apparat zur Aufnahme freier DNA um ein komplexes Gebilde aus einer Vielzahl wechselwirkender Proteine (Review, (Lacks, 1999)). Auch wenn eine Beteiligung von Yhgl an der natürlichen Kompetenz nur gemutmaßt wurde (Finkel & Kolter, 2001), war geplant mögliche Wechselwirkungen zwischen

YhgI und YhgH, einer nachgewiesenen Komponente des DNA-Aufnahmeapparates, zu untersuchen. Dabei wurde angenommen, dass benachbart angeordnete Proteine möglicherweise auch in dem Komplex benachbart angeordnet sind oder an aufeinanderfolgenden Prozessen teilhaben. Als alternativer Ansatz sollten in einem Parallelexperiment mögliche unbekannte Wechselwirkungspartner von YhgI durch das „Screening“ einer Genbank identifiziert werden. Hierbei bestand aber auch die Möglichkeit einer Bestätigung der Beteiligung von *yhgI* an Kompetenzmechanismen.

Die Untersuchungen mit dem BacterioMatch® Two-Hybrid-System ergaben keinen Nachweis einer Wechselwirkung von YhgI aus *H. elongata* bzw. *E. coli* mit YhgH und auch keinen Hinweis auf die Bildung von Homooligomere der einzelnen Proteine. Dieses negative Ergebnis ist jedoch weniger schwer zu gewichten als ein positives. Negative Ergebnisse in Two-Hybrid-Systemen müssen nicht unbedingt in einer nicht-erfolgenden Interaktion der beiden Proteine begründet sein, sondern können Probleme bei der Expression der Fusionsproteine und sterische Probleme bei Interaktion der Fusionsproteine als Grund haben. Eine Wiederlegung der Kompetenzbeteiligung von *yhgI* stellt das Ergebnis nicht dar.

Ein Problem bei den vorliegenden Untersuchungen war die hohe Grundexpression der Reportergene. So zeigte die Negativkontrolle, welche die beiden nicht rekombinanten Plasmide enthielt, ohne die Zugabe des β -Galaktosidasehemmstoffes (PETG) eine Blaufärbung der Kolonien, die von der Positivkontrolle nicht zu unterscheiden war. Außerdem zeigte die Negativkontrolle eine Resistenz gegenüber mindestens 300 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin. Im Vergleich dazu ist für eine übliche Selektion Carbenicillin-resistenter Klone eine Carbenicillin-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ vollkommen ausreichend. Mittlerweile wurden die Probleme vom Hersteller Stratagene erkannt und der Reporterstamm (BacterioMatch® I) durch einen anderen (BacterioMatch® II) mit alternativen Reportergenen ersetzt. Der neue Reporterstamm weist eine Interaktion zweier Proteine durch Komplementierung einer Histidin-Auxotrophie und eine Resistenz gegenüber Streptomycin nach.

Unbekannte Wechselwirkungspartner von YhgI in *H. elongata* konnten nicht gefunden werden, da die Herstellung einer *H. elongata* Genbank nicht möglich war. Dies lag vermutlich an dem für die Klonierung der Genbank genutzten Stamm *E. coli* XL1-blue MRF^RKan^R. Dieser scheint eine Unverträglichkeit mit der genomischen DNA von *H. elongata* aufzuweisen. Denkbar ist eine störendes Methylierungsmuster der *H. elongata* DNA. Das Problem war schon vorher bei der Erstellung einer pHSG575-kodierten Genbank mit *H. elongata* DNA in *E. coli* XL1-blue aufgetreten (Kunte, persönliche Mitteilung). Hinweise auf eine störende Methylierung hatten sich auch bei der Klonierung des Tn1732-Insertionsortes von *H. elongata* ABU44 ergeben (Burdziak, 1999). Hier hatte an einer *Sal*I-Schnittstelle, die mittlerweile durch dreifache Sequenzierung bestätigt ist, keine Restriktion stattgefunden. *Sal*I reagiert nach Angaben der Fa. New-England-biolabs empfindlich auf Methylierung. Ein alternativer *E. coli* Klonierungsstammes konnte nicht verwendet werden, da nur der verwendete *E. coli* XL1-blue MRF^RKan^R den erforderlichen genetischen Hintergrund (z.B. *lac*^R) aufwies. Versuche die nicht rekombinanten Plasmide pBT und pTRG in den alternativen Klonierungsstamm *E. coli* DH5 α zu transformieren, schlugen fehl.

Eine Alternative für zukünftige Untersuchungen wäre die Nutzung einer *E. coli* K-12 Genbank, die keine Probleme bei deren Erstellung in *E. coli* XL1-blue MRF^RKan^R bereiten dürfte. Auch hier wäre mit

der Identifizierung von Bindungspartner zu rechnen, auch wenn es nicht unbedingt die gleichen wie bei *H. elongata* sein müssten. Jedenfalls ergäben sich mögliche Hinweise auf zelluläre Funktionen. Zwischenzeitlich werden durch den Anbieter des Systems (Stratagene) vorgefertigte Genbanken für eine „Screening“ angeboten. Darunter befinden sich cDNA-Banken von Mensch, Maus, Ratte und Hefe. Genbanken von Prokaryonten sind bisher nicht erhältlich, wären jedoch eine zeitsparende Alternative.

6.2 Wachstumsverhalten der *yhgH*-Mutanten von *E. coli* K-12

Durch die Untersuchungen mit dem Two-Hybrid-System hatten sich keine Hinweise auf eine Interaktion von Yhgl und YhgH ergeben. Da es sich bei diesem Verfahren jedoch um Experiment handelt, dass durch verschiedenste Parameter zu einem negativen Verlauf führen kann, wurde geplant weitere Untersuchungen an *yhgH* durchzuführen. So sollte der ORF des Gens deletiert werden und der Phänotyp der erstellten Mutante bestimmt werden. Bei einer Beteiligung an einem gemeinsamen zellulären Prozess wurde mit einem salzsensitiven Wachstumsverhalten, das dem von *E. coli* BK1 entspricht, gerechnet. *E. coli* BK2 ($\Delta yhgH$) zeigte dann auch ein *E. coli* BK1 ($\Delta yhgl$) entsprechendes Wachstumsverhalten. Komplementierungsexperimente mit *E. coli* BK2 und kloniertem *yhgl_{Ec}* und *yhgH* deckten jedoch eine Komplementierbarkeit des Defektes mit kloniertem *yhgl_{Ec}* auf und wiesen damit einen Ausfall der Expression von *yhgl_{Ec}* durch die vollständige *yhgH*-Deletion nach.

Mutanten mit Teildeletionen von *yhgH* (*E. coli* BK3 und BK4) zeigten bei steigender Salinität ein dem Wildtyp entsprechendes Wachstumsverhalten. Weitere Untersuchungen zum Phänotyp von *E. coli* BK3 und BK4 wurden nicht durchgeführt, da nach diesen Ergebnissen eine Beteiligung von *yhgl* und *yhgH* an einem gemeinsamen Prozess unwahrscheinlich erschien.

6.3 Eine Beteiligung von Yhgl an Kompetenzmechanismen lässt sich nicht bestätigen

Die bisherigen Ergebnisse sprechen gegen eine Beteiligung von *yhgl* an Kompetenzmechanismen, da die *yhgl*-Deletionsmutante von *E. coli* K-12 (BK1) einen anderen Phänotyp aufweist als die Mutanten mit Teildeletionen von *yhgH* (BK3 und BK4). Auch einige neuere Erkenntnisse der Literatur deuten bei näherer Betrachtung auf eine Unabhängigkeit von Kompetenzmechanismen hin. So zeigen die unterschiedlichen *Buchnera* Stämme neben einer Abstimmung des Syntheseapparates auf den Wirt eine allgemeine Reduktion von Genen für DNA-Aufnahme, Reparatur und Rekombination. Zu erwähnen ist hier ein Verlust von *recA* und *recF*, die für DNA-Neuordnungen erforderlich sind (Silva *et al.*, 2003; Tamas *et al.*, 2002), aber auch der Kompetenzgene ausgenommen *yhgl*. Durch diese Reduzierung kann das Genom vor zu großen Veränderungen bewahrt werden, die bei der sehr engen symbiotischen Bindung zwischen *Buchnera* und Aphid-Wirt (Läuse) nicht erforderlich oder sogar hinderlich sind. Fraglich bleibt jedoch, warum *yhgl* bei einer derartigen Genomreduktion als einziges Kompetenzgen, ohne eine ausprägbare Kompetenz zur DNA-Aufnahme, vorhanden geblieben sein sollte.

Bei den *Buchnera* Stämmen handelt es sich um phylogenetisch enge Verwandte von *E. coli*, mit dem sie einen gemeinsamen Vorfahren besitzen (Moran & Mira, 2001). Ausgehend von diesem rekonstruierten Vorfahren hat einerseits die Genomreduktion zu *Buchnera*, aber auch die Entwicklung zu *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis* und *Klebsiella pneumoniae* stattgefunden (Abb. 55).

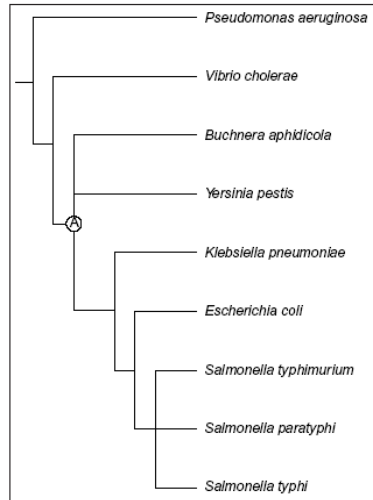


Abb. 55: Darstellung der 16S rRNA-basierten phylogenetische Verwandtschaft von *Buchnera aphidicola*, *E. coli* und verwandten Gattungen mit einem rekonstruierten, freilebenden Vorfahren von *Buchnera* (A)
Abbildung: (Moran & Mira, 2001).

Betrachtet man die Anordnung der Gene im Bereich von *yhgI*, findet man ähnliche Anordnungen bei *Vibrio cholerae*, *E. coli* und *Yersinia pestis* mit vorhandenem *yhgH* und *bioH*. Bei den unterschiedlichen *Buchnera aphidicola* Stämmen ist *yhgI* vorhanden, teilweise auch *bioH*, *yhgH* jedoch nicht. In *B. aphidicola* str. Bp (Symbiont von *Baizongia pistaciae*) ist *bioH* als funktionelles Gen vorhanden, in *B. aphidicola* str. Sg (Symbiont von *Schizaphis graminum*) als Pseudogen und in *B. aphidicola* str. APS (Symbiont von *Acyrtosiphon pisum*) gar nicht ((van Ham *et al.*, 2003); supporting information: www.pnas.org/cgi/content/abstract/100/2/581). Pseudogene sind Gene, die durch Leserasterverschiebung oder Einführung von Stoppcodons inaktiviert wurden (Andersson & Andersson, 2001). Sie wurden zuerst bei *Lactococcus lactis* als inaktive Gene beschrieben (Delorme *et al.*, 1993). Pseudogene treten bei vielen symbiontischen Mikroorganismen auf und stellen einen Weg bei der Genomreduktion dar (Mira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001). Eine vergleichbare Genanordnung dieser eng verwandten Stämme deutet darauf hin, dass schon der gemeinsame Vorfahre diese „geclusterte“ Genanordnung von *yhgH* und *yhgI* aufwies. Es ist unter dieser Annahme unwahrscheinlich, dass, bei Reduzierung der Genausstattung in *Buchnera* auf ein nahezu Mindestmaß (Gil *et al.*, 2002), zusammenhängende Kompetenzgene nicht gemeinsam verloren gingen und einzelne Gene (*yhgI*) ungenutzt im Genom zurückbleiben. Betrachtet man die Genanordnung von *Buchnera* im Bereich von *yhgI* fallen größere Lücken mit nicht-kodierenden DNA-Bereichen auf. Diese deuten auf die erfolgten reduktiven Prozesse hin.

Auch die *E. coli* verwandten Stämme *Wigglesworthia glossinidia* (Symbiont von *Glossina brevipalpis*) und *Blochmannia floridanus* (Symbiont von *Camponotus floridanus*, Ameise) haben ähnliche Genomreduktionen wie die *Buchnera* Stämme erfahren, aber auch bei ihnen ist *yhgI* im Genom vorhanden

(Akman *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2003). Gleichzeitig fehlen ihnen nach eigenen Analysen der Genomsequenz *yhgH* sowie die übrigen Kompetenzgene.

In *Buchnera aphidicola*, *Wigglesworthia glossinidia* und *Blochmannia florianus* könnte jedoch auch eine funktionelle Umgestaltung *yhgI*/YhgI erfolgt sein, zur Erlangung einer neuen Aufgabe im Stoffwechsel. Um ein nicht funktionelles Pseudogen wird es sich bei *yhgI* nicht handeln, da sich in Sequenzvergleichen keine Hinweise auf Leserasterverschiebungen oder eingeführte Stoppcodons, die zu einem verkürzten Protein führen, ergeben haben.

Vergleiche YhgI-ähnlicher Proteinsequenzen hatten deutliche Unterschiede in der Lage der theoretischen isoelektrischen Punkte ergeben. So liegen die Wert bei freilebenden Organismen, wie z.B. *H. elongata*, *E. coli* und den *Pseudomonas* Stämmen, bei ca. 4,5 , während der pI-Wert bei *Buchnera aphidicola* str. APS bei 6,59 liegt (siehe Ergebnisse Abschnitt 11.1). Dies würde zunächst auf eine funktionelle Umgestaltung der Proteine hindeuten. Betrachtet man jedoch andere zelluläre Komponenten, fällt hierbei auf, dass auch andere cytoplasmatische Protein wesentlich basischer sind (Tab. 20). Es lässt sich jedoch auch erkennen, dass die YhgI-Proteine bei den untersuchten Organismen jeweils saurer sind als der Durchschnitt der übrigen Proteine. Dies könnte eine trotz der physikalischen Unterschiede prinzipiell ähnliche Funktion der YhgI-Proteine andeuten.

Gen	Funktion des Produktes	Theoretischer isoelektrischer Punkt	
		<i>B. aphidicola</i> str. APS	<i>E. coli</i> K-12
<i>yhgI</i>	?	6,59	4,52
<i>ibpA</i>	α -kristallines Heat-Schock-Prot.	6,9	5,57
<i>rpoH</i>	Heat-Schock-Sigma-Faktor	9,76	5,64
<i>tufB</i>	Elongationsfaktor (EFTu)	5,57	5,3
<i>bioB</i>	Biotin-Synthase	9,08	5,32
<i>gapA</i>	Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase	9,08	6,61
<i>pgi</i>	Glucose-6-P-Isomerase	9,31	5,85

Tab. 20: Theoretische isoelektrische Punkte ausgewählter Proteine von *Buchnera aphidicola* str. APS und *E. coli* K-12

Zusätzliche, besonders deutliche Unterschiede hatten sich zwischen den *yhgI* DNA-Sequenzen ergeben. Die Sequenzen obiger Symbionten wiesen die größten Unterschiede im Vergleich zu den übrigen DNA-Sequenzen auf. Aber auch dies stellt keinen Hinweis auf eine funktionelle Änderung dar, da es bei diesen Stämmen im Rahmen der Genomreduktion generell zu einer Verschiebung zu AT-reichen DNA-Sequenzen gekommen ist. Die Sequenzen weisen daher einen wesentlich geringeren GC-Gehalt als z.B. die Sequenzen von *H. elongata* und *E. coli* auf.

Mikroorganismus	GC-Gehalt (%)
<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	16,7
<i>Buchnera aphidicola</i> sp. APS	28,67
<i>Blochmannia florianus</i>	27,83
<i>Halomonas elongata</i>	64,13
<i>Escherichia coli</i>	53,3

Tab. 21: GC-Gehalt ausgewählter *yhgI*-Sequenzen

Eine Genreduktion auf ein Kerngenom in unterschiedlichen Gattungen unter einer zufälligen Aussparung eines homologen, nicht benötigten Kompetenzgens erscheint unwahrscheinlich. Vielmehr scheint der Organismus einen Nutzen von *yhgI* zu besitzen, der mit großer Wahrscheinlichkeit jedoch unabhängig von bakterieller Kompetenz ist. Zusammengefasst deuten die bisherigen Ergebnisse mit den Erkenntnissen der Literatur auf eine unbekannte, jedoch wichtige und zentrale Funktion in den zellulären Prozessen von γ -Proteobakterien hin.

7. Analysen der Transkriptionsregulation

Eine physiologische relevante Koexpression von *yhgH* und *yhgI* aus *E. coli* K-12 in einem dicistronischen Operon schien nach der Charakterisierung der *yhgH*-Mutante *E. coli* BK2 unwahrscheinlich. Es hätte in einem discistronischen Operon nach der Deletion von *yhgH* eine Expression von *yhgI* erfolgen müssen, was aber nicht der Fall war. Dies wurde durch die Komplementierung des salzsensitiven Phänotyps von *E. coli* BK2 mit kloniertem *yhgI_{Ec}* nachgewiesen.

Der Vergleich des Wachstumsverhaltens der *yhgH*-Mutanten *E. coli* BK2 ($\Delta yhgH \Delta bioH$ 1-11), BK3 ($\Delta yhgH$ 52-618) und BK4 ($\Delta yhgH$ 522-729) ließ auf das Vorhandensein mehrerer transkriptionsregulatorischer Elemente, welche die Expression von *yhgI_{Ec}* steuern, im ORF von *yhgH* vermuten.

So zeigte das Wachstum von BK2, dass nun keine funktioneller Promotor mehr vor *yhgI* lokalisiert sein durfte. Da eine Komplementierung mit kloniertem *yhgI* (Primer *yhgIEc1* und *yhgIEc2*) aus *E. coli* K-12 möglich war, wurde mindestens 1 funktioneller Promotor (σ^{70}) in diesem Konstrukt vermutet. Bestätigt wurde dies durch das Wachstum der Mutante BK3. In dieser Mutante war neben dem ORF von *yhgI_{Ec}* ungefähr derselbe C-terminale Bereich von *yhgH* vorhanden, der auch auf dem für die Komplementierung von BK2 verwendeten PCR-Produkt vorlag. In BK4 wurde der C-terminale Bereich von *yhgH* deletiert, der für einen Phosphoribosyl-Transferase-ähnlichen Bereich kodiert. Einzig das Stoppcodon blieb vorhanden. Trotzdem wuchs die Mutante wie der Wildtyp. Folglich musste trotz Deletion im Bereich des Stoppcodons oder in dem Bereich stromaufwärts der Deletion (σ^{54} -abhängig, wie sich später herausstellte) ein Promotor vorhanden sein. Daher wurde mit mindestens zwei Promotoren oder regulatorischen Elementen stromaufwärts von *yhgI* aus *E. coli* gerechnet. Aufgrund dieser Überlegungen wurde unabhängig von einer Funktionszuordnung für *yhgI* die Bestimmung der zugehörigen Transkriptionsstartpunkte in *H. elongata* und *E. coli* durchgeführt. Auch Erkenntnisse der Expressionsregulation können zum Verständnis eines Anpassungsmechanismus beitragen.

Die RACE-PCR-Analysen zur Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte und Promotoren von *yhgI* ergaben im Fall von *E. coli* drei und im Fall von *H. elongata* zwei hypothetische Promotoren. Diese gehören bei *E. coli* zu den Gruppen der σ^{70} -, σ^{32} - und σ^{54} -abhängigen Promotoren (Wösten, 1998), bei *H. elongata* zu den Gruppen der σ^{70} - bzw. σ^{32} -abhängigen Promotoren. Die nicht in allen Fällen bis auf die genaue Base bestimmbaren Transkriptionsstartpunkte stellen hierbei keine wesentlichen Einschränkungen dar, da sie nur also Anhaltspunkte für die Identifizierung der vorgelagerten Promotorsequenzen dienten. Aus der Identifizierung des Tn1732-Insertionsortes in *H. elongata* ABG31 konnten

keine weiteren Erkenntnisse über die Transkriptionsregulation von *yhgI* aus *H. elongata* gewonnen werden, da der Insertionsort mit dem von ABU44 identisch ist. Die Expression der unterschiedlichen Promotortypen geschieht in Abhängigkeit Promotor-spezifischer σ -Faktoren im Komplex mit dem Holoenzym der RNA-Polymerase.

7.1 σ^{70} -abhängige Promotoren

Verallgemeinernd gesagt, reguliert die σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase in Bakterien die Transkription der Gene, die während des exponentiellen Wachstums exprimiert werden. Die als primärer σ -Faktor bezeichnete Untereinheit ist daher für das Überleben der Zellen essentiell.

Ein σ^{70} -Promotor ist durch konservierte -35 und -10-Regionen gekennzeichnet, die 16 - 18 bp voneinander entfernt liegen. Die -10-Region liegt, wie durch die Bezeichnung angedeutet, in der Regel maximal 10 bp vom zugehörigen Transkriptionsstartpunkt entfernt, die -35-Region entsprechend. Untersuchungen verschiedener σ^{70} -abhängiger Promotoren aus *E. coli* ergaben, dass große Abweichungen in der Consensus-Sequenz zu einer verringerten Aktivität des Promotors führen (Dombroski *et al.*, 1992; Moyle *et al.*, 1991). Nach Angaben von Miller (1992), die auf Untersuchungen der *lac*-Promotorregion aus *E. coli* basieren, wird die Promotoraktivität vor allem durch Basenaustausche in der -35-Region stark verringert. Eine abweichende Basenabfolge in der -10-Region verringert die Transkriptionseffizienz dagegen nur geringfügig.

Durch den ersten in *H. elongata* identifizierten Transkriptionsstartpunkt konnte der nach Computeranalysen vorhergesagte σ^{70} -abhängige Promotor (Burdziak, 1999) in *H. elongata* bestätigt werden. Verglichen mit der Consensus-Sequenz bekannter Promotoren aus *E. coli* weicht die -10-Region in zwei von sechs Basen ab und auch in der -35-Region weichen zwei von sechs Basen ab (Abb. 56). Damit handelt es sich nach Vorgaben von Miller (1992) um einen schwächeren Promotor. Die vorgelegte AT-reiche Region könnte in ihrer Funktion als „a-tract“ oder „UP-element“ durch Anbindung an die α -Untereinheit der RNA-Polymerase oder durch Krümmung der DNA zu einer Verstärkung des Promotors führen (Aiyar *et al.*, 1998; Estrem *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1998).

Die identifizierten Regionen weisen einen Abstand von 17 bp auf. Der Transkriptionsstartpunkt ist 58 bp stromaufwärts von *yhgI* lokalisiert und weist damit einen Abstand von 15 bp zur -10-Region des Promotors auf. Damit liegt der Abstand jedoch deutlich über den namensgebenden 10 bp, außerdem weicht die Lokalisation deutlich von den Computervorhersagen ab (Burdziak, 1999). Denkbar ist ein Abbruch der cDNA-Synthese für die RACE-PCR oder einer Instabilität der mRNA. Eine schlechtere Qualität der *H. elongata* mRNA deutet sich auch durch die unklare Produktbande der RACE-PCR an. Beides führt zu einem falsch-bestimmten Transkriptionsstartpunkt. Denkbar jedoch ist auch eine Promotoranordnung in *H. elongata*, die von üblichen *E. coli* Promotoren abweicht. Bei dem bestimmten Promotor handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit jedoch um den gesuchten, da schon am Wachstumsverhalten der Transposonmutante *H. elongata* ABU44 ein Einfluss auf die *yhgI*-Expression erkennbar gewesen ist (Burdziak, 1999).

		-35		-10	+1	+1
HPr1: Pos. 2507	5'	...	<u>TTGTCTCGACGCCATCGCTCGCT</u> <u>TACCAT</u> <u>TAGGG</u> <u>AAAACACCGAT</u> <u>TATTCCG</u> ...			
			+++--		++----	
Con. Seq.: σ^{70}			TTGACA	(n) ₁₆₋₁₈	TATAAT	
			+++---		+++++	
EPr1: Pos. 2075	5'	...	<u>TTGTAGAGCCTCGATGATGGGCG</u> <u>TATTATAACCAACT</u> <u>AAAAATA</u> ...			
			-35	-10	+1	

Abb. 56: Vergleich der identifizierten σ^{70} -abhängigen Promotoren mit der entsprechenden Consensus-Sequenz

Die in *H. elongata* (HPr1) und *E. coli* (EPr1) identifizierten hypothetischen Promotoren sind der Consensus-Sequenz eines σ^{70} -abhängigen Promotors gegenübergestellt. Grau unterlegt sind die Kernbereiche des Promotors (Wösten, 1998). „+“ und „-“ markieren Übereinstimmungen bzw. Abweichungen von der Consensus-Sequenz. „+1“ markiert die identifizierten Transkriptionsstartpunkte. Einfach unterstrichen sind die mittels RACE-PCR identifizierten Startpunkte, doppel unterstrichen der mittels Computeranalysen vorhergesagte Startpunkt (Burdziak, 1999).

Auch bei dem ersten in *E. coli* identifizierten Promotor handelt es sich um einen σ^{70} -abhängigen Promotor, der in der -35-Region in drei von sechs Basen und in der -10-Region in einer von sechs Basen von der jeweiligen Consensus-Sequenz abweicht (Abb. 56). Der Abstand dieser Regionen beträgt 17 bp. Der zugehörige Transkriptionsstartpunkt liegt 7 bp stromabwärts und damit 27 bp vom *yhgI*-Startcodon entfernt. Die Abweichungen von der Consensus-Sequenz weisen den Promotor als schwachen Promotor aus (Miller, 1992).

7.2 σ^{32} -abhängige Promotoren

σ^{32} -abhängige Promotoren sind vor Genen lokalisiert, die für Proteine mit speziellen Aufgaben in der Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels versehen sind (Gross, 1996). Es handelt sich in der Mehrzahl um Gene für sog. „Heat-shock“-Proteine (Hsp) und Chaperone. Für die Expression dieser Promotoren ist ein spezieller σ -Faktor (σ^{32}), der durch *rpoH* kodiert wird, erforderlich. Die Kontrolle der Expression dieser Gene erfolgt durch veränderliche σ^{32} -Translation (*rpoH*-mRNA), Stabilität und Aktivität. Nach Temperaturschocks (30 °C auf 42 °C) erhöht sich der Level von σ^{32} innerhalb kürzester Zeit von ca. 10 Molekülen auf das bis zu 15-fache (Gross, 1996). Dabei hat erhöhte Translation einen größeren Anteil als Transkription (Nagai *et al.*, 1991). Die Stabilität und Aktivität wird durch das Chaperon DnaK und seine Cochaperone DnaJ und GrpE beeinflusst (Bukau, 1993; Liberek & Georgopoulos, 1993). Möglicherweise führt die Bindung von DnaK an σ^{32} zu einem Abbau von σ^{32} durch die Protease FtsH (Arsene *et al.*, 2000; Tomoyasu *et al.*, 1995). Bei steigenden Temperaturen bindet DnaK bevorzugt denaturierte Proteine und entlässt σ^{32} aus dem Komplex (Gamer *et al.*, 1996). Das Resultat ist eine gesteigerte Stabilität von σ^{32} . Sinkende Temperaturen kehren diesen Mechanismus um.

Wie σ^{70} -abhängige Promotoren zeichnen sich σ^{32} -abhängige Promotoren durch konservierte -35 und -10-Regionen aus. Der Abstand dieser Regionen beträgt 11 bis 16 bp (Wösten, 1998).

Der zweite in *H. elongata* identifizierte Promotor weist Ähnlichkeiten zu σ^{32} -abhängigen Promotoren auf (Abb. 57). Hier jedoch gibt es starke Abweichungen. So weicht die -35-Region in drei von sieben

Basen von der Consensus-Sequenz ab, die –10-Region in zwei von sieben Basen. Es scheint sich um einen schwächeren Promotor zu handeln. Erschwerend kommt hinzu, dass der Promotor ca. 1,32 kb stromaufwärts von *yhgI* liegt. Eine Erklärung für eine derartig große Entfernung eines Promotors von seinem Zielgen könnte eine mit der Länge des Transkriptes varrierende mRNA-Stabilität sein. So führen stabile 5'-gelegene Sekundärstrukturen von RNA zu Stabilität stromabwärtsgelegener Sequenzen (Emory *et al.*, 1992) während 3'-gelegene Polyadenylierungen zu einem bevorzugten Abbau der mRNA (Sarkar, 1997) führen. Dieser Abbau geschieht durch Zusammenwirken von Exo- und Endonukleasen. Der Abbau der mRNA spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Expression vieler Gene (Kushner, 2002). Sollte aufgrund einer Stresseinwirkung eine erhöhte Expression von *yhgI* erforderlich sein, könnte eine stabilere mRNA dies ermöglichen.

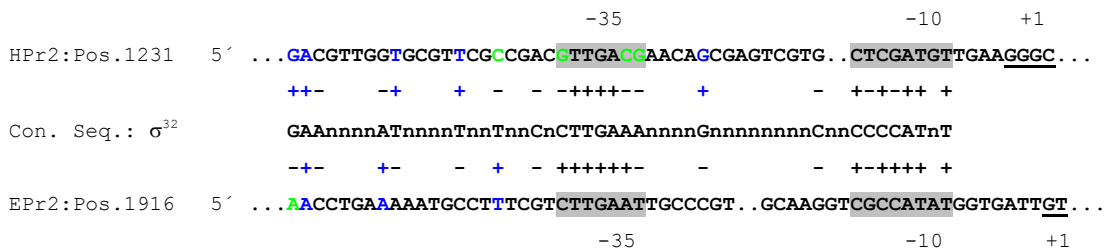


Abb. 57: Vergleich der identifizierten σ^{32} -abhängigen Promotoren mit der entsprechenden Consensus-Sequenz

Die in *H. elongata* (HPr2) und *E. coli* (EPr2) identifizierten hypothetischen Promotoren sind der Consensus-Sequenz eines σ^{32} -abhängigen Promotors gegenübergestellt. Grau unterlegt sind die Kernbereiche eines sog. „Heat-Shock“-Promotors (Wösten, 1998). „+“ und „-“ markieren Übereinstimmungen bzw. Abweichungen von der Consensus-Sequenz. „n“ steht für eine beliebige Base. „+1“ markiert die identifizierten Transkriptionsstartpunkte. Die übrigen Basen der Consensus-Sequenz sind einer eigens erstellten Häufigkeitsverteilung (Makelogo (Schneider & Stephens, 1990)) einzelner Basen in σ^{32} -abhängigen Promotoren entnommen, die sich der Sequenzen von „Heat-Shock“-Promotoren aus Gross (1996) bedient. Blau markiert sind Übereinstimmungen im Bereich dieser erweiterten Consensus-Sequenz, grün dargestellt sind am zweithäufigsten vorkommenden Basen der entsprechenden Position. Durch Einbezug dieser Basen ergibt sich eine leicht erhöhte Konservierung. Die Punkte (.) in der DNA-Sequenz stellen eine beliebig positionierte, nicht vorhandene Lücke der Sequenz dar. Bedingt ist diese Lücke durch unterschiedliche Abstände zwischen der –35 und –10-Region der für die Erstellung der Consensus-Sequenz herangezogenen Promotoren.

Auch der zweite in *E. coli* identifizierte Promotor ähnelt einem σ^{32} -abhängigen Promotor (Abb. 57). Der Transkriptionsstartpunkt des in *E. coli* identifizierten Promotors liegt 440 bp stromaufwärts von *yhgI*. Die identifizierten –10 und –35-Regionen stimmen jeweils in sechs von sieben Basen mit der Consensus-Sequenz überein. Es ist daher von einem starken Promotor auszugehen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die dem Promotor vorgelagerte AT-reiche Region. Das Vorhandensein dieses σ^{32} -abhängige Promotors in *E. coli* wird durch die Untersuchungen von Lesley *et al.* (2002) unterstützt, die eine *rpoH*-(σ^{32})-abhängige Expression von *yhgI* als Antwort auf eine Proteinfalschaltung nachgewiesen hatten.

7.3 σ^{54} -abhängige Promotoren

Bei dem dritten in *E. coli* identifizierten Promotor handelt es sich um einen σ^{54} -abhängigen Promotor (Abb. 58). Der Aufbau dieser Promotoren unterscheidet sich grundlegend von einem σ^{70} - bzw. σ^{32} -abhängigen Promotor. So gibt es statt der konservierten –35 und –10-Regionen konservierte –24 und –12-Regionen. Der Abstand zwischen diesen Regionen (5 bp) unterliegt weniger Variationen als bei den anderen beiden Promotorklassen. σ^{54} wurde während der Analyse der Glutamin-Synthetase und Stickstoffassimilation in Enterobakterien entdeckt (Hirschman *et al.*, 1985). Später stellten sich jedoch vielseitigere Funktionen in der Verwertung von Kohlenstoffquellen, Fermentationsprozessen, Flagellensynthese und bakterieller Virulenz heraus (Review (Reitzer & Schneider, 2001)). Nach heutigem Wissensstand sind σ^{54} -abhängige Promotoren an Funktionen zur Adaptation an raue metabolische und umweltbedingte Verhältnisse beteiligt (Kustu *et al.*, 1989).

Im Gegensatz zu einer RNA-Polymerase mit komplexiertem σ^{70} -Faktor, kann der Komplex mit σ^{54} den zur RNA-Synthese notwendigen offenen Promotorkomplex nur mit Hilfe von Aktivatoren ausbilden. Eine σ^{54} -abhängige Expression kann daher vollständig abgeschaltet werden. Die Aktivatoren ähneln in ihrer Funktion eukaryontischen Enhancer, die unabhängig von Orientierung und Lokalisation an ihre Zielsequenz binden und die Transkription aktivieren (Buck *et al.*, 2000). Die Wechselwirkung des Aktivatorproteins (z.B. NifA) mit σ^{54} erfordert eine Biegung der DNA, die durch ein spezielles Protein (IHF, integration host factor) hervorgerufen wird (Hoover *et al.*, 1990). Alternativ kann diese Biegung auch durch eine sequenzbedingte DNA-Krümmung hervorgerufen werden (Carmona *et al.*, 1997).

Vergleiche des in *E. coli* K-12 identifizierten σ^{54} -abhängigen Promotors zeigen in der –24-Region eine Abweichung auf sechs Basen, in der –12-Region ist eine Abweichung auf fünf Basen vorhanden. Der Abstand zwischen beiden Regionen beträgt, wie in der Literatur angegeben, 5 Basen (Barrios *et al.*, 1999). Es kann also vom Vorhandensein eines σ^{54} -abhängigen Promotors stromaufwärts von *yhgI* aus *E. coli* ausgegangen werden. Bestärkt wird dies noch durch eine stromaufwärts des Promotors gelegene hypothetische Anbindungsstelle für die Aktivatorproteine GlnG/NtrC bzw. NifA (Ow *et al.*, 1983). NifA ist ein Transkriptionsaktivator, der auch die Expression der Nitrogenase-Gene aktiviert (Hoover *et al.*, 1990).

```

                                     +1
EcPr3:Pos. 1674 5' ... TGTCACGTCTGTTACTATTGGAAGTCTTACAC...
                                     +-+----+-+----+-+
Consensus:  $\sigma^{54}$  TGGCACGGCTCTTGCW
                                     -24      -12

```

Abb. 58: Vergleich des identifizierten σ^{54} -abhängigen *E. coli* Promotors mit der entsprechenden Consensus-Sequenz

Die vorhergesagte Promotorsequenz im Bereich des dritten Transkriptionsstartpunktes zeigt Ähnlichkeiten zu σ^{54} -abhängigen Promotoren. **Grau unterlegt** ist der Kernbereich eines σ^{54} -abhängigen Promotors (Wösten, 1998). „+“ und „-“ markieren Übereinstimmungen bzw. Abweichungen von der Consensus-Sequenz. „+1“ markiert den identifizierten Transkriptionsstartpunkt. Die Base „W“ entspricht den Basen „A“ oder „T“. Die übrigen Basen der Consensus-Sequenz sind Barrios *et al.* (1999) entnommen. **Blau** markiert sind Übereinstimmungen im Bereich dieser erweiterten Consensus-Sequenz.

7.4 Vergleiche der Regulation von *yhgI* mit der Regulation anderer an der Stressanpassung beteiligter Gene

Die festgestellte Vielfalt von vorgeschalteten Promotoren lässt eine unter verschiedensten Wachstumsbedingungen erforderliche Aktivität des Genproduktes YhgI vermuten. Gemeinsam ist den *yhgI* Genen aus *H. elongata* und *E. coli* das Vorhandensein eines σ^{70} - und eines σ^{32} -abhängigen Promotors, *yhgI* von *E. coli* weist zusätzlich einen σ^{54} -abhängigen Promotor auf.

Die Regulation wichtiger für die Stressanpassung benötigter Gene wird oft durch mehrere, zu unterschiedlichen Gruppen gehörende, Promotorelemente kontrolliert. So wird der Solutetransporter ProP durch 2 unterschiedliche Promotoren, einen σ^S - und einen σ^{70} -abhängigen Promotor, kontrolliert (Mellies *et al.*, 1995). σ^S reguliert die Expression verschiedener Gene beim Übergang in die stationäre Phase und in unterschiedlichem Maße auch eine Expression von Genen als Antwort auf Stresseinwirkungen, wie hyperosmotischer Schock, Hitze-, Kälte- oder Säurestress. Dabei hat die Konzentration dieses alternativen σ -Faktors direkten Einfluss auf die Transkription (Hengge-Aronis, 2003).

ibpA und *ibpB*, die für zwei „inclusion-body“-assoziierte Chaperone kodieren, werden gemeinsam σ^{32} -abhängig exprimiert. *ibpB* kann jedoch auch allein σ^{54} -abhängig exprimiert werden (Chuang & Blattner, 1993; Kuczynska-Wisnik *et al.*, 2001). Somit scheint ein in *E. coli* dem *yhgI*-Gen vorgeschalteter σ^{54} -abhängiger Promotor nicht gegen eine Beteiligung an der Stressanpassung zu sprechen.

„Heat-shock“-Promotoren werden als Antwort auf Proteinfalschaltung aktiv. Jedoch konnte in *E. coli* eine vorübergehende Aktivierung des *ibpAB* „Heat-shock“-Promotors als Antwort auf einen osmotischen Schock gezeigt werden (Bianchi & Baneyx, 1999b). Dies deutet zunächst einmal darauf hin, dass osmotischer Stress zu einer Bildung von „inclusion-bodies“ oder Falschaltung von Proteinen führen kann, an deren Verhinderung die Chaperone IbpAB beteiligt sind. Auf diesen Punkt wird in der weiteren Diskussion noch eingegangen werden (siehe Abschnitt 8.1). Die Untersuchungen von Bianchi & Baneyx (1999b) unterstützen auch die vorliegenden Ergebnisse, indem sie zeigen, dass ein Gen wie *yhgI*, das nach eigenen Untersuchungen an der Adaptation an osmotischen Stress beteiligt ist, auch durch einen σ^{32} -abhängigen Promotor reguliert werden kann und nicht unbedingt eine σ^S -abhängiger Promotor vorgeschaltet sein muss. Das Vorhandensein eines σ^{32} -abhängigen Promotors deutet dann jedoch auch auf die Beteiligungen von *yhgI* an der Adaptation an andere Stressfaktoren hin. Dabei sind Zusammenhänge mit Proteinfalschaltung denkbar.

7.5 Termination der Transkription von *yhgI* aus *E. coli* und *H. elongata*

Stromabwärts von *yhgI* aus *E. coli* konnte ein mögliches Transkriptionsterminationssignal und eine sich anschließende AT-reiche Region identifiziert werden. Die freie Energie dieser Schleife beträgt nach dem Programm „mfold“ $\Delta G^0 = -100,5$ kJ/mol (Mathews *et al.*, 1999; Zuker, 2003). Damit handelt es sich um eine für die Transkriptionstermination ausreichend stabile Schleifenstruktur (Kunte, persönliche Mitteilung). Anders sieht es stromabwärts von *yhgI* in *H. elongata* aus. Auch hier konnte eine mögliche Haarnadelschleife identifiziert werden, die jedoch mit $\Delta G^0 = -44,4$ kJ/mol eine

wesentliche geringere freie Energie ausweist. Obwohl sich eine AT-reiche Region anschließt, ist aufgrund der niedrigeren freien Energie bei *yhgI* von *H. elongata* eher von der alternativen Rho-Faktor abhängigen Termination auszugehen.

7.6 Versuche zum Nachweis der Aktivität der *E. coli* Promotoren

Alle PCR-Konstrukte, inkl. der Negativkontrollen, zur Analyse der Promotoraktivität führten nach ihrer Klonierung in pHSG575 zu einer Komplementierung des salzsensitiven Phänotyps von *E. coli* BK1 ($\Delta yhgI$). Dabei machte die Orientierung des inserierten PCR-Produktes im Vektor keinen Unterschied. Zumindest für die Negativkontrollen (pHSGNoProF und pHSGNoProR) war ein Ausbleiben des Wachstums auf Mineralsalzmedium mit 4 % NaCl ohne zugesetzte kompatible Solute zu erwarten gewesen.

Bei Analysen des Vektors pHSG575 (Takeshita *et al.*, 1987) ließen sich zwei Promotoren identifizieren, die vermutlich für die Expression von *yhgI* in der Negativkontrolle und wahrscheinlich auch den übrigen Konstrukten verantwortlich sind. Ist *yhgI* bei einer Insertion der PCR-Produkte in den Vektor entgegen *lacZ'* orientiert, sorgt vermutlich der Promotor des Chloramphenicol-Resistenzgens für eine Expression von *yhgI*. Bei einer umgekehrten Orientierung wird der *lacZ'* vorgeschaltete Promotor durch seine Grundaktivität zu einer Expression von *yhgI* führen.

Um diese Probleme zu umgehen, müssten Vektorkonstrukte hergestellt werden, in denen dem PCR-Produkt z.B. die Ω -Kassette vorgelagert ist. Diese unterbricht die Expression stromabwärtsgelegener Gene (Frey & Krisch, 1985), d.h. stromaufwärts der Ω -Kassette gelegene Promotoren könnten nicht mehr zu einer Expression von *yhgI* führen.

Besser wäre es jedoch, Promotorfusionen an anderer Stelle im Genom des *E. coli* K-12 Wildtyps zu integrieren. Dabei hat sich ein Bereich des Tryptophan-Operons von *E. coli* als geeignet erwiesen (Elliott, 1992). Durch die Verwendung des Wildtypstammes als Basis für diese Experimente würden keine negativen Effekte auf das Wachstum durch Veränderungen der *yhgI*-Region entstehen. Außerdem würden die Auswirkungen multipler Vektorkopien auf die Expression von *yhgI* entfallen. So könnte ohne störende Einflüsse die Expression von *yhgI* in Abhängigkeit unterschiedlicher Promotoren und verschiedener Stresseinflüsse untersucht werden. Zum Nachweis der Promotoraktivität könnten die Promotoren mit einem Reportergen (z.B. *lacZ* oder *gfp*) fusioniert werden. Alternativ könnte auch die *yhgI*-DNA-Sequenz verwendet werden, die über „Real-Time“-PCR-Analyse oder Northern-Hybridisierung quantifiziert wird.

7.7 Nachweis von langen Transkripten ohne nachweisbare Transkriptionsstartpunkte

Stromaufwärts des σ^{54} -abhängigen Promotors konnten in *E. coli* mittels RACE-PCR auch mit eingrückten PCR-Primern keine weiteren Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden. Das Vorhandensein eines schwachen RT-PCR-Produktes, das auf ein Transkript hindeutet, welches stromaufwärts von *yhgH* beginnt, scheint daher ein physiologisch nicht relevantes Phänomen zu sein. Dieses könnte

möglicherweise auf Promotor-ähnliche DNA-Bereiche stromaufwärts von *yhgH* zurückzuführen sein. Transkriptionsstartpunkte und vorgelagerte Promotorsequenzen, die zu einer Expression von *yhgH* führen, wurden nicht untersucht. Möglicherweise gibt es ein Transkript von *yhgH* dessen Termination unvollständig abläuft und daher auch die Sequenz von *yhgI* beinhaltet. Stabile Terminationsschleifen konnten stromabwärts von *yhgH* nicht nachgewiesen werden. Im übrigen scheint ein kompliziertes Terminationsverfahren notwendig zu sein, um zum einen die Transkription von *yhgH* zu terminieren und zum anderen die Transkription von *yhgI*, die auch innerhalb von *yhgH* beginnt, fortlaufen zu lassen. Denkbar wäre hier eine Rho-Faktor abhängige Termination der Transkription, die keine starken Schleifenstrukturen mit angrenzenden AT-reichen Regionen benötigt.

Ähnlich wie bei *E. coli* ließen sich auch bei *H. elongata* längere Transkripte ohne Transkriptionsstartpunkt nachweisen. Da aber hier zusätzlich kein vorgelagertes Gen zu identifizieren ist, ist wiederum von einer physiologisch nicht relevanten Transkription auszugehen.

8. Untersuchung alternativer Stresseinwirkungen

Die Untersuchungen der *yhgH*-Mutanten hatten keinen Phänotyp ergeben, der den *yhgI*-Mutanten ähnelt. Es hatten sich außerdem keine Beweise für eine Wechselwirkung von YhgI und YhgH ergeben und so hatte sich auch die Vermutung einer Beteiligung von *yhgI* an Kompetenzmechanismen nicht erhärtet. Die Identifizierung unterschiedlicher Promotoren stromaufwärts beider *yhgI*-Gene hatte jedoch Hinweise auf eine Beteiligung an der zellulären Antwort auf Stress ergeben. Daher sollte anderen Anhaltspunkten der Literatur nachgegangen werden. Die dort aufgezeigten Versuchsbedingungen (Lesley *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2003) liefen auf die Untersuchungen unterschiedlicher Stressbedingungen hinaus. So wurde bei *E. coli* eine erhöhte Expression von *yhgI* im Zusammenhang mit der Einwirkung von Kanamycin oder der Expression falschgefalteter Proteine beobachtet. Bei näherer Betrachtung erscheint es wahrscheinlich, dass auch die Einwirkung von Kanamycin zu falschgefalteten Proteinen führt, da es die Translation der mRNA in Proteinsequenz stört. Proteine mit Sequenzfehlern können sich möglicherweise nicht mehr richtig falten und lagern sich dann vermutlich in „inclusion-bodies“ zusammen.

Nach den vorgenannten Überlegungen lag es nahe, Versuchsbedingungen zu wählen, unter denen es zur Falschfaltung oder Denaturierung von Proteinen kommt. Dazu wurden als Stressfaktoren Hitze und steigende Harnstoffkonzentrationen ausgewählt. Das Wachstum der unterschiedlichen *H. elongata* und *E. coli* Stämme inklusive der *yhgI*-Deletionsmutanten sollte unter den entsprechenden Bedingungen untersucht werden.

8.1 Wachstum unter Hitzestress, Vergleich mit den Ergebnissen der Salzstress-Experimente

Die Mehrzahl von Organismen ist durch sog. „Heat-shock“-Proteine und spezialisierte σ -Faktoren (σ^{32}) auf Hitzestress eingestellt. Die komplexen Zusammenhänge der unter Hitzestress aktivierten Mechanismen wurden bei *E. coli* sehr intensiv untersucht. Bei *H. elongata* sind Details bisher nicht bekannt. Die Identifizierung „Heat-shock“-Promotor ähnlicher Sequenzen stromaufwärts der *yhgI*-Gene beider Organismen und die Analysen von Lesley *et al.* (2002) und Shaw *et al.* (2003) wurden zum Anlass genommen Untersuchungen im Hinblick auf eine Temperatursensitivität der *yhgI*-Mutanten durchzuführen.

Untersuchungen des Wachstums bei verschiedenen Inkubationstemperaturen wurden mit beiden Organismen in AB-Medium durchgeführt, da bei *H. elongata* KB6 ($\Delta yhgI$) schon bei geringer Salinität in Mineralsalzmedium ein verlangsamtes Wachstum zu beobachten war und in diesem Versuchsansatz nur eine Form des Stresses auf den Organismus ausgeübt werden sollte. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigten sich in *E. coli* keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtypstamm und der *yhgI*-Mutante BK1. Bei *H. elongata* zeigte der Wildtyp im Vergleich zu den *yhgI*-Mutanten ABU44 (Tn1732-Mutante), KB6 ($\Delta yhgI$) und KB7 ($\Delta yhgI::yhgI_{Ec}$) ein geringfügig schlechteres Wachstum. Aufgrund der großen Messschwankungen erscheint der Unterschied jedoch nicht signifikant. Eine Hitzesensitivität der *yhgI*-Mutanten war daher sowohl bei *E. coli* als auch bei *H. elongata* unter den gewählten Wachstumsbedingungen nicht erkennbar. Diese Ergebnisse waren zunächst überraschend. Vergleicht man diese jedoch mit dem Wachstum von *H. elongata* Wildtyp, ABU44 (Burdziak, 1999) und KB6 in LB-Medium steigender Salinität, lassen sich Parallelen erkennen. Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse ist ein kompensierender Einfluss durch die im Komplexmedium enthaltenen kompatiblen Solute wahrscheinlich. Untersuchungen der Auswirkungen von Hitzestress auf salzadaptierte *E. coli* Zellen durch Diamant *et al.* (2001) zeigten, dass im Komplexmedium enthaltenen Solute (z.B. Betain und Prolin) einen positiven Einfluss auf die Anpassung an Hitzestress ausüben. So aktivierten niedrige physiologische Konzentrationen von Betain molekulare Chaperone. Dies geschieht vermutlich durch die Unterstützung der Faltung der in den Chaperonen gebundenen Polypeptide und die Stabilisierung des nativen Endproduktes dieser Reaktion (Diamant *et al.*, 2001). Niedrige Trehalose-Konzentrationen haben diesen Effekt nicht. Unphysiologisch hohe Osmolyt-Konzentrationen, insbesondere Trehalose inhibieren stark die DnaK-abhängigen Chaperonnetzwerke (DnaK-GroEL oder DnaK-ClpB)(Diamant *et al.*, 2001). Dies liegt vermutlich daran, dass eine hohe Viskosität die dynamischen Interaktionen zwischen Chaperonen und dem zu faltenden Substrat beeinflusst und die Proteinaggregate stabilisiert. Eine Auflösung von Proteinaggregaten nach einem Hitzeshock erfolgt sehr effektiv in salzadaptierten *E. coli* Zellen aus Komplexmedium, welche erhöhte Konzentrationen von Betain, nicht jedoch Trehalose akkumulieren. Dies führt zu der Vermutung, dass ein in einem hyperosmotischen nährstoffreichen Medium gewachsener Organismus optimal seine Proteine vor Hitzeschäden bewahren kann und gleichzeitig das Netzwerk molekularer Chaperone aktiv hält. Unter nährstofflimitierten Bedingungen und unter fortgesetztem Salz- und Hitzestress jedoch könnte die Trehalose-Akkumulation eine bessere Option sein, da sie effektiv die Membran schützt (Crowe & Crowe, 1992; Welsh & Herbert, 1999), was für das Überleben des Organismus unter

diesen limitierenden Wachstumsbedingungen eventuell wichtiger ist. Fehlende Membranintegrität führt zu einem Zusammenbruch wichtiger Ionengradienten über der Membran und somit zu einem schnellen Absterben der Zelle.

Die im AB-Komplexmedium enthaltene Betain-Vorstufe Cholin hat in den vorliegenden Experimenten mit *E. coli* und *H. elongata* vermutlich diesen geschilderten positiven Effekt. Letzterer scheint auszureichen, um einen negativen Einfluss der *yhgI*-Deletion, wie er in den Wachstumsexperimenten in Mineralsalzmedium steigender Salinität aufgetreten war, völlig auszugleichen. *E. coli* ist in der Lage Betain aus Cholin zu synthetisieren (Landfald & Strøm, 1986). Gleiches gilt vermutlich auch für *H. elongata* DSM 2581^T, zumal in dem verwandten Stamm *H. elongata* DSM 3043 (jetzt *Chromohalobacter salexigens* (Arahal *et al.*, 2001)) diese Fähigkeit nachgewiesen werden konnte (Canovas *et al.*, 1998).

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Hitzestress-Experimente mit den Salzstress-Experimenten an *E. coli* K-12 und *E. coli* BK1 ($\Delta yhgI$), stellt sich jedoch die Frage, warum der negative Effekt der *yhgI*-Deletion bei *E. coli* BK1 in Mineralsalzmedium steigender Salinität trotz zugesetztem Betain (5 mM) erkennbar ist, während dies bei der Untersuchung zur Hitzesensitivität nicht der Fall ist. Möglicherweise enthält das Komplexmedium andere Bestandteile, die einen Schutz von Proteinen oder Zellen positiv beeinflussen. So wurde bei Zusatz von Biotin im Mineralsalzmedium (5 mM Betain) eine geringfügig erhöhte Salztoleranz von *E. coli* BK1 und BK2 beobachtet. Hier mussten 5,25 % NaCl statt 5,0 % NaCl eingesetzt werden, um einen Ausfall des Wachstums hervorzurufen. Andererseits könnte dies auch in einem Zusammenhang mit dem sog. „molecular-crowding“ stehen. Cayley *et al.* (1991) hatten gezeigt, dass mit steigender Salinität des Mineralsalzmediums die Menge des freien cytoplasmatischen Wassers in *E. coli* abnimmt. In der Folge sinkt die Wachstumsrate der Kulturen. Bei *E. coli* wurde dieser Effekt durch Zusatz von Betain zum Medium abgemildert, jedoch nicht völlig aufgehoben. Die Experimente wurden bis zu einer NaCl-Konzentration von 0,5 M durchgeführt (1 mM Betain) (Cayley *et al.*, 1992). Möglicherweise ist bei noch höheren NaCl-Konzentrationen, die in den vorliegenden Salzstress-Experimenten verwendet wurden (0,6 M = 3,5 % NaCl bzw. 0,86 M = 5 % NaCl), dieser abmildernde Effekte durch zugesetzte kompatible Solute nicht mehr ausreichend. Geringeres Volumen freien cytoplasmatischen Wassers führt zu einer Zunahme des „molecular-crowdings“ und im Extremfall dann möglicherweise zu einer Aggregation von Proteinen, wie es durch Diamant *et al.* (2001) gemutmaßt wurde. Hinweis auf die Verbindungen von osmotischem Stress und der Aggregation von Proteinen könnte die „Heat-shock“-Promotor-abhängige Expression von *ibpAB* als Antwort auf osmotischen Stress sein (Bianchi & Baneyx, 1999b). Für die erneute Faltung oder Entfernung von Proteinen aus den „inclusion-bodies“ wäre ein Zusammenspiel von Chaperone erforderlich. Ist *YhgI*, wie durch einige Experimente aus der Literatur angedeutet, an einer Erkennung oder Renaturierung falschgefalteter Proteine beteiligt, könnte die Deletion unter den für *E. coli* extremen Salzstress-Bedingungen trotz vorhandener externer Solute die nachgewiesenen Folgen haben.

8.2 Wachstum von *E. coli* und *H. elongata* unter Harnstoffstress

Als ungeladene Verbindung mit geringem Molekulargewicht diffundiert Harnstoff über die Membran und kann als chaotrope Verbindung seine destabilisierende Wirkung direkt auf intrazelluläre Proteine ausüben (Wirkungsweise von Harnstoff auf Proteine: Einleitung Abschnitt 3). Eine destabilisierende Wirkung des Harnstoffs ist jedoch auch auf die Membran denkbar, wofür sich in Modelluntersuchungen Hinweise ergeben hatten (Mukerjee & Ray (1963) zitiert in Barton *et al.* (1999)).

Untersuchungen zur zellulären Harnstoffsensitivität sollten nach den Ergebnissen der Hitzestress-Experimente in Mineralsalzmedium durchgeführt werden. Dies war auch schon vorher in ähnlicher Weise durch Peddie *et al.* (1999) an *E. coli* und *Staphylococcus aureus* durchgeführt worden. Diese untersuchten die Schutzfunktion unterschiedlicher Testsolute gegenüber Salz und Harnstoff und konnten so eine Schutzfunktion von Betain gegenüber den destabilisierenden Effekten des Harnstoffs nachweisen. Um die Aufnahme der Solute in die Zellen zu fördern, war dem Medium 0,6 M NaCl zugesetzt worden.

Untersuchungen an *E. coli* in Flüssigmedium steigender Harnstoffkonzentration gaben erste Hinweise auf eine erhöhte Harnstoffsensitivität der *yhgI*-Deletionsmutante *E. coli* BK1. Es traten Unterschiede im Wachstum ab einer Harnstoffkonzentration von 0,6 M auf. Bei 0,8 M Harnstoff im Medium war im Falle beider Stämmen kein Wachstum mehr nachweisbar. Vermutet wurde hier ein Einfluss der Versuchsdurchführung. Bei einer möglichen Verlängerung der Inkubationsdauer wäre bei 0,8 M Harnstoff, aufgrund der vorherigen Unterschiede der Stämme, noch ein Wachstum von *E. coli* K-12 zu erwarten gewesen. Jedoch wäre auch ein vollständiges Auswachsen der Kulturen beider Stämme bei geringeren Harnstoffkonzentrationen zu erwarten gewesen, was zu einer weniger deutlichen Dokumentation der steigenden Harnstoffsensitivität geführt hätte.

Die Durchführung eines ähnlichen Tests mit den *H. elongata* Stämmen scheiterte an der Salzsensitivität der *yhgI*-Deletionsmutante *H. elongata* KB6. Diese zeigte schon im Bereich des Wachstumsoptimums von *H. elongata* ein im Vergleich zum Wildtyp und ABU44 (Tn1732-Mutante) verlangsamtes Wachstum. Der Test auf Harnstoffsensitivität wurde daher nur als Agarplattentest durchgeführt, jedoch wurde gleichzeitig die NaCl-Konzentration variiert. Zur Bestätigung der Ergebnisse von *E. coli*, sollte auch dieses Experiment als Agarplattentest durchgeführt werden, jedoch ohne Variation der Salinität.

Das Wachstumsverhalten der *H. elongata* Stämme macht deutlich, dass diese mit steigender Mediensalinität (1 %, 1,5 %, 2 % und 3 % NaCl) höhere Harnstoffkonzentrationen tolerieren. Ansonsten sind keine offensichtlichen harnstoffabhängigen Unterschiede im Wachstum der einzelnen Stämme ersichtlich. Die Deletion von *yhgI* scheint keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten auszuüben. Die zunehmende Toleranz der *H. elongata* Stämme gegenüber Harnstoff ist vermutlich durch eine Akkumulation von Ectoin bei steigender Mediensalinität erklärbar. Kompatible Solute sind in der Lage die negativen Auswirkungen des Harnstoffs auf Proteine zu verringern. Dies wurde bereits für Trimethylaminoxid (TMAO) nachgewiesen (Wang & Bolen, 1997). Ähnliches wird auch für andere Solute z.B. Ectoin gelten. Bei geringerer Salinität (unter 3 % NaCl) werden jedoch durch *H. elongata* nur geringe Mengen Ectoin synthetisiert (Kunte, 1995). Daher ist hier vermutlich auch das Wachstum aller *H. elongata* Stämme schlechter. Unter der Annahme, dass YhgI an einer Erkennung und

Renaturierung falschgefalteter oder denaturierter Proteine beteiligt ist, wäre unter Einwirkung von Ectoin dieser Einfluss möglicherweise von geringerer Bedeutung und einer *yhgI*-Mutante würde kein Wachstumsnachteil entstehen. Dann wären auch keine Wachstumsunterschiede zwischen den einzelnen *H. elongata* Stämmen erkennbar.

Anders sieht es bei den *E. coli* Stämmen aus. Hier erfolgte die Anzucht auf Agarplatten mit 0,5 % NaCl und steigendem Harnstoffgehalt. *E. coli* BK1 ($\Delta yhgI$) zeigt im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich eingeschränktes Wachstum. Zu erklären ist dies vermutlich durch das Fehlen ausreichender Konzentrationen von Trehalose. Nach Strøm *et al.* (1986) akkumuliert *E. coli* bei einer Salinität von 0,5 % nur sehr geringe Mengen Trehalose. Daher erfolgt keine Aufhebung des negativen Einflusses des Harnstoffs, folglich käme es zu einer Denaturierung von Proteinen in der Zelle. Hierdurch hätte nach der obigen Theorie die *yhgI*-Deletionsmutante einen Wachstumsnachteil und würde eine erhöhte Harnstoffsensitivität aufweisen, wie in dem Experiment auch gezeigt werden konnte.

Bei einem Vergleich des Wachstumsverhaltens von *E. coli* und *H. elongata* auf Agarplatten fällt jedoch ein weiterer Punkt auf. *E. coli* kann 0,8 M Harnstoff bei einer Salinität von 0,5 % NaCl vermutlich ohne kompatible Solute tolerieren, während *H. elongata* dies erst bei 3 % NaCl (Wachstumoptimum; (Severin, 1993)) mit vorhandenem Ectoin vermag. Grund hierfür könnte der halophile Charakter von *H. elongata* sein. Bei einer Salinität unterhalb des Optimums ist die Membran von *H. elongata* vermutlich durch Mangel externen positiver Ladungen destabilisiert, da sich die negativen Ladungen gegenseitig abstoßen. Gleiches wird auch für Proteine gelten, die im Vergleich zu *E. coli* vermehrt negative Ladungen aufweisen (Gandbhir *et al.*, 1995). Zusätzliche schädigende Wirkung auf die Proteine, der durch Mangel an Ectoin nicht begegnet werden kann, erfolgt durch Harnstoff. In der Folge würden alle *H. elongata* Stämme ein vergleichbar schlechtes Wachstum zeigen. Mit steigender Salinität würde die Membran durch positive Ladungen stabilisiert, gleichzeitig wird Ectoin gebildet, das eine Kompensation des denaturierenden Effektes des Harnstoffs mit sich bringt. Wiederum würden alle *H. elongata* Stämme ein vergleichbares Wachstum aufweisen.

Denkbar ist auch, dass harnstoffabhängige Einflüsse auf die Membranstabilität Auswirkungen auf das Wachstum zeigen können. Ein destabilisierender Effekt könnte darin bestehen, dass die Membran von *H. elongata* eher auf eine salinitätsabhängige Anpassung als auf eine Anpassung an Harnstoff vorbereitet sein wird. Bei halophilen Organismen wie *H. elongata*, *Ectothiorhodospira mobilis* und *E. halophila* werden als Antwort auf eine Salinitätserhöhung vermehrt anionischer Lipide in die Membran eingebaut (Thiemann & Imhoff, 1991; Vreeland *et al.*, 1984). Zusätzlich werden durch *Ectothiorhodospira* vermehrt kürzere und gesättigten Fettsäuren in die Membran eingelagert (Imhoff & Thiemann, 1991), um die Integrität der Membran aufrecht zu erhalten. Kürzere und gesättigte Fettsäurereste unterstützen den L_{α} -Zustand (lamellarer Bilayer-Zustand der Membran) durch Steigerung der Übergangstemperatur (T_m) von L_{α} nach HII (Seddon, 1990). Die Membran wird also viskoser. Andere halophile Organismen verwenden vermehrt Cyclopropan-Fettsäuren und senken den Anteil ungesättigter Fettsäuren. Auch dies wird zu einem Absinken der Membranfluidität führen (Ventosa *et al.*, 1998). Als Anpassung an Harnstoff, welcher möglicherweise durch Wechselwirkung mit den hydrophoben Bereichen der Membran die Membranfluidität erhöht ((Mukerjee & Ray, 1963) zitiert in Barton *et al.* (1999)), wäre vermutlich eine ähnliche Fettsäureanpassung erforderlich. Durch Mathai *et*

al. (2001) konnte gezeigt werden, dass eine geringere Membranfluidität auch zu einer verringerten Harnstoffdiffusion führt. Es ist daher denkbar, dass *H. elongata* seine Membran nicht harnstoffabhängig anpassen kann, dieses Problem jedoch bei steigender Salinität durch eine salinitätsabhängige Membrananpassung kompensiert wird. Gleichzeitig übt das mit steigender Salinität synthetisierte Ectoin einen stabilisierenden Effekt aus.

Im Gegensatz zu *H. elongata* wäre für *E. coli* eine harnstoffbedingte Membrananpassungsfähigkeit zu erwarten, denn virulente Stämme von *E. coli* müssen bei Harnwegsinfektionen erhöhte Harnstoffkonzentrationen (beim Menschen 0,5 – 1,5 M laut Culham *et al.* (2001)) tolerieren. *E. coli* wird vermutlich die Fluidität seiner Membran durch Variation der Lipide entsprechend der Harnstoffkonzentration verringern, möglicherweise ist die Membran jedoch von vornherein ausreichend angepasst.

Der erfolgte Nachweis einer Harnstoffsensitivität der *yhgI*-Mutante von *E. coli* K-12 könnte von medizinischer Bedeutung sein. So wurde in virulenten *E. coli* Stämmen die Relevanz der Solute-transporter ProP und ProU für die Toleranz gegenüber Harnstoff untersucht und festgestellt, dass diese zwar nicht unbedingt benötigt werden, jedoch die Überlebensfähigkeit unterstützen (Culham *et al.*, 2001). Es müssen also noch andere Mechanismen an der Toleranz der virulenten Stämme gegenüber Harnstoff beteiligt sein. Neue Angriffspunkte in *E. coli*, die zu einer verminderten Toleranz gegenüber Harnstoff führen, könnten Ansatzpunkte für zukünftige Therapieansätze bilden. Weitere Hinweise auf die Relevanz von *yhgI* im Zusammenhang mit Infektionen hatten sich auch bereits in den Untersuchungen von Lai *et al.* (2001) an *Klebsiella pneumoniae* ergeben.

Weitere Untersuchungen zur Harnstoffsensitivität von *H. elongata* erscheinen sinnvoll, sind jedoch schwer durchzuführen. Hauptprobleme sind die Salzsensitivität von *H. elongata* KB6 ($\Delta yhgI$) und die einsetzende Ectoin-Synthese bei steigender Salinität. Auch die Verwendung einer *H. elongata* Mutante mit defekter Ectoin-Synthese (*H. elongata* KB1 (Grammann, 2000)) würde keine weitere Klärung bringen, da diese schon im Bereich des Wachstumsoptimums von *H. elongata* (3 % NaCl) nur noch sehr verlangsamt wächst.

9. Charakterisierung von YhgI

In der vorliegenden Arbeit ist es mit Hilfe des Expressionsstammes *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 gelungen das hypothetische Protein YhgI_{He} als Fusionsprotein mit einem C-terminalen (His)₆-tag zu synthetisieren und nahezu vollständig aufzureinigen. Mit dem gereinigten Protein sollten Vorhersagen, die anhand von Computeranalysen getroffen worden waren, mittels proteinbiochemischer Analysen überprüft werden. Für YhgI aus *H. elongata* und ähnliche Sequenzen hatten sich Hinweise auf eine Thioredoxin-ähnliche Funktion ergeben. Außerdem ist das YhgI-Protein aus *Yersinia pestis* als prokaryontisches Lipoprotein annotiert.

9.1 Überexpression Yhgl-(His)₆

Der Vergleich des Wachstums unterschiedlich stark induzierter *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 Kulturen, zeigte erste Hinweise auf eine unproblematische Überexpression des rekombinanten Proteins. Auch bei der höchsten angewendeten Induktionsstufe (0,2 mM IPTG) war kein Einbruch des Wachstums erkennbar. Oft kommt es bei der heterologen Überexpression von Proteinen in *E. coli* zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten, „inclusion-bodies“ (Carrio *et al.*, 1998; Hartley & Kane, 1988), die das Wachstum erheblich zum Negativen beeinflussen. Ein derartiges Ereignis wurde hier nicht beobachtet. Ein Zellfraktionierungsexperiment, das mit einer mit 0,1 mM IPTG induzierten Kultur durchgeführt wurde, machte dann auch deutlich, dass der größte Teil des rekombinanten Proteins in der löslichen Zellfraktion zu finden war. In der unlöslichen Fraktion war nur ein wesentlich geringerer Teil von Yhgl-(His)₆ vorhanden und dieser Teil beruht vermutlich eher auf einer unvollständigen Lyse der Zellen mit der „French-Press“, als auf der Bildung unlöslicher Aggregate. Unter der Annahme einer Thioredoxin-Funktion von Yhgl ist dieser Effekt nicht verwunderlich. So konnte bei einer Koexpression von Thioredoxin und eukaryontischen Proteinen in *E. coli* die Löslichkeit der rekombinanten Proteine erhöht werden (Yasukawa *et al.*, 1995). Auch die Expression von Proteinen als Thioredoxin-Fusion hat einen ähnlichen Effekt (LaVallie *et al.*, 1993). Auch hierdurch wird die Bildung von „inclusion-bodies“ verhindert. Zwischenzeitlich sind sogar kommerzielle Expressionssysteme erhältlich (z.B. pET32a-c(+)-Serie der Fa. Novagen), die sich diese Eigenschaft zunutze machen. Nach Hinweisen aus der Literatur schien Yhgl unbekannte Aufgaben unter Bedingungen, die zur Falschfaltung von Proteinen führen, auszuüben (Lesley *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2003). Auch hiermit lässt sich das Ausbleiben einer „inclusion-body“-Bildung erklären. Sollte ein Proteine an der Auflösung von „inclusion-bodies“ oder deren Verhinderung beteiligt sein, wäre es nicht sinnvoll, wenn es selbst welche ausbilden würde.

9.2 Reinigung von Yhgl-(His)₆

Die Reinigung von Yhgl-(His)₆ erfolgte mittels einer Nickelchelate-Chromatographie (Porath *et al.*, 1975). Dabei gehen Nickelionen spezifische Bindungen mit Histidinresten, die dem Protein angehängt wurden, ein. Im vorliegenden Fall wurde eine C-terminaler (His)₆-tag ausgewählt. Damit wird sichergestellt, dass nur vollständig translatierte Proteine in der Reinigung gewonnen werden. Die Funktionalität des rekombinanten Proteins konnte vorher *in vivo* durch Komplementierung der salzsensitiven Mutante *E. coli* BK1 ($\Delta yhgl$) nachgewiesen werden.

Nach anfänglichen Problemen gestaltete sich auch die Aufreinigung von Yhgl-(His)₆ über Nickelchelate-Chromatographie unproblematisch. In den ersten Reinigungsexperimenten wurde jeweils nur Waschpuffer einer festgelegten Imidazolkonzentration (60 mM) verwendet. Schnell war jedoch ersichtlich, dass bei dieser Konzentration schon ein Großteil des rekombinanten Proteins von der Säule eluiert und außerdem eine starke Verunreinigung mit anderen Proteinen vorlag. Die Anbindung von Yhgl-(His)₆ an die Säulenmatrix schien nicht sehr effektiv zu sein. Dies kann sterisch durch die Faltung des Proteins und die resultierende Lokalisation des (His)₆-tags bedingt sein. Bei einer nicht

exponierten Anordnung oder schlechter Zugänglichkeit des (His)₆-tags könnten die Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix für eine feste Anbindung zu schwach ausfallen. Dieses Problem könnte möglicherweise durch Verwendung eines (His)₁₀-tag behoben werden. Längere (His)-tags führen zu einer stärkeren Anbindung an die Säule, jedoch müsste für diesen Fall die Funktionalität des Proteins erneut überprüft werden. Die starken Proteinverunreinigungen bei den ersten Reinigungsexperimenten sind in der nur unzureichenden Beladung der Säule begründet. Bindet wenig spezifisches Protein an die Säulenmatrix, stehen die Bindungsstellen für die unspezifische Anbindungen anderer Proteine zur Verfügung, die durch benachbarte Histidinreste ebenfalls eine, wenn auch meist geringere, Affinität zur Matrix besitzen.

Die weiteren Reinigungsversuche wurden mit größeren Mengen Protein (280 mg Gesamtprotein) durchgeführt, um eine Sättigung der Säule mit Yhgl-(His)₆ zu erreichen. Die verwendete Säulenmatrix weist eine Bindungsfähigkeit von 8 mg Protein pro ml auf (Volumen: 2,5 ml). Die vollständige Absättigung der Säulenmatrix konnte daran nachvollzogen werden, dass schon im Probendurchlauf rekombinantes Protein von der Säule eluierte. Außerdem wurden die Reinigungsschritte jeweils mit Waschpuffern durchgeführt, die stufenweise aufsteigende Imidazolkonzentrationen (30 bis 80 mM) enthielten. Aber auch schon bei einer Imidazolkonzentration von 30 mM und sogar im Bindungspuffer (4 mM Imidazol) eluierte eine Teil des Proteins von der Säule. Damit erhärteten sich die Hinweise auf einen zum Teil sterische verdeckten (His)₆-tag. Trotz dieser Verluste verlief die Aufreinigung mit steigenden Imidazolkonzentrationen wesentlich erfolgreicher. Die Proteinverunreinigungen wurden durch das große Volumen unterschiedlich konzentrierter Waschpuffer zum größten Teil ausgewaschen. Dies konnte in den jeweiligen zur Kontrolle durchgeführten SDS-PAGES nachvollzogen werden. Bei den zuletzt durchgeführten Reinigungen waren in der Coomassie-gefärbten SDS-PAGES ab dem Waschpuffer mit 70 mM Imidazol keine verunreinigenden Proteine mehr erkennbar.

9.3 Charakterisierung des gereinigten Yhgl-(His)₆

9.3.1 Yhgl-(His)₆ im Insulin-Reduktionstest

Nach einer von Holmgren (1979) entwickelten Methode lässt sich durch Reduktion von oxidiertem Insulin unter Zusatz von DTT die Thioredoxin-Funktion eines Proteins nachweisen. Die Reduktion des Insulins durch Thioredoxins (TrxA aus *E. coli*) führt zu einer schnellen Trübung des Reaktionsansatzes durch Präzipitation der freien A- und B-Ketten. Diese Trübung kann durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 – 650 nm verfolgt werden. Reduziertes Thioredoxin zeigt eine apparente Reaktivität mit Insulin, die ca. 10⁴-fach über der von DTT liegt (Holmgren, 1979). Diese Standardreaktion wurde jedoch nicht nur auf Thioredoxine, sondern auch auf eine Vielzahl anderer Proteine, u.a. das Cochaperon DnaJ von *E. coli*, zum Nachweis einer Thioredoxin-ähnlichen Aktivität angewendet (de Crouy-Chanel *et al.*, 1995). Andere Testobjekte waren die Protein-Disulfid-Isomerase der Kalbsleber (Lundström & Holmgren, 1990) und verschiedene Glutaredoxine aus *E. coli* (Jordan *et al.*, 1997).

Die Funktion eines Thioredoxins konnte für das aufgereinigte Yhgl-(His)₆ nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich in dem angewendeten Insulin-Reduktionstest für Yhgl-(His)₆ nur eine OD₆₀₀-Zunahme,

die unwesentlich über der ohne Enzymzusatz (nur DTT) lag. Dabei machte es keinen Unterschied, ob Yhgl-(His)₆ bei der Aufreinigung zwischenzeitlich eingefroren wurde oder nicht. Für das Ausbleiben der untersuchten Aktivität gibt es mehrere Möglichkeiten. Einerseits kommt eine völlig anders gelagerte Funktion des Proteins in Frage, andererseits könnte das Protein während der Aufreinigung inaktiviert worden sein. Zu bedenken sind in diesem Zusammenhang die relativ hohen Imidazol-konzentrationen, die für die Waschstreps verwendet wurden. Nach Angaben der Firma Novagen wäre ein Austausch des Imidazols gegen Histidin eine schonende Alternative. Eine Rolle kann aber auch die Dauer des gesamten Reinigungsprozesses spielen, das Fehlen eines Partnerproteins, eines unbekanntes Cofaktors oder eines anderen zellulären Parameters. Dabei könnte auch die Membran entscheidenden Einfluss auf die Aktivität eines Proteins ausüben.

9.3.2 Absorptionsspektrum von Yhgl-(His)₆

Im Absorptionsspektrum von Yhgl-(His)₆ sind nur die Absorptionsmaxima bei ca. 218 bzw. 280 nm erkennbar. Dabei handelt sich um die üblichen Absorptionsmaxima der Peptidbindung bzw. der aromatischen Aminosäuren. Absorptionsmaxima für z.B. NAD(P)⁺/ NAD(P)H (255 nm / 255 und 340 nm) ließen sich nicht erkennen, jedoch ist dieses als Coenzym auch nicht kovalent an das Protein gebunden und könnte bei einer Aufreinigung verloren gegangen sein.

Genauso verhielt es sich mit Hinweisen auf mögliche Eisen-Schwefel-Zentren. Für Yhgl hatten sich Hinweise auf Ähnlichkeiten zu NifU oder den nicht Nitrogenase-assoziierten IscA und IscU-Proteinen ergeben. Wollenberg (2003) und Wollenberg *et al.* (2003) führten eine heterologe Expression von IscA und IscU aus *Synechocystis* PCC6803 in dem lysogenen *E. coli* BL21 (DE3) Stamm durch und konnte in keinem Fall ein Protein mit enthaltenen FeS-Zentrum aufreinen. Die isolierten Proteine wiesen nur eine übliche Absorption auf, die der für Yhgl-(His)₆ nachgewiesenen glich. Durch Zusatz von Eisenammoniumsulfat, Cystein und IscC konnte unter anaeroben reduzierenden Bedingungen in beiden Proteinen ein FeS-Cluster rekonstituiert werden. Die Absorptionsmaxima bei 278 nm, 325 nm (330 nm), 420 nm und 570 nm (580 nm) von IscU und IscA deuteten auf eine [2Fe2S]²⁺-Form des Clusters hin. Sollte Yhgl, wie durch die Analysen der Domänen angedeutet, Träger von FeS-Clustern sein, könnten auch diese bei der Reinigung verlorengegangen sein. Alternativ könnte die zelluläre Maschinerie für die Bildung von FeS-Clustern nicht ausreichend sein, um bei einer Überexpression alle Proteine mit FeS-Cluster zu versehen. Für eine Überprüfung könnte versucht werden, ein Rekonstitutionsverfahren für Yhgl, das dem von Wollenberg (2003) angewandten ähnelt, zu entwickeln.

9.3.3 Analysen zu einer möglichen Membranassoziation

Yhgl von *Yersina pestis* ist als prokaryontisches Lipoprotein (PROSITE-Pattern PS00013) annotiert. Merkmal von Lipoproteinen ist eine sog. Lipobox (Abb. 59). Im Jahr 2000 konnte diese Annotation als Lipoprotein auch für Yhgl aus *H. elongata* (Abb. 59) und *E. coli* mit dem PROSITE-Server nachvollzogen werden (Bairoch *et al.*, 1997). Als Lipoproteine werden anscheinend jedoch nur periplasmatische, über eine Diacylglyceroleinheit an die innere oder äußere Membran gebundenen

Proteine bezeichnet. Für Yhgl von *H. elongata* wurde jedoch eine Lokalisation im Cytoplasma bestimmt (Psort-B, (Gardy *et al.*, 2003)), was einen Widerspruch zu einem Lipoprotein darstellt. Die cytoplasmatische Lokalisation schien sich im Übrigen auch durch die unkomplizierte Überexpression von Yhgl-(His)₆ in *E. coli* BL21 (DE3) zu bestätigen. Bei einer starken Überexpression von periplasmatischen Proteinen kommt es häufiger zur Bildung von „inclusion-bodies“, wie dies auch bei der heterologen Expression von TeaA, dem Substratbindeprotein des Ectoin-Transportsystems TeaABC, deutlich wurde (Tetsch, 2001). Nach neueren PROSITE-Analysen gibt es keinen Hinweis mehr auf das charakteristische Motiv eines prokaryontischen Lipoproteins. Dies ist möglicherweise in einer Änderung der Vorhersageparameter durch die Datenbankbetreiber begründet (Falquet *et al.*, 2002). Andere Server (LipoP, (Juncker *et al.*, 2003)) unterscheiden zwischen membranständigen Proteinen (Transmembranhelix) sowie periplasmatische Proteinen und Lipoproteinen und klassifizieren die übrigen Proteine, wie auch Yhgl, als cytoplasmatisch. Eine Untergliederung in membranassoziierte oder nicht membranassoziierte cytoplasmatische Proteine erfolgt nicht.

```

Consensus:      {DERK} (6) - [LIVMFWSTAG] (2) - [LIVMFYSTAGCQ] - [AGS] - C
                -3                -2                -1  +1

YhgIHe:      As 143  QVAVLAF - [G] - [G] - [G] - C
                -3  -2  -1  +1

```

Abb. 59: Vergleich der PROSITE-Consensus-Pattern PS00013 (Lipobox) prokaryontischer Lipoproteine mit der Yhgl-Sequenz von *H. elongata*

Dargestellt ist eine Sequenzvergleich zwischen der Consensus-Sequenz einer Lipobox eines Lipoproteins und der Aminosäuresequenz von Yhgl aus *H. elongata*. Das charakteristische Merkmal eines Lipoproteins ist eine N-terminale Signalsequenz, gefolgt von einem Cystein (Hayashi & Wu, 1990). Diese Signalsequenz wird durch die Signalpeptidase II abgeschnitten. Das typische Signalpeptid enthält eine n-Domäne (geladenen Aminosäure Lysin und/oder Arginin), eine zentrale h-Domäne (hydrophob) und eine konservierte c-Region aus 4 Aminosäuren (Lipobox/ Schnittbereich) (Klein *et al.*, 1988; von Heijne, 1989). Die am stärksten konservierte Aminosäure in der Lipobox sind ein Leucin in Position **-3** bezogen auf die Schnittstelle, ein Alanin in Position **-2** und ein Glycin oder Alanin in Position **-1**. Das Cystein in Position **+1** ist zwingend erforderlich: LA(G,A)↓C. Dabei dürfen keine geladenen Aminosäuren (DERK) innerhalb der 6 ersten Basenpositionen (Position **-10** bis **-5** relativ zur Schnittstelle) vorkommen. In Yhgl aus *H. elongata* lassen sich Übereinstimmungen mit diesen Merkmalen erkennen, die früher als Lipobox gedeutet wurden. Die gefundenen Ähnlichkeiten in der Yhgl-Sequenz finden sich jedoch nicht, wie gefordert, in den ersten 15-35 Aminosäuren (Falquet *et al.*, 2002), sondern im Bereich ab Aminosäure 143.

Trotz dieser widersprüchlichen Angaben wurde Yhgl auf eine mögliche Membranassoziation hin untersucht. Dazu wurden nach erneuter Fraktionierung des Zellmaterials von induziertem *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 und uninduziertem *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+) die einzelnen Fraktionen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im anschließenden Western-Blot wurde Yhgl-(His)₆ auch in der Membranfraktion von *E. coli* BL21(DE3) pETY5 mittels Anti-His-tag-Antikörper nachgewiesen. Dadurch zeichnete sich auch eine Membranassoziation ab. Vergleiche von Blot-Membran und SDS-PAGE deuteten darauf hin, dass in der Membranfraktion zwei unterschiedlich große, jedoch kaum getrennt Proteinbanden detektiert wurden. Dies könnte auf eine mögliche proteolytische Prozessierung und das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Yhgl-(His)₆ Populationen hinweisen.

Zwar weisen die mögliche proteolytische Prozessierung, die nachgewiesene Membranassoziation und die frühere Computeranalyse auf Gemeinsamkeiten von Yhgl mit Lipoproteinen hin, doch stehen das

Fehlen einer periplasmatischen Exportsequenz und die Klassifizierung als cytoplasmatisches Protein im Widerspruch dazu. Zudem beziehen sich bei den früheren Vorhersagen gefundenen Ähnlichkeiten in der Yhgl-Sequenz nicht, wie gefordert, auf die ersten 15-35 Aminosäuren (Falquet *et al.*, 2002), sondern auf den Bereich ab Aminosäure 143. Anhand dieser Abweichungen der Yhgl-Sequenz von den vorgegebenen Merkmalen kann mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es sich bei Yhgl um ein Lipoprotein handelt. Vielmehr ist eher von einem cytoplasmatischen peripheren Membran-protein auszugehen, das über einen anderen Mechanismus an die Membran gebunden ist. Eine cytoplasmatische Acylierungen prokaryontischer Proteine scheint ein sehr seltener, kaum untersuchter Prozess zu sein. In dem Review von Stanley *et al.* (1998) wird ein derartiger Prozess jedoch für ein Poren-formendes Hämolyisin (HlyA, Toxin) uropathogener Stämme von *E. coli* beschrieben. Bei diesem Protein erfolgt cytoplasmatisch durch posttranslationale Modifikation eine kovalente, amidartige Anbindung zweier Fettsäuren an zwei konservierte Lysinreste. Erst nach dieser Modifikation kann das Toxin nach erfolgter Sekretion seine lytische Aktivität auf Blutzellen entfalten. Katalysiert wird die Fettsäureübertragung durch eine spezielle Acyltransferase (HlyC), deren Aktivität nicht durch andere Proteine ersetzt werden kann. Als Donor für die Fettsäuren dient Acyl-ACP, das auch bei der Fettsäuresynthese eine zentrale Rolle spielt. Eine proteolytische Prozessierung des Toxin erfolgt anscheinend nicht.

Denkbar ist, dass es für eine Modifikation von Yhgl einen ähnlichen cytoplasmatischen Prozess gibt. Jedoch dürfte anschließend keine Sekretion des acylierten Proteins erfolgen, wie es bei HlyA der Fall ist. Auffallend sind bei Yhgl zwei konservierte Lysinreste, die in dem unbekanntem Aminosäure-Sequenzmotiv (K-A-P-N-A-K) lokalisiert sind. Hier könnte eine Anknüpfung von Fettsäuren über Amidbindungen erfolgen. Anders als bei dem Toxin scheint sich für Yhgl jedoch eine proteolytische Prozessierung anzudeuten. Angewendet auf eine mögliche enzymatische Funktion von Yhgl könnte eine fehlende Membran die ausbleibende Thioredoxin-ähnliche Aktivität erklären. Außerdem könnte als Effekt der Überexpression von Yhgl-(His)₆ ein Großteil des aus der löslichen Zellfraktion aufgereinigten Proteins nicht in seiner prozessierten Form vorliegen.

Fettsäureanknüpfungen müssen nicht unbedingt zu einer festen und dauerhaften Anbindung an die Membran führen, sondern können eine reversible Assoziation erlauben. Dabei könnten die Membranlipide ladungsbedingt zu einer Steigerung oder Abschwächung dieser Assoziation beitragen.

Zur Absicherung der angedeuteten Membranassoziation wäre ein Austausch des natürlichen *yhgl*-Gens im Genom von *H. elongata* und/oder *E. coli* gegen das entsprechende für Yhgl-(His)₆-kodierende Gen sinnvoll. Hier wäre dann eine Expression des Fusionsproteins in Abhängigkeit des natürlichen Promotors, ohne störende Einflüsse einer zu starken IPTG-induzierten Expression möglich. Wiederum sollte nach einer Fraktionierung des Zellmaterials eine Detektion in einem Western-Hybridisierungsexperiment durchgeführt werden (siehe Ausblick).

9.3.4 Untersuchung des Oligomerisierungszustandes des gereinigten Yhgl-(His)₆ in einer nativen PAGE

In der nativen PAGE bestätigte sich zunächst einmal der saure Charakter von Yhgl (pI= 4,44), da Yhgl-(His)₆ schneller als alle Proteine des Markers gelaufen ist. Außerdem war eine Vielzahl spezifisch detektierter Proteinbanden erkennbar, die auf unterschiedliche Populationen von Oligomeren, die durch Yhgl-(His)₆ gebildet werden, schließen lassen. In die gleiche Richtung zielende Untersuchungen mittels des BacterioMatch[®] Two-Hybrid-Systems hatten kein derartiges Ergebnis ergeben. Eine Größenordnung konnte für die einzelnen Oligomer-Populationen in dieser nativen PAGE nicht erfolgen, da kein geeigneter Protein-Marker vorhanden war. Außerdem könnten sekundäre Effekte, wie oxidative Bedingungen, auf Cysteinreste enthaltende Proteine Einfluss nehmen und zu ihrer Oligomerisation führen. Das Ergebnis bedarf daher einer weiteren Bestätigung bzw. Präzisierung, die z.B. durch Verwendung einer Gelfiltrations-Chromatographie erfolgen könnte. Bei diesem schonenden Verfahren wären unterschiedliche Populationen von Proteinoligomeren durch ihre verzögerte Retention bei der Elution von der Säule erkennbar. Zunächst müsste jedoch eine Eichung der Elution erfolgen, indem verschiedene Proteine steigenden Molekulargewichts über die Säulenmatrix aufgetrennt werden und anschließend das Molekulargewicht der eluierten Proteine gegen die Zeit aufgetragen wird. Anhand der Retentionszeit der unterschiedlichen Oligomere könnte dann ihr Molekulargewicht und schließlich die Anzahl der Untereinheiten bestimmt werden.

Vergleiche mit der Literatur zeigen, dass verschiedene Chaperone zur Ausbildung von Multimeren neigen. So bildet das „inclusion-body“-assoziierte Chaperon IbpB (α -kristallines Hitzeschockprotein, α -Hsp) mit einem monomeren Molekulargewicht von 16 kDa Oligomere mit einem Molekulargewicht von bis zu ca. 2 MDa aus (Shearstone & Baneyx, 1999). Das FeS-Protein IscU bildet Homodimere, aber auch Heterodimere mit dem *in vivo* koexprimierten IscS (Kato *et al.*, 2002).

10. Mögliche Aktivierung, Wirkungsweisen und Funktionen von Yhgl

Die Funktion eines Thioredoxin oder eines NifU-ähnliche FeS-Cluster-enthaltenden Proteins konnten nicht bestätigt werden. Erhärtet werden konnten jedoch Hinweise aus der Literatur, die Zusammenhänge von *yhgl* und der Anpassung an unterschiedliche Stressbedingungen ergeben hatten. Denkbar sind in diesem Zusammenhang Chaperon-ähnliche Funktionen und Aufgaben, die im Zusammenhang mit der Aktivierung von Chaperonen stehen. Dabei wird die wichtige und zentrale Rolle von Yhgl in der Stressanpassung von γ -Proteobakterien vor allem durch das Vorhandensein bei Organismen mit reduzierter Genausstattung, wie *Buchnera*, *Wigglesworthia* oder *Blochmannia* Stämmen betont.

Auffälligstes Merkmal bei den meisten Yhgl-ähnlichen Sequenzen ist die negative Ladung des Proteins, die sicherlich eine wichtige Rolle in der Funktionalität des Proteins spielt. Dies ist besonders auffällig, da die Homologen auch bei nicht halophilen Organismen, wie z.B. *E. coli*, einen pI von ca. 4,5 aufweisen. Die Proteine der symbiontischen Stämme bilden hier eine Ausnahme. Deren isoelektrische Punkte sind basischer, liegen jedoch noch immer unterhalb der isoelektrischen Punkte durchschnittlicher cytoplasmatischer Proteine (siehe Diskussion Abschnitt 6.3). Ein saurer pI bedeutet, dass ein Protein bei einem neutralen cytoplasmatischen pH-Wert eine negative Nettoladung aufweist.

Bei steigender intrazellulärer Konzentration positiver Ladungen durch einströmende Kaliumionen, wie es nach einem hyperosmotischen Schock bei *E. coli* oder *H. elongata* geschieht (Dinnbier *et al.*, 1988; Kraegeloh, 1998), könnte dies eine besondere Stabilität oder Aktivität des Proteins bedeuten. Besonders saure Proteine gibt es bei *Archaea* und einigen *Bacteria*, die hohe Konzentrationen von Kalium- oder Natriumionen akkumulieren, um bei erhöhter Außensalinität das osmotische Gleichgewicht über der Membran einzustellen („Salz-im-Cytoplasma-Strategie“ der Osmoadaptation). Um die hohe internen Ionenkonzentration tolerieren zu können, haben diese Proteine entwickelt, die reich an sauren Aminosäuren (Glutamat und Aspartat) und arm an basischen Aminosäuren (Lysin und Arginin) sind (Lanyi, 1974). Der Überschuss saurer Aminosäuren führt zu einer negativen Nettoladung, die eine native (aktive) Faltung verhindert, bis Kalium als Gegenion in ausreichender Konzentration vorhanden ist. So benötigt die Malat-Dehydrogenase von *Halobacterium marismortui* hohe Salzkonzentrationen (2,5 M NaCl oder KCl) für eine korrekte Faltung (Zaccai *et al.*, 1989). Ähnliches könnte für wesentlich geringere Salzkonzentrationen auch auf Yhgl-Proteine zutreffen. Die negative Ladung könnte dazu führen, dass bei Einstrom von Kalium ihre Aktivität hervorgerufen wird.

In Kombination mit einer möglichen Membranassoziation könnte die negative Ladung von Yhgl dafür sorgen, dass das Protein aufgrund eines Mangels an Kationen keine Wechselwirkungen mit der Membran eingehen kann, da diese, bedingt durch die Lipidzusammensetzung, zum Teil ebenfalls negative Ladungen aufweist. *Halomonas elongata* erhöht in Anpassung an hohe Salinität den Anteil anionischen Phosphatidylglycerols seiner Membran (Vreeland *et al.*, 1984). Bei einem Einstrom positiver Ladungen könnten jedoch Wechselwirkungen mit der Membran möglich werden und damit eine Aktivierung des Proteins erfolgen. Umgekehrte Mechanismen werden beispielsweise für den Betain-Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* gemutmaßt. Bei BetP handelt es sich um einen sekundären hochaffinen Betain-Transporter, der zur BCC-Transporter-Familie gehört und die typischen 12 Transmembran-Domänen aufweist (Peter *et al.*, 1996). Das Protein ist durch N- und C-terminale, aus 50 - 60 geladenen Aminosäuren bestehende cytoplasmatische Extensionen gekennzeichnet. Deletionen in den Extensionen führen zu veränderten regulatorischen Eigenschaften. Deletionen kleiner C-terminaler Segmente führen zu einer permanenten Aktivierung, während Deletionen in der N-terminalen Extension das Aktivierungsprofil verändern (Peter *et al.*, 1998). Aufnahmeexperimente an Proteoliposomen konnten Kaliumionen als relevantes Signal für die Aktivierung ausmachen (Rübenhagen *et al.*, 2000). Aufnahmeexperimente in Gegenwart des amphiphilen Tetracains, lassen vermuten, dass auch die physikalischen Eigenschaften der Membran die Aktivität von BetP beeinflussen. Außerdem verschieben steigende Konzentrationen des anionischen Lipids Phosphatidylglycerol das Aktivitätsoptimum in Richtung höherer Osmolarität. Aus diesen Ergebnissen wurden die Hypothese einer Wechselwirkung der cytoplasmatischen Extensionen mit den negativ geladenen Lipiden der Membran entwickelt. Diese Wechselwirkungen könnten durch KaliumEinstrom nach einem osmotischen Schock verringert werden, was dann zu einer Aktivierung des Transporters führt (Morbach, persönliche Mitteilung).

Im vorliegenden Fall könnte eine Einstrom positiver Ladungen auch dazu führen, dass eine Oligomerbildung der negativ geladenen Yhgl-Proteine möglich wird. In der nativen PAGE hatten sich Hinweise

auf eine Oligomerbildung ergeben. Eine Bildung großer Komplexe ist auch von andere sauren Proteinen geringen Molekulargewichts bekannt. So bildet das α -kristalline Hitzeschockprotein (α -Hsp) IbpB Multimere (bis 2 MDa) aus (Shearstone & Baneyx, 1999). α -Hsp-Homologe aus *Methanococcus jannaschii* bilden Oligomere aus 24 Untereinheiten (ca. 400 kDa) (Kim *et al.*, 1998). IbpAB sind in *E. coli* spezifisch mit „inclusion-bodies“ assoziiert (Allen *et al.*, 1992). In dem Experiment zur Expression falschgefalteter Proteine in *E. coli* waren neben *ibpAB* auch *yhgl* verstärkt exprimiert worden (Lesley *et al.*, 2002). Eine Beteiligung an einem gemeinsamen Prozess könnte daher gemutmaßt werden. Jedoch konnte bisher nur IbpAB und nicht Yhgl mit „inclusion-bodies“ assoziiert nachgewiesen werden. Dies könnte jedoch auch nur ein Problem der Nachweisbarkeit sein. Möglicherweise ist die Konzentration von Yhgl wesentlich geringer. Andererseits sind nicht in allen Organismen, die *yhgl*-ähnliche Sequenzen aufweisen, auch α -Hsps zu finden. So lassen sich in *Haemophilus influenzae* keine derartigen Proteine identifizieren (Review (Narberhaus, 2002)). Einander ergänzende Funktionen sind daher eher denkbar. Zu bedenken ist auch, dass eine Deletion von *ibpAB* in *E. coli* nicht zu einem Stamm führt, der sensitiver gegen verschiedene Stressbedingungen ist. Erst eine zusätzliche Mutation von DnaK führt zu einer steigenden Hitzesensitivität (Thomas & Baneyx, 1998). Anders ist dies bei *yhgl*. Hier konnte für die *yhgl*-Deletionsmutanten von *H. elongata* und *E. coli* eine erhöhte Sensitivität gegenüber steigender Salinität und bei *E. coli* BK1 ($\Delta yhgl$) auch gegenüber Harnstoff nachgewiesen werden. Die Rolle von *yhgl* in der Stressanpassung scheint also für *E. coli* bedeutender zu sein als die von *ibpAB*. Eine Funktion in der Proteinfaltung unter nicht-Stressbedingungen scheint für *E. coli* unwahrscheinlich, da die *yhgl*-Deletion bei *E. coli* erst unter gesteigerter Salinität (3,5 % NaCl) oder hoher Harnstoffkonzentration (über 0,4 M) ihre Auswirkungen zeigt. Bei *H. elongata* sind die Auswirkungen der *yhgl*-Deletion schon bei geringer Salinität erkennbar. Doch auch diese Bedingungen werden für *H. elongata* Stress darstellen. Hier sind vermutlich seine Proteine, die im Vergleich zu *E. coli* eine geringfügig negativere Nettoladung aufweisen (Gandbhir *et al.*, 1995), aufgrund eines Mangels an positiven, stabilisierenden Kationen instabil. Diese Instabilität könnte zur Denaturierung betroffener Proteine führen. Dann wäre, wie durch die vorliegenden Ergebnisse angedeutet, *yhgl* erforderlich.

Als Reaktion auf eine Temperaturerhöhung (Hitzeschock) oder Erhöhung der externen Salinität kommt es bei IbpB zu einer Verkleinerung der Proteinaggregate und zunehmend zu Konformationsänderungen, die in der Präsentation hydrophober Proteinbereiche resultieren. Über diese hydrophoben Bereiche könnte die Bindung denaturierter Proteine erfolgen (Shearstone & Baneyx, 1999). IbpB-Aggregate könnten nach Senkung der Temperatur auf eine Normalniveau ein Reservoir an ungefalteten oder denaturierten Proteinen für die Chaperone DnaK-DnaJ-GrpE darstellen (Veinger *et al.*, 1998) oder die denaturierten Proteine dem proteolytischen Recycling präsentieren. Daten über ein Verhalten von Yhgl unter Hitze- bzw. Salzstress liegen nicht vor. Auch kann keine Aussage über eine mögliche Exposition hydrophober Aminosäurereste getroffen werden. Jedoch gibt es Hinweise auf eine Fettsäureanbindung in Yhgl aus *H. elongata*. Auch dies führt zu einer Erhöhung der Hydrophobizität eines Proteins. Möglicherweise ist die festgestellte Membranassoziation nur ein sekundärer Effekt einer Acylierung, die einen ganz anderen Sinn besitzt, z.B. die Erkennung hydrophober Sequenzbereiche in ungefalteten Proteinen.

Ein weiteres herausragendes Merkmal von Yhgl sind die konservierten Cysteinreste. Hindeuten könnte dies auf eine redoxgesteuerte Regulation der Aktivität, aber auch auf eine Funktion als Redoxsensor. Denkbar ist die Ausbildung inter- oder intramolekularer Disulfidbrücken unter oxidativen Bedingungen, die zur Aktivierung von Yhgl führen könnten. Die Aktivität als Redoxsensor stellt keinen Widerspruch zu einer Beteiligung von Yhgl in der Anpassung an Hitze- oder Denaturierungsstress dar. Benov & Fridovich (1995) zeigten eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit eines *E. coli* Stammes ohne Superoxid-Dismutase ($\Delta sodA \Delta sodB$) nach einem Hitzeschock. Das Chaperon Hsp33 von *E. coli* dient als Redoxsensor (Jakob *et al.*, 1999). In seiner reduzierten monomeren Form ist Hsp33 inaktiv. In der oxidierten Form liegt es als Dimer vor und ist aktiv in der Renaturierung von oxidativ-geschädigten Proteinen. Die Aktivität wird durch die reversible Bildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Paaren von Cysteinresten hervorgerufen, die in ihrem reduzierten Zustand ein Zink koordinieren (Barbirz *et al.*, 2000). Möglicherweise gibt es für Yhgl einen ähnlichen Mechanismus, der jedoch nicht unbedingt über die Koordinierung eines Zinks ablaufen müsste. Auch die einfache Ausbildung von Disulfidbrücken könnte zu Konformationsänderungen führen, die eine mögliche Aktivität von Yhgl hervorrufen.

11. Ausblick

Als neue, kaum charakterisierte Komponente der Stressanpassung bietet *yhgI*/Yhgl ein weites Untersuchungsfeld, um neue Einblicke in die Stressanpassung von Mikroorganismen, vor allem γ -Proteobakterien, zu gewinnen. Dabei wäre die Identifizierung von anderen Stressfaktoren, deren Anpassung auch durch die *yhgI*-Deletion betroffen ist, von großem Interesse. So könnte auf ähnlich gelagerte zelluläre Auswirkungen durch die unterschiedlichen Stressfaktoren geschlossen werden, aber auch auf eine gleichermaßen regulierte oder durchgeführte Stressantwort.

Von großer Wichtigkeit ist auch die Identifizierung möglicher Wechselwirkungspartner von Yhgl. Dazu sollte ein Two-Hybrid-System verwendet werden. Hierbei müssten jedoch zuerst die Probleme bei der Erstellung einer vollständigen Genbank von *H. elongata* DNA beseitigt werden. Die Nutzung einer *E. coli* Genbank oder cDNA-Bank wäre die einfachere Alternative. Je nach Funktion von Yhgl wären unterschiedliche Ergebnisse zu erwarten. Wäre die Funktion ähnlich der von IbpAB, wäre mit einer Vielzahl möglicher Wechselwirkungspartner zu rechnen, da hier die Bindung vermutlich unspezifisch über die Exponierung hydrophober Aminosäurereste erfolgt. Regulatorische Funktionen von Yhgl würden vermutlich zu einer wesentlich geringeren Zahl möglicher Wechselwirkungspartner führen.

Für eine weitere Charakterisierung von Yhgl wäre zunächst eine Bestätigung der Membranassoziation erforderlich. Dazu sollte anstelle des Wildtypallels eine Variante von *yhgI* mit angehängter (His)₆-tag kodierender Sequenz chromosomal bei *E. coli* K-12 bzw. *H. elongata* DSM 2581^T integriert werden. Erneut müsste eine Zellfraktionierung erfolgen. Dafür wäre es sinnvoll, Wachstumsbedingungen für die Anzucht des Zellmaterials auszuwählen, die den Stamm einem gewissen Stress aussetzen, wie z.B. erhöhte Salinität oder Temperatur. Die Anzucht sollte in Mineralsalzmedium erfolgen, um kompensierende Einflüsse der im Komplexmedium enthaltenen kompatiblen Solute zu verhindern.

Weiterhin wären verschiedene Sequenzmutation für eine Charakterisierung von Yhgl sinnvoll. Diese Mutationen könnten das konservierte Sequenzmotiv KAPNAK betreffen. Hier wäre an einen Austausch der Lysinreste (K) zu denken, über die möglicherweise eine Fettsäureanbindung erfolgt ist. In Kombination mit einer chromosomal integrierten Variante von *yhgI* mit angehängter (His)₆-tag kodierender Sequenz könnte anschließend erneut eine Membranassoziation überprüft werden. Der Austausch der Lysinreste könnte über PCR und entsprechend modifizierte Primer erfolgen.

Weitere Mutationen könnten die unterschiedlichen konservierten Cysteinreste betreffen. Diese könnten gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden, die möglichst wenig Einfluss auf eine Proteinfaltung besitzen. Denkbar wäre dabei ein Austausch gegen Alaninreste. Vorher sollte jedoch eine computergestützte Strukturvorhersage durchgeführt werden, um die Lokalisation der Cysteinreste im Protein genauer zu bestimmen. Nach dem Austausch müsste das Wachstum dann mit dem der salzsensitiven Stämme *H. elongata* KB6 bzw. *E. coli* BK1 verglichen werden. Dabei würde sich herausstellen, ob weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Funktion eines Thioredoxins, NifU/IscU-Proteins oder eines Redoxensors sinnvoll sind.

Auch die Stärke der Expression, ausgehend der unterschiedlichen identifizierten *yhgI*-Promotoren, wäre ein wichtiges Charakteristikum für die Identifizierung von zellulärem Stress. So könnte diese Quantifizierung unter verschiedenen Stresseinwirkungen erfolgen. Damit könnte auch festgestellt werden, ob Wachstum bei geringer Salinität für *H. elongata* eine Art des Stresses darstellt und ob unter diesen Bedingungen eine verstärkte Expression von *yhgI* erfolgt. Diese Arbeiten sollten mit chromosomal, in den Wildtypstämmen integrierten Promotorfusionen durchgeführt werden. Dies ist jedoch bisher nur bei *E. coli* möglich, da nur hier eine geeignete Insertionsstelle innerhalb des Tryptophan-Operons bekannt ist (Elliott, 1992). In *H. elongata* könnte möglicherweise einer der zahlreichen Solutetransporter als Insertionsstelle verwendet werden. Denkbar wäre hier an die *proX*-Region, deren Ausschaltung keinen Phänotyp ergeben hatte (Kraegeloh, 2003). Da die Experimente zur Expression von *yhgI* in Mineralsalzmedium durchgeführt würden, dürfte dem Stamm dadurch keine Wachstumsnachteile entstehen. Die Quantifizierung könnte über Reportergene und ihre Stoffwechselaktivität (*lacZ* oder *gfp*), besser jedoch über den Nachweis eines Transkriptes (Real-Time-PCR oder Northern-Blots) erfolgen.

V. Zusammenfassung

Halomonas elongata ABU44, eine salzsensitive Transposonmutante (Tn1732) von *H. elongata* DSM 2581^T (Wildtyp), zeigt bei geringer Salinität (2 % NaCl) ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum in Mineralsalzmedium und bei 16 % NaCl einen Ausfall des Wachstums in Mineralsalzmedium (Burdziak, 1999). Durch die Tn1732-Insertion war es zu einer Beeinträchtigung eines unbekanntem Mechanismus, der an der Osmoadaptation von *H. elongata* beteiligt ist, gekommen. Die Transposoninsertion war innerhalb der Promotorregionen zweier entgegengesetzt orientierter Genen, *yhgI* und *metH*, erfolgt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diesen neuen Mechanismus der Osmoadaptation vergleichend bei *H. elongata* DSM 2581^T und *E. coli* K-12 näher zu charakterisieren.

Zunächst wurde die DNA-Sequenz der *yhgI-metH*-Region von *Halomonas elongata* DSM 2581^T durch Ligase-vermittelte PCR vervollständigt. Die genutzte *E. coli* K-12 DNA-Sequenz ist auf der NCBI-Homepage (AE000417, Basen 450 - 4710) erhältlich.

Mittels Insertion- und Deletionsmutagenese konnte für *H. elongata* eine Beteiligung des *yhgI*-Gens an der Osmoadaptation nachgewiesen werden. Die *yhgI*-Deletionsmutanten *H. elongata* KB5 ($\Delta yhgI::\Omega$) und KB6 ($\Delta yhgI$) zeigten einen salzsensitiven Phänotyp, die *metH*-Insertionsmutante *H. elongata* KB4 (*metH*:: Ω) einen auxotrophen, nicht durch Methionin komplementierbaren, Phänotyp. Das Wachstumsdefizit von KB5 und KB6 ist teilweise durch plasmidkodiertes *yhgI* aus *E. coli* K-12 komplementierbar. Gleiches gilt bei einer chromosomalen Integration des *E. coli* Gens (*H. elongata* KB7 ($\Delta yhgI::yhgI_{Ec}$)). Auch die Deletion von *yhgI* aus *E. coli* K-12 führte zu einem salzsensitiven Stamm (*E. coli* BK1). Dessen Salzsensitivität ist vollständig durch kloniertes *yhgI* aus *H. elongata* komplementierbar. Die wechselseitige Komplementierbarkeit deutet darauf hin, dass *yhgI* als Protein seine Funktion ausübt. Als *cis-aktive* regulatorische DNA-Sequenz (z.B. Enhancer) ist eine *in trans* wirkende Funktion ausgehend von einem Plasmid auszuschließen. Außerdem weisen beide DNA-Sequenzen keine nennenswerte Ähnlichkeit auf. Eine gleichartige regulatorische Funktion ist von daher ebenfalls unwahrscheinlich.

Durch einige Autoren war eine Beteiligung von *yhgI* an der Kompetenz zur DNA-Aufnahme vermutet worden (Finkel & Kolter, 2001). Mittels des verwendeten BacterioMatch[®] Two-Hybrid-Systems konnten diese Vermutungen jedoch nicht bestätigt werden. Es konnten keine Wechselwirkungen zwischen YhgI und YhgH nachgewiesen werden. YhgH wird durch das stromaufwärts von *yhgI* gelegene Kompetenzgen *yhgH* kodiert. Außerdem war es nicht möglich durch „Screening“ einer Genbank von *H. elongata* anderen Wechselwirkungspartner zu identifizieren.

Vollständige bzw. teilweise Deletionen von *yhgH* in *E. coli* K-12 deuteten ebenfalls nicht auf eine Beteiligung von YhgI und YhgH an einem gemeinsamen zellulären Prozess hin. Auswertungen von Genomsequenzen symbiontischer Stämme (*Buchnera*, *Wigglesworthia*, *Blochmannia*) ließen auf eine

alternative wichtige Funktion schließen. Diese Stämme weisen eine sehr reduzierte Genausstattung ohne Kompetenzgene auf. Dennoch besitzen sie ein *yhgI*-Gen. Damit gehört *yhgI* zum Kerngenom von γ -Proteobakterien und muss eine zentrale, wichtige Funktion besitzen.

Die Deletionen von *yhgH* in *E. coli* K-12 deuteten auf mehrere regulatorische Bereiche, welche die Expression von *yhgI* steuern, hin. Im Bereich des ORFs von *yhgH* konnten mittels RACE-PCR drei Transkriptionsstartpunkte für *yhgI* und die zugehörigen Promotoren identifiziert werden. Es handelte sich um einen σ^{70} -, einen σ^{32} - und einen σ^{54} -abhängigen Promotor. Stromaufwärts von *yhgI* aus *H. elongata* konnte ein σ^{70} - und ein σ^{32} -abhängiger Promotor bestimmt werden. Für beide Gene bestätigte sich auch hier die zentrale Rolle in zellulären Prozessen. Die σ^{32} -abhängigen Promotoren lassen eine wichtige Funktion von *yhgI* in der Antwort auf Stresseinwirkung vermuten.

Shaw *et al.* (2003) wiesen bei *E. coli* eine erhöhte Expression von *yhgI* als Antwort auf die Einwirkung von Kanamycin nach. Lesley *et al.* (2002) zeigten eine verstärkte *yhgI*-Promotoraktivität bei der Expression falschgefalteter Proteine. Daran anknüpfende Wachstumsexperimente unter steigenden Inkubationstemperaturen ergaben keine erhöhte Hitzesensitivität der *yhgI*-Mutanten von *E. coli* und *H. elongata* in Komplexmedium (AB-Medium). Untersuchungen des Wachstums in Mineralsalzmedium unter steigenden Harnstoffkonzentrationen zeigten eine erhöhte Harnstoffsensitivität von *E. coli* BK1 ($\Delta yhgI$). Alle *H. elongata* Stämme tolerierten mit steigender Salinität auch steigende Harnstoffkonzentrationen. Eine erhöhte Harnstoffsensitivität war bei den *yhgI*-Mutanten von *H. elongata* nicht zu erkennen.

YhgI aus *H. elongata* konnte als (His)₆-tag Fusionsprotein in *E. coli* BL21 (DE3) pETY5 überexprimiert und mittels Nickelchelat-Chromatographie aufgereinigt werden. Die Aktivität eines Thioredoxin, auf die sich bei den Untersuchungen der YhgI-Sequenz Hinweise ergeben hatten, konnte für YhgI-(His)₆ nicht nachgewiesen werden. Gleichermäßen konnte in einem Absorptionsspektrum keine Hinweise auf Cofaktoren wie z.B. FeS-Cluster oder NAD(P)⁺/NAD(P)H gefunden werden. So ergaben sich auch keine Hinweise auf mögliche alternative Funktionen. Western-Blot-Analysen der Zellfraktionen deuten auf eine Membranassoziation von YhgI aus *H. elongata* hin.

VI. Literatur

- Agar, J.; Yuvaniyama, P.; Jack, R.; Cash, V.; Smith, A.; Dean, D. und Johnson, M. (2000) Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein. *J Biol Inorg Chem* **5**: 167-177.
- Aiyar, S.; Gourse, R. und Ross, W. (1998) Upstream A-tracts increase bacterial promoter activity through interactions with the RNA polymerase alpha subunit. *PNAS* **95**: 14652-14657.
- Ajouz, B.; Berrier, C.; Garrigues, A.; Besnard, M. und Ghazi, A. (1998) Release of Thioredoxin via the Mechanosensitive Channel MscL during Osmotic Downshock of *Escherichia coli* Cells. *J Biol Chem* **273**: 26670-26674.
- Akman, L.; Yamashita, A.; Watanabe, H.; Oshima, K.; Shiba, T.; Hattori, M. und Aksoy, S. (2002) Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat Genet* **32**: 402-407.
- Alaminos, M. und Ramos, J. (2001) The methionine biosynthetic pathway from homoserine in *Pseudomonas putida* involves the *metW*, *metX*, *metZ*, *metH* and *metE* gene products. *Arch Microbiol* **176**: 151-154.
- Allen, S.; Polazzi, J.; Gierse, J. und Easton, A. (1992) Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 6938-6947.
- Altschul, S.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. und Lipman, D. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Andersen, G.; Beattie, G. und Lindow, S. (1998) Molecular Characterization and Sequence of a Methionine Biosynthetic Locus from *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* **180**: 4497-4507.
- Andersson, J. und Andersson, S. (2001) Pseudogenes, Junk DNA, and the Dynamics of *Rickettsia* Genomes. *Mol Biol Evol* **18**: 829-839.
- Angelichio, M. und Camilli, A. (2002) *In Vivo* Expression Technology. *Infect Immun* **70**: 6518-6523.
- Antoine, R. und Locht, C. (1992) Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol* **6**: 1785-1799.
- Anton, J.; Oren, A.; Benlloch, S.; Rodriguez-Valera, F.; Amann, R. und Rossello-Mora, R. (2002) *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 485-491.
- Arahal, D.; Garcia, M.; Vargas, C.; Canovas, D.; Nieto, J. und Ventosa, A. (2001) *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1457-1462.
- Arakawa, T. und Timasheff, S. (1983) Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch Biochem Biophys* **224**: 169-177.
- Arner, E. und Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**: 6102-6109.
- Arsene, F.; Tomoyasu, T. und Bukau, B. (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **55**: 3-9.
- Bairoch, A.; Bucher, P. und Hofmann, K. (1997) The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res* **25**: 217-221.
- Banerjee, R.; Johnston, N.; Sobeski, J.; Datta, P. und Matthews, R. (1989) Cloning and sequence analysis of the *Escherichia coli metH* gene encoding cobalamin-dependent methionine synthase and isolation of a tryptic fragment containing the cobalamin-binding domain. *J Biol Chem* **264**: 13888-13895.

- Barbirz, S.; Jakob, U. und Glocker, M. (2000) Mass Spectrometry Unravels Disulfide Bond Formation as the Mechanism That Activates a Molecular Chaperone. *J Biol Chem* **275**: 18759-18766.
- Barrios, H.; Valderrama, B. und Morett, E. (1999) Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **27**: 4305-4313.
- Barton, K.; Buhr, M. und Ballantyne, J. (1999) Effects of urea and trimethylamine N-oxide on fluidity of liposomes and membranes of an elasmobranch. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **276**: 397-406.
- Beissinger, M. und Buchner, J. (1998) How chaperones fold proteins. *Biol Chem* **379**: 245-259.
- Beney, L. und Gervais, P. (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**: 34-42.
- Benov, L. und Fridovich, I. (1995) Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 3344-3346.
- Berrier, C.; Garrigues, A.; Richarme, G. und Ghazi, A. (2000) Elongation Factor Tu and DnaK Are Transferred from the Cytoplasm to the Periplasm of *Escherichia coli* during Osmotic Downshock Presumably via the Mechanosensitive Channel MscL. *J Bacteriol* **182**: 248-251.
- Bianchi, A. und Baneyx, F. (1999a) Stress Responses as a Tool To Detect and Characterize the Mode of Action of Antibacterial Agents. *Appl Envir Microbiol* **65**: 5023-5027.
- Bianchi, A. und Baneyx, F. (1999b) Hyperosmotic shock induces the sigma32 and sigmaE stress regulons of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**: 1029-1038.
- Birnboim, H. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Blattner, F.; Plunkett, G., III; Bloch, C.; Perna, N.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J.; Rode, C.; Mayhew, G.; Gregor, J.; Davis, N.; Kirkpatrick, H.; Goeden, M.; Rose, D.; Mau, B. und Shao, Y. (1997) The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.
- Bolen, D. und Baskakov, I. (2001) The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol* **310**: 955-963.
- Brown, A. (1976) Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40**: 803-846.
- Buck, M.; Gallegos, M.-T.; Studholme, D.; Guo, Y. und Gralla, J. (2000) The Bacterial Enhancer-Dependent σ^{54} (σ^N) Transcription Factor. *J Bacteriol* **182**: 4129-4136.
- Bukau, B. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* **9**: 671-680.
- Bukau, B. und Horwich, A. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366.
- Burdziak, D. (1999) Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Osmoadaptation an *Halomonas elongata* - Isolierung und Charakterisierung eines DNA-Locus, beteiligt an der Anpassung an hohe Salzkonzentration. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Bursy, J.; Pierik, A.; Pica, N. und Bremer, E. (2004) Osmoregulated biosynthesis of compatible solutes ectoine and hydroxyectoine in *Salibacillus sallexigens*: Characterization of the ectoine hydroxylase. *Biospektrum: Sonderausgabe zur VAAM-Jahrestagung 2004*.
- Canovas, D.; Vargas, C.; Csonka, L.; Ventosa, A. und Nieto, J. (1998) Synthesis of Glycine Betaine from Exogenous Choline in the Moderately Halophilic Bacterium *Halomonas elongata*. *Appl Envir Microbiol* **64**: 4095-4097.
- Carmona, M.; Claverie-Martin, F. und Magasanik, B. (1997) DNA bending and the initiation of transcription at σ^{54} -dependent bacterial promoters. *PNAS* **94**: 9568-9572.
- Carrio, M.; Corchero, J. und Villaverde, A. (1998) Dynamics of *in vivo* protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **169**: 9-15.

- Cayley, D.; Guttman, H. und Record, M., Jr (2000) Biophysical Characterization of Changes in Amounts and Activity of *Escherichia coli* Cell and Compartment Water and Turgor Pressure in Response to Osmotic Stress. *Biophys J* **78**: 1748-1764.
- Cayley, S.; Lewis, B.; Guttman, H. und Record, M. (1991) Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. Implications for protein-DNA interactions *in vivo*. *J Mol Biol* **222**: 281-300.
- Cayley, S.; Lewis, B. und Record, M., Jr (1992) Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **174**: 1586-1595.
- Chuang, S. und Blattner, F. (1993) Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 5242-5252.
- Cohen, S.; Chang, A. und Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *PNAS* **69**: 2110-2114.
- Crowe, L. und Crowe, J. (1992) Stabilization of dry liposomes by carbohydrates. *Dev Biol Stand* **74**: 285-294.
- Cserzo, M.; Wallin, E.; Simon, I.; von Heijne, G. und Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* **10**: 673-676.
- Csonka, L. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Mol Biol Rev* **53**: 121-147.
- Culham, D.; Lasby, B.; Marangoni, A.; Milner, J.; Steer, B.; van Nues, R. und Wood, J. (1993) Isolation and sequencing of *Escherichia coli* gene *proP* reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. *J Mol Biol* **229**: 268-276.
- Culham, D.; Lu, A.; Jishage, M.; Krogfelt, K.; Ishihama, A. und Wood, J. (2001) The osmotic stress response and virulence in pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*: contributions of RpoS, ProP, ProU and other systems. *Microbiology* **147**: 1657-1670.
- Cullis, P. und de Kruijff, B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* **559**: 399-420.
- de Crouy-Chanel, A.; Kohiyama, M. und Richarme, G. (1995) A Novel Function of *Escherichia coli* Chaperone DnaJ. *J Biol Chem* **270**: 22669-22672.
- Delorme, C.; Godon, J.; Ehrlich, S. und Renault, P. (1993) Gene inactivation in *Lactococcus lactis*: histidine biosynthesis. *J Bacteriol* **175**: 4391-4399.
- Diamant, S.; Eliahu, N.; Rosenthal, D. und Goloubinoff, P. (2001) Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones *in Vitro* and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses. *J Biol Chem* **276**: 39586-39591.
- Dimroth, P. (1987) Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **51**: 320-340.
- Ding, H. und Clark, R. (2004) Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron sulfur cluster assembly protein. *Biochem J Pt.*
- Dinnbier, U.; Limpinsel, E.; Schmid, R. und Bakker, E. (1988) Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol* **150**: 348-357.
- Dobson, S.; McMeekin, T. und Franzmann, P. (1993) Phylogenetic relationships between some members of the genera *Deleya*, *Halomonas*, and *Halovibrio*. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 665-673.
- Dombek, K. und Ingram, L. (1984) Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol* **157**: 233-239.

- Dombroski, A.; Walter, W.; Record, M.; Siegele, D. und Gross, C. (1992) Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* **70**: 501-512.
- Dove, S.; Joung, J. und Hochschild, A. (1997) Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* **386**: 627-630.
- Drennan, C.; Huang, S.; Drummond, J.; Matthews, R. und Lidwig, M. (1994) How a protein binds B12: A 3.0 Å X-ray structure of B12-binding domains of methionine synthase. *Science* **266**: 1669-1674.
- Elliott, T. (1992) A method for constructing single-copy lac fusions in *Salmonella typhimurium* and its application to the *hema-prfA* operon. *J Bacteriol* **174**: 245-253.
- Emory, S.; Bouvet, P. und Belasco, J. (1992) A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes & Dev* **6**: 135-148.
- Estrem, S.; Gaal, T.; Ross, W. und Gourse, R. (1998) Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *PNAS* **95**: 9761-9766.
- Falquet, L.; Pagni, M.; Bucher, P.; Hulo, N.; Sigrist, C.; Hofmann, K. und Bairoch, A. (2002) The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res* **30**: 235-238.
- Fayet, O.; Ziegelhoffer, T. und Georgopoulos, C. (1989) The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* **171**: 1379-1385.
- Finkel, S. und Kolter, R. (2001) DNA as a Nutrient: Novel Role for Bacterial Competence Gene Homologs. *J Bacteriol* **183**: 6288-6293.
- Forward, J.; Behrendt, M.; Wyborn, N.; Cross, R. und Kelly, D. (1997) TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **179**: 5482-5493.
- Frazzon, J.; Fick, J. und Dean, D. (2002) Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. *Biochem Soc Trans* **30**: 680-685.
- Frey, J. und Krisch, H. (1985) Omega mutagenesis in gram-negative bacteria: a selectable interposon which is strongly polar in a wide range of bacterial species. *Gene* **36**: 143-150.
- Galinski, E.; Pfeiffer, H. und Trüper, H. (1985) 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem* **149**: 135-139.
- Galinski, E. und Trüper, H. (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 95-108.
- Galinski, E. (1995a) Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* **37**: 272-328.
- Galinski, E. (1995b) Halophile und halotolerante Eubakterien. In *Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen*. Kremer, B. (ed): VCH Weinheim.
- Gamer, J.; Multhaup, G.; Tomoyasu, T.; McCarty, J.; Rudiger, S.; Schonfeld, H.; Schirra, C.; Bujard, H. und Bukau, B. (1996) A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor sigma32. *EMBO J* **15**: 607-617.
- Gandbhir, M.; Rasched, I.; Marliere, P. und Mutzel, R. (1995) Convergent evolution of amino acid usage in archaeobacterial and eubacterial lineages adapted to high salt. *Res Microbiol* **146**: 113-120.
- Gardy, J.; Spencer, C.; Wang, K.; Ester, M.; Tusnady, G.; Simon, I.; Hua, S.; deFays, K.; Lambert, C.; Nakai, K. und Brinkman, F. (2003) PSORT-B: improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. *Nucl Acids Res* **31**: 3613-3617.
- Giæver, H.; Styrvold, O.; Kaasen, I. und Strom, A. (1988) Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 2841-2849.

- Gil, R.; Sabater-Munoz, B.; Latorre, A.; Silva, F. und Moya, A. (2002) Extreme genome reduction in *Buchnera* spp.: Toward the minimal genome needed for symbiotic life. *PNAS* **99**: 4454-4458.
- Gil, R.; Silva, F.; Zientz, E.; Delmotte, F.; Gonzalez-Candelas, F.; Latorre, A.; Rausell, C.; Kamerbeek, J.; Gadau, J.; Holldobler, B.; van Ham, R.; Gross, R. und Moya, A. (2003) The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *PNAS* **100**: 9388-9393.
- Gläser, H.; Thomas, D.; Gaxiola, R.; Montrichard, F.; Surdin-Kerjan, Y. und Serrano, R. (1993) Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *EMBO J* **12**: 3105-3110.
- Gleason, F. und Holmgren, A. (1988) Thioredoxin and related proteins in procaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **4**: 271-297.
- Göller, K. (1995) Enzymologische und fluoreszenzspektroskopische Studien zur Stabilisierung der Lactatdehydrogenase durch kompatible Solute und Hofmeister-Salze. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Göller, K.; Ofer, A. und Galinski, E. (1998) Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **161**: 293-300.
- Göller, K. (1999) Identifizierung und Charakterisierung des Ectoin-Genclusters in *Halomonas elongata*. Dissertation, Universität Bonn.
- Göller, K. und Galinski, E. (1999) Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute addition. *J Mol Catal B Enzymatic* **7**: 37-45.
- Gouesbet, G.; Jebbar, M.; Talibart, R.; Bernard, T. und Blanco, C. (1994) Pipecolic acid is an osmoprotectant for *Escherichia coli* taken up by the general osmoporters ProU and ProP. *Microbiology* **140**: 2415-2422.
- Goulding, C. und Matthews, R. (1997) Cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*: involvement of zinc in homocysteine activation. *Biochemistry* **36**: 15749-15757.
- Goulding, C.; Postigo, D. und Matthews, R. (1997) Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine. *Biochemistry* **36**: 8082-8091.
- Gowrishankar, J. (1989) Nucleotide sequence of the osmoregulatory *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 1923-1931.
- Grammann, K. (2000) Identifizierung und Charakterisierung eines osmoregulierten Solutetransporters in einer Δ *ectA* Mutante von *H. elongata*. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Grammann, K.; Volke, A. und Kunte, H. (2002) New Type of Osmoregulated Solute Transporter Identified in Halophilic Members of the Bacteria Domain: TRAP Transporter TeaABC Mediates Uptake of Ectoine and Hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *J Bacteriol* **184**: 3078-3085.
- Grammel, N. (1999) Molekulargenetische und biochemische Analyse der Biosynthese von 2-Methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin und seinem 5-Hydroxyderivat, zwei salzstreßinduzierbaren Osmolyten, in *Streptomyces chrysomallus*. Dissertation, Technischen Universität Berlin.
- Gross, C. (1996) Function and Regulation of the Heat Shock Proteins. In *Escherichia coli and Salmonella - Cellular and Molecular Biology*. Vol. 1. Umberger, H. (ed). Washington D.C.: ASM Press, pp. 1382-1399.
- Hamilton, C.; Aldea, M.; Washburn, B.; Babitzke, P. und Kushner, S. (1989) New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 4617-4622.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hancock, R. (1981) Aminoglycoside uptake and mode of action-with special reference to streptomycin and gentamicin. II. Effects of aminoglycosides on cells. *J Antimicrob Chemother* **8**: 429-445.
- Hartley, D. und Kane, J. (1988) Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* **16**: 101-102.
- Hayashi, S. und Wu, H. (1990) Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* **22**: 451-471.

- Hengge-Aronis, R. (2003) The general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. In *Regulatory Networks in Prokaryotes*. Friedrich, B. (ed): Horizon Scientific Press, pp. 173-179.
- Hillen, W. (1999) The Genetic Information. In *Biology of the Prokaryotes*. Schlegel, H. (ed). Stuttgart/ New York: Thieme / Blackwell Science, pp. 362-385.
- Hirschman, J.; Wong, P.; Sei, K.; Keener, J. und Kustu, S. (1985) Products of nitrogen regulatory genes *ntxA* and *ntxC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntxA* product is a sigma factor. *PNAS* **82**: 7525-7529.
- Hoff, K.; Silberg, J. und Vickery, L. (2000) Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *PNAS* **97**: 7790-7795.
- Holmgren, A. (1968) Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli* B. *Eur J Biochem* **6**: 475-484.
- Holmgren, A. (1979) Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *J Biol Chem* **254**: 9113-9119.
- Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* **54**: 237-271.
- Holtwick, R.; Meinhardt, F. und Keweloh, H. (1997) *cis-trans* Isomerization of Unsaturated Fatty Acids: Cloning and Sequencing of the *ctf* Gene from *Pseudomonas putida* P8. *Appl Envir Microbiol* **63**: 4292-4297.
- Hoover, T.; Santero, E.; Porter, S. und Kustu, S. (1990) The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* **63**: 11-22.
- Horton, R.; Hunt, H.; Ho, S.; Pullen, J. und Pease, L. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**: 61-68.
- Houry, W.; Frishman, D.; Eckerskorn, C.; Lottspeich, F. und Hartl, F. (1999) Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* **402**: 147-154.
- Imhoff, J. und Thiemann, B. (1991) Influence of salt concentration and temperature on the fatty acid composition of *Ectothiorhodospira* and other halophilic phototrophic purple. bacteria. *Arch Microbiol* **156**: 370-375.
- Inoue, H.; Nojima, H. und Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Isturiz, T.; Diaz-Benjumea, R.; Rodriguez, N. und Porco, A. (2001) Involvement of *gntS* in the control of Gntl, the main system for gluconate metabolism in *Escherichia coli*. *J Basic Microbiol* **41**: 75-83.
- Jacobson, M.; Cash, V.; Weiss, M.; Laird, N.; Newton, W. und Dean, D. (1989) Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet* **219**: 49-57.
- Jakob, U.; Gaestel, M.; Engel, K. und Buchner, J. (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* **268**: 1517-1520.
- Jakob, U.; Muse, W.; Eser, M. und Bardwell, J. (1999) Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96**: 341-352.
- Jordan, A.; Aslund, F.; Pontis, E.; Reichard, P. und Holmgren, A. (1997) Characterization of *Escherichia coli* NrdH. A GLUTAREDOXIN-LIKE PROTEIN WITH A THIOREDOXIN-LIKE ACTIVITY PROFILE. *J Biol Chem* **272**: 18044-18050.
- Joshi, A.; Baichwal, V. und Ames, G.-I. (1991) Rapid polymerase chain reaction amplification using intact bacterial cells. *Biotechniques* **10**: 42-45.
- Juncker, A.; Willenbrock, H.; von Heijne, G.; Brunak, S.; Nielsen, H. und Krogh, A. (2003) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* **12**: 1652-1662.
- Kaasen, I.; McDougall, J. und Strom, A. (1994) Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* **145**: 9-15.

- Kato, S.-I.; Mihara, H.; Kurihara, T.; Takahashi, Y.; Tokumoto, U.; Yoshimura, T. und Esaki, N. (2002) Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfide bridge formation in a covalently bound IscS/IscU complex: Implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly. *PNAS* **99**: 5948-5952.
- Kelly, D. und Thomas, G. (2001) The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 405-424.
- Kennedy, C. und Dean, D. (1992) The *nifU*, *nifS* and *nifV* gene products are required for activity of all three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet* **231**: 494-498.
- Kim, R.; Kim, K.; Yokota, H. und Kim, S.-H. (1998) Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *PNAS* **95**: 9129-9133.
- Kita, Y.; Arakawa, T.; Lin, T. und Timasheff, S. (1994) Contribution of the surface free energy perturbation to protein-solvent interactions. *Biochemistry* **33**: 15178-15189.
- Kitagawa, M.; Matsumura, Y. und Tsuchido, T. (2000) Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 165-171.
- Klein, P.; Somorjai, R. und Lau, P. (1988) Distinctive properties of signal sequences from bacterial lipoproteins. *Protein Eng* **2**: 15-20.
- Knapp, S.; Ladenstein, R. und Galinski, E. (1999) Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* **3**: 191-198.
- Koch, A. (1990) Growth and Form of the Bacterial Cell Wall. *Am Sci* **78**: 327-345.
- Kovach, M.; Phillips, R.; Elzer, P.; Roop, R. und Peterson, K. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**: 800-802.
- Kraegeloh, A. (1998) Die Bedeutung von Kalium für die Osmoadaptation von *Halomonas elongata*. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Kraegeloh, A. und Kunte, H. (2002) Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*. *Extremophiles* **6**: 453-462.
- Kraegeloh, A. (2003) Untersuchungen zur Osmoregulation von *Halomonas elongata*: Identifizierung und Charakterisierung von Aufnahmesystemen für Kalium und organische Solute. Dissertation, Universität Bonn.
- Kraegeloh, A.; Amendt, B. und Kunte, H. (2004) Cation transport in halophilic members of the *bacteria* domain: identification and characterization of the K⁺ uptake systems TrkH and TrkI from *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *J Bacteriol* eingereicht.
- Kuczynska-Wisnik, D.; Laskowska, E. und Taylor, A. (2001) Transcription of the *ibpB* heat-shock gene is under control of sigma(32)- and sigma(54)-promoters, a third regulon of heat-shock response. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 57-64.
- Kunte, H. (1995) Grundlagen zur molekularbiologischen Untersuchung halophiler Eubakterien: Aufbau eines Insertionsmutagenese-Systems für *Halomonas elongata*. Doktorarbeit, Universität Bonn.
- Kunte, H. und Galinski, E. (1995) Transposon mutagenesis in halophilic eubacteria: conjugal transfer and insertion of transposon Tn5 and Tn1732 in *Halomonas elongata*. *FEMS Microbiol Lett* **128**: 293-299.
- Kushner, S. (2002) mRNA Decay in *Escherichia coli* Comes of Age. *J Bacteriol* **184**: 4658-4665.
- Kustu, S.; Santero, E.; Keener, J.; Popham, D. und Weiss, D. (1989) Expression of sigma 54 (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* **53**: 367-376.
- Kyte, J. und Doolittle, R. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
- Lacks, S. (1999) DNA uptake by transformable bacteria. In *Transport of molecules across microbial membranes*. F.B. Ward, F. (ed). Cambridge: Cambridge University Press, pp. 136-168.

- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai, M.; Sowers, K.; Robertson, D.; Roberts, M. und Gunsalus, R. (1991) Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaeobacteria. *J Bacteriol* **173**: 5352-5358.
- Lai, Y.-C.; Peng, H.-L. und Chang, H.-Y. (2001) Identification of Genes Induced *In Vivo* during *Klebsiella pneumoniae* CG43 Infection. *Infect Immun* **69**: 7140-7145.
- Lande, M.; Donovan, J. und Zeidel, M. (1995) The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *J Gen Physiol* **106**: 67-84.
- Landfald, B. und Strøm, A. (1986) Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **165**: 849-855.
- Lanyi, J. (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **38**: 272-290.
- Larsen, P.; Sydnes, L.; Landfald, B. und Strom, A. (1987) Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch Microbiol* **147**: 1-7.
- LaVallie, E.; DiBlasio, E.; Kovacic, S.; Grant, K.; Schendel, P. und McCoy, J. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (NY)* **11**: 187-193.
- Lee, G.; Roseman, A.; Saibil, H. und Vierling, E. (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J* **16**: 659-671.
- Lee, J. und Timasheff, S. (1981) The stabilization of proteins by sucrose. *J Biol Chem* **256**: 7193-7201.
- Lesley, S.; Graziano, J.; Cho, C.; Knuth, M. und Klock, H. (2002) Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein. *Protein Eng* **15**: 153-160.
- Lesley, S. und Knuth, M. (2003) Solubility reporter gene constructs. USA: IRM LLC.
- Liberek, K. und Georgopoulos, C. (1993) Autoregulation of the *Escherichia coli* Heat Shock Response by the DnaK and DnaJ Heat Shock Proteins. *PNAS* **90**: 11019-11023.
- Lippert, K. und Galinski, E. (1992) Enzym stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbial Biotechnol* **37**: 61-65.
- Liu, Y. und Bolen, D. (1995) The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* **34**: 12884-12891.
- Louis, P. und Galinski, E. (1997) Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**: 1141-1149.
- Lundström, J. und Holmgren, A. (1990) Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J Biol Chem* **265**: 9114-9120.
- Ly, A.; Henderson, J.; Lu, A.; Culham, D. und Wood, J. (2004) Osmoregulatory Systems of *Escherichia coli*: Identification of Betaine-Carnitine-Choline Transporter Family Member BetU and Distributions of *betU* and *trkG* among Pathogenic and Nonpathogenic Isolates. *J Bacteriol* **186**: 296-306.
- Mahan, M.; Slauch, J. und Mekalanos, J. (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science*: 686-688.
- Marchler-Bauer, A.; Anderson, J.; DeWeese-Scott, C.; Fedorova, N.; Geer, L.; He, S.; Hurwitz, D.; Jackson, J.; Jacobs, A.; Lanczycki, C.; Liebert, C.; Liu, C.; Madej, T.; Marchler, G.; Mazumder, R.; Nikolskaya, A.; Panchenko, A.; Rao, B.; Shoemaker, B.; Simonyan, V.; Song, J.; Thiessen, P.; Vasudevan, S.; Wang, Y.; Yamashita, R.; Yin, J. und Bryant, S. (2003) CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res* **31**: 383-387.

- Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganism. *J Mol Biol* **3**: 208-218.
- Maskow, T. und Babel, W. (2001) Calorimetrically obtained information about the efficiency of ectoine synthesis from glucose in *Halomonas elongata*. *Biochim Biophys Acta* **1527**: 4-10.
- Mathai, J.; Sprott, G. und Zeidel, M. (2001) Molecular Mechanisms of Water and Solute Transport across Archaeobacterial Lipid Membranes. *J Biol Chem* **276**: 27266-27271.
- Mathews, D.; Sabina, J.; Zuker, M. und Turner, D. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* **288**: 911-940.
- McClelland, M.; Sanderson, K.; Spieth, J.; Clifton, S.; Latreille, P.; Courtney, L.; Porwollik, S.; Ali, J.; Dante, M.; Du, F.; Hou, S.; Layman, D.; Leonard, S.; Nguyen, C.; Scott, K.; Holmes, A.; Grewal, N.; Mulvaney, E.; Ryan, E.; Sun, H.; Florea, L.; Miller, W.; Stoneking, T.; Nhan, M.; Waterston, R. und Wilson, R. (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2. *Nature* **413**: 852-856.
- Melchior, D. (1982) Lipid phase transition and regulation of membrane fluidity in procaryotes. In *Current topics in Membranes and Transport*. Vol. 17. Rottem, S. (ed). New York: Academic Press, pp. 263-316.
- Mellies, J.; Wise, A. und Villarejo, M. (1995) Two different *Escherichia coli proP* promoters respond to osmotic and growth phase signals. *J Bacteriol* **177**: 144-151.
- Miller, J. (1972) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for E. coli and Related Bacteria*. Los Angeles: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, J. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for E. coli and Related Bacteria*. Los Angeles: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mira, A.; Ochman, H. und Moran, N. (2001) Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet* **17**: 589-596.
- Miranda-Vizuete, A.; Damdimopoulos, A.; Gustafsson, J.-A. und Spyrou, G. (1997) Cloning, Expression, and Characterization of a Novel *Escherichia coli* Thioredoxin. *J Biol Chem* **272**: 30841-30847.
- Moran, N. und Mira, A. (2001) The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Genome Biol* **2**: 1-12.
- Moyle, H.; Waldburger, C. und Susskind, M. (1991) Hierarchies of base pair preferences in the P22 *ant* promoter. *J Bacteriol* **173**: 1944-1950.
- Mukerjee, P. und Ray, A. (1963) The effect of urea on micelle formation and hydrophobic bonding. *Journal of Physical Chemistry* **67**: 190-192.
- Mullis, K. und Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Nagai, H.; Yuzawa, H. und Yura, T. (1991) Interplay of Two Cis-Acting mRNA Regions in Translational Control of σ^{32} Synthesis During the Heat Shock Response of *Escherichia coli*. *PNAS* **88**: 10515-10519.
- Narberhaus, F. (2002) α -Crystallin-Type Heat Shock Proteins: Socializing Minichaperones in the Context of a Multichaperone Network. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 64-93.
- Needleman, S. und Wunsch, C. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* **48**: 443-453.
- Nyysölä, A.; Kerovuo, J.; Kaukinen, P.; von Weymarn, N. und Reinikainen, T. (2000) Extreme Halophiles Synthesize Betaine from Glycine by Methylation. *J Biol Chem* **275**: 22196-22201.
- Old, R. und Primrose, S. (1992) *Gentechnologie- Eine Einführung*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Oren, A. (1999) Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 334-348.
- Oren, A. (2002) *Halophilic Microorganisms and their Environments*. Dodrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers.

- Oren, A.; Heldal, M.; Norland, S. und Galinski, E. (2002) Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* **6**: 491-498.
- Ow, D.; Sundaresan, V.; Rothstein, D.; Brown, S. und Ausubel, F. (1983) Promoters regulated by the *glnG* (*ntrC*) and *nifA* gene products share a heptameric consensus sequence in the -15 region. *PNAS* **80**: 2524-2528.
- Paek, K. und Walker, G. (1987) *Escherichia coli dnaK* null mutants are inviable at high temperature. *J Bacteriol* **169**: 283-290.
- Peddie, B.; Lever, M.; Randall, K. und Chambers, S. (1999) Osmoprotective activity, urea protection, and accumulation of hydrophilic betaines in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75**: 183-189.
- Peter, H.; Burkovski, A. und Krämer, R. (1996) Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J Bacteriol* **178**: 5229-5234.
- Peter, H.; Burkovski, A. und Krämer, R. (1998) Osmo-sensing by N- and C-terminal Extensions of the Glycine Betaine Uptake System BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **273**: 2567-2574.
- Peters, P.; Galinski, E. und Trüper, H. (1990) The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* **71**: 157-162.
- Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I. und Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599.
- Porco, A.; Alonso, G. und Isturiz, T. (1998) The gluconate high affinity transport of GntI in *Escherichia coli* involves a multicomponent complex system. *J Basic Microbiol* **38**: 395-404.
- Prentki, P. und Krisch, H. (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313.
- Reese, M. (2001) Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem* **26**: 51-56.
- Reitzer, L. und Schneider, B. (2001) Metabolic Context and Possible Physiological Themes of σ^{54} -Dependent Genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 422-444.
- Richmond, C.; Glasner, J.; Mau, R.; Jin, H. und Blattner, F. (1999) Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* **27**: 3821-3835.
- Rietsch, A.; Bessette, P.; Georgiou, G. und Beckwith, J. (1997) Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J Bacteriol* **179**: 6602-6608.
- Ritz, D.; Patel, H.; Doan, B.; Zheng, M.; Aslund, F.; Storz, G. und Beckwith, J. (2000) Thioredoxin 2 Is Involved in the Oxidative Stress Response in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 2505-2512.
- Roberts, M.; Lai, M. und Gunsalus, R. (1992) Biosynthetic pathways of the osmolytes N epsilon-acetyl-beta-lysine, beta-glutamine, and betaine in *Methanohalophilus* strain FDF1 suggested by nuclear magnetic resonance analyses. *J Bacteriol* **174**: 6688-6693.
- Romano, I.; Nicolaus, B.; Lama, L.; Trabasso, D.; Caracciolo, G. und Gambacorta, A. (2001) Accumulation of osmoprotectants and lipid pattern modulation in response to growth conditions by *Halomonas pantelleriense*. *Syst Appl Microbiol* **24**: 342-352.
- Ross, W.; Aiyar, S.; Salomon, J. und Gourse, R. (1998) *Escherichia coli* Promoters with UP Elements of Different Strengths: Modular Structure of Bacterial Promoters. *J Bacteriol* **180**: 5375-5383.
- Rübenhagen, R.; Ronsch, H.; Jung, H.; Krämer, R. und Morbach, S. (2000) Osmosensor and Osmoregulator Properties of the Betaine Carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in Proteoliposomes. *J Biol Chem* **275**: 735-741.
- Sanger, F.; Nicklen, S. und Golson, A. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**: 5463-5467.

- Sarkar, N. (1997) Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* **66**: 173-197.
- Schäfer, A.; Tauch, A.; Jäger, W.; Kalinowski, J.; Thierbach, G. und Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Scharf, C.; Riethdorf, S.; Ernst, H.; Engelmann, S.; Volker, U. und Hecker, M. (1998) Thioredoxin Is an Essential Protein Induced by Multiple Stresses in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**: 1869-1877.
- Schneider, T. und Stephens, R. (1990) Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* **18**: 6097-6100.
- Schnoor, M. (2001) Konstruktion eines Expressionsvektors für *Halomonas elongata*. Diplomarbeit, Universität Münster.
- Seddon, J.; Cevc, G. und Marsh, D. (1983) Calorimetric studies of the gel-fluid (L beta-L alpha) and lamellar-inverted hexagonal (L alpha-HII) phase transitions in dialkyl- and diacylphosphatidylethanolamines. *Biochemistry* **22**: 1280-1289.
- Seddon, J. (1990) Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim Biophys Acta* **1031**: 1-69.
- Severin, J.; Wohlfarth, A. und Galinski, E. (1992) The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol* **138**: 1629-1638.
- Severin, J. (1993) Kompatible Solute und Wachstumskinetik bei halophilen aeroben heterotrophen Eubakterien. Dissertation, Universität Bonn.
- Shaw, K.; Miller, N.; Liu, X.; Lerner, D.; Wan, J.; Bittner, A. und Morrow, B. (2003) Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**: 105-122.
- Shearstone, J. und Baneyx, F. (1999) Biochemical Characterization of the Small Heat Shock Protein IbpB from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**: 9937-9945.
- Silva, F.; Latorre, A. und Moya, A. (2001) Genome size reduction through multiple events of gene disintegration in *Buchnera* APS. *Trends Genet* **17**: 615-618.
- Silva, F.; Latorre, A. und Moya, A. (2003) Why are the genomes of endosymbiotic bacteria so stable? *Trends Genet* **19**: 176-180.
- Simon, R.; Priefer, U. und Pühler, A. (1982) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.
- Sinensky, M. (1974) Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *PNAS* **71**: 522-525.
- Smith, P.; Krohn, R.; Hermanson, G.; Mallia, A.; Gartner, F.; Provenzano, M.; Fujimoto, E.; Goeke, N.; Olson, B. und Klenk, D. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Stanley, P.; Koronakis, V. und Hughes, C. (1998) Acylation of *Escherichia coli* Hemolysin: A Unique Protein Lipidation Mechanism Underlying Toxin Function. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 309-333.
- Strøm, A.; Falkenberg, P. und Landfald, B. (1986) Genetics of osmoregulation in *Escherichia coli*: uptake and biosynthesis of organic osmolytes. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 79-86.
- Stryer, L. (1996) *Biochemie*. Heidelberg/Berlin/Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Studier, F. und Moffat, B. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.

- Stumpe, S.; Schlösser, A.; Schleyer, M. und Bakker, E. (1996) K⁺ circulation across the procaryotic cell membrane: K⁺-uptake systems. In *Handbook of Biological Physics*. Vol. 2. JS, L. (ed): Elsevier Science B.V, pp. 473-499.
- Styrvold, O.; Falkenberg, P.; Landfald, B.; Eshoo, M.; Bjornsen, T. und Strøm, A. (1986) Selection, mapping, and characterization of osmoregulatory mutants of *Escherichia coli* blocked in the choline-glycine betaine pathway. *J Bacteriol* **165**: 856-863.
- Sutcliffe, J. (1979) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **43 Pt 1**: 77-90.
- Sutton, G.; Russell, N. und Quinn, P. (1991) The effect of salinity on the phase behaviour of total lipid extracts and binary mixtures of the major phospholipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. *Biochim Biophys Acta* **1061**: 235-246.
- Sweeney, T. und Beuchat, C. (1993) Limitations of methods of osmometry: measuring the osmolality of biological fluids. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **264**: R469-480.
- Szipirer, C.; Faelen, M. und Couturier, M. (2000) Interaction between the RP4 coupling protein TraG and the pBHR1 mobilization protein Mob. *Mol Microbiol* **37**: 1283-1292.
- Takahashi, Y. und Nakamura, M. (1999) Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **126**: 917-926.
- Takeshita, S.; Sato, M.; Toba, M.; Masahashi, W. und Hashimoto-Gotoh, T. (1987) High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ* alpha-complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* **61**: 63-74.
- Tamas, I.; Klasson, L.; Canback, B.; Naslund, A.; Eriksson, A.-S.; Wernegreen, J.; Sandstrom, J.; Moran, N. und Andersson, S. (2002) 50 Million Years of Genomic Stasis in Endosymbiotic Bacteria. *Science* **296**: 2376-2379.
- Tatusov, R.; Koonin, E. und Lipman, D. (1997) A Genomic Perspective on Protein Families. *Science* **278**: 631-637.
- Tatusov, R.; Natale, D.; Garkavtsev, I.; Tatusova, T.; Shankavaram, U.; Rao, B.; Kiryutin, B.; Galperin, M.; Fedorova, N. und Koonin, E. (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* **29**: 22-28.
- Tetsch, L. (2001) Aufreinigung und Charakterisierung von TeaA, dem Substratbindeprotein des osmoregulierten Ectoitransporters TeaABC. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Thanbichler, M.; Neuhierl, B. und Bock, A. (1999) S-Methylmethionine Metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 662-665.
- Thiemann, B. und Imhoff, J. (1991) The effect of salt on the lipid composition of *Ectothiorhodospira*. *Arch Microbiol* **156**: 376-384.
- Thomas, J. und Baneyx, F. (1998) Roles of the *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA and IbpB in Thermal Stress Management: Comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *in vivo*. *J Bacteriol* **180**: 5165-5172.
- Thomas, J. und Baneyx, F. (2000) ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Mol Microbiol* **36**: 1360-1370.
- Thompson, J.; Higgins, D. und Gibson, T. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Tillett, D.; Burns, B. und Neilan, B. (2000) Optimized rapid amplification of cDNA ends (RACE) for mapping bacterial mRNA transcripts. *Biotechniques* **28**: 448-456.
- Tokumoto, U.; Nomura, S.; Minami, Y.; Mihara, H.; Kato, S.; Kurihara, T.; Esaki, N.; Kanazawa, H.; Matsubara, H. und Takahashi, Y. (2002) Network of protein-protein interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **131**: 713-719.

- Tomb, J.; Barcak, G.; Chandler, M.; Redfield, R. und Smith, H. (1989) Transposon mutagenesis, characterization, and cloning of transformation genes of *Haemophilus influenzae* Rd. *J Bacteriol* **171**: 3796-3802.
- Tomb, J.; el-Hajj, H. und Smith, H. (1991) Nucleotide sequence of a cluster of genes involved in the transformation of *Haemophilus influenzae* Rd. *Gene* **104**: 1-10.
- Tomczyk, N.; Nettleship, J.; Baxter, R.; Crichton, H.; Webster, S. und Campopiano, D. (2002) Purification and characterisation of the BIOH protein from the biotin biosynthetic pathway. *FEBS Lett* **513**: 299-304.
- Tomoyasu, T.; Gamer, J.; Bukau, B.; Kanemori, M.; Mori, H.; Rutman, A.; Oppenheim, A.; Yura, T.; Yamanaka, K. und Niki, H. (1995) *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *EMBO J* **14**: 2551-2560.
- Towbin, H.; Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* **76**: 4350-4354.
- Ubben, D. und Schmitt, R. (1986) Tn1721 derivatives for transposon mutagenesis, restriction mapping and nucleotide sequence analysis. *Gene* **41**: 145-152.
- Ubben, D. und Schmitt, R. (1987) A transposable promoter and transposable promoter probes derived from Tn1721. *Gene* **53**: 127-134.
- van Ham, R.; Kamerbeek, J.; Palacios, C.; Rausell, C.; Abascal, F.; Bastolla, U.; Fernandez, J.; Jimenez, L.; Postigo, M.; Silva, F.; Tamames, J.; Viguera, E.; Latorre, A.; Valencia, A.; Moran, F. und Moya, A. (2003) Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *PNAS* **100**: 581-586.
- Veinger, L.; Diamant, S.; Buchner, J. und Goloubinoff, P. (1998) The Small Heat-shock Protein IbpB from *Escherichia coli* Stabilizes Stress-denatured Proteins for Subsequent Refolding by a Multichaperone Network. *J Biol Chem* **273**: 11032-11037.
- Ventosa, A.; Nieto, J. und Oren, A. (1998) Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 504-544.
- Volke, A. (2001) Konstruktion des Produktionsstammes *Halomonas elongata* KB2 für die Synthese von Ectoin durch Mutation des Ectointransporters TeaABC. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- von Heijne, G. (1989) The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Protein Eng.* **2**: 531-534.
- Vreeland, R.; Litchfield, C.; Martin, E. und Elliot, E. (1980) *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. *Int J Syst Bact* **30**.
- Vreeland, R.; Anderson, R. und Murray, R. (1984) Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. *J Bacteriol* **160**: 879-883.
- Wang, A. und Bolen, D. (1997) A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry* **36**: 9101-9108.
- Welsh, D. und Herbert, R. (1999) Osmotically induced intracellular trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **174**: 57-63.
- Wiechelman, K.; Braun, R. und Fitzpatrick, J. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175**: 231-237.
- Wierenga, R.; Terpstra, P. und Hol, W. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* **187**: 101-107.
- Withers, P.; Hefter, G. und Pang, T. (1994) Role of Urea and Methylamines in Buoyancy of Elasmobranchs. *J Exp Biol* **188**: 175-189.
- Wollenberg, M. (2003) Biogenese von Eisen-Schwefel-Zentren in Cyanobakterien. Doktorarbeit, Ruhr-Universität Bochum.
- Wollenberg, M.; Berndt, C.; Bill, E.; Schwenn, J. und Seidler, A. (2003) A dimer of the FeS cluster biosynthesis protein IscA from cyanobacteria binds a [2Fe2S] cluster between two protomers and transfers it to [2Fe2S] and [4Fe4S] apo proteins. *Eur J Biochem.* **270**: 1662-1671.

- Wood, J.; Bremer, E.; Csonka, L.; Kraemer, R.; Poolman, B.; van der Heide, T. und Smith, L. (2001) Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **130**: 437-460.
- Wösten, M. (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 127-150.
- Xu, Z.; Horwich, A. und Sigler, P. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* **388**: 741-750.
- Yamada, M.; Kawai, T. und Izu, H. (1996) Analysis of the *Escherichia coli* *gntT* and *gntU* genes and comparison of the products with their homologues. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**: 1548-1550.
- Yasukawa, T.; Kanei-Ishii, C.; Maekawa, T.; Fujimoto, J.; Yamamoto, T. und Ishii, S. (1995) Increase of Solubility of Foreign Proteins in *Escherichia coli* by Coproduction of the Bacterial Thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **270**: 25328-25331.
- Zaccai, G.; Cendrin, F.; Haik, Y.; Borochoy, N. und Eisenberg, H. (1989) Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *J Mol Biol* **208**: 491-500.
- Zheng, L.; Cash, V.; Flint, D. und Dean, D. (1998) Assembly of Iron-Sulfur Clusters. IDENTIFICATION OF AN *iscSUA-hscBA-fdx* GENE CLUSTER FROM *AZOTOBACTER VINELANDII*. *J Biol Chem* **273**: 13264-13272.
- Zhu, X.; Zhao, X.; Burkholder, W.; Gragerov, A.; Ogata, C.; Gottesman, M. und Hendrickson, W. (1996) Structural Analysis of Substrate Binding by the Molecular Chaperone DnaK. *Science* **272**: 1606-1614.
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406-3415.

Anhang

Halomonas elongata DSM 2581^T

PstI
|
CTGCAGGACCACCGCCGACGATGTTCTTGCCGATGTCGTGGACGTCGCCATGACGATTCGCCCTGGCTGCTGATCTTGTAGAGAGTTCGCTCTTCTCGCCCTC
GACGTCCTGTTGGCTGCTACAAGAACGGCTACAGCACCTGCAGCGGAACTGGCAGCGGTAAGTCTAGAACGGGAAACCGGACGACTAGAAGACATCTCTCAAGCGAGAAAGACCGCGGAG
GATATAGGGAATCAGATAGGCCACGGCCGTGTTTCAACACAGGGCCGACTTGACACCCTGGGGCAGGAACATCTTCCCGGCCCCCGAACAGGTCGCCGACACCGTTTCATGCCATCCATCAG
CTATACTCCCTTAGTCTATCCGGTCCGGACAAAGTACTGTGCCCGGTGAAGTGGACCCCGCTCTGTAGAACGGCCGGGCTTGTCCACGCGGCTGGTCAAGTACGGTAGGTAGTCTC
GGGCGCTTCGATGACCTCGATGGGGCGGTGGCGGCTGTCCGGTGTATCCCTGATATAGGCCGCTGATGCCCTTGACACGAGGCGTCTCGATCGCTTCTCGACCTCCCA
CCCCGGAAGCTACTGGAGCTACCCCGGACAGCCCGGTCAAGCCACAGTAGGAGCTATATCCGGCATAACGGGAACCTGGTCCCGCACGAGCTACGCCAAAGACTGGAGGGT
ACTGCGCATTCAGGTCCTCTTGGGGAGGGCCGCTGCGGTGCTCTTGTACTTGTACCAAGGTCAAGCAGCCGTTTCAGTGGCATCTGTCGCCGCGGTTGAGCACCCACATCCTCGAC
TGACCGGTAGGTCCAGGAGAACGCCCTCCGGGACAGGACAGGAAATGAACAGTCTGTCAGTTCCAGTTCCGTCGGCAAGTACCCGTAGCAGCGGCCCAACTCCGTGGTGTAGGAGCTG
NcoI
|
ACCTTCGGCAATTCCTCGGGAGATCGTCTGAGCCGCAACTGGCCGGCATTTGACGATCCCCATGGTCTATGCCGCACGGATGGCATGGTAGAANAACAACCGAGTGGATCGCCTCGG
TGGAAAGCGGTTAAGGACCCCTCTAGCAGCATCTGGCGGTTGACCGCCGTAACCTGCTAGGGGTACCCAGTACGGCCGTTGCCATCTCTTTGTGGCTCACCTAGCGGGAGCGC
NcoI BamHI
| |
CACCGGTTGTTGCCACGGAAACGAGAAAGAAACGTTGGACACGCCCGGACACCAATGGGTTGGGACAGGTCCTCGGGATCCAGGAGTCCGCCTCGATGAAGTCCACGGCGTAGTTATT
GTGGGCAACAACCGGTGCTCTCTTCCCTTTGCAACCTGTGGCGGCTGTGGTACCGCACCCCGTCCAGAGCCCTAGGTCCGCTACGGGAGCTACTTCAGGTCGCCCATCAATAA
Sali BglII
| |
GTGTTCCCTCGATGCGCGTGGCAATGGCGAAGATGTTGGGTTGAAAGATGATGTCCTCGCGGGAAAGTCCGATCTCTGACACAGCAAGCGGTAGGCCCGCTGGCAGATCTCGGCCCTTGG
CACAAAGAGCTACGGCCACCGTTACCCGCTTCTACAAACCCAGCTTCTACTACAGGACCCGCGCTTACAGTAGAGCAGTGGTCTGCCATCCGGGACCGCTAGAGCCCGGAACCG
GGCGAAGTGTCCGCTGCGCCTGTTCTGTCGAAAGGCAATGACCGGACCGTAGCGGGCACCTGGTCCCTGTCGGGAAAGGCACTCCGCTTCCCTAACCGAGATGGA
CCGCTTCCACACCCCGGACCGGACCAACGAGCTCCGGTACTGGTGTAGCCCGGTGGCATCCCGCCCGGTGAACCAACCGGACGAGCCGCTTCGGTAGGACCGGAAGGATTGCTCTACCT
XmaI SmaI
| |
GTTGACCACCGCCTTGCCCTGGATGCATTCAGGGCGGCTCGATGATCTCCACTTGGAGAGTGAACCATGATCGGCACCCCGGGGATGTGGGTTCCCGGGGATCAGGTTGAGAAA
CRAACTGTTGGCGAACCGGACCTACGTGAAGTCCGGCCGAGCTACTAGAGGGTGAACCTCCTCAGTGGTACTAGCCGTTGGCCGCTACAGCCCAAGCGCCCGCTAGTCCCAACTCTTT
NcoI BstXI
| |
GGCACCATGGATCCTGAGACTCCAGCATGCCCTCGTCCATGTTGATGTCGATGACCTGGGCGCGCTTCTCGACCTGCTCCAGGGCCACCTCCAGGGCGGTGGTGTAGTCTTCTCTT
CCGGTGTACCGTAGGACTCTGAGGTCGTACCGGAGCAGGTAACAATCAGCTACTGGACCCCGGGCAAGAGCTGGACAGGTCGCCGTTCCCGGTGGAGGTCGCCCCACCATCAGGAGAAAGAA

Escherichia coli K-12

120 TTGATGCTGGAFACAAAACGTTGCCGATGGTGGCCATGTTGTTTACACCGTATATGAAAGCCCTATCCCTATTCGGTGTGTTGGTGGATTGTTTCGCCGATCCCAAATCGGCAA
 AACACGACCTATGTTTGCRAACGGCTACCACCGGTAAACAACAAATGGTGGCCATAACTTTCGGGGATAGGGAFAAGCGACACACCGACCTAACAAACGGCTAGGGTTGACCGTT
 240 GGCAGCTTTATGCCCTCCGCAATTCGGCTGATGATGCACCGTCAIGCCTGATGATGAAAATCATGCAGCACCGACGATATGGCGCTGCTGGAGTTAATTCAAAACACATATTCGTCACACGG
 CCGTCGAAATACGGAGCGTAAAGGCGACTAACACAGTGGCAGTACCGACTACTATTTAGTACCTCGTGGCTGCATACCCGACGACCTCAATTAAGTTTTTGTATAGCAGTTGCGG
 360 ACCGTATGGGGCTGTAGAGCAAAATGGCTGCTTATTAAGTAGTGGATACGCTAATGACAGACAAATCAAAAGGCTGTTTTAATACATACATGCAAACTGGCGACGCTGTACGTTTTAAACG
 TGGACTACCCCGACCATCTCGTTTACCGGACGAAATAATTCATCACCTATGGGATTACTGTCTGTTTAGTTTCCCGACAAATAATGATGACGTTTGACCCGCTGGACATGCAAAATTGC
 480 ATTTTATCGACGGCTTGCAGAACGTTCCGAAACACAGAGAGTTTAAATGACTATATGGGAAAGATTTGGGCAAGATTTGGGCAAGAGTTTAAATGACTATATGGGCAAGATTTGATAGC
 TAAAATAGCTGCCGCAACGGCTTGCAAGTGGCTTTGTTCTCTCAAAATTAAGTAAACGCTTTCTAACGCGCTCTCCCTTGTAGGTTTCGGGACGTATATCGGTTTTATTACG
 600 TTGAATCCGGAGTTCCCTTTGCAGACATCATCGGCTTACCAGGCTCTCAGAAAGAGTTGGCTGGCGGAGTCTAGTAAAGTCTCTCGCCATTTCAAAGCCACCTACACCTCTG
 AACTTAGGCTCAAGGAGAACGCTCTGTAGTACGGAAATGGCCCGACAGTCTTCTCAACCGACCGCTCAGTCAATTTCAAGACAGCGGTAAGATTTCCGTTGATGGGAGAC
 720 CTTCAACGCCACAGGAGTGAACAACCTGGCCCGGATGCGAAATAAATGGCGCATGGCCGCTTTGGCGAAGATAATGATTCGCTGTAGAGGCCAAAGTTTATCCAGCATCGGACCCAC
 GAAATTCGGGTGGTCCACATGTTTAGCCGGCTACGCTTATTTACCCTGACCCGGGAAACCGCTCTATATACHTAAGCGACACATCCCGTTTCAAATAGGTCGTAGCCCGTGGT
 840 TTTGGCGGCCACAGCCGTCGAGATAGCCATACAAATCGCAAAACGGCATGGACAGTCTTTTTCAGCGGCTGACGGAGATCGACCGTTCAGGATTTCCAGCCCGCCATTTAAGCAGCTC
 AAACCGCCGCTGGCTGGCAGCTCTATCGGTAAGTTAGCGTTTTGGCCGTAACCTGTGCAAAAACGTGCGCGACTGCCTTAGCTGGCAAAAGCTCTAAAGGTCGGGCGGTAATTCGTGCAG
 960 AACCTCCGGCATCGGTAACCGCAGACGGTTTTCTTCAACGCCCGGCATCCTGGCGCCGCTTTCAGTCCCATGGTTTGTAAACCCAGGAAACCGCTCCACTGTACGCTGAAAAATCATC
 TTGGAGCCGTTAGCCATTCGGTCTTTCGCAAAAGAGTTGGCGCGGCTAGGACCCGCGGGCAAGTACAGGGTACCAACAATGGGGTCCCTTGGGAGGTGACATGCGACTTTTAGTAG
 1080 ACTGATGCTGCTGAAAATCCCGCCAGCACGTCGGTTTTATCCCGCCACTCGTCAAGACACTAAAACAAGGTGACGACCGCCAGGTCACCGCCCTGAACACGCTCGGGATGGGT
 TGACTAACCGACTTTAGGCGGCTGGCAGCCAAAATAGGGCCGCTGAGCAGTGTCTGTGATTTTGTTCCTACTGCTGCGGTGCCACTGTCGGGACTTGTGCGAGCCCTTACCCCA
 1200 TAAAGCAATCTGGCTTGCACAGCCCGCCAGACTCCAGCTAACCAAAATGGCTTTATCAGGTGCTTATCAGCAGCAGGCTTCGGCAATCAGCAAGTACAGCGCACCAAAATCCCGG
 ATTCCGTTAGACCGAACGGTGTGGGGGGTCTGAGTCCGGATTGGTTTACCAGAAATAGTCCAGGACACAGCTGCTGCCGAAAGCCGGTATAGTCCGTTCACTGTCCGGTGGTTTAGGGGG
 1320 GGTACGCCGAAGCCGGCAGGTCAACAAGTGCAGCGTAAAATGGAGCTAAATTCCTCGTCAATGCAAGCCCACTTCCGCTCAGTCCCAATCCGTCAGCAGCAGCAGCAAGATGAAC
 CGATGCGGCTTCGGCCCGTCCAGTTGTTCCACGTCGATTTACGCTCGATTCAGGAGCAGTTACGTTGGGGTGTGAAGCCGTAAGTCAAGGGTAGGCGTCCGCTCGTCTTACTTTG
 NdeI
 1440 ATTCCTGACCTTTGGTCTGCCACAGATGTTTATCATCCGCTATGTTTCTGTTTGTGACTTACAAAGGATGAAACAGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGGATGCGGAT
 TAAAGGACTGGAAACAGACGGTGGTCTACAAATAAGTAGGCGATAACAAGAGAAAATGAAATGTTCCCTACTTGTATACGATTTGTCATGGCCCTAAATACGACCCGATACGGCTTACGGTGA
 1560 GCGGTTAGGTCATTTGGGGATTTGTTCCGCTGTTTACCGGCGCACCGGACAGATAAAACGTTATGCCACAATGTTGATTTACCCGCCACACACTCTTCCCTGCGGTGCGGTGCGCT
 CCGCAATCCAGTAACCCCTAAACAAGCCAGACAAGTGGCGGTGGCGGTGCTATTTTGGAAATACGGGTGTACACCTAAATGGCGGTGTGTAGGGTGAAGAGGACGCCAGCGGACCGGA

HindIII
|

AFCATCGGCAACACTCAAGCGTTGGGAAAGCTTGGCTGCCAGTTTTTATACTGGTAACTGGTGCCAGGAATATTCACCGTTCCGCCCAATATCCAGCCAGCTTCCGGGTGTAG 4680
TAGTAGCCGTTTGTAGCTGAGTTCGCAACGCCCTTTCGAACGCGGTCAAAAATATGACCATTTGACCACCGTCCCTTATAAGTGGCCAGCCGGTATAGGTCGGTCAGAGGCCCGACATC

TCCTAACAGAGCAGCTGTACTGTCCGCAAT 4710
AGGATTCTCTCGTACAATGACAGCCGTTA

Enzym	Schnittstelle	Anzahl
BamHI	G [^] GATCC	0
BglII	A [^] GATCT	0
BspHI	T [^] CATGA	0
BstXI	CCANNNN [^] NTGG	1
EcoRI	G [^] AATTC	1
Eco47III	AGC [^] GCT	0
HindIII	A [^] AGCTT	1
KpnI	GGTAC [^] C	1
NcoI	C [^] CATGG	2
NdeI	CA [^] TATG	2
NotI	GC [^] GGCCGC	0
PstI	CTGCA [^] G	2
PvuII	CAG [^] CTG	1
SalI	G [^] TCGAC	0
SmaI	CCC [^] GGG	0
XbaI	T [^] CTAGA	0
XhoI	C [^] TCGAG	0
XmaI	C [^] CCGGG	0

Abb. 1: DNA-Sequenz der *yhgI* Region von *E. coli* K12

Dargestellt ist die DNA-Sequenz von *E. coli* K12 aus der Region von *yhgI*, *yhgH* und *bioH*. Angegeben sind wichtige Restriktionsschnittstellen und Sequenzmerkmale, wie Transkriptionsstartpunkte (+1), Ribosomenanbindungsstellen (rbs), Promotorregionen (σ^{70} , σ^{32}) und (σ^{54}), eine mögliche Anbindungsstelle für ein Stickstoff-abhängiges Regulatorprotein (**N-reg**), palindromische Bereiche möglicher Terminations Schleifen (hp) und die darauf folgende AT-reiche Region. Bei der dargestellten DNA-Sequenz handelt es sich um einen Teil (Basen 450-4710) der unter der NCBI-Accession-Nr. AE000417 erhältlichen DNA-Sequenz.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Erwin A. Galinski danke ich sehr für die Überlassung des Arbeitsplatzes, für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans G. Trüper danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Hans Jörg Kunte für sein reges Interesse am Fortgang meiner Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Bei Frau Birgit Amendt und Frau Marlene Stein möchte ich mich sehr herzlich für ihre stetige Unterstützung und die angenehme Atmosphäre bedanken. Frau Amendt danke ich außerdem für die Hilfe bei den Experimenten zur Komplementierung von *H. elongata* KB5 und KB6 sowie für die vielen Tätigkeiten rund um unsere Stammsammlung.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Katrin Grammann für ihre Einweisung bei den RNA-Arbeiten. Bei ihr und Frau Dr. Annette Kraegeloh möchte ich mich für die nette Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft und Anteilnahme während meiner Labortätigkeit bedanken. Der gesamten AG Biotechnologie, allen früheren und jetzigen Mitgliedern, danke ich für die schöne und abwechslungsreiche Zeit im Labor. Gedankt sei auch Frau Silvia Faßbender, Frau Verena Mentrup und Herrn Dr. Matthias Kurz für ihr Engagement bei der Organisation von „social events“.

Den Mitarbeitern der AG Dahl und AG Fakoussa danke ich für die Nutzung der Geräte und für ihre Hilfsbereitschaft. Gedankt sei hier Herrn Dipl. Biol. Jens Rudat für seine ständige Diskussionslaune in den gemeinsamen Kaffeepausen.

Besonders hervorheben möchte ich meine Frau, Amal Burdziak. Ihr unentbehrlicher emotionaler Beistand und ihr Glaube an den Fortschritt dieser Arbeit hat viele experimentelle Rückschläge vergessen gemacht. Mit ihr fielen die im Labor verbrachten arbeitsreichen Wochenenden leichter.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Mutter Heidrun Burdziak und meinem verstorbenen Vater Johannes Burdziak für ihre uneingeschränkte Unterstützung.