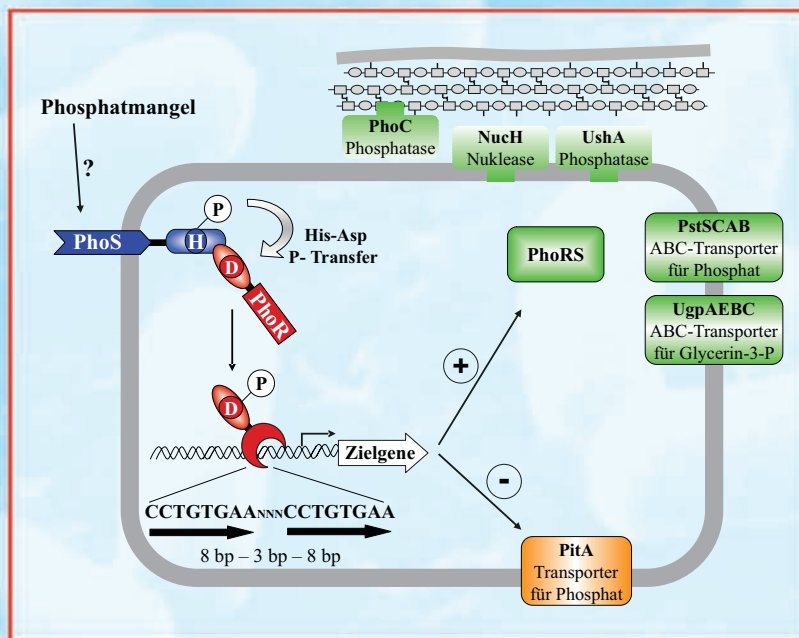


Regulation der Phosphatmangelgene von *Corynebacterium glutamicum* durch das Zweikomponenten-System PhoRS

Sarah Schaaf



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Biotechnologie 1

Regulation der Phosphatmangelgene von *Corynebacterium glutamicum* durch das Zweikomponenten-System PhoRS

Sarah Schaaf

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 36

ISSN 1433-5549

ISBN 978-3-89336-496-1

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Telefon: 02461 61-5368 · Telefax: 02461 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2007

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences Band/Volume 36

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2007)

ISSN 1433-5549
ISBN: 978-3-89336-496-1

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Teile dieser Arbeit erschienen in der folgenden Publikation:

Schaaf, S. and Bott, M. (2007) Target genes and DNA-binding sites of the response regulator PhoR from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **189**: 5002-5011.

Inhaltsverzeichnis

I	Abstract	1
II	Zusammenfassung	2
III	Einleitung	3
1	Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen.....	3
1.1	Das klassische Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem.....	3
1.1.1	Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme in <i>C. glutamicum</i>	6
1.2	Regulation der Phosphatmangelantwort.....	7
1.2.1	Phosphatmangelantwort in <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. tuberculosis</i> und <i>Streptomyces</i> -Spezies.....	7
1.2.2	Phosphatmangelantwort in <i>C. glutamicum</i>	11
2	L-Lysinbiosynthese in <i>C. glutamicum</i>	12
3	Das Thema der Arbeit.....	14
IV	Material und Methoden	15
1	Pufferlösungen und Antibiotika (Stammlösungen).....	15
2	Nährmedien.....	15
3	Bakterienstämme.....	17
4	Plasmide.....	17
4.1	Konstruktion der Expressionsplasmide pET16b-PhoR _{N-His10} und pMalE-PhoSK.....	18
5	Stammhaltung von Bakterienstämmen.....	19
6	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	20
6.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	20
6.2	Kultivierung von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	20
7	Molekularbiologische Methoden.....	21
7.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	21
7.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	22
7.3	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	22

II Inhaltsverzeichnis

7.4	Rekombinante DNA-Techniken	23
7.5	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	23
7.6	Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	24
7.7	Konstruktion von Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19 <i>mobsacB</i> -Systems	25
7.8	Polymerasekettenreaktion.....	26
7.9	„Overlap extension“-Polymerasekettenreaktion.....	27
7.10	DNA-Sequenzierung	27
8	Proteinbiochemische Methoden	28
8.1	Zellaufschluss und Zellfraktionierung	28
8.2	Affinitätschromatographie mittels „Ni ²⁺ -Nitrilotriacetic acid“ (NTA)-Agarose	28
8.3	Affinitätschromatographie mittels Amylose-Harz.....	29
8.4	Pufferaustausch durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10-Säulen.....	30
8.5	Proteolytischer Verdau mittels Faktor Xa	30
8.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	30
8.7	Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen.....	31
8.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	31
8.9	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
8.10	Gelfiltrationschromatographie zur Bestimmung der nativen Größe von PhoR.....	32
9	Phosphorylierungsexperimente mit γ-[³²P]-ATP	33
10	DNA-Protein-Interaktionsstudien	34
10.1	Radioaktive Gelretardationsexperimente.....	34
10.2	Nicht-radioaktive Gelretardationsexperimente.....	35
10.3	DNase I-Footprint-Analysen	36
11	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Enzymtests	37
12	Enzymatisch-photometrische Glukose-Bestimmung	38
13	Bestimmung von Aminosäuren mittels <i>reversed-phase</i> HPLC	40
V	Ergebnisse	41
1	DNA-Protein-Interaktionsstudien mit PhoRΔ1-125	41
1.1	Radioaktive Gelretardationsexperimente mit PhoR Δ 1-125.....	41
1.2	DNase I-„Footprint“-Analysen mit PhoR Δ 1-125.....	43
2	DNA-Protein-Interaktionsstudien mit PhoR	45
2.1	Überproduktion, Reinigung und Verdau von PhoR _{N-His10}	45
2.2	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von PhoR	46

2.3	Überproduktion und Reinigung von MalE-PhoS	49
2.4	Autophosphorylierung der Kinase-Domäne von PhoS und Phosphorylgruppentransfer auf den Antwortregulator PhoR	50
2.5	Untersuchungen zum Einfluss der Phosphorylierung und des N-terminalen His-„tags“ auf die DNA-Bindungsaffinität von PhoR	52
2.6	Direkter Vergleich der Bindungsaffinitäten von PhoR _{N-H} zu den Promotorregionen von <i>pstS</i> und <i>nucH</i>	54
2.7	Identifizierung weiterer Promotoren, an die PhoR direkt bindet	55
2.8	Identifizierung von PhoR-Bindestellen in den Promotorregionen von <i>pstS</i> und <i>phoR</i>	57
2.9	Mutationsanalysen der PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von <i>pstS</i>	58
2.10	Mutationsanalysen der PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von <i>phoR</i>	61
2.11	Herleitung und Überprüfung eines möglichen PhoR-Konsensus-Bindemotivs	62
2.12	Nachweis der <i>in vivo</i> -Relevanz der identifizierten PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von <i>phoR</i>	65
3.	Einfluss von unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen und von PhoRS auf die Lysinproduktion von <i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1730	67
3.1	Konstruktion der Deletionsmutante <i>C. glutamicum</i> DM1730 Δ <i>phoRS</i> /pEKE _{x2} sowie der Komplementationsmutante <i>C. glutamicum</i> DM1730 Δ <i>phoRS</i> /pEKE _{x2} - <i>phoRS</i>	67
3.2	Einfluss der Phosphatkonzentration im Medium auf das Wachstumsverhalten und die Lysinbildung des Stammes DM1730/pEKE _{x2}	68
3.3	Einfluss der Phosphatkonzentration im Medium auf das Wachstumsverhalten und die Lysinbildung des Stammes DM1730 Δ <i>phoRS</i> /pEKE _{x2} - <i>phoRS</i>	69
3.4	Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der PhoRS-Überproduktion und der Phosphatkonzentration im Medium auf das Wachstumsverhalten und die Lysinbildung des Stammes DM1730	71
VI	Diskussion	75
1	Regulation der Phosphatmangelgene durch das Zweikomponenten-System PhoRS	75
1.1	Das PhoRS-System, ein Rheostat?	77
1.2	PhoR, ein bifunktionaler Antwortregulator?	79
1.3	Aktivierung von PhoR durch Phosphorylierung	80
1.4	PhoR bindet an einen für OmpR-Regulatoren typischen „direct repeat“	81
1.5	Zusammenfassende Darstellung der Regulation der Phosphatmangelgene durch das Zweikomponenten-System PhoRS von <i>C. glutamicum</i>	85
2.	Einfluss von PhoRS und unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen auf die Lysinproduktion von <i>C. glutamicum</i> DM1730	87

VII	Literaturverzeichnis	90
VIII	Anhang	103
1	Oligonukleotide.....	103
2	PCR-Fragmente für Gelretardationsexperimente	111
3	Restriktionskarten der konstruierten Plasmide	112

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶) oder Wachstumsrate
Ω	Ohm
A	Ampere oder Adenin
Abb.	Abbildung
ATP/ADP	Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat
Amp ^R	Ampicilinresistenz
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
BHI	Brain Heart Infusion
BHIS	Brain Heart Infusion + Sorbitol
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ci	Curie
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
et al.	et alii (und andere)
EDTA	siehe Na ₂ EDTA
F	Farad
g	Gramm
g	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin
h	Stunde(n)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid
k	Kilo (10 ³)
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaar(e)

VI Abkürzungen

l	Liter
LB	Luria Bertani
m	milli- (10^{-3})
M	molar (mol/l) oder mega- (10^6)
max.	maximal(e)
min	Minute(n)
MOPS	3- <i>N</i> -Morpholinopropansulfonsäure
n	nano (10^{-9})
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, oxidiert/reduziert
NTA	nitriilotriacetic acid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
orf	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris base - Acetic acid - EDTA
TBE	Tris base - Boric acid - EDTA
TE	Tris base – EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TNI	Tris base – NaCl - Imidazol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	4-Octylphenolpolyethoxylat
U	Unit (1 Unit = 1 μ mol/min)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifugation
ÜN	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

I Abstract

The Gram-positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* possesses 13 two-component signal transduction systems. Among these the membrane-bound sensor kinase PhoS and the response regulator PhoR are involved in the phosphate (P_i) starvation response. To analyse the binding of unphosphorylated and phosphorylated PhoR to the promoters of phosphate starvation-inducible (*psi*) genes, this response regulator and the kinase domain of its cognate sensor PhoS were overproduced and purified. The kinase domain showed constitutive autophosphorylation activity and a rapid phosphoryl group transfer from phosphorylated kinase domain to PhoR was observed. Gel mobility shift assays revealed that phosphorylation increases the DNA-binding affinity of PhoR about 5-fold. The affinity of PhoR~P to different promoters varied and decreased in the order *pstSCAB* > *phoRS* > *phoC* > *ushA* > *porB* > *ugpA* > *pita* > *nucH*, *phoH1* > *glpQ1*. The binding sites in front of *pstSCAB* and *phoRS* were localized at positions -194 to -176 and -61 to -43 upstream of the transcriptional start sites, respectively. Using mutational analysis these two 19-bp binding sites were analysed in detail and an alignment revealed a high identity in the 5'-terminal part, but not the 3'-terminal part. As many OmpR-type response regulators bind to direct repeats, the 19-bp sequence might be interpreted as a loosely conserved 8-bp direct repeat separated by three bp. This idea was supported by the fact that the highest binding affinity was observed with a perfect 8-bp direct repeat of the sequence CCTGTGAAaatCCTGTGAA. Inspection of the other target promoters revealed sequences with some similarity to this binding motif, which represent putative PhoR binding sites. The *in vivo* relevance of the PhoR-binding site within the *phoRS* promoter was supported by reporter gene studies.

C. glutamicum is used industrially for the production of more than two million tons of amino acids per year, mainly L-glutamate and L-lysine. In the second part of this work the influence of phosphate limitation and the overproduction of the PhoRS-system on the lysine production of DM1730 were analysed. Interestingly, cultivation under phosphate limitation resulted in an increased productivity of DM1730/pEKEx2 of about 12,5 % to $0,045 \pm 0,001$ g lysine \cdot l $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$ compared to cultivation under phosphate excess. Overproduction of PhoRS under phosphate limitation even led to an increased productivity of about 60 % in comparison to DM1730/pEKEx2 cultivated under phosphate excess.

II Zusammenfassung

Das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* besitzt 13 Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme. Darunter befinden sich die Sensor kinase PhoS und der Antwortregulator PhoR, die bei der Phosphatmangelantwort eine zentrale Rolle spielen. Durch Transkriptomanalysen konnten die Phosphatmangelgene identifiziert werden. Ein Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Wechselwirkung des Transkriptionsregulators PhoR mit seinen Zielgenen. Mittels Gelretardationsexperimenten konnte die direkte Bindung von PhoR an die Promotorregion von 10 postulierten Zielgenen, u. a. *pstSCAB* (ABC-Transporter für Phosphat) und *phoRS*, nachgewiesen werden. Dabei deutet die Bindung von PhoR an seine eigene Promotorregion auf Autoregulation hin. Phosphorylierungsexperimente zeigten die für ein Zwei-Komponentensystem typische Autophosphorylierung der Sensor kinase und den effektiven Phosphorylgruppentransfer von der Sensor kinase auf den Antwortregulator. Gelretardationsexperimente mit unphosphoryliertem PhoR und PhoR~P zeigten, dass PhoR eine etwa 5-fach gesteigerte DNA-Bindungsaffinität durch die Phosphorylierung aufwies. Des Weiteren konnten unterschiedliche Bindungsaffinitäten von PhoR gegenüber den getesteten Promotorregionen nachgewiesen werden (*pstS* > *phoR* > *phoC* > *ushA*, *porB* > *ugpA* > *pitA* > *nucH*, *phoH1* > *glpQ1*). Um ein Konsensusmotiv abzuleiten, wurden die PhoR-Bindestellen innerhalb der Promotorregion von *pstS* und *phoR* eingegrenzt und durch Mutationsanalysen genauer untersucht. Das abgeleitete PhoR-Bindemotiv, bestehend aus einem für OmpR-Typ Regulatoren charakteristischen „direct repeat“, konnte durch Mutationsanalysen bestätigt werden. Hierbei konnte die beste Interaktion von PhoR~P mit dem optimierten 8 bp langen „direct repeat“ CCTGTGAAaatCCTGTGAA festgestellt werden. Die 8 bp langen Sequenzwiederholungen werden dabei durch 3 bp separiert. Darüber hinaus wurde exemplarisch die *in vivo*-Relevanz der PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von *phoR* mittels Transkriptionsfusionsanalysen verifiziert.

C. glutamicum ist für die industrielle Aminosäureproduktion, u. a. des Futtermitteladditivs L-Lysin, von großer Bedeutung. In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Phosphatmangel und des PhoRS-Zweikomponenten-Systems auf die Lysinbildung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Produktivität von DM1730/pEKEEx2 durch Kultivierung unter Phosphatmangel um etwa 12,5 % auf $0,045 \pm 0,001$ g Lysin \cdot l $^{-1}$ \cdot h $^{-1}$ gegenüber der Kultivierung bei Phosphatüberschuss gesteigert wurde. Durch Überproduktion von PhoRS unter Phosphatüberschussbedingungen konnte sogar eine Produktivitätssteigerung von ca. 60 % auf $0,064 \pm 0,003$ g Lysin \cdot l $^{-1}$ \cdot h $^{-1}$ gegenüber DM1730/pEKEEx2 ohne IPTG bei Phosphatüberschuss erreicht werden.

III Einleitung

1 Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen

Mikroorganismen müssen in der Lage sein, sich auf ändernde Umweltbedingungen, z. B. pH-Wert, Osmolarität, Temperatur und Nährstoffkonzentrationen, möglichst effizient einzustellen. Dazu muss die Zelle die Veränderung der Umweltbedingung detektieren können und dementsprechend z. B. ihren Metabolismus regulieren. Dieses adaptive Verhalten wird durch unterschiedliche Regulationsmechanismen gewährleistet, u. a. durch das klassische Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem (Stock *et al.*, 2000).

1.1 Das klassische Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem

Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme (2-KS) konnten bislang nicht nur in Prokaryoten, sondern auch in Eukaryoten nachgewiesen werden (Stock *et al.*, 2000). In fast allen sequenzierten bakteriellen Genomen konnten eine Mehrzahl von Genen, die für 2-KS kodieren, identifiziert werden. Die Anzahl der Gene reicht dabei von 0 in *Mycoplasma*-Spezies bis hin zu 80 in *Synechocystis*-Spezies (Stock *et al.*, 2000). Der Modellorganismus *Escherichia coli* besitzt 30 Gene, die für Histidin-Kinasen kodieren, und 32 Gene, die für Antwortregulatoren kodieren (Mizuno, 1997). In dem Genom von *Bacillus subtilis* konnten 70 Gene identifiziert werden, die für 2-KS kodieren (Fabret *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu dieser Vielzahl an 2-KS in Prokaryoten finden sich nur wenige 2-KS in einer begrenzten Anzahl an Eukaryoten (Mascher *et al.*, 2006). In *Saccharomyces cerevisiae* kommt ein erweitertes 2-KS, ein so genanntes „Phosphorelay“-System, vor, das an der Osmoregulation beteiligt ist (Ketela *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 1994; Ota and Varshavsky, 1993; Posas *et al.*, 1996). In dem pathogenen Pilz *Candida albicans* konnten zwei Sensorinasen identifiziert werden, die sowohl bei der Osmoregulation wie auch bei der Entwicklung der Hyphen involviert sind (Alex *et al.*, 1998; Chauhan *et al.*, 2003; Nagahashi *et al.*, 1998). In Tieren, wie z. B. der Fliege, dem Wurm *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans* consortium, 1998) oder aber auch dem Menschen, konnten bislang keine 2-KS gefunden werden. Dagegen finden sich 2-KS-Proteine in Pflanzen, wie z. B. *Arabidopsis thaliana* und der Tomate, bei der die Ethylen-vermittelte Fruchtreifung durch Proteine, die denen des prokaryotischen 2-KS ähneln, reguliert zu sein scheint (Wilkinson *et al.*, 1995; Yen *et al.*, 1995).

Das klassische 2-KS besteht aus einer Histidin-Proteinkinase und einem Antwortregulator-Protein. Die Mehrheit der Sensorkinasen sind membrangebundene, homodimere Proteine mit einer N-terminalen periplasmatischen Sensor-Domäne und einer C-terminalen cytoplasmatischen Kinase-Domäne. Dabei weisen die Sensor-Domänen geringe Sequenzähnlichkeiten zueinander auf, was im Einklang mit den unterschiedlichen Signalen steht, die sie erkennen (West and Stock, 2001). Die Sensor-Domäne wird von zwei Transmembranhelices flankiert und ist über eine cytoplasmatische „Linker-Region“ mit der Kinase-Domäne verbunden (Mascher *et al.*, 2006). Die Kinase-Domäne, auch als Transmitter-Domäne bezeichnet, kann wiederum in zwei Subdomänen unterteilt werden, der Phosphorylierungs-Subdomäne mit dem konservierten Histidin-Rest (als H-Box bezeichnet) und der katalytischen oder ATP-bindenden Subdomäne (Mascher *et al.*, 2006). Die Kinase-Domäne enthält charakteristische konservierte Sequenzbereiche, die als H-, N-, F-, G1- und G2-Box bezeichnet werden (Parkinson and Kofoed, 1992). In 2005 konnte das erste Mal die Kristallstruktur der gesamten cytoplasmatischen Region einer Sensorkinase beschrieben werden (Marina *et al.*, 2005). Die Kinase-Domäne katalysiert eine ATP-abhängige *trans*-Autophosphorylierung, d. h. eine Untereinheit des Dimers phosphoryliert den spezifischen Histidin-Rest der anderen Untereinheit (West and Stock, 2001).

Die Mehrheit der Antwortregulatoren fungiert als Transkriptionsregulatoren und wird aufgrund ihrer Struktur in verschiedene „Typen“, oder auch Subfamilien genannt, untergliedert. Diese Subfamilien wurden nach repräsentativen Mitgliedern benannt. Transkriptionsregulatoren des OmpR-, NarL- und NtrC-Typs stellen mit 60 % die Mehrheit aller Antwortregulatoren dar (Galperin, 2006). Antwortregulatoren vom OmpR- und NarL-Typ bestehen aus einer konservierten N-terminalen Regulator-Domäne (auch als Empfänger-Domäne bezeichnet) und einer variablen C-terminalen Effektor-Domäne (West and Stock, 2001). Diese Effektor-Domäne enthält im Fall von OmpR-Typ-Regulatoren ein „winged *helix-turn-helix*“-Motiv, im Fall von NarL-Typ-Regulatoren ein „*helix-turn-helix*“-Motiv (Galperin, 2006). Die N-terminale Regulator-Domäne besitzt mehrere Aktivitäten. Sie interagiert mit der phosphorylierten Sensorkinase und katalysiert den Transfer der Phosphorylgruppe auf den konservierten Aspartat-Rest innerhalb der Regulator-Domäne des Antwortregulators. Weiterhin reguliert die Regulator-Domäne auch die Aktivität der assoziierten Effektor-Domäne (Stock *et al.*, 2000).

Zusammenfassend lässt sich das klassische 2-KS folgendermaßen darstellen (Abb. III. 1.): Ein externer Stimulus wird von der periplasmatischen Sensor-Domäne der Sensorkinase erkannt und führt zur Aktivierung der cytoplasmatischen Kinase-Domäne. Die γ -Phosphorylgruppe

von ATP wird von der ATP-bindenden Subdomäne auf den konservierten Histidin-Rest innerhalb der Phosphorylierungs-Subdomäne übertragen. Daraufhin interagiert die N-terminale Regulator-Domäne des Antwortregulators mit der phosphorylierten Sensorkinase und katalysiert den Transfer der Phosphorylgruppe auf den konservierten Aspartat-Rest innerhalb der Regulator-Domäne. Dies führt zu einer Konformationsänderung und zu einer Aktivierung der Effektor-Domäne. Diese Aktivierung kann u. a. zur Regulation der Expression spezifischer Gene führen. Zur Dephosphorylierung des Antwortregulators wird die Phosphorylgruppe des Aspartat-Restes auf Wasser übertragen (Parkinson and Kofoid, 1992; Stock *et al.*, 2000). Die Dephosphorylierung kann autokatalytisch, d. h. durch den Antwortregulator selbst, oder aber durch Phosphatasen erfolgen. Ein Beispiel für die Dephosphorylierung durch eine Phosphatase stellt der Transkriptionsfaktor Spo0A aus *B. subtilis* dar, der durch die Spo0E-Phosphatase dephosphoryliert und damit deaktiviert wird (Ohlsen *et al.*, 1994; Perego *et al.*, 1994).

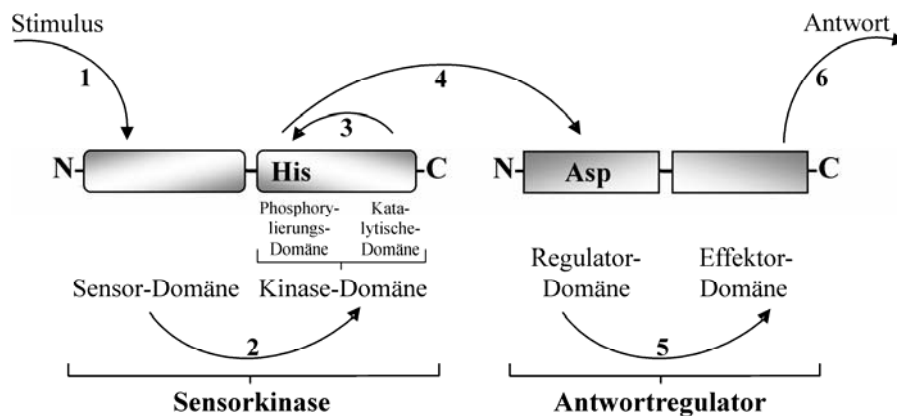


Abb. III. 1: Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von Sensorkinasen und Antwortregulatoren sowie Funktionsweise des klassischen 2-KS. 1, Erkennung des Signals; 2, Konformationsänderung; 3, *trans*-Autophosphorylierung; 4, Phosphorylgruppentransfer von dem Histidin-Rest auf den Aspartat-Rest innerhalb der Regulator-Domäne des Antwortregulators; 5, Aktivierung der Effektor-Domäne durch Konformationsänderung; 6, Auslösung der Antwort (Parkinson and Kofoid, 1992; Wagner, 2000).

1.1.1 Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme in *C. glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ist ein biotechnologisch bedeutendes Bakterium, das weltweit zur industriellen Produktion von Aminosäuren, insbesondere von L-Glutamat und L-Lysin, verwendet wird (Eggeling *et al.*, 2001; Eggeling and Bott, 2005). Auf der Suche nach einem Glutamat-produzierenden Bakterium wurde es 1957 von Dr. Shukuo Kinoshita und Mitarbeitern von der Firma Kyowa Hakko Kogyo in Japan isoliert und charakterisiert (Kinoshita *et al.*, 1957). *C. glutamicum* ist ein apathogenes, stäbchen- bis keulenförmiges („coryne“ bedeutet im Griechischen „Keule“), Gram-positives Bakterium, das keine Sporen bildet. Es gehört zu der Klasse der *Actinobacteria*, in welcher es der Ordnung *Actinomycetales* und der Unterordnung der *Corynebacterineae* zugeordnet wird (Liebl, 1991; Stackebrandt *et al.*, 1997). Darüber hinaus dient *C. glutamicum* als Modellorganismus für seine pathogenen Verwandten wie z. B. *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*, die auch zu der Unterordnung *Corynebacterineae* gehören.

Mit Hilfe von Sequenzvergleichen konnten 13 Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme in dem 3,28 Mbp großen Genom (Kalinowski *et al.*, 2003) von *C. glutamicum* identifiziert werden. Analysen dieser 13 2-KS ergaben, dass die Gene für die Sensorkinasen und für die Antwortregulatoren unmittelbar benachbart im Chromosom vorliegen (Kocan *et al.*, 2006). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass vermutlich alle Sensorkinasen membrangebunden sind und alle Antwortregulatoren aus einer Regulator-Domäne und einer Effektor-Domäne mit *helix-turn-helix*-Motiv bestehen. Dies deutet auf eine DNA-bindende Funktion der Antwortregulatoren hin, die daher wahrscheinlich als Transkriptionsregulatoren fungieren.

Bislang konnten fünf der 13 2-KS von *C. glutamicum* näher charakterisiert werden. Demnach könnte das MtrA/MtrB-System eine übergeordnete Funktion bei der Koordination von Stressantwort, Zellteilung und Wachstum haben (Brocker, 2006). Das CitA/CitB-System aktiviert Gene für den Citrat-Transport in die Zelle und das CgtS9/CgtR9-System spielt vermutlich eine Rolle bei der Regulation der Kupfer-Homöostase. Das CgtS4/CgtR4-System scheint bei der Antwort auf oxidativen Stress eine Rolle zu spielen (Wessel, 2003; Wingens, 2004). Daneben gibt es auch Hinweise auf eine Funktion bei der Phosphatmangelantwort (Sorger-Herrmann, 2006; Wessel, 2003), die primär vermutlich durch das PhoS/PhoR-System reguliert wird (Kocan *et al.*, 2006). Auf die Regulation der Phosphatmangelantwort wird in dem folgenden Abschnitt detaillierter eingegangen.

1.2 Regulation der Phosphatmangelantwort

Phosphor ist ein essentieller Nährstoff für alle Zellen und wird z. B. für die Biosynthese von Nukleotiden, DNA und RNA benötigt. Darüber hinaus ist Phosphor für die Regulation von Proteinaktivitäten durch Phosphorylierung von Histidin-, Aspartat-, Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten essentiell. Bakterien haben daher Mechanismen zur Akquisition, Assimilierung und Speicherung von Phosphor entwickelt. Die zellulären Speicherformen von anorganischem Phosphat (P_i) ist Polyphosphat (polyP). Unter Phosphatmangelbedingungen induzieren viele Bakterien die Synthese von Proteinen, die es ihnen erlauben, verbliebenes Phosphat effizienter zu nutzen und alternative Phosphorquellen zugänglich zu machen. Die Regulation der Transkription dieser Gene wird sehr oft durch 2-KS gesteuert und wurde intensiv in *E. coli* (Wanner, 1996) und *B. subtilis* (Hulett, 2002) untersucht.

1.2.1 Phosphatmangelantwort in *E. coli*, *B. subtilis*, *M. tuberculosis* und *Streptomyces*-Spezies

Das PhoR-PhoB 2-KS steuert die Phosphatmangelantwort in *E. coli* (Wanner, 1996). Dieser Prozess beinhaltet die Kontrolle der Expression von mehr als 38 Genen (als Phosphatregulon bezeichnet), die die Aufnahme von P_i mit höherer Affinität ermöglichen sowie die Verwendung von organischem Phosphat oder Phosphonaten (Shinagawa *et al.*, 1983; Wanner, 1993; Wanner, 1996). Das Phosphatregulon enthält neben Genen, die für die Phosphoraufnahme bzw. den Phosphormetabolismus benötigt werden, auch Gene, die z. B. eine Rolle bei der *de novo*-Biosynthese von NAD^+ (Hove-Jensen, 1996) und bei der Initiation der Chromosomenreplikation (Han *et al.*, 1999) spielen. Erst kürzlich wurden drei weitere durch PhoB regulierte Gene identifiziert, *amn* (AMP Nukleosidase), *yibD* (kodiert ein Protein, dass bei der Schwermetallantwort beteiligt ist) und *ytfK* (hypothetisches Protein), die diesen Antwortregulator als globalen Regulator charakterisieren (Baek and Lee, 2006). Unter Phosphatmangelbedingungen autophosphoryliert die membrangebundene Sensorkinase PhoR und phosphoryliert den Antwortregulator PhoB (Ellison and McCleary, 2000; Makino *et al.*, 1989; Parkinson, 1993; Stock *et al.*, 1989). PhoB ist ein Mitglied der OmpR-Subfamilie und besteht aus einer N-terminalen Regulator-Domäne und einer C-terminalen Effektor-Domäne mit „*helix-turn-helix*“-Motiv (Sola *et al.*, 1999). Phosphoryliertes PhoB bindet an die sogenannte PHO-Box, ein Bindemotiv bestehend aus einem „direct repeat“ von je 7 bp mit der gut konservierten Sequenz CTGTCAT separiert durch ein 4 bp langes Segment (Wanner,

1996). Wie bei den meisten 2-KS ist der Vorgang der Signalerkennung durch die Sensor kinase, so auch im Fall von PhoR, noch ungeklärt. Die Phosphorylierung von PhoR erfolgt *in trans* und eine Phosphorylgruppe wird an den Aspartat-Rest des Antwortregulators übertragen. Durch Phosphorylierung erfährt PhoB eine Aktivierung, die sich in einer 150-fach höheren DNA-Bindungsaffinität ausdrückt (Wanner, 1993). Durch Interaktion mit der σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase wird die Transkription gesteigert (Makino *et al.*, 1989; Makino *et al.*, 1996; McCleary, 1996). Bei der Dephosphorylierung von PhoB scheint ein drittes Protein, PhoU, involviert zu sein (Arribas-Bosacoma *et al.*, 2007; Oganessian *et al.*, 2005). PhoB liegt sowohl im phosphorylierten als auch im unphosphorylierten Zustand als Dimer vor (Bachhawat *et al.*, 2005; McCleary, 1996). Zudem zeigten biochemische Studien, dass bei unphosphoryliertem PhoB die N-terminale Regulator-Domäne inhibitorisch auf die C-terminale Effektor-Domäne wirkt (Allen *et al.*, 2001; Ellison and McCleary, 2000). Zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus, den man sich als eine Konformationsänderung der Regulator-Domäne durch Phosphorylierung und der Weitergabe dieser Konformationsänderung auf die Effektor-Domäne durch Interaktion der beiden Domänen vorstellt, wurden Studien mit konstitutiv aktiven PhoB-Proteinen durchgeführt. Dabei fand man heraus, dass der Austausch von nur zwei Aminosäuren (Mutante 1: Asp10Ala/ Asp53Glu; Mutante 2: Asp53Ala/ Tyr102Cys) zu einem konstitutiv aktiven Protein führte (Arribas-Bosacoma *et al.*, 2007). Gleiches konnte für den Transkriptionsregulator OmpR nachgewiesen werden. Hier reichte der Austausch einer Aminosäure aus (Tyr102Cys), um ein konstitutiv aktives Derivat zu erhalten (Kanamaru and Mizuno, 1992).

Die Regulation der Phosphatmangelantwort verläuft in *B. subtilis* komplexer als in *E. coli* ab, da in dieser Spezies drei 2-KS, nämlich PhoPR, ResDE und Spo0A, involviert sind (Hulett, 2002; Sun *et al.*, 1996). Unter Phosphatlimitierung, die wahrscheinlich durch die Sensor kinase PhoR erkannt wird, erfolgt deren Autophosphorylierung und die Phosphorylierung des Antwortregulators PhoP, der wiederum die Transkription der Phosphatmangelgene aktiviert bzw. reprimiert (Hulett, 1996; Liu and Hulett, 1997). Dabei bindet PhoP an multiple Wiederholungen des Sequenzmotivs TT(A/T/C)ACA, die durch ca. 5 bp separiert sind (Liu and Hulett, 1998). Das Phosphatmangelstimulon besteht aus Genen, die einen hoch-affinen Phosphattransporter (Eymann *et al.*, 1996; Qi *et al.*, 1997) und alkalische Phosphatasen und Phosphodiesterasen (Antelmann *et al.*, 2000; Kapp *et al.*, 1990) kodieren. Es enthält aber auch Gene für die Biosynthese von Zellwandpolymeren (Lahooti and Harwood, 1999; Muller *et al.*, 1997), bei deren Transkriptionsregulation PhoP nicht nur

als Aktivator, sondern auch als Repressor agiert. So erfolgt unter Phosphatmangelbedingungen eine Induktion des *tuaABCDEFGH*-Operons, das für die Biosynthese von Teichuronsäuren kodiert, und eine Repression der *tagAB*- und *tagDEF*-Operons, die für die Biosynthese von Teichonsäuren kodieren. Bei Phosphatmangel werden dadurch die phosphathaltigen Teichonsäuren gegen phosphatfreie Teichuronsäuren ausgetauscht (Antelmann *et al.*, 2000; Pragai and Harwood, 2002; Pragai *et al.*, 2004). Wie bereits erwähnt kommen neben dem PhoPR-System, dessen primäre Rolle die Phosphatmangelantwort ist (Birkey *et al.*, 1998; Hulett, 2002), auch Spo0A, notwendig für die Initialisierung der Sporulation (Burbulys *et al.*, 1991) und das 2-KS ResDE, spielt eine Rolle bei der Atmung (Nakano *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2001), in *B. subtilis* vor. Dabei wird das PhoRP-System positiv durch das ResDE-System und den Regulator AbrB reguliert, während das Spo0A-System eine reprimierende Wirkung auf beide Systeme ausübt (Eldakak and Hulett, 2007; Sun *et al.*, 1996). Unter Phosphatmangelbedingungen wirkt PhoP selbst aktivierend auf das ResDE-System, was zu einer positiven Rückkopplung zwischen diesen beiden 2-KS führt (Birkey *et al.*, 1998). Demnach ist die Konzentration an P_i zwar essentiell zum Auslösen der Phosphatmangelantwort, aber die Stärke der Phosphatmangelantwort ist abhängig von ResD und/oder AbrB (Eldakak and Hulett, 2007).

In *Mycobacterium tuberculosis*, einem pathogenen Mitglied der *Corynebacterineae*, konnten 11 2-KS identifiziert werden (Cole *et al.*, 1998), darunter das PhoRP-System (Perez *et al.*, 2001). PhoP von *M. tuberculosis* weist die höchste Sequenzübereinstimmung (65 %) unter den *Mycobacterium* Spezies zu *C. glutamicum* PhoR auf. PhoP scheint für das intrazelluläre Wachstum in Mausemphysemakrophagen essentiell zu sein. Darüber hinaus konnte die *phoP*-Mutante nicht in Medium mit einer geringen Mg^{2+} -Konzentration wachsen (Walters *et al.*, 2006). Das durch Transkriptomanalysen bestimmte *M. tuberculosis* PhoP-Regulon enthält Gene, die an der Biosynthese von Sulphatiden, Polyacyltrehalosen und Diacyltrehalosen beteiligt sind (Gonzalo Asensio *et al.*, 2006; Walters *et al.*, 2006). Biochemische Analysen einer *phoP*-Mutante, durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette erhalten, zeigten, dass diese die wichtigen Lipid-Komponenten der Zellwand nicht mehr enthielt, wodurch der Wachstumsdefekt verursacht sein könnte (Gonzalo Asensio *et al.*, 2006; Walters *et al.*, 2006). Demnach scheint das PhoPR 2-KS an der Regulation der komplexen Lipid-Biosynthese in *M. tuberculosis* involviert zu sein (Walters *et al.*, 2006). Eine direkte Interaktion von PhoP mit einem Zielgen konnte bislang nur für die Promotorregion von *phoP* nachgewiesen werden. PhoP interagiert dabei mit einer Region bestehend aus drei 9 bp langen

Wiederholungen mit der Konsensussequenz AC(T/G)(T/G)(T/G)(C/T)A(A/G)C und reprimiert dadurch seine eigene Expression (Gupta *et al.*, 2006).

Interessanterweise konnten in *M. tuberculosis* drei *pst*-Operons identifiziert werden (Braibant *et al.*, 1996a; Braibant *et al.*, 1996b; Cole *et al.*, 1998), die möglicherweise eine fein abgestimmte Anpassung des Mikroorganismus an Phosphatmangel während des Infektionszyklus ermöglichen (Lefevre *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass PstS1 aus *M. tuberculosis* in der Lage ist Phosphat mit einer ähnlich hohen Affinität, wie für PstS aus *E. coli* beschrieben, zu binden (Chang *et al.*, 1994; Vyas *et al.*, 2003). Zudem scheint die Produktion der verschiedenen PstS-Proteine unter Phosphatmangel erhöht zu sein (Andersen *et al.*, 1990; Lefevre *et al.*, 1997). Nicht nur für *pstS1*, sondern auch für *pstS2* konnte gezeigt werden, dass sie hoch-affine Phosphatbindepoteine kodieren (Peirs *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die *pstS1*-Mutante, als auch die *pstS2*-Mutante eine stark abgeschwächte Virulenz zeigt. Demnach scheint *M. tuberculosis* sehr wahrscheinlich während seiner intrazellulären Lebensdauer Phosphatlimitierung zu erfahren (Peirs *et al.*, 2005).

Die Phosphatmangelantwort in den Antibiotika-produzierenden Bakterien *Streptomyces coelicolor*, *S. lividans* und *S. natalensis* wird durch das 2-KS PhoRP reguliert (Mendes *et al.*, 2007; Sola-Landa *et al.*, 2003). Bei der Sensorkinase PhoR handelt es sich, wie bei den zuvor dargestellten 2-KS, um ein membrangebundenes Protein und der Antwortregulator PhoP gehört zu der OmpR-Familie der DNA-bindenden Antwortregulatoren (Sola-Landa *et al.*, 2003). Für die *S. coelicolor*-Gene *pstS* und *phoRP-phoU* konnte eine direkte Interaktion von phosphoryliertem PhoP mit den Pho-Boxen gezeigt werden. Bei der Pho-Box handelt es sich um eine 11 bp lange Sequenz mit dem Konsensusmotiv G(G/T)TCA(C/T)(C/T)(C/T)(A/G)(G/C)G. Dieses Motiv konnte in beiden Promotorregionen als direkte Sequenzwiederholung identifiziert werden (Sola-Landa *et al.*, 2005). Auch in *S. natalensis* konnte eine Bindung des Antwortregulators PhoP an dieses Konsensusbindemotiv innerhalb der Promotorregion des *phoRP-phoU*-Operons nachgewiesen werden (Mendes *et al.*, 2007).

Interessanterweise finden sich bei den dargestellten *Streptomyces*-Spezies Zusammenhänge zwischen dem PhoRP 2-KS und der Biosynthese von Sekundärmetaboliten (Martin, 2004; Mendes *et al.*, 2007; Sola-Landa *et al.*, 2003). Die Expression von Genen, die Enzyme für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten kodieren, wird unter Phosphatüberschussbedingungen reprimiert (McDowall *et al.*, 1999). In *S. lividans* *phoP*- und *phoRP*-Mutanten konnte ein

Anstieg der Sekundärmetabolite Actinorhodin und Undecylprodigiosin nachgewiesen werden, was eine Beteiligung des PhoRP-Systems bei der Regulation der Biosynthese von Sekundärmetaboliten vermuten lässt (Sola-Landa *et al.*, 2003). Jedoch konnten bislang keine Pho-Boxen in den Promotorregionen der Biosynthesegene der Sekundärmetabolite Actinorhodin und Undecylprodigiosin identifiziert werden, wodurch eher eine indirekte Regulierung durch PhoRP vermutet wird (Martin, 2004). Eine indirekte Beteiligung von PhoRP wird auch bei der Regulierung der Primaricin-Biosynthesegene in *S. natalensis* vorgeschlagen (Mendes *et al.*, 2007). Bei einer Phosphatkonzentration von ca. 1 mM ist die Expression aller Primaricin-Biosynthesegene stark reduziert, während deren Expression bei einer Phosphatkonzentration von 10 mM dagegen vollständig reprimiert ist. In *phoP*- und *phoRP*-Mutanten ist die Primaricin-Produktion dagegen um bis zu 80 % gesteigert, jedoch finden sich in den Promotorregionen der Primaricin-Biosynthesegene keine Pho-Boxen (Mendes *et al.*, 2007).

1.2.2 Phosphatmangelantwort in *C. glutamicum*

In *Corynebacterium glutamicum* wurde das Phosphatmangelstimulon mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie identifiziert (Ishige *et al.*, 2003). Ein Vergleich der mRNA-Level vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem Wechsel von Phosphatüberschuss zu Phosphatmangel führte zur Identifikation von 92 Genen mit einer ≥ 4 -fach veränderten Expression. Darunter finden sich 25 Gene, die bei der Phosphataufnahme und dessen Metabolismus eine Rolle spielen. Diese Gene werden im Folgenden *psi*-Gene (phosphate starvation inducible) genannt. Dazu gehört das *pstSCAB*-Operon, das einen hochaffinen ABC-Transporter für die Aufnahme von Phosphat kodiert; das *ugpABCE*-Operon, das einen hochaffinen ABC-Transporter für die Aufnahme von Glycerin-3-phosphat kodiert; *glpQ1*, das eine Glycerinphosphoryldiester-Phosphodiesterase kodiert; *ushA*, das ein Enzym mit UDP-Zuckerhydrolase- und 5'-Nukleotidase-Aktivität kodiert (Rittmann *et al.*, 2005); *nucH*, das eine putative extrazelluläre Nuklease kodiert; *phoC* (NCgl2959/cg3393), das eine Zellwand-assoziierte Phosphatase kodiert (Wendisch and Bott, 2005); *phoH1*, das eine ATPase unbekannter Funktion kodiert und das *pctABCD* Operon, das ein ABC-Transportsystem kodiert, das möglicherweise für die Aufnahme einer noch unbekanntem phosphorhaltigen Komponente kodiert (Ishige *et al.*, 2003).

Zur Identifizierung eines 2-KS, das an der Phosphatmangelantwort in *C. glutamicum* beteiligt sein könnte, wurden Wachstumsexperimente mit Deletionsmutanten durchgeführt (Kocan *et*

al., 2006). Insgesamt wurden 12 *C. glutamicum*-Mutanten untersucht, in denen jeweils die Gene für ein bestimmtes 2-KS deletiert waren. Es zeigte sich, dass eine Mutante unter Phosphatmangelbedingungen, nicht aber bei ausreichender Phosphatversorgung, signifikant schlechter wuchs als der WT. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das entsprechende 2-KS an der Regulation der Phosphatmangelantwort beteiligt ist (Kocan *et al.*, 2006). Aufgrund dessen wurden die Gene für dieses 2-KS *phoS* (kodiert die Sensor-Kinase) und *phoR* (kodiert den Antwortregulator) genannt.

Mittels DNA-Microarray-Analysen wurde die Rolle des PhoRS-Systems bei der Anpassung an Phosphatmangelbedingungen bestätigt. Es zeigte sich, dass die *psi*-Gene, mit Ausnahme des *pstSCAB* Operons, in der Δ *phoRS* Mutante bis zu 60 min nach einem Wechsel von Phosphatüberschuss zu Phosphatmangel nicht mehr induziert wurden (Kocan *et al.*, 2006). Die Induktion des *pstSCAB*-Operons unter Phosphatmangelbedingungen in der Δ *phoRS*-Mutante deutet auf mindestens einen weiteren Regulator neben PhoRS hin (Kocan, 2005). Mittels Gelretardationsexperimenten konnte eine direkte Interaktion der beiden Regulatoren des Acetat-Stoffwechsels, RamB (Gerstmeir *et al.*, 2004) und GlxR (Kim *et al.*, 2004) mit der Promotorregion von *pstS* nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine in weiteren Arbeiten zu untersuchende Verbindung zwischen der Regulation von Kohlenstoff- und Phosphorstoffwechsel hin (Sorger-Herrmann, 2006).

2 L-Lysinbiosynthese in *C. glutamicum*

L-Lysin ist eine essentielle Aminosäure, die als Futtermitteladditiv zur Steigerung der Fleischproduktivität vor allem in der Schweine- und Geflügelzucht eingesetzt wird (Kelle *et al.*, 2005). Jährlich werden mehr als 750.000 Tonnen L-Lysin produziert (Wittmann and Becker, 2007). Die Biosynthese von L-Lysin erfolgt bei Ammonium-Mangel über den energetisch „kostspieligen“ Tetrahydrodipicolinatsuccinylase-Weg und bei Ammonium-Überschuss über die energetisch weniger „kostspielige“ Diaminopimelatdehydrogenase (Abb. III. 2; Eggeling and Sahn, 1999). Zur Steigerung der Produktivität wurden in den vergangenen Jahren Gene, die die L-Lysin-Biosynthese direkt betreffen, aber auch Stoffwechselwege, die zu Nebenprodukten führen und solche, die der Synthese von Vorstufenmolekülen dienen, genetisch verändert (Hermann, 2003; Pfefferle *et al.*, 2003; Sahn *et al.*, 2000).

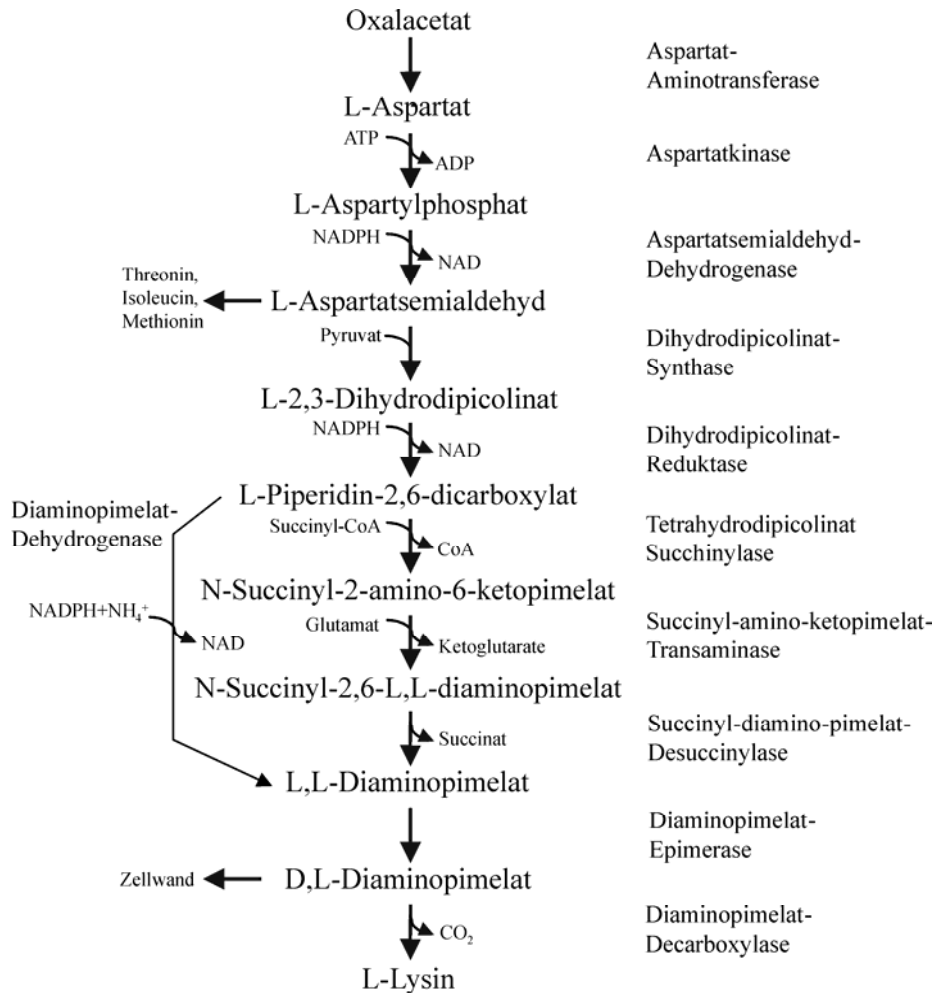


Abb. III. 2: Darstellung der L-Lysin Biosynthese in *C. glutamicum* (nach Kelle *et al.*, 2005).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein Derivat von *C. glutamicum* ATCC13032 konstruiert, der Modellstamm DM1730 (B. Bathe, Degussa). Dieser Stamm enthält Punktmutationen in den Genen *lysC* (T311I; Aspartatkinase), *hom* (V59A; Homoserin-Dehydrogenase) und *pyc* (P458S; Pyruvat-Carboxylase). Darüber hinaus wurde das Gen *pck*, das die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodiert, in diesem Stamm deletiert. Die Aspartatkinase *LysC* wird durch L-Lysin und auch durch L-Threonin kumulativ „feedback“ inhibiert (Kalinowski *et al.*, 1991; Shiio and Miyajima, 1969). Die *lysC*-Genregion besteht aus zwei „in-frame“ überlappenden Genen, *lysC* alpha und *lysC* beta. Der Austausch einer einzelnen Aminosäure (T311I) innerhalb der beta-Untereinheit der Aspartatkinase führte zu

einer „feedback“ resistenten Aspartatkinase (Kalinowski *et al.*, 1991). Zur Verringerung der Nebenproduktbildung in Form von L-Threonin wurde das *hom* Gen mutiert. Durch die eingeführte Mutation zeigt die Homoserin-Dehydrogenase eine geringere Aktivität, so dass weniger Homoserin und damit L-Threonin aus Aspartat-4-semialdehyd entsteht, sondern mehr Dihydrodipicolinat durch die Dihydrodipicolinat-Synthase gebildet wird. Gleichzeitig wird dadurch die „feedback“-Inhibition durch L-Threonin verringert (Eikmanns *et al.*, 1991b; Follettie *et al.*, 1988). Die eingeführte Mutation in dem *pyc* Gen führt zu einer Aktivitätssteigerung und damit dazu, dass die Pyruvat-Carboxylaseaktivität gesteigert wird. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Synthese von Oxalacetat, der Vorstufe von Aspartat, was zu einer erhöhten Lysinbildung führt (Peters-Wendisch *et al.*, 2001). Eine verbesserte Bereitstellung von Oxalacetat und der damit erhöhten Lysinproduktion konnte auch durch Deletion des Gens *pck*, das die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodiert, die die Reaktion von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat bei der Glukoneogenese katalysiert, erreicht werden (Riedel *et al.*, 2001).

3 Das Thema der Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Regulation der Phosphatmangelgene von *C. glutamicum* durch das Zweikomponenten-System PhoRS weiter untersucht werden. Dazu sollte die für Zweikomponentensysteme typische Autophosphorylierung der Sensor kinase PhoS sowie der Phosphorylgruppentransfer auf den Antwortregulator PhoR analysiert werden. Zum Nachweis der direkten Regulation der Transkription der *psi*-Gene durch PhoR sollten Gelretardationsexperimente durchgeführt, der Einfluss der Phosphorylierung von PhoR auf dessen DNA-Bindungsaffinität untersucht und ein PhoR-Bindemotiv abgeleitet werden. Neben diesen *in vitro*-DNA-PhoR-Interaktionsstudien sollte die Relevanz der identifizierten PhoR-Bindestellen auch *in vivo* mittels Transkriptionsfusionsanalysen verifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluss von Phosphatmangel und des PhoRS-Zweikomponentensystems auf die Lysinbildung untersucht werden. Dazu sollten die *phoRS*-Gene in dem Lysin-Modellstamm DM1730 deletiert und im Anschluss die Stämme DM1730/pEKEx2, DM1730 Δ *phoRS*/pEKEx2 und DM1730 Δ *phoRS*/pEKEx2-*phoRS* hinsichtlich Wachstum und Lysinbildung unter Phosphatüberschuss und Phosphatmangel analysiert werden.

IV Material und Methoden

1 Pufferlösungen und Antibiotika (Stammlösungen)

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen mit bidest. Wasser angesetzt.

Ampicillin	100 mg/ml (sterilfiltriert)
ATP	100 mM
Biotin	100 mg/l (sterilfiltriert), 0,4 mM
BS-Puffer	50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 0,5 mM Na ₂ EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5
Calciumchlorid	10 g/l (sterilfiltriert), 68 mM
Glukose	50 % (w/v) (autoklaviert), 2,8 M (550 g/l Glukose · H ₂ O)
Kanamycin	50 mg/ml (sterilfiltriert)
SDS	10 % (w/v)
“Strip”-Puffer	20 mM Tris, 500 mM NaCl, 100 mM Na ₂ EDTA, pH 7,9, autoklaviert, entgast mit einer Vakuumpumpe bei einem Unterdruck von ca. 840 mbar (Vacuum Pump XF 5423050 von Millipor, Eschborn)
50 x TAE-Puffer	37,2 g/l Na ₂ EDTA 2H ₂ O, 242 g/l Tris, mit Eisessig <i>ad</i> pH 8,5
10 x TBE-Puffer	55 g/l Borsäure, 7,44 g/l Na ₂ EDTA 2H ₂ O, 108 g/l Tris
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA
TKMD-Puffer	50 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT (frisch zusetzen), pH 7,5, entgast
TNI x-Puffer	20 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, x mM Imidazol, pH 7,9, sterilfiltriert, entgast

2 Nährmedien

SOC-Medium: 20 g/l Trypton (Difco), 5 g/l Hefeextrakt (Difco), 0,6 g/l NaCl (Merck),
0,2 g/l KCl (Merck), nach dem Autoklavieren 1 g/l MgCl₂ (Merck)
(sterilfiltriert) und 4 g/l Glukose (Merck) (separat autoklaviert) zugeben

LB-Medium:	10 g/l Trypton (Difco), 5 g/l Hefeextrakt (Difco), 10 g/l NaCl (Merck)
BHI-Medium:	37 g/l BHI (Difco)
BHIS-Medium:	37 g/l BHI (Difco) und 182 g/l Sorbitol (Merck) (separat autoklaviert)
CGIII-Medium:	2,5 g/l NaCl, 10g/l Bacto-Pepton (Difco), 10 g/l Hefeextrakt (Difco), pH 7,4, nach dem Autoklavieren 20 g/l Glukose (Merck) separat autoklaviert) zugeben
CGXII-Medium:	20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), 5 g/l Harnstoff (Merck), 1 g/l KH_2PO_4 (Merck), 1 g/l K_2HPO_4 (Merck), 0,25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 10 mg/l CaCl_2 (Merck), 42 g/l MOPS (Roth), 0,2 mg/l Biotin (Merck), pH 7 (mit NaOH einstellen), nach dem Autoklavieren 1 ml/l Protokatechusäure (30 g/l in verd. NaOH gelöst, sterilfiltriert), 1 ml/l Spurensalzlösung und 40 g/l Glukose (Merck) zugeben
Spurensalzlösung:	10 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 10 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck), 1 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 0,2 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 20 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck), zum Lösen mit HCl ansäuern (pH 1)

Für entsprechende Nährböden wurde den Medien 15 g/l Agar-Agar (Difco) zugesetzt. Wenn erforderlich wurde den Nährmedien Kanamycin zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml (*E. coli*) oder 25 µg/ml (*C. glutamicum*) bzw. Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml (*E. coli*) zugesetzt.

3 Bakterienstämme

Tab. IV.1: Bakterienstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Stamm	Relevante Charakteristika	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ <i>thi-1 endA1 hsdR17</i> (r ⁻ , m ⁻) <i>supE44 ΔlacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZΔM15</i>) <i>recA1 gyrA96 relA1</i> ; Stamm für Klonierungen	Invitrogen (Hanahan, 1985a)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (λ cIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>); Wirtsstamm für die Überproduktion der pET-kodierten rekombinanten Proteine; enthält den lysogenen Phagen λ DE3, der das T7-Phagen-RNA-Polymerase-Gen unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors trägt.	Novagen Inc., Madison, USA
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC13032	Wildtyp, Biotin-auxotroph	Abe <i>et al.</i> , 1967
DM1730	<i>pyc</i> ^{P458S} , <i>hom</i> ^{V59A} , <i>lysC</i> ^{T311I} , Δ <i>pck</i> , Derivat von ATCC13032	B. Bathe, Degussa
DM1730 Δ <i>phoRS</i>	Derivat von DM1730 mit Deletion der <i>phoRS</i> -Gene	Diese Arbeit

4 Plasmide

Tab. IV.2: Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Plasmid	Merkmale	Referenz
pEKEx2	Kan ^R ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> -Shuttle-Vektor für die regulierte Genexpression (P _{tac} , lacI ^Q , pBL1 oriV _{C.g.} , pUC18 oriV _{E.c.}), MCS im Vergleich zum pEKEx1 invertiert	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991a
pEKEx2- <i>phoRS</i>	Kan ^R ; pEKEx2-Derivat, enthält 2466-bp-Fragment mit den <i>phoRS</i> Genen aus <i>C. glutamicum</i>	Kočan <i>et al.</i> , 2006
pET2	Kan ^R , Promotor-Testvektor	Vasicova <i>et al.</i> , 1998

Fortsetzung Tabelle IV.2:

Plasmid	Merkmale	Referenz
pET2- <i>phoR1</i>	Kan ^R ; pET2-Vektor mit einem 233-bp-Fragment des <i>phoR</i> -Promotors	Diese Arbeit
pET2- <i>phoR2</i>	Kan ^R ; pET2-Vektor mit einem 200-bp-Fragment des <i>phoR</i> -Promotors	Diese Arbeit
pET2- <i>phoR3</i>	Kan ^R ; pET2-Vektor mit einem 180-bp-Fragment des <i>phoR</i> Promotors	Diese Arbeit
pET16b	Ap ^R ; <i>P_{T7}</i> , <i>lacI</i> , <i>oriV</i> aus pBR322, Vektor zur Überexpression von Genen in <i>E. coli</i> , der das Anfügen eines N-terminalen „tags“ aus 10 Histidin-Resten ermöglicht	Novagen
pET16b- <i>phoR</i> Δ1-125	pET16b-Derivat für die heterologe Überproduktion von PhoRΔ1-125 mit N-terminalem His ₁₀ „tag“ (PhoRΔ1-125)	Kocan, 2005
pET16b- <i>phoR</i>	pET16b-Derivat für die heterologe Überproduktion von PhoR mit N-terminalem His ₁₀ „tag“ (PhoR _{N-His10})	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> Δ <i>cgtSR3</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat, dass das <i>cgtSR3</i> Deletionskonstrukt trägt	Kočan <i>et al.</i> , 2006
pMal-c	Amp ^R ; <i>P_{tac}</i> , <i>lacI^q</i> , ColE1 <i>oriV</i> , <i>E. coli</i> Vektor zu Konstruktion und Überexpression von Fusionsproteinen, die das Maltose-Bindeprotein (MalE) aus <i>E.coli</i> , ohne dessen Signalpeptid, enthalten	New England Biolabs
pMalE-PhoS	Amp ^R ; pMal-c Derivat zur Überproduktion eines Fusionsproteins aus der Kinase-Domäne (Aminosäuren 247-485) von PhoS aus <i>C. glutamicum</i> und MalE aus <i>E. coli</i> ohne dessen Signalpeptid	Diese Arbeit

4.1 Konstruktion der Expressionsplasmide pET16b-PhoR_{N-His10} und pMalE-PhoS

Für die Konstruktion des Plasmides pET16b-PhoR_{N-His10} wurde *phoR* mittels der Oligonukleotide *phoR-NdeI-fw* und *phoR-bin1/2-XhoI-rv* amplifiziert und über das QIAquick PCR Purification-Kit (Qiagen) aufgereinigt. Im Anschluss an die Aufreinigung wurde das 767 bp große Insert sowie der Vektor pET16b (N-terminaler 10fach His-„tag“; Faktor Xa

Schnittstelle) mit *NdeI* und *XhoI* verdaut. Zur Aufreinigung der Proben wurde eine Gelextraktion durchgeführt und anschließend erfolgte die Ligation von *NdeI/XhoI* verdautem *phoR* mit *NdeI/XhoI* verdautem pET16b (Plasmidkarte siehe Abb. VIII. 4). *E. coli* DH5 α wurde mit pET16b-*phoR* transformiert und die erfolgreiche Transformation wurde via Kolonie-PCR überprüft. Nachfolgend wurde eine DNA-Sequenz-Analyse durchgeführt und es fanden sich Plasmide ohne Mutationen in den klonierten *phoR*-Fragmenten, mit denen dann *E. coli* BL21(DE3) transformiert wurde.

Die Kinase-Domäne wurde mit dem C-Terminus des Maltose-Bindeproteins von *E. coli*, dem das Signalpeptid fehlt, fusioniert. Dazu wurde die DNA-Region, welche die Kinase-Domäne kodiert (Aminosäuren 247-485), mit den Oligonukleotiden *phoSK-EcoRI-fw* (fügt eine *EcoRI* Schnittstelle vor die Aminosäure 247 ein) und *phoSK-PstI-rv* (fügt eine *PstI* Schnittstelle hinter das Stoppcodon ein) amplifiziert und über das QIAquick PCR Purification-Kit (Qiagen) aufgereinigt. Nach Verdau des aufgereinigtem PCR Fragmentes mit *EcoRI* und *PstI*, wurde dieses mit dem Vektor pMal-c (New England Biolabs, Frankfurt, Germany), der zuvor ebenfalls mit den Restriktionsendonucleasen *EcoRI* und *PstI* geschnitten wurde, ligiert. Das resultierende Expressionsplasmid pMalE-PhoSK (Plasmidkarte siehe Abb. VIII. 5) wurde auf Richtigkeit durch eine DNA-Sequenz-Analyse überprüft. *E. coli* BL21(DE3) wurde mit Plasmiden ohne Mutationen in den klonierten *phoSK*-Fragmenten transformiert.

5 Stammhaltung von Bakterienstämmen

Die Kultivierung von Bakterien zur Stammhaltung erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 ml BHI-Medium, die 12-15 h mit 170 Upm bei 30 °C (*C. glutamicum*) bzw. bei 37 °C (*E. coli*) geschüttelt wurden. Anschließend wurden die Zellen geerntet, in 1 ml BHI-Medium resuspendiert, mit 1 ml sterilem Glycerin (70 %) gemischt und in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde bei -20 °C, das andere bei -75 °C gelagert.

6 Kultivierung von Bakterienstämmen

6.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde routinemäßig Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Nur zur Regeneration der Zellen nach einer Transformation bzw. bei der Kultivierung zur Herstellung kompetenter Zellen wurde SOC-Komplexmedium (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt. Alle *E. coli*-Stämme wurden in Schüttelkolben, in Röhren bzw. auf Agarplatten bei 37 °C kultiviert. Die Kultivierungen zur Plasmid-Isolierung erfolgten im Allgemeinen in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium, die für 15-20 h mit 170 Upm geschüttelt wurden.

Expressionskulturen:

Für die Überproduktion von Proteinen in *E. coli* BL21(DE3) bzw. DH5 α wurden 2 l LB-Medium mit 50 μ g/ml Kanamycin oder 100 μ g/ml Ampicillin mit einer Übernacht-Kultur des *E. coli*-Stammes, der das gewünschte Expressionsplasmid trug, auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 130 Upm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3 wurde die Expression des Zielgens durch Zusatz von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Anschließend wurden die Zellen bei 30 °C weitere 3-4 Stunden inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (10 min, 5300 g, 4 °C), die sedimentierten Zellen wurden einmal in 50 ml Aufschlusspuffer (TNI5 für pET-Derivate, TKMD für pMal-c-Derivate) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor Induktion sowie 1, 2, 3 und 4 Stunden danach wurde die OD₆₀₀ bestimmt sowie 1 ml Proben entnommen und abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in (OD₆₀₀ x 150) μ l 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen und bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C gelagert.

6.2 Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum*

Kultivierung für die Chloramphenicolacetyltransferase-Enzymtests (CAT-Enzymtests):

Für die CAT-Enzymtests wurden zum Animpfen der Vorkulturen Einzelkolonien von Agarplatten verwendet, die nicht älter als 4 Tage waren. Die Vorkultivierung erfolgte in 5 ml BHI-Medium für ~8 h bei 30 °C und 170 Upm. Diese erste Vorkultur wurde zum Animpfen von 50 ml CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glukose verwendet. Diese zweite Vorkultur wurde über Nacht bei 30 °C und 120 Upm inkubiert und zum Animpfen der Hauptkultur verwendet. Die Hauptkultur (300 ml CGXII Medium mit 4 % (w/v) Glukose in

1L Kolben mit seitlichen Schikanen) wurde auf eine OD_{600} von ~1 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 4-5 bei 30 °C und 120 Upm inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden 30 ml Kultur durch Zentrifugation auf Eis geerntet und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Zellen aus 200 ml der verbleibenden Kultur wurden zweimal mit phosphatfreiem CGXII-Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen und anschließend in 200 ml phosphatfreiem CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glukose resuspendiert und weiter bei 30 °C und 120 Upm inkubiert. 10, 30, 60, 90 und 120 min nach dem Transfer in phosphatfreies Medium wurden jeweils 30 ml Kultur durch Zentrifugation auf Eis geerntet und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Alle Kulturen enthielten 25 µg/ml Kanamycin.

Kultivierung von DM1730-Stämmen

Zum Animpfen der ersten Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit 4 % (w/v) Glukose und eine Einzelkolonie von Agarplatte verwendet. Diese erste Vorkultur wurde für ~9 h bei 30 °C und 170 Upm inkubiert und zum Animpfen der zweiten Vorkultur verwendet. Diese, bestehend aus 50 ml CGIII-Medium mit 4 % (w/v) Glukose, wurde über Nacht bei 30 °C und 120 Upm inkubiert. Bei Kultivierung unter Phosphatmangelbedingungen wurde eine dritte Vorkultivierung eingeschoben. Hierzu wurden 50 ml CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glukose und Phosphatmangel (0,6 mM Phosphat) auf eine OD_{600} von ~1 angeimpft und für 24 h bei 30 °C und 120 Upm inkubiert. Dieser Schritt ist zur Verringerung der internen Phosphatspeicher, z. B. Polyphosphat, notwendig. Die Hauptkultur, bestehend aus 50 ml CGXII-Minimalmedium mit 4 % oder 8 % (w/v) Glukose und Phosphatüberschuss (13 mM Phosphat) bzw. Phosphatmangel (0,065, 0,13 oder 0,6 mM Phosphat) wurde auf eine OD_{600} von ~1 angeimpft. Zur Induktion von pEKEx2-Derivaten enthielt die Hauptkultur IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM. Generell wurde dem Medium 25 µg/ml Kanamycin hinzugefügt.

7 Molekularbiologische Methoden

7.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der QIAprep-Spin Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser Kit basiert auf der alkalischen Lyse von Zellen (Birnboim and Doly, 1979). Die Isolierung von Plasmid-DNA aus

C. glutamicum erfolgte ebenfalls mit dem QIAprep-Spin Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden). Aufgrund des im Vergleich zu *E. coli* dickeren Mureinsacculus wurden die *C. glutamicum*-Zellen zunächst 1-2 h mit 15 mg/ml Lysozym im Puffer P1 (Qiagen, Hilden) unter Schütteln bei 37 °C inkubiert (Schwarzer and Pühler, 1991).

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wurden Zellen einer 5-ml-Übernachtskultur vollständig sedimentiert, in 400 µl Lysispuffer (2,42 g/l Tris, 0,74 g/l Na₂EDTA, 1,2 % (v/v) Triton X-100, pH 8,0) mit 20 mg/ml Lysozym (frisch zugesetzt) resuspendiert und 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden 80 µl 10 % (w/v) SDS und 25 µl Proteinase K (20 mg/ml in TE-Puffer) zugegeben, kurz gevortext und 30 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1; pH 7,5 - 8,0) und vortexen wurden die Phasen durch 3 min Zentrifugation bei 14000 Upm (Sigma Zentrifuge 2K15) getrennt, die obere wässrige Phase abgenommen, mit 1 ml eiskaltem abs. Ethanol versetzt, gevortext und 10 min mit 15300 Upm bei 4 °C zentrifugiert (Sigma Zentrifuge 2K15). Die präzipitierte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, der Ethanol vollständig abgenommen, die DNA luftgetrocknet und in 250 µl EB-Puffer (Qiagen, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) gelöst. Die Ausbeute nach dieser Methode beträgt ca. 0,5 mg DNA.

7.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektrophotometrisch am Nanodrop (Spectrophotometer ND-1000 PeQLab Biotechnologie GmbH) durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei wurde mit folgendem Umrechnungsfaktor gearbeitet (Sambrook, 1989): Doppelsträngige DNA: $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 ng/µl. Die Reinheit der DNA wurde anhand der Quotienten E260/E280 (Verunreinigung mit Proteinen) und E260/E230 (Verunreinigung mit Kohlenhydraten) bestimmt, welche beide zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollten.

7.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Auftrennungen von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgten in horizontalen Elektrophoresekammern. Für die Gele wurde 1-2 %-ige (w/v) Agarose (GibcoBRL Ultra Pure Agarose) in 1xTAE-Puffer verwendet, der gleichzeitig auch als Elektrophorese-Puffer diente. Die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung zwischen 120 und 160 V. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch mindestens 10-minütige Inkubation des

Gels in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) mit anschließendem Waschen in bidest. H₂O. Durch Belichtung mit UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Image Master VDS System (Amersham Biosciences). Zur Größenbestimmung der DNA wurde der DNA-Längenstandard XIV¹ von Roche Diagnostics verwendet.

7.4 Rekombinante DNA-Techniken

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs oder Roche Diagnostics bezogen. Der Verdau von DNA erfolgte standardmäßig in 20 µl-Ansätzen unter Verwendung eines geeigneten „SuRE/Cut Buffers for Restriction Enzymes“ (Boehringer Mannheim) und 5 U Enzym. Die Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurden 1- 3 h, chromosomale DNA über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die alkalische Phosphatase katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe von den 5'-Enden der DNA. Da die Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wurde durch Behandlung linearer Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase eine Rezirkularisierung des Vektoranteils bei der Ligationsreaktion vermieden. Hierdurch wurde der Anteil rekombinanter Plasmide im Ligationsansatz erhöht. Zur Dephosphorylierung der 5'-Stränge wurde das Plasmid mit 0,5 U alkalischer Phosphatase („Shrimp alkaline phosphatase“, Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der alkalischen Phosphatase für 15 min bei 65 °C.

Für Ligationen wurde in der Regel der „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche Diagnostics) verwendet. Die Ansätze wurden dabei 15 min bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

7.5 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch eine RbCl₂-Behandlung erhielten logarithmisch wachsende *E. coli*-Zellen die Kompetenz, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Präparation der kompetenten Zellen erfolgte nach Hanahan (Hanahan, 1983, 1985b). Einige 2-3 mm große Kolonien wurden von einer frischen LB-Platte in 1 ml SOC-Medium resuspendiert. Damit wurden 50 ml SOC-Medium inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5 bei 37 °C und 160 Upm

¹ Der DNA-Längenstandard XIV enthält Fragmente folgender Größen: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp, 1300 bp, 1400 bp, 1500 bp und 2642 bp

inkubiert. Danach wurden die Zellen in 50-ml-Falcontubes überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Auch alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden 15 min bei 16000 g und 4 °C geerntet, in 1/3 Kulturvolumen eiskalter RF1-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 1/12,5 Kulturvolumen eiskalter RF2-Lösung resuspendiert, nochmals 15 min auf Eis inkubiert und dann in 50- bzw. 100- μ l-Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -75 °C gelagert.

RF1-Lösung

RbCl ₂	100	mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	50	mM
K-Acetat	30	mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10	mM
Glycerin	15	%
mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8		

RF2-Lösung

Morpholinopropansulfonsäure	10	mM
RbCl ₂	10	mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	75	mM
Glycerin	15	%
mit 6 M NaOH auf pH 6,8		

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50 μ l der Zellen mit bis zu 10 μ l Ligationsansatz für 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C wurden 0,5 ml SOC-Medium (auf 37 °C erwärmt) zugegeben und der Ansatz für weitere 45-60 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Entsprechend dem Resistenzgen des transferierten Plasmids wurden 20 μ l und 100 μ l des Ansatzes auf LB-Platten mit 50 μ g/ml Kanamycin oder 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert.

7.6 Herstellung und Transformation kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Die Herstellung und Transformation von kompetenten *C. glutamicum*-Zellen erfolgte nach der Methode von (van der Rest *et al.*, 1999). Aus einer Übernacht-Vorkultur in LB-Medium mit 2 % (w/v) Glukose wurde die Hauptkultur in 200 ml EPO-Medium (2 g Trypton, 2 g NaCl, 1 g Hefeextrakt, in 160 ml H₂O lösen und autoklavieren; 800 mg Isonicotinsäure-Hydrazid, 5 g Glycin und 0,2 ml Tween-80 in 40 ml H₂O lösen, sterilfiltrieren und zum Medium

hinzugeben) auf eine OD_{600} von 0,3 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 18 °C für 28 h. Die Kulturen wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert, die Zellen abzentrifugiert (10 min 4000 rpm), dreimal mit eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin gewaschen und dann in 2 ml 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert. 200 μ l-Aliquots wurden in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -75 °C gelagert.

Die Transformation der kompetenten *C. glutamicum*-Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Dazu wurden 100 μ l kompetente Zellen mit maximal 1 μ g Plasmid in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette gemischt. Die Elektroporation (Gene Pulser, BioRad, München) erfolgte mit einer Kapazität von 25 μ F, einem Widerstand von 600 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 800 μ l BHIS-Medium (auf 46 °C vorgewärmt) suspendiert, einem Hitzeschock unterzogen (6 min bei 46 °C) und abschließend 1 h bei 30 °C inkubiert. Jeweils 300 μ l des Ansatzes wurden auf BHIS-Platten mit 25 μ g/ml Kanamycin ausplattiert.

7.7 Konstruktion von Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19*mobsacB*-Systems

C. glutamicum-Deletionsmutanten wurden nach Niebisch und Bott (Niebisch and Bott, 2001) in Anlehnung an die von Link *et al.* (Link *et al.*, 1997) beschriebene Methode mit dem Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) konstruiert. Dazu wurde das Plasmid pK19*mobsacB* Δ *cgfSR3* (Kocan *et al.*, 2006) verwendet, das mittels Elektroporation in *C. glutamicum* DM1730 transferiert wurde. Die transformierten Zellen wurden auf BHIS-Nährböden mit 25 μ g/ml Kanamycin ausplattiert. Der Vektor pK19*mobsacB* wird in *C. glutamicum* nicht repliziert. Daher sollte bei kanamycinresistenten Klonen das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert worden sein. Kanamycinresistente Klone wurden zunächst über Nacht in 5 ml BHI-Medium mit 2 % Glukose und 25 μ g/ml Kanamycin kultiviert und anschließend wurden jeweils 100 μ l einer 1:100- und 1:200-Verdünnung der Kulturen auf BHIS-Nährböden mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Das *sacB*-Gen des pK19*mobsacB*-Plasmids kodiert für das Enzym Levansucrase, das Saccharose in Fructose und Glukose spaltet und Fructose zu oligomerem Levan umsetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die *sacB*-Expression in Anwesenheit von Saccharose lethal für *C. glutamicum* ist (Jäger *et al.*, 1992). Daher sollte bei saccharoseresistenten Klonen das Plasmid durch ein weiteres Rekombinationsereignis wieder aus dem Chromosom entfernt

worden sein. Bei diesem zweiten Rekombinationsereignis kann entweder die Wildtyp-Situation wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion erzeugt werden. Klone, die sowohl saccharoseresistent als auch kanamycinsensitiv waren, wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern *cgtRS3-out-fw* und *cgtRS3-out-rv* überprüft.

7.8 Polymerasekettenreaktion

Die PCR (Mullis and Faloona, 1987) wurde sowohl für analytische (Kontrolle von Transformanden und Deletionsmutanten) als auch für präparative Zwecke (*in-vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten) genutzt. Falls im Text nicht anders vermerkt, wurde für präparative PCR-Ansätze der Expand High Fidelity Kit (Roche Diagnostics) verwendet, der neben *Taq*-DNA-Polymerase auch *Tgo*-DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonucleaseaktivität beinhaltet. Durch Kombination der beiden Polymerasen und die 3'-5'-Exonucleaseaktivität der *Tgo*-DNA-Polymerase wird die Fehlerrate der DNA-Synthese um den Faktor 3 reduziert. Für analytische PCR-Ansätze wurde *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tabelle VIII. 1 dargestellt. Die Reaktionen wurden in einem Primus Thermocycler (MWG Biotech) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden bei Verwendung des Expand High Fidelity Kit entsprechend den Angaben des Herstellers wie folgt gewählt: Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielten 0,1 - 0,75 µg Matrizen-DNA, je 300 nM der beiden Primer, 2,6 U *Taq/Tgo*-DNA-Polymerase sowie je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Nach einem Denaturierungsschritt für 5 min bei 95 °C wurden 30 Zyklen mit folgenden Parametern durchlaufen: 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s „Annealing“ bei $T_m - 5$ °C und x s Elongation bei 72 °C. Die Annealing-Temperatur wurde üblicherweise 5 °C unter der Schmelztemperatur T_m der Primer gewählt. Die Schmelztemperatur T_m der DNA kann mit der Formel $T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \cdot (\text{G} + \text{C}) + 2 \cdot (\text{A} + \text{T})$ abgeschätzt werden. Als Elongationszeit wurde 40 s pro 1000 bp des zu amplifizierenden Fragments verwendet. Zur Kontrolle von *C. glutamicum*-Transformanden wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher zunächst auf eine neue Agarplatte ausgestrichen und der am Zahnstocher verbliebene Rest der Zellen als Matrize direkt in die PCR-Ansätze gegeben. Zur Analyse wurden Aliquots der PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Reinigung wurden die PCR-Fragmente aus dem Gel mit dem QIAEX II Gel Extraction-Kit (Qiagen) eluiert und gereinigt oder alternativ mit dem QIAquick PCR Purification-Kit (Qiagen) gereinigt, wenn die Gelelektrophorese keine Nebenprodukte erkennen ließ.

7.9 „Overlap extension“-Polymerasekettenreaktion

Für die Herstellung von mutierten DNA-Fragmenten für DNA-Protein-Interaktionsstudien wurden diese via „overlap extension“-PCR konstruiert bzw. amplifiziert. Dazu wurde die PhoR-Bindestelle (19 bzw. 22 bp) bzw. mutierte Derivate zwischen zwei nicht retardierende Fragmente aus dem *pstSCAB*-Promotorbereich inseriert (Fragment 1 umfasst die Region von -72 bis +162 bezüglich des *pstS*-Transkriptionsstarts, Fragment 2 die Region von -369 bis -283). Zur Amplifikation des Fragments 1 wurden die Primer P_{pstS rev} (+162 bis +140, bezogen auf den Transkriptionsstart (+1) von *pstS*) und ein 49-mer Oligonukleotid verwendet. Der 5'-Terminus dieses 49-mer Oligonukleotides enthielt die 19 bp oder 22 bp lange mutierte PhoR-Bindestelle und der 3'-Terminus die Sequenz von -72 bis -45 des *pstS*-Promotors. Zur Amplifikation des Fragments 2 wurden die Primer P_{pstS fw} (-369 bis -347, bezogen auf den Transkriptionsstart (+1) von *pstS*) und ein weiteres 49-mer Oligonukleotid verwendet. Der 5'-Terminus dieses 49-mer Oligonukleotides enthielt die komplementäre Sequenz der mutierten PhoR-Bindestelle und der 3'-Terminus die Sequenz von -283 bis -310 aus dem *pstS*-Promotor. Die beiden so erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. In einer anschließenden „overlap extension“-PCR mit den Primern P_{pstS fw} und P_{pstS rev} wurden je 50 ng der Fragmente 1 und 2 als Template verwendet. Dabei überlappen die Einzelstränge der Fragmente 1 und 2 im Bereich der PhoR-Bindestelle und die beiden Fragmente können auf diese Weise fusioniert und amplifiziert werden. Das daraus resultierende PCR-Produkt wurde, wie zuvor beschrieben, aufgereinigt und für Gelretardationsexperimente eingesetzt.

7.10 DNA-Sequenzierung

Für DNA-Sequenzierungen wurde die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durch Zugabe von ddNTP's verwendet. Hierfür wurde das „BigDyeTerminator Kit V3.1" (Applied Biosystems), das „DyeEx-Kit" (Qiagen) sowie ein ABI PRISM[®] 3100 Avant-Kapillarsequenziergerät (Applied Biosystems) nach Angaben der Hersteller genutzt. Es wurde eine 50 cm lange Kapillare mit dem Polymer POP-6 verwendet. Vergleiche der in dieser Arbeit ermittelten DNA-Sequenzen mit DNA-Sequenzen aus Datenbanken wurden mit Hilfe des Programmes „Blast-Blast 2 Sequences" (www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt. Die weitere Bearbeitung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit dem Programm „Clone Manager 7" für Windows XP (Version 7.03, Scientific & Educational Software).

8 Proteinbiochemische Methoden

8.1 Zellaufschluss und Zellfraktionierung

Für den Aufschluss von *E. coli*-Zellen wurden diese in ca. 4 ml Aufschlusspuffer (TNI5) pro g Feuchtzellen resuspendiert und 10 µl Proteaseinhibitor-Mix (100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 100 mM Diisopropylfluorophosphat (DFP) in wasserfreiem Ethanol) pro 1 ml Aufschlusspuffer hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte durch drei- bis fünfmalige Passage durch eine French-Press-Zelle (SLM AMINCO® Spectronic Instruments, Rochester) bei einem Druck von 108 MPa. Anschließend wurden intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min bei 5500 g, 4 °C) abgetrennt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes (60 min bei 180000 g, 4 °C), die zur Sedimentierung der Membranen führte. Für die Proteinaufreinigung wurde der Überstand der Ultrazentrifugation filtriert (0,22 µm Millex®GP-Filter; Millipore, Carrigtwohill, Irland), bevor er als Rohextrakt eingesetzt wurde.

Für die Bestimmung der CAT-Aktivitäten wurden die eingefrorenen Zellen von 30 ml Kultur in 40 ml 0,08 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) resuspendiert und für 5 min bei 5422 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml des gleichen Puffers resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 30 Hz in einer Retsch mixer mill MM200 (Retsch, Haan, Germany) aufgeschlossen und anschließend wurden die Zelltrümmer für 1 h bei 13000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurden die CAT-Enzymtests durchgeführt.

8.2 Affinitätschromatographie mittels „Ni²⁺-Nitrilotriacetic acid“ (NTA)-Agarose

Die Proteinaufreinigung der verschiedenen Polyhistidin-„getaggten“ Proteine erfolgte über separate 15-ml-Polypropylen-Säulen (Qiagen), die luftblasenfrei mit je 2 ml suspendierter Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) gefüllt wurden, was einem Bettvolumen von 1 ml entsprach. Das Material wurde mit einer Fritte abgedeckt. Die Säule wurde zunächst mit 25 ml TNI5-Puffer äquilibriert und der Rohextrakt (vgl. Kapitel IV.8.1) auf die Säule gegeben. Das Eluat des Rohextrakts wurde nochmals auf die Säule gegeben, um eine möglichst vollständige Bindung

des Histidin-„getagten“ Proteins zu erreichen. Schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine wurden stufenweise durch nacheinander folgende Waschschriffe mit 20 ml TNI5-Puffer, 15 ml TNI20-Puffer, 15 ml TNI50-Puffer und 10 ml TNI70-Puffer entfernt. Spezifisch gebundenes Protein wurde mit 8 x 1 ml TNI200-Puffer eluiert. Proteine, die immer noch an Ni²⁺ gebunden waren, wurden durch Entfernen der Ni²⁺-Ionen mit 10 ml des EDTA enthaltenden "Strip"-Puffers entfernt. Die Säule wurde nun entweder bis zum nächsten Gebrauch bei 4 °C gelagert oder mit 5 ml 100 mM NiSO₄ für eine neue Chromatographie vorbereitet. Die eluierten Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht, indem je 10-20 µl mit jeweils 100 µl Bradford-Reagenz (Coo Protein Assay, Uptima, Frankreich) gemischt wurden. Die Blaufärbung der Lösung zeigte an, ob die Fraktion Protein enthielt oder nicht. Die Eluatfraktionen mit Protein wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

8.3 Affinitätschromatographie mittels Amylose-Harz

Durch die Affinitätschromatographie mittels Amylose-Harz konnten Proteine, die als Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein vorlagen, aufgereinigt werden. Eine 15 ml-Polypropylensäule wurde mit 10 ml einer Amylose-Harz-Suspension (New England Biolabs, Schwalbach) gefüllt, was einem Bettvolumen von 5 ml entsprach. Da die Aufreinigung entweder mit TKMD-Puffer (eingesetzt bei radioaktiven Phosphorylierungsexperimenten) oder mit BS-Puffer (eingesetzt bei nicht-radioaktiven Phosphorylierungen) erfolgte, wird bei der weiteren Beschreibung der Methode nur der Begriff Puffer verwendet. Die Säule wurde mit 25 ml Puffer äquilibriert und mit dem Rohextrakt (vgl. Kapitel IV.8.1) beladen. Auch hier wurde das Eluat des Rohextraktes nochmals auf die Säule gegeben, um eine möglichst vollständige Bindung des „getagten“ Proteins an die Säule zu erreichen. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 3 x 10 ml Puffer. Die spezifisch gebundenen Proteine wurden mit 10 x 1 ml Puffer, der 10 mM Maltose enthielt, eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht (vgl. Kapitel IV.8.2), proteinhaltige Fraktionen vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

8.4 Pufferaustausch durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10-Säulen

Der Pufferaustausch von Proteinlösungen erfolgte durch Gelfiltration mit Sephadex-G25-Material. Dazu wurden PD-10-Säulen von GE Healthcare (Freiburg) verwendet. Von der Säule wurde die Kappe entfernt und die Ausflussspitze abgeschnitten. Die Säule wurde mit 25 ml des gewünschten neuen Puffers äquilibriert. Anschließend wurden bis zu 2,5 ml Proteinlösung aufgetragen. Daraufhin wurde das Protein mit 10 x 0,5 ml des gewünschten Puffers eluiert. Die Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht (vgl. Kapitel 8.2) und die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen vereinigt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

8.5 Proteolytischer Verdau mittels Faktor Xa

Die Abspaltung des Histidin-„tags“ von PhoR_{NHis10} erfolgte mit Hilfe des Faktor Xa-Kits (Novagen). Dazu wurden pro 50 µg gereinigtem PhoR_{NHis10}, vorliegend in BS-Puffer, 1 U Faktor Xa zugegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Die Entfernung des Faktor Xa erfolgte nach Angaben des Herstellers mit 50 µl Xarrest-Agarose pro 4 U Faktor Xa. Allerdings wurde die äquilibrierte „Xarrest-Agarose“ nicht mit einem Bettvolumen 1x Faktor Xa „Cleavage/Capture“-Puffer resuspendiert, sondern mit dem verdauten Ansatz. Hierdurch wurde die Verdünnung der Proteinlösung so gering wie möglich gehalten. Nach Abspaltung des His-„tags“ enthält das Protein nur noch einen zusätzlichen Histidin-Rest am N-Terminus und wird als PhoR_{N-H} bezeichnet.

8.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Test (Smith et al., 1985) mit BSA als Standard bestimmt. Das Prinzip des BCA-Assay beruht auf der Reduktion von Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Durch die anschließende Chelatbildung von zwei Molekülen BCA wird ein blau-violetter Komplex gebildet, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat. Die Absorption bei dieser Wellenlänge ist innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches linear zur Proteinkonzentration. Es wurde je 50 µl Probe mit 1 ml BCA-Reagenz (BCA™ Protein Assay-Kit, Pierce Biotechnology Inc.) versetzt, 30 min bei 37 °C inkubiert, 10 min bei RT

abgekühlt und die Extinktion bei 562 nm gemessen (Ultrospec 500 pro Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences).

Neben dem BCA-Test wurde die Bradford-Methode (Bradford, 1976) zur Proteinkonzentrationsbestimmung angewandt. Dazu wurden 50 µl Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz (Coo Protein Assay, Uptima, Frankreich) versetzt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Standard wurde BSA verwendet.

8.7 Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen

Nach der proteolytischen Abspaltung des N-terminalen His-,tags“ war des Öfteren eine Aufkonzentrierung der Proteinproben notwendig. Diese erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe von Vivaspin-Säulen (Vivascience AG, Hannover). Darüber hinaus wurden Vivaspin-Säulen auch zur schnellen Umpufferung von Proteinen verwendet.

8.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung löslicher und membrangebundener Proteine nach ihrer Masse wurde die SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in vertikalen Gelkammern (MiniProtean-II-Apparatur, BioRad) durchgeführt. Es wurden 12 %-ige Trenngele und 6 %-ige Sammelgele bzw. 15 %-ige Trenngele und 8 %-ige Sammelgele genutzt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen sechsfach konzentriertem Ladepuffer (350 mM Tris, 10 % (w/v) SDS, 6 % β-Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, pH 6,8) gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein Prestained Standard (Bio-Rad) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (0,02 A pro Gel) und einer maximalen Spannung von 200 V. Routinegemäß wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie-Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele dreimal 10 min mit bidest. H₂O gewaschen, mind. 1 h in ca. 20 ml GelCode[®]Blue Stain Reagent (Pierce) gefärbt und überschüssige Färbelösung durch Waschen in bidest. H₂O (mindestens 1 h) entfernt.

8.9 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der nativen Größe von PhoR wurde native Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Die zu untersuchenden Proteinproben, aufgereinigtes PhoR_{N-His10} und PhoR_{N-H}, wurden mit 2 µl 6-fach konzentriertem Ladepuffer (0,1 % (w/v) Xylencyanolblau, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 20 % (v/v) Glycerin in 1xTBE) versetzt und auf 15 %-ige native Gele (Acrylamid:Bisacrylamid 75:1) (1,33 ml 40 % (w/v) Acrylamid, 0,5 ml 2 % (w/v) Bisacrylamid, 0,5 ml 10xTBE, 2,12 ml H₂O bidest., 50 µl 10 % (w/v) APS und 5 µl TEMED) aufgetrennt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 1xTBE-Puffer und als Standard der „Native Molecular Weight Marker“ MW-100 der Firma Gradipore (Wasserburg).

8.10 Gelfiltrationschromatographie zur Bestimmung der nativen Größe von PhoR

Neben der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die native Größe von PhoR_{N-H} durch Größenausschlusschromatographie analysiert. Hierfür wurde aufgereinigtes Protein mittels einer HiLoad 16/60 Superdex 200 „prep grade“-Säule (Amersham Biosciences) nach Größe aufgetrennt. Für die Bestimmung wurden 1 ml einer ~1 mg/ml-PhoR-Lösung in 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl auf die mit dem gleichen Puffer zuvor äquilibrierte Säule aufgegeben und bei 4 °C mit einer Flussrate von 1 ml/min (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl) von der Säule eluiert. Die Eichung erfolgte mit Cytochrom *c* (aus dem Pferdeherz; 12,4 kDa), Carboanhydrase (aus Rindererythrozyten; 29 kDa), Albumin (aus Rinderserum; 66 kDa), Alkohol-Dehydrogenase (aus der Hefe, 150 kDa) und β-Amylase (aus Süßkartoffeln, 200 kDa) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

8.11 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der nativen Größe von PhoR durch MALDI-TOF-MS wurde aufgereinigtes PhoR_{N-H} mittels „ZipTip[®] C₁₈ standard bed“ (Millipore) nach Angaben des Herstellers konzentriert, mit 2-3 µl Sinapinsäurematrix (*trans*-3,5-Dimethyl-4-hydroxyzimtsäure, 98 % *trans*-Form) in 50 % (v/v) Acetonitril/0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure auf die Probenplatte pipettiert. Die Probe wurden in einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems) im positiven Linearmodus mit 25 kV Beschleunigungsspannung, 93 % Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 320 ns analysiert. Als Standard wurde der

Standard 3 aus dem Sequazyme™ Peptide Mass Standards Kit (Applied Biosystems), verwendet, der Peptide und Proteine mit Massen zwischen 900 Da und 17 kDa enthält

9 Phosphorylierungsexperimente mit γ -[³²P]-ATP

Um die Autophosphorylierungs-Aktivität von MalE-PhoSK zu untersuchen, wurden 12 μ M MalE-PhoSK mit 0,17 μ M γ -[³²P]-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham Bioscience) und 80 μ M nicht-radioaktivem ATP in einem Gesamtvolumen von 60 μ l gemischt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von γ -[³²P]-ATP gestartet und der Ansatz bei RT inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, mit dem gleichen Volumen 2xSDS-Ladepuffer versetzt, um die Reaktion zu stoppen, und auf Eis gelagert.

Zum Nachweis des Phosphoryltransfers von MalE-PhoSK~P auf PhoR wurde ein zweifacher molarer Überschuss an aufgereinigtem PhoR dem Reaktionsansatz mit MalE-PhoSK hinzugefügt, und zwar 5 min nachdem die Autophosphorylierung von MalE-PhoSK mit ATP gestartet worden war. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden wiederum Aliquots entnommen, wobei berücksichtigt wurde, dass durch Zugabe von PhoR die MalE-PhoSK-Konzentration verändert wurde. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen 2xSDS-Ladepuffer versetzt und auf Eis gelagert. Am Ende der Inkubation wurden die Proben ohne vorheriges Aufkochen auf ein 15 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die Lauffront der Gele abgetrennt, die so zurechtgeschnittenen Gele auf Whatman-3MM-Papier transferiert, mit Saranfolie bedeckt und 45 - 60 min bei 80 °C unter Vakuum auf einem Gelrockner getrocknet. Die getrockneten Gele wurden anschließend mit dem Whatman-3MM-Papier unten liegend in einer „Even-Pressure“-Kassette fixiert und ein PhosphorImage-Screen (Fuji Imaging Plates BAS-MS, 20 x 25 cm) aufgelegt. Die Screens ermöglichen die Detektion der in den Gelen vorhandenen 32P-Beta-Strahlung. Hierbei werden durch die β -Strahlung Elektronen des Eu²⁺, in dem mit bivalenten Europiumionen dotierten Bariumfluorobromid Kristall (BaFBr:Eu²⁺) der photostimulierbaren-phosphor Schicht der „Imaging plate“, in das Leitungsband des Kristalls freigesetzt. Diese Elektronen werden in den Fehlstellen des Bromidionen-Kristallgitters in einem metastabilen Zustand „gefangen“, wodurch die Information über die räumliche Verteilung der Radioaktivität gespeichert wird. Durch Excitation der Elektronen mittels Laserlicht einer Wellenlänge von 633 nm kann die gespeicherte Information abgelesen werden. Durch die Excitation wird den Elektronen Energie zugeführt, die es ihnen ermöglicht,

die Energiesenke ihres „gefangenen“ Zustands zu verlassen und auf das Energieniveau des Valenzbandes zurückzukehren. Die hierbei freiwerdende Energie wird in Form von Lumineszenz abgegeben und kann bei einer Wellenlänge von 390 nm detektiert werden. Nach 16 h Inkubation der Kassetten bei Raumtemperatur wurden die Screens mit einem PhosphorImager (Fuji BAS 1800) ausgewertet. Die quantitative Auswertung der ausgelesenen Screens erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms Aida 2.11 (Raytest, Straubenhardt).

10 DNA-Protein-Interaktionsstudien

10.1 Radioaktive Gelretardationsexperimente

Für Gelretardationsexperimente mit radioaktiv-markierten DNA-Fragmenten wurden die Promotorregionen der putativen Zielgene, *pstS*, *pitA*, *ugpA*, *nucH*, *ushH* und *porB* mittels PCR amplifiziert, anschließend aus dem Agarosegel aufgereinigt und mit γ -[³²P]-ATP mittels T4-Polynukleotidkinase radioaktiv markiert. Hierbei wurde die Markierung nach Angaben des Herstellers durchgeführt (USB Corporation, Cleveland, USA).

Markierung des 5'-Terminus:

x μ l (1 pmol)	aufgereinigtes PCR Produkt
5 μ l	10x T4-PNK-Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM 2-Mercaptoethanol (USB Corporation))
0,6 μ l (2 pmol)	γ -[³² P]-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham Bioscience)
(20-x) μ l	bidest. H ₂ O
3 μ l	T4-Polynukleotidkinase (1:10 verdünnt auf 3 U/ μ l mit T4 PNK „dilution buffer“ (50 mM Tris-HCl, pH 8))

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde ADP und nicht umgesetztes ATP mit Hilfe des PCR-Purification Kit von Qiagen entfernt. Die DNA wurde mit BS-Puffer eluiert. Das aufgereinigte PhoR Δ 1-125 wurde erst unmittelbar vor dem Experiment in den BS-Puffer umgepuffert. Der 20 μ l Reaktionsansatz enthielt 2 μ g poly-(dI-dC) als Kompetitor-DNA, 2 nM der markierten DNA-Fragmente und verschiedene PhoR Δ 1-125-Konzentrationen. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei RT wurden 10 μ l der Ansätze mit 1 μ l einer 0,1 %-igen Xylencyanol-Lösung auf ein 10 %-iges natives

Polyacrylamidgel (Acrylamid:Bisacrylamid 75:1 (w/w)) aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wurde gekühlter 1 x TBE-Puffer verwendet. Nach der Elektrophorese auf Eis bei einer konstanten Spannung von 180 Volt wurden die Gele auf Whatman 3MM Papier unter Vakuum getrocknet und mittels eines PhosphoImagers ausgewertet (Details siehe IV.9).

10.2 Nicht-radioaktive Gelretardationsexperimente

Zum Nachweis, dass PhoR an die Promotorregionen putativer Zielgene bindet, wurden die Promotorregionen dieser Gene oder Teile davon (89 - 704 bp) durch PCR amplifiziert und mittels des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Jeweils 100 ng des PCR-Produktes wurde zusammen mit verschiedenen molaren Überschüssen an PhoR_{N-His10} oder PhoR_{N-H}, entweder unphosphoryliert oder durch vorherige Inkubation mit MalE-PhoS_K und ATP phosphoryliert (siehe IV.9), für 30 min bei RT inkubiert. Für die Phosphorylierung wurde ein zweifacher molarer Überschuss an PhoR_{N-His10} oder PhoR_{N-H} mit MalE-PhoS_K und 5 mM nicht-radioaktivem ATP für 60 min inkubiert, bevor die DNA zugegeben wurde. Der Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl und die Proteine lagen jeweils umgepuffert in BS-Puffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM Na₂EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) vor. Anschließend wurden die Ansätze mit 4 µl Ladepuffer (0,1 % (w/v) Xylencyanolblau, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 20 % (v/v) Glycerin in 1xTBE) versetzt und auf einem 15 %-igen nativen Gel (Acrylamid:Bisacrylamid 75:1) aufgetrennt. Für ein Gel wurden 1,33 ml 40 % (w/v) Acrylamid, 0,5 ml 2 % (w/v) Bisacrylamid, 0,5 ml 10xTBE, 2,12 ml H₂O bidest., 50 µl 10 % (w/v) APS und 5 µl TEMED gemischt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente auf 4 °C gekühlter 1xTBE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 90 min auf Eis und bei einer konstanten Spannung von 170 V. Nach 20-minütigem Schwenken der Gele bei RT in einem SYBR[®] Green-Färbegrad (10 µl Sybr[®]Green I (Sigma)/100 ml TAE-Puffer) wurden die DNA-Banden durch Belichtung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Image Master VDS System (Amersham Biosciences).

10.3 DNase I-Footprint-Analysen

Zur Identifizierung der Bindungsstellen des Transkriptionsregulators PhoR im Promotorbereich putativer Zielgene wurden DNase I-Footprint-Analysen durchgeführt, wobei der vor dem Abbau durch DNase I geschützte Bereich der DNA-Sonden die Bindungsstelle des Proteins anzeigt. Für die Herstellung der DNA-Sonde wurde die Promotorregion der Zielgene zunächst in einer PCR mit unmarkierten Oligonukleotiden amplifiziert, die PCR-Produkte aus dem Gel eluiert und als Template für eine PCR eingesetzt, bei der eines der Oligonukleotide am 5'-Ende eine IRD800-Markierung trug. Die IRD800-markierten PCR-Produkte wurden mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt und anschließend mit Microcon YM-30 Mikrokonzentratoren (Millipore) auf ca. 20 µl aufkonzentriert.

In einem Gesamtvolumen von 200 µl wurden 1,5 - 3 nM IRD800-markierte DNA-Sonde mit 0,5 µl poly(dI-dC) (10 µg/µl, Sigma), 20 µl BS-Puffer und verschiedenen Proteinkonzentrationen gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden dem Reaktionsansatz 10 µl Footprinting-Salzlösung (100 mM MgCl₂, 50 mM CaCl₂) zugefügt. Durch Zugabe von 5 µl 0,125 - 0,25 µg/ml DNase I in DNase I-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT (frisch zugegeben)) und 2 min Inkubation bei RT wurde die Sonde partiell fragmentiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 700 µl eiskalter Stopplösung (640 µl 96 %-iges (v/v) Ethanol, 10 µl Lachssperma-DNA („sonicated“, 2 - 4 µg/µl), 50 µl gesättigte Ammoniumsulfatlösung) gestoppt und die DNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die DNA 30 min bei 16100 x g und 4 °C sedimentiert, mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in je 2,5 µl Wasser und Formamid-Ladepuffer (Thermosequenase-Kit, Amersham-Pharmacia) gelöst. Vor der Auftrennung wurde der Ansatz 5 min bei 70 °C inkubiert. 1,2 µl Probe wurde auf ein Sequenziergel (66 cm; 4,6 % (w/v) Long Ranger; Biozym, Hamburg, Deutschland) aufgetragen und bei 2200 V, 37 mA, 50 W und 45 °C mit Hilfe eines „LiCor DNA sequencer“ 4200 (MWG Biotech) aufgetrennt und analysiert. Die Sequenzzuordnung des geschützten Bereiches erfolgte mittels einer parallel aufgetragenen Sequenzierungsreaktion. Dazu wurde das der Sonde entsprechende, unmarkierte PCR-Produkt als Matrize für die Sequenzierungsreaktion mit dem entsprechenden IRD800-markierten Oligonukleotid eingesetzt.

11 Chloramphenicol-Acetyltransferase-Enzymtests

Zur Konstruktion und Charakterisierung transkriptioneller Fusionen mit dem *cat*-Reportergen wurde der autonom replizierende „Shuttle“-Vektor (*E. coli* – *C. glutamicum*) pET2 verwendet (Vasicova *et al.*, 1998), der zur Analyse von Promotoraktivitäten in *C. glutamicum* eingesetzt werden kann. Dabei ist zu beachten, dass der entsprechende Promotor dann in mehrfacher Kopie pro Zelle vorliegt. Die transkriptionelle Aktivität von spezifischen Promotoren kann durch Messung der Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität getestet werden, dem Enzym, das durch das *cat*-Reportergen kodiert wird. Drei unterschiedlich lange Fragmente des *phoR*-Promotors aus *C. glutamicum* wurden mit Hilfe der Primer *phoR*-75 fw, *phoR*-42 fw, *phoR*+22 fw und *phoR*+158 rv amplifiziert. Nach Aufreinigung der generierten PCR-Fragmente erfolgte der Verdau der Fragmente sowie des Vektors pET2 mit den Restriktionsendonukleasen SallI und BamHI. Es folgte die Klonierung der Fragmente in den Vektor pET2 und die resultierenden Plasmide pET2-*phoR1*, pET2-*phoR2* und pET2-*phoR3* wurden mittels Elektroporation in *C. glutamicum* WT transferiert. Die Stämme *C. glutamicum* pET2-*phoR1-3* wurden dreimal unabhängig voneinander kultiviert (siehe IV.6.2). Die Expression des *cat*-Reportergens unter Kontrolle des vorgeschalteten *phoRS*-Promotorfragments wurde durch Messung der CAT-Aktivität untersucht. Dazu wurden die eingefrorenen Zellpellets mit 40 ml 0,08 M Tris-HCl (pH 7) gewaschen und in 1 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Die Zellen wurden in ein 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 30 Hz in einer Retsch mixer mill MM200 (Retsch, Haan) aufgeschlossen. Anschließend wurden intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (1 h, 13000 g, 4 °C) und der Überstand bis zur Bestimmung der CAT-Aktivität auf Eis gelagert. Die CAT-Aktivität wurde photometrisch mit einem UV-Visible Spectrophotometer (UV-160 1PC, Shimadzu) bei 412 nm und 37 °C nach der Methode von Shaw *et al.* (1975) bestimmt. Die Chloramphenicol-Acetyltransferase katalysiert dabei die Acetylierung von Chloramphenicol mit Acetyl-CoA. Das freigesetzte CoA reagiert mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) zu Dithionitrobenzoyl-CoA und 5-Thio-2-nitrobenzoesäure. Letzteres besitzt bei 412 nm einen molaren Extinktionskoeffizienten von $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und kann photometrisch bestimmt werden.

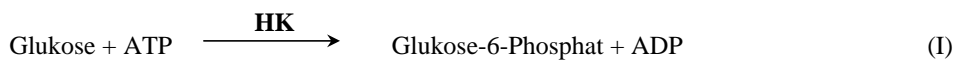
Die Durchführung erfolgte in einem 1 ml Ansatz nach folgendem Schema:

100	μl	0,9 M Tris-HCl, pH 7,8
100	μl	0,9 mM Acetyl-CoA
100	μl	10x DNTB (3,6 mg/ml, frisch angesetzt)
x	μl	Rohextrakt
ad 900	μl	bidest. H ₂ O

Nach Vorwärmen der Proben auf 37 °C (ca. 3 min) wurde die Messung durch Zugabe von 100 μl Chloramphenicol (2,5 mM) gestartet und die Zunahme der Absorption bei 412 nm über die Zeit verfolgt. Aus der Umsatzrate und der Proteinkonzentration des Rohextraktes (bestimmt mit der Bradford-Methode, siehe IV.8.6), wurde die spezifische CAT-Aktivität in nmol min⁻¹ mg Protein⁻¹ berechnet.

12 Enzymatisch-photometrische Glukose-Bestimmung

D-Glukose wurde nach einer Methode von Bergmeyer *et al.* (Bergmeyer *et al.*, 1974) enzymatisch mit Hexokinase (HK) und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) bestimmt. Dieser Test beruht auf den in Gleichungen (I) und (II) dargestellten Reaktionen.



Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der umgesetzten D-Glukose-Menge äquivalent und wurde anhand der Absorption bei 340 nm (Extinktionskoeffizient $\epsilon_{340} = 6,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt. Für den Test wurden Mikrotiterplatten für 96 Proben (Wellplates, VWR International, Wien, Österreich) verwendet. Es wurden jeweils 40 μl Probe bzw. Glukose-Standards unterschiedlicher Konzentrationen (0,1- 2,5 mM) in die Probenvertiefungen pipettiert (jeweils Doppelbestimmungen) und 260 μl der Reaktionslösung (siehe unten) zugesetzt. Danach erfolgte eine 90-minütige Inkubation bei RT unter leichter Bewegung auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Heidolph Polymax 1040).

Anschließend wurde die Extinktion bei 340 nm mittels eines Mikrotiterplattenphotometers (ThermoMax microplate reader, MWG) bestimmt.

Die Umrechnung der gemessenen Extinktionen in die Glukosekonzentration erfolgte anhand der mit den Glukose-Standards erstellten Kalibriergeraden.

A: 50 mM Tris-Maleat-Puffer pH 6,8:

Tris		12,1 g
Maleinsäure		11,6 g
NaOH (konz.)		pH 6,8 einstellen
bidest. H ₂ O	ad	1000 ml

B: 100 mM Magnesiumchlorid-Lösung:

MgCl ₂ x 6 H ₂ O		1,017 g
Tris-Maleat-Puffer (siehe A)	ad	50 ml

C: NAD/ATP-Mix (24 Ansätze):

ATP		367,5 mg
NAD		477,0 mg
MgCl ₂ -Lsg. (siehe B)		25,0 ml
Tris-Maleat-Puffer (siehe A)	ad	600 ml

D: Enzym-Lösung:

Hexokinase (3000 U/ml; Isoliert aus Hefe; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	55 µl
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1000 U/ml; Isoliert aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	55 µl
bidest. H ₂ O	4290 µl

E: Reaktionslösung:

Probe	40 µl
Gesamte Enzym-Lsg. (siehe D) mit 1 Ansatz des NAD/ATP-Mixes (siehe C)	260 µl

13 Bestimmung von Aminosäuren mittels *reversed-phase* HPLC

Zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Aminosäuren im Kulturüberstand wurden von der jeweiligen Kultur zum gewünschten Zeitpunkt 1 ml Proben entnommen und die Zellen sedimentiert (10 min, 16100 g, 4 °C). Die Aminosäure-Analyse des Überstandes erfolgte unter Verwendung eines Agilent Technologies 1100 LC Systems (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) mit einer ODS Hypersil 120 x 4 mm Trennsäule (CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) mit 5 µm Partikelgröße und einer 40 x 4 mm Vorsäule. Die Aminosäure-Bestimmung erfolgte mittels *reversed phase*-HPLC nach Derivatisierung der Probe mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) nach (Lindroth and Mopper, 1979). Bei der automatisierten Derivatisierung wurde 1 µl der zu analysierenden Probe mit 20 µl OPA/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Niederlande) gemischt und eine Minute bei RT im Probenraum inkubiert. Die Derivatisierung beruht auf der Reaktion der primären Aminogruppe mit OPA und 2-Mercaptoethanol in alkalischem Medium, wobei das fluoreszierende 1-Mercaptoethanol-2-alkylisoindol entsteht (Jones and Gilligan, 1983). Die Substanzen wurden entsprechend ihrer Hydrophobizität mit einer Flussrate von 0,35 ml min⁻¹ innerhalb der ersten Minute und von 0,6 ml min⁻¹ innerhalb der folgenden 15 min bei 40 °C mit einem Gradienten aus 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2) als polarer Phase und Methanol als unpolare Phase eluiert. Die Fluoreszenz der Aminosäure-Isoindol-Derivate wurde nach Excitation bei einer Wellenlänge von 230 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm detektiert. Die Identifizierung von Aminosäuren erfolgte anhand ihrer Retentionszeit.

V Ergebnisse

1 DNA-Protein-Interaktionsstudien mit PhoR Δ 1-125

Zur Beantwortung der Frage, ob die *psi*-Gene (*psi* = phosphate starvation inducible) direkt durch den Transkriptionsregulator PhoR reguliert werden, wurden in vorangegangenen Arbeiten radioaktive Gelretardationsexperimente mit drei unterschiedlichen PhoR-Derivaten durchgeführt (Kocan, 2005). Hierbei konnte keine Interaktion zwischen einem PhoR-Derivat mit C-terminalem His-,tag“ und den Promotorregionen der Gene *ugpA*, *pstS* und *phoR* beobachtet werden. Auch die Phosphorylierung von PhoR_{C-His} durch Inkubation mit der Sensorkinase PhoS und ATP oder durch Inkubation mit Acetylphosphat hatte keinen positiven Einfluss auf das DNA-Bindungsvermögen von PhoR_{C-His}. Daraufhin wurden Gelretardationsexperimente mit PhoR-Derivaten durchgeführt, denen die N-terminale „Receiver“-Domäne fehlte. Für einige andere Antwortregulatoren wurde gezeigt (Molle *et al.*, 2003), dass solche Derivate eine konstitutive DNA-Bindungsaffinität besitzen. Die Derivate PhoR Δ 1-139 und PhoR Δ 1-125 zeigten eine Interaktion mit den postulierten Zielpromotoren. Da mit dem Derivat PhoR Δ 1-139 nur eine sehr schwache Interaktion detektierbar war, wurden weitere Experimente mit dem Derivat PhoR Δ 1-125 durchgeführt. Unter Verwendung eines 150- bis 1000-fachen molaren Überschusses an PhoR Δ 1-125 konnte eine Retardation der Promotorregionen der Gene *ugpA*, *pstS*, *phoR* und *pitA* beobachtet werden. Der Nachweis der spezifischen Interaktion erfolgte durch Zugabe eines 20-fachen Überschusses an nicht-radioaktiv markierter DNA. Darüber hinaus wurde die Promotorregion von *clpPIP2* als Negativkontrolle verwendet (Kocan, 2005).

1.1 Radioaktive Gelretardationsexperimente mit PhoR Δ 1-125

In dieser Arbeit wurden weitere Gelretardationsexperimente mit PhoR Δ 1-125 durchgeführt. Diese Experimente zeigten eine Interaktion von PhoR Δ 1-125 mit den Promotorregionen der Gene *pstS*, *pitA*, *ugpA*, *nucH*, *ushA* und *porB*. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede der DNA-Bindungsaffinität von PhoR Δ 1-125 gegenüber den eingesetzten Promotorregionen beobachtet werden. Ein ca. 200-facher molarer PhoR Δ 1-125 Überschuss war notwendig, um

die Hälfte der eingesetzten DNA zu binden. Exemplarisch wird hier nur das Gelretardationsexperiment unter Verwendung der Promotorregion von *nucH* gezeigt (Abb. V. 1).

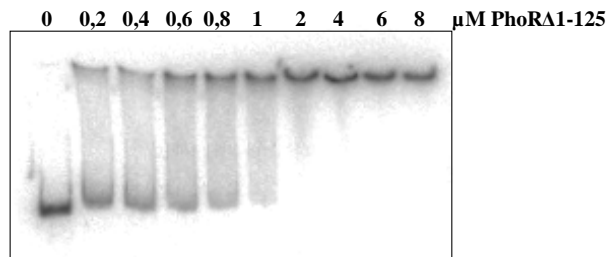


Abb. V. 1: Gelretardationsexperiment mit der DNA-bindenden Domäne des Antwortregulators PhoR (PhoRΔ1-125) und der Promotorregion von *nucH*. Unterschiedliche Konzentrationen an PhoRΔ1-125 (0- 8 μM) wurden mit 2 nM markierter DNA und 2 μg poly-(dI-dC) als Kompetitor-DNA für 20 min bei RT inkubiert, anschließend über ein 10 %-iges natives Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels eines PhosphoImagers ausgewertet.

Zum Nachweis der spezifischen Interaktion von PhoRΔ1-125 mit den Promotorregionen der Phosphatmangelgene wurden Gelretardationsexperimente mit den Promotorregionen der Gene *acn*, *mepA*, *clpP1P2*, *clpC* sowie einer kodierenden Region aus dem Gen *phoR* durchgeführt. Wider Erwarten wurden diese Fragmente auch durch PhoRΔ1-125 retardiert und es gab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Bindungsaffinität zwischen den postulierten Zielpromotoren und den Negativkontrollen. Daher scheint PhoRΔ1-125 relativ unspezifisch an DNA zu binden. Auch Veränderungen hinsichtlich der verwendeten Kompetitor-DNA führten nicht zu einer höheren Spezifität der DNA-PhoRΔ1-125-Interaktion. Dabei wurde die Konzentration an poly-(dI-dC) in Gelretardationsexperimenten verdreifacht bzw. versechsfacht oder Lachssperma-DNA anstelle von poly-(dI-dC) verwendet. Um eine unspezifische Aggregation von PhoRΔ1-125 auszuschließen, die die Ursache der Interaktion von PhoRΔ1-125 mit jeglicher DNA sein könnte, wurde dem BS-Puffer 0,25 % (v/v) Tween-20 zugefügt. Doch auch die Zugabe dieses Detergenzes bewirkte keine Veränderung des Bindungsverhaltens von PhoRΔ1-125, so dass PhoRΔ1-125 unter den hier gewählten Bedingungen anscheinend unspezifisch an DNA bindet.

1.2 DNase I-,Footprint“-Analysen mit PhoRA1-125

Parallel zu den Gelretardationsexperimenten mit PhoRA1-125 wurden DNase I-,Footprint“-Analysen mit PhoRA1-125 zur Identifizierung eines PhoR-Bindemotives durchgeführt. In vorangegangenen Arbeiten konnte ein geschützter Bereich in der Promotorregion von *pstS* identifiziert werden (Position -170 bis -205 bezüglich des *pstS*-Transkriptionsstartes). Dagegen konnten keine geschützten Bereiche in den Promotorregionen der Gene *ugpA* und *pitA* nachgewiesen werden (Kocan, 2005). Zur Bestätigung der PhoR-Bindestelle in der Promotorregion von *pstS* sowie zur Identifizierung weiterer PhoR-Bindestellen in den Promotorregionen der Gene *pitA*, *ugpA* und *phoR* wurden DNase I-,Footprint“-Analysen mit PhoRA1-125 durchgeführt. Dabei konnten innerhalb eines ungewöhnlich großen Bereiches (147 bp bis 273 bp) vor DNase I-Verdau geschützte Basenfolgen sowie hypersensitive Bereiche identifiziert werden (Tab. V. 1). Exemplarisch werden hier nur die DNase I-,Footprint“-Analysen unter Verwendung der Promotorregion von *pstS* dargestellt (Abb. V. 2). Diese Ergebnisse waren, wie am Beispiel *pstS* gezeigt (Abb. V. 2), für jede Promotorregion reproduzierbar, jedoch konnte anhand der geschützten Basenfolgen kein PhoR-Bindemotiv abgeleitet werden. Die Ergebnisse der Gelretardationsexperimenten und der DNase I-,Footprint“-Analysen deuten darauf hin, dass die carboxy-terminale Domäne von PhoR möglicherweise unspezifisch an DNA bindet. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Experimente mit dem Derivat PhoRA1-125 durchgeführt.

Tab. V. 1: Ergebnisse der DNase I-Footprint Analysen mit PhoRA1-125 und den Promotorregionen von *pstS*, *pitA*, *ugpA* und *phoR*. Dargestellt sind die vor DNase I-Verdau geschützten Bereiche (angegeben in bp), sowie deren Position in Bezug auf den Transkriptionsstart.

Promotorregion des Gens	Länge des geschützten Bereiches in bp	Lokalisierung des geschützten Bereiches in Bezug auf den Transkriptionsstart (+1)
<i>pstS</i>	273 bp	-306 bis -34
<i>pitA</i>	232 bp	-177 bis +55
<i>ugpA</i>	248 bp	-225 bis +23
<i>phoR</i>	147 bp	-168 bis -22

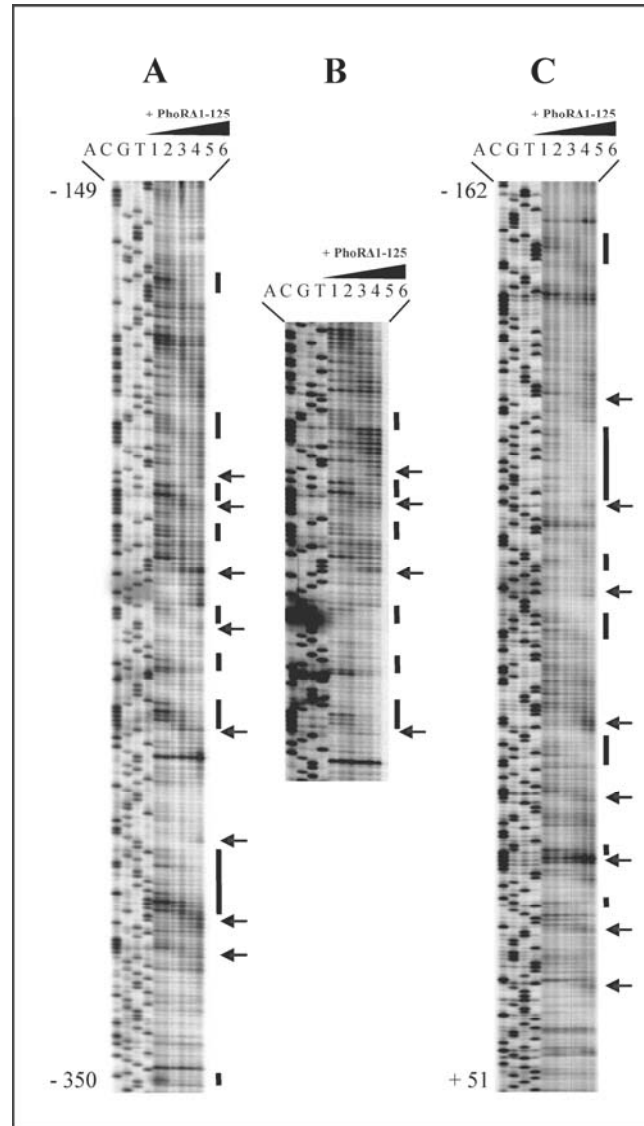


Abb. V. 2: DNase I-„Footprint“-Analysen mit der DNA-bindenden Domäne des Antwortregulators PhoR (PhoRA1-125) und der Promotorregion von *pstS*. 2 nM IRD800-markierte *pstS*-Sonde (A+B: kodierender Strang; C: nicht-kodierender Strang) wurde mit 0,5 μ l poly(dI-dC) (10 μ g/ μ l), 20 μ l BS-Puffer und verschiedenen PhoRA1-125-Konzentrationen (1: 0 μ M; 2: 0,2 μ M; 3: 1,9 μ M; 4: 3,9 μ M; 5: 7,8 μ M; 6: 15,6 μ M) in einem Gesamtvolumen von 200 μ l inkubiert. Die geschützten Bereiche sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet, die hypersensitiven Bereiche mit einem Pfeil. Die Sequenz dieser Bereiche kann anhand der daneben aufgetragenen Sequenzierungsreaktion bestimmt werden. Die Position in Bezug auf den Transkriptionsstart ist links neben der Sequenzierungsreaktion angegeben.

2 DNA-Protein-Interaktionsstudien mit PhoR

2.1 Überproduktion, Reinigung und Verdau von PhoR_{N-His10}

Da die DNA-Bindungsversuche mit PhoR Δ 1-125 auf eine möglicherweise unspezifische Bindung dieses Proteins an DNA hinwiesen und das vollständige PhoR-Protein mit einem C-terminalen His-,tag“ keine Bindung an drei der putativen Zielpromotoren zeigte, sollte bei den folgenden Interaktionsstudien mit einem möglichst nativen PhoR-Protein gearbeitet werden. Dazu wurde das Expressionsplasmid pET16-PhoR_{N-His10} konstruiert (vgl. IV. 4.1), das für ein PhoR-Derivat mit einem aminoterminalen Decahistidin-,tag“ kodiert, der mittels der Endoproteinase Faktor Xa abgespalten werden kann. Das daraus resultierende PhoR-Protein enthält nur noch einen zusätzlichen Histidin-Rest am N-Terminus. Zur Überproduktion wurde pET16-PhoR_{N-His10} in *E. coli* BL21(DE3) transferiert und 2 l Expressionskulturen gezüchtet (vgl. IV. 6.1). Vor sowie 1, 2, 3 und 4 h nach Induktion des *phoR*-Gens mit 1 mM IPTG wurden Proben entnommen, die Zellen durch 15-minütige Inkubation bei 95 °C in SDS-Ladepuffer lysiert und anschließend die Zellextrakte durch SDS-PAGE analysiert. Wie in Abb. V. 3A gezeigt, ist eine dominante Bande mit einer apparenten Masse von ~28 kDa bereits 1 h nach IPTG-Zugabe sichtbar. Diese Bande entspricht höchstwahrscheinlich dem des PhoR_{N-His10}-Protein, das eine berechnete Masse von 28,54 kDa besitzt. Das Maximum an PhoR_{N-His10} im Zellextrakt wurde 3 h nach IPTG-Induktion erreicht (Abb. V. 3A).

Die Aufreinigung von PhoR_{N-His10} erfolgte mittels Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie wie im Material und Methoden Teil (vgl. IV. 8.1 und 8.2) beschrieben. Wie in Abb. V. 3B gezeigt, konnte PhoR_{N-His10} ohne erkennbare Verunreinigungen (bei Coomassie-Färbung) erfolgreich aufgereinigt werden. Nach einem Pufferaustausch über Gelfiltration mit Sephadex G-25 (PD-10 Säulen, Amersham Pharmacia), bei dem TNI200-Puffer durch BS-Puffer ersetzt wurde, wurde aufgereinigtes PhoR_{N-His10} bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert, oder es erfolgte die proteolytische Abspaltung des N-terminalen His-,tags“. Das PhoR_{N-His10}-Protein enthält 21 zusätzliche Aminosäuren (MGHHHHHHHHSSGHIEGRH) an seinem N-Terminus, darunter die Faktor Xa-Schnittstelle (SGHIEGR). Nach erfolgreichem Verdau mit Faktor Xa besitzt das PhoR-Protein nur noch eine zusätzliche N-terminale Aminosäure, nämlich einen Histidin-Rest. Dieses PhoR Derivat, in der folgenden Arbeit PhoR_{N-H} genannt, hat eine berechnete Masse von 26,49 kDa. Der Faktor Xa-Verdau wurde mittels SDS-PAGE

überprüft und war erfolgreich (Abb. V. 3B). Aliquots des aufgereinigten PhoR_{N-H}-Proteins wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

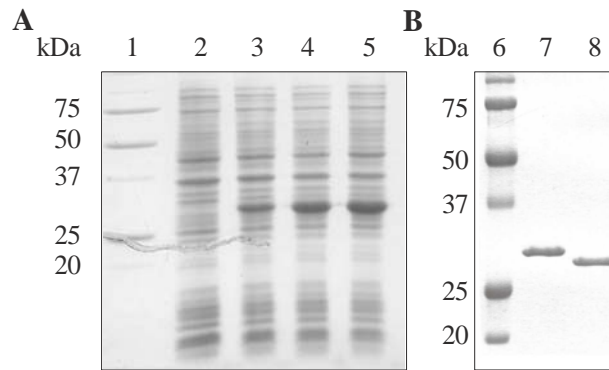


Abb. V. 3: Analyse der Überproduktion, der Reinigung und des Faktor Xa-Verdau von PhoR_{N-His10} durch SDS-PAGE. **A:** Überproduktion von PhoR_{N-His10} in *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-PhoR. Spur 1 und 6, Proteinstandard (Precision Plus Protein Prestained Standard, Bio-Rad); Spur 2, Zellen unmittelbar vor Induktion mit 1 mM IPTG; Spur 3, 4 und 5, Zellen 1, 2 und 3 h nach Induktion mit 1 mM IPTG. **B:** Reinigung von PhoR_{N-His10} aus *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-PhoR. Spur 7, 1,3 µg aufgereinigtes PhoR_{N-His10}; Spur 8, 1,3 µg PhoR nach Verdau mit Faktor Xa.

2.2 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von PhoR

Die native molekulare Masse von gereinigtem PhoR_{N-His10} und PhoR_{N-H} wurde zunächst durch native Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Dazu wurden jeweils ~3 µg des aufgereinigten Proteins auf einem 15 %-igen nativen Acrylamidgel aufgetrennt (Abb. V. 4).

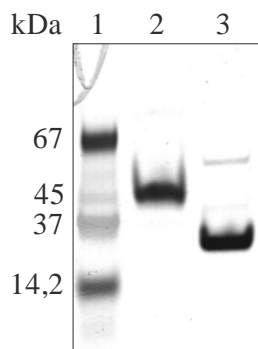


Abb. V. 4: 15 %-iges natives Polyacrylamidgel zur Analyse der nativen Größe von PhoR. 1, Proteinstandard (Native Molecular Weight Marker MW-100, Gradipore); 2, ~3 µg aufgereinigtes PhoR_{N-His10}; 3, ~3 µg aufgereinigtes PhoR_{N-H}.

Anhand der Abbildung V. 4 zeigt sich, dass PhoR_{N-His10} eine apparente Masse von etwas mehr als 45 kDa hat. Dies entspricht eher der Masse eines Dimers (~57,08 kDa) als der eines Monomers (~28,54 kDa). Für PhoR_{N-H} konnte eine starke Bande zwischen 14,2 - 37 kDa beobachtet werden und eine schwache Proteinbande zwischen 45 - 67 kDa. Damit scheint ein großer Teil von PhoR_{N-H} als Monomer (~26,49 kDa) und nur ein ganz geringer Teil als Dimer (~52,98 kDa) vorzuliegen. Eine Erklärung für den beobachteten Unterschied bzgl. der nativen Größe der beiden PhoR-Derivate gibt es nicht, denn beide Derivate lagen in BS-Puffer vor. Darüber hinaus würde man eine dimere Form eher bei dem nativeren PhoR-Derivat, PhoR_{N-H}, erwarten. Da mithilfe der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden konnte, wurden Größenausschlusschromatographien durchgeführt. Dazu wurde 1 ml einer PhoR_{N-H}-Lösung (ca. 1 mg/ml; vorliegend in 100 mM Tris-HCl pH 7,5 und 50 mM NaCl) über eine Superdex 200-Säule mit 1 ml/min Flussrate aufgetrennt (vgl. IV. 8.10). Die Gelfiltration wurde dreimal durchgeführt und es ergaben sich molekulare Massen von 37 kDa, 41 kDa und 43 kDa (Abb. V. 5; Mittelwert: 40 kDa; Abb. V. 6).

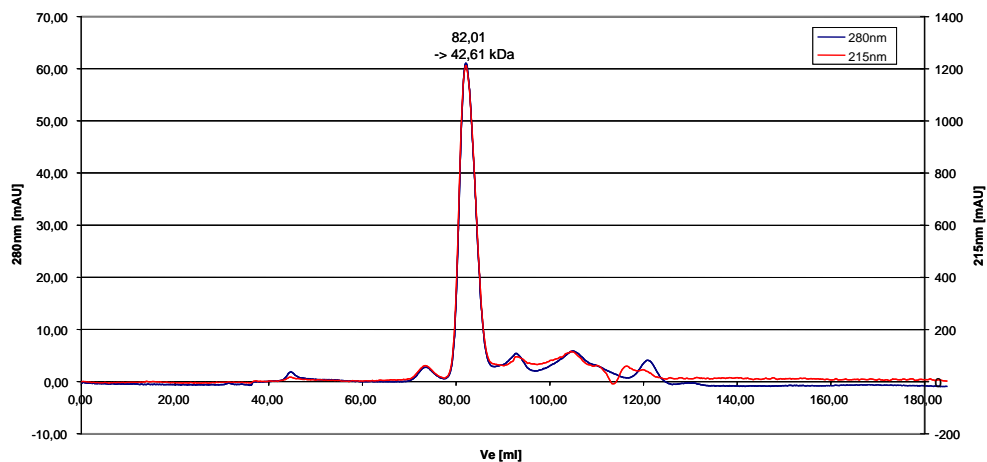


Abb. V. 5: Elutionsprofil von PhoR_{N-H} nach Größenausschlusschromatographie. 1 mg PhoR_{N-H} wurde über eine HiLoad 16/60 Superdex 200 „prep grade“-Säule getrennt. Als Elutionspuffer diente 100 mM Tris-HCl pH, 7,5, 50 mM NaCl. Ein Peak bei 82,01 Ve [ml], entspricht der molekularen Masse von 42,61 kDa, konnte beobachtet werden.

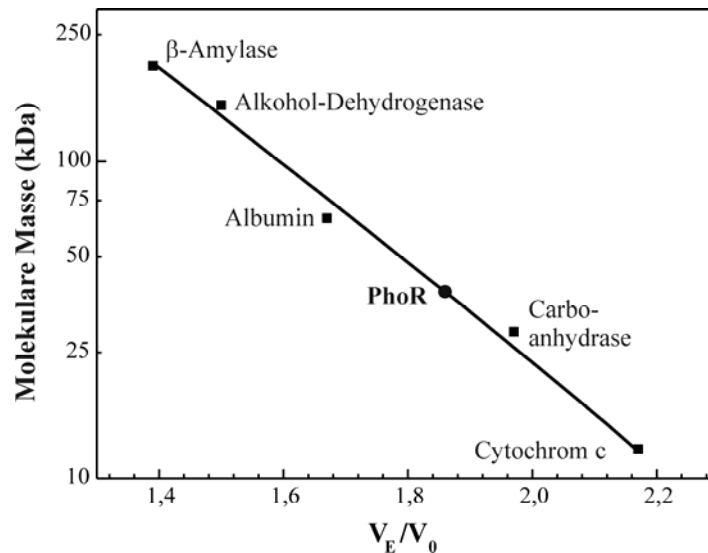


Abb. V. 6: Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der nativen molekularen Masse von PhoR_{N-His10}. PhoR_{N-His10} und fünf Standardproteine wurden separat über eine HiLoad 16/60 Superdex 200 „prep grade“-Säule aufgetrennt. Als Elutionspuffer diente 100 mM Tris-HCl pH, 7,5, 50 mM NaCl. V_0 entspricht dem Ausschlussvolumen (44,58 ml) der Säule, das mit Dextranblau (2.000 kDa) bestimmt wurde. V_E entspricht dem Elutionsvolumen der verschiedenen Proteine.

Diese Werte lieferten wiederum keine definitive Aussage über die native Form von PhoR, da sie weder der Masse eines Dimers (~52,98 kDa) noch der eines Monomers (~26,49 kDa) entsprachen. In einem weiteren Schritt wurde die native Größe von PhoR_{N-H} massenspektrometrisch bestimmt (siehe IV. 8.11). Das Massenspektrum von PhoR_{N-H} zeigt zwei Peaks mit den Massen 26,485 kDa und 53,057 kDa sowie einen kleinen Peak bei 79,576 kDa (Abb. V. 7). Vergleicht man die Massen der Peaks mit den theoretischen molaren Massen eines PhoR_{N-H}-Monomers (~26,49 kDa) und eines Dimers (~52,98 kDa), so könnte der erste Peak dem eines einfach geladenen Monomers oder eines zweifach geladenen Dimers entsprechen und der zweite Peak dem eines einfach geladenen Dimers oder eines zweifach geladenen Tetramers. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zumindest ein geringer Anteil von PhoR_{N-H} als Dimer vorliegt.

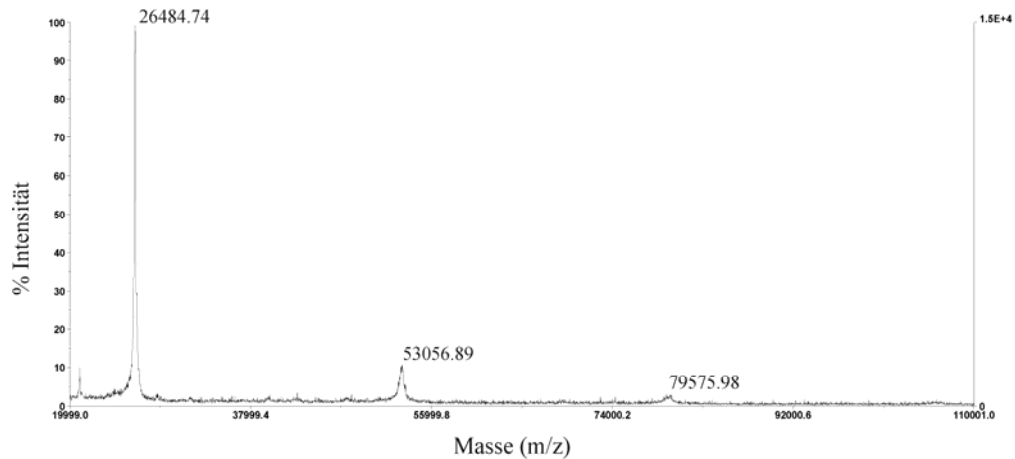


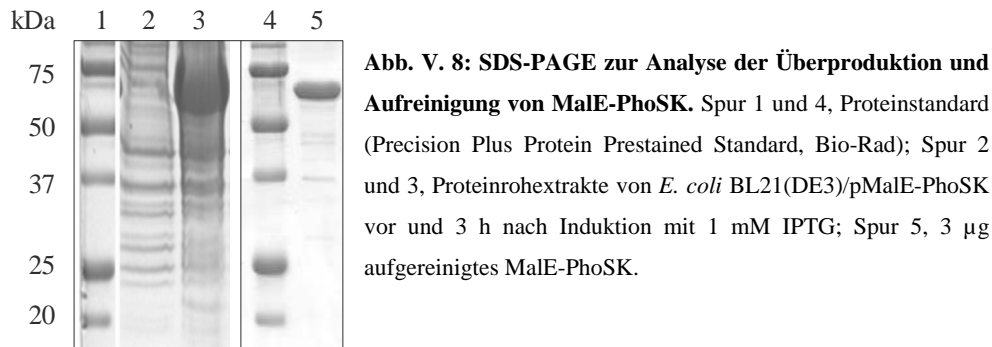
Abb. V. 7: MALDI-TOF-Massenspektrum von PhoR_{N-H}. Dabei konnten drei Peaks bei 26485, 53057 und bei 79576 m/z beobachtet werden.

2.3 Überproduktion und Reinigung von MalE-PhoSK

Um den Einfluss der Phosphorylierung von PhoR *in vitro* testen zu können, wurde, basierend auf Erfahrungen mit anderen Histidinkinasen, die Kinase-Domäne der Sensorkinase PhoS (Aminosäuren 247-485) als Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein von *E. coli* überproduziert und gereinigt. Im Gegensatz zum vollständigen PhoS-Protein, das zwei Transmembranhelices besitzt und nur eine sehr schwache Autophosphorylierungsaktivität im solubilisierten Zustand zeigte, sollte das Fusionsprotein löslich sein und eine konstitutive Autophosphorylierungsaktivität besitzen. Dazu wurde das Expressionsplasmid pMalE-PhoSK konstruiert (vgl. IV. 4.1; VIII. 3) und in *E. coli* BL21(DE3) transferriert.

Die Überproduktion des MalE-PhoSK Proteins (624 Aminosäuren, 67,7 kDa) erfolgte wie für PhoR_{N-His10} beschrieben (siehe V.2.1). Auch in diesem Fall konnte das Maximum an MalE-PhoSK-Protein im Zellextrakt drei Stunden nach IPTG-Induktion beobachtet werden (Abb. V. 8).

MalE-PhoSK wurde mittels Affinitätschromatographie an Amylose-Harz (New England Biolabs) aufgereinigt (vgl. IV. 8.3). Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft, bei der man einige zusätzliche Banden mit kleinerer apparanter Masse erkennen konnte. Hierbei handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um Abbauprodukte von MalE-PhoSK (Abb. V. 8).



Die Fraktionen, die Male-PhoS enthielten, wurden vereinigt und es erfolgte eine Umpufferung in TKMD-Puffer oder in BS-Puffer. Aufgereinigtes und umpufferetes Male-PhoS wurde bis zur Verwendung in Phosphorylierungsexperimenten bei -20 °C gelagert.

2.4 Autophosphorylierung der Kinase-Domäne von PhoS und Phosphorylgruppentransfer auf den Antwortregulator PhoR

Zum Nachweis der für ein Zweikomponenten-System charakteristischen Phosphorylierungsaktivitäten, d. h. der Autophosphorylierungsaktivität der Sensorkinase und des Phosphorylgruppentransfers auf den Antwortregulator, wurden radioaktive *in vitro*-Phosphorylierungsstudien durchgeführt. Die Autophosphorylierungsaktivität wurde analysiert, indem 12 µM Male-PhoS mit 0,17 µM [γ - 32 P]-ATP (~3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) und 80 µM nicht-radioaktivem ATP bei Raumtemperatur in einem Gesamtvolumen von 60 µl inkubiert wurden. 1, 5, 20 und 60 min nach Zugabe von ATP wurden 7 µl Proben entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt, um die Reaktion zu stoppen, und auf Eis gelagert. Am Ende des Experiments wurden die Proben ohne Aufkochen auf ein 12 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Gel eine Stunde bei 80 °C getrocknet und für 18 h auf einem Phosphorscreen (Fuji Photo Film (Europe) GmbH, Düsseldorf) exponiert. Das daraus resultierende Autoradiogramm zeigt die Abb. V. 9.

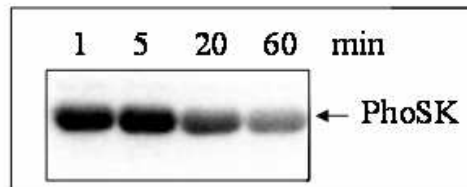


Abb. V. 9: Autophosphorylierung von MalE-PhoS K. MalE-PhoS K ($12 \mu\text{M}$) wurde mit $0,17 \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ($\sim 3000 \text{ Ci/mmol}$, 10 mCi/ml) und $80 \mu\text{M}$ nicht-radioaktivem ATP bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je $7 \mu\text{l}$ Aliquots entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt, auf Eis aufbewahrt und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und mit einem PhosphoImager BAS-1800 (Fujifilm) analysiert.

Anhand der Abb. V. 9 ist deutlich zu erkennen, dass MalE-PhoS K seine eigene Phosphorylierung katalysiert. Ein Anstieg an autophosphoryliertem MalE-PhoS K konnte innerhalb der ersten 5 Minuten beobachtet werden, wobei dieser Anstieg gering ausfiel, denn bereits einer Minute nach Inkubation mit ATP scheint ein großer Anteil an MalE-PhoS K phosphoryliert vorzuliegen. Die Menge an phosphoryliertem MalE-PhoS K nimmt nach 5 min wieder ab. Daher wurde für den nachfolgenden Versuch zum Nachweis des Phosphorylgruppentransfers auf PhoR das MalE-PhoS K-Protein ($12 \mu\text{M}$) wie in dem zuvor beschriebenen Versuch 5 min mit $0,17 \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und $80 \mu\text{M}$ nicht-radioaktivem ATP bei Raumtemperatur in einem Gesamtvolumen von $60 \mu\text{l}$ inkubiert und nach 1 und 5 min $7 \mu\text{l}$ Proben entnommen, mit SDS-Ladepuffer gemischt und auf Eis gelagert. Anschließend wurden $30 \mu\text{l}$ dieser Lösung mit $30 \mu\text{l}$ einer $25,8 \mu\text{M}$ Pho_{R-N-H}-Lösung gemischt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden $14 \mu\text{l}$ Proben entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und auf Eis gelagert. Am Ende des Versuchs wurden diese Proben dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die getrockneten Gele mit einem PhosphoImager analysiert (Abb. V. 10). Wie in Abb. V. 10 gezeigt, führte die Zugabe von Pho_{R-N-H} zu phosphoryliertem MalE-PhoS K zu einem raschen Phosphorylgruppentransfer von der Kinase-Domäne auf den Antwortregulator. Bereits nach 1 min ist Pho_{R-N-H} signifikant phosphoryliert (Abb. V. 10, Spur 3), eine maximale Phosphorylierung wird nach 30 bis 60 min Inkubationszeit erreicht (Abb. V. 10, Spur 5 und 6). Um eine Autophosphorylierung des Antwortregulators auszuschließen, wurde Pho_{R-N-H} (Endkonzentration $12,9 \mu\text{M}$) mit $0,17 \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und $80 \mu\text{M}$ nicht-radioaktivem ATP in einem Gesamtvolumen von $15 \mu\text{l}$ für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei konnte kein phosphoryliertes Pho_{R-N-H} detektiert werden, so dass der Phosphorylgruppentransfer nur über MalE-PhoS K~P erfolgen kann (Daten nicht gezeigt).

Ähnliche Ergebnisse konnten auch unter Verwendung von PhoR_{N-His10} erzielt werden. Ein effizienter Phosphorylgruppentransfer von Male-PhoSK~P auf PhoR_{N-His10} fand auch hier innerhalb von 40 min statt (Daten nicht gezeigt). Für die folgenden DNA-Bindungsstudien wurde die Phosphorylierung von PhoR_{N-His10} und PhoR_{N-H} mit nicht-radioaktivem ATP durchgeführt. Dazu wurde Male-PhoSK mit 5 mM ATP inkubiert, nach 5 min die 2-fach molare Menge an PhoR_{N-His10} bzw. PhoR_{N-H} hinzugefügt und nach weiteren 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die zu untersuchende DNA-Probe hinzugefügt.

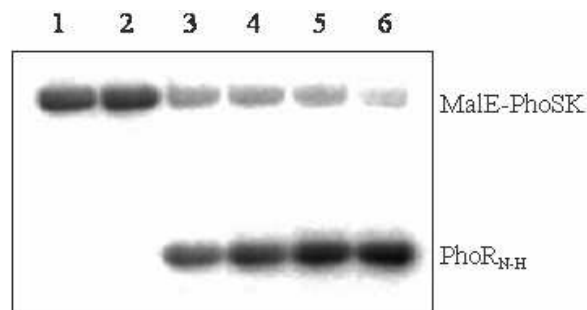


Abb. V. 10: Autophosphorylierung von Male-PhoSK und Phosphorylgruppentransfer von Male-PhoSK~P auf PhoR_{N-H}. Male-PhoSK (12 μ M) wurde mit 0,17 μ M [γ -³²P]-ATP (~3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) und 80 μ M nicht-radioaktivem ATP in einem Gesamtvolumen von 60 μ l bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1 Minute (Spur 1) und 5 Minuten (Spur 2) wurden jeweils 7 μ l Probe entnommen. Nach 5 Minuten wurden 30 μ l einer 25,8 μ M PhoR_{N-H}-Lösung zu 30 μ l der bestehenden Male-PhoSK-Lösung hinzugefügt und nach insgesamt 6 Minuten (Spur 3), 11 Minuten (Spur 4), 26 Minuten (Spur 5) und 66 Minuten (Spur 6) jeweils 14 μ l Probe entnommen. Die Proben wurden sofort mit 2xSDS-Ladepuffer versetzt, auf Eis aufbewahrt und ohne vorheriges Aufkochen mittels SDS-PAGE (12 % Gel) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und mit einem PhosphoImager BAS-1800 (Fujifilm) analysiert.

2.5 Untersuchungen zum Einfluss der Phosphorylierung und des N-terminalen His-,tags“ auf die DNA-Bindungsaffinität von PhoR

Zur Überprüfung, ob der Phosphorylierungszustand bzw. der N-terminale Histidin-,tag“ die Interaktion der PhoR-Derivate PhoR_{N-H} bzw. PhoR_{N-His10} mit den vermuteten Zielpromotoren beeinflusst, wurden vergleichende Gelretardationsexperimente sowohl mit PhoR_{N-His10} und PhoR_{N-His10}~P, als auch mit PhoR_{N-H} und PhoR_{N-H}~P durchgeführt (Abb. V. 11). Es konnte eine Interaktion der verschiedenen PhoR-Derivate mit der Promotorregion des *phoRS*-

Operons nachgewiesen werden, nicht jedoch mit den Promotorfragmenten der Gene *icd* (Isocitrat-Dehydrogenase) und *acn* (Aconitase), die als Negativkontrollen verwendet wurden (Abb. V. 11A-D). Phosphorylierung durch Vorinkubation mit MalE-PhoSK und ATP führte sowohl bei PhoR_{N-His10} als auch bei PhoR_{N-H} zu einer deutlich erhöhten Bindungsaffinität. Die molaren Proteinüberschüsse, die für die Retardation von ca. 50 % der DNA-Sonde benötigt wurden, betragen für PhoR_{N-His10} ca. 300, für PhoR_{N-His10~P} ca. 150, für PhoR_{N-H} ca. 300 und für PhoR_{N-H~P} ca. 30 – 60. Die retardierten Banden waren für PhoR_{N-His10}, für PhoR_{N-His10~P} und für PhoR_{N-H} sehr diffus, für PhoR_{N-H~P} dagegen distinkt. Aus diesen Daten ergibt sich, dass der N-terminale Histidin-„tag“ die DNA-Bindung stark stört und dass PhoR vermutlich im phosphorylierten Zustand aktiv ist.

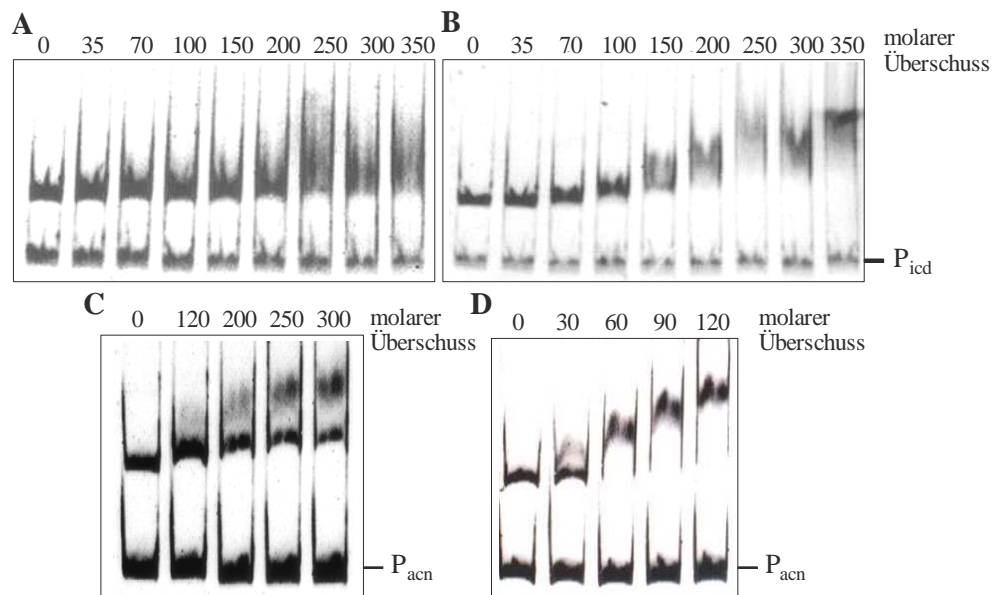


Abb. V. 11: Gelretardationsexperimente mit der Promotorregion von *phoR* und PhoR_{N-His10} (A), PhoR_{N-His10~P} (B), PhoR_{N-H} (C) sowie PhoR_{N-H~P} (D) zur Analyse des Einflusses der Phosphorylierung und des N-terminalen His-„tags“ auf die DNA-Bindungsaffinität. Verschiedene Konzentrationen an unphosphoryliertem bzw. phosphoryliertem PhoR_{N-His10} und PhoR_{N-H} (0-bis 350-facher molare Überschuss) wurden mit 100 ng eines 317-bp *phoR*-Promotorfragments (-79 bis -238 bezüglich des Transkriptionsstarts) sowie 100 ng einer als Negativkontrolle verwendeten Promotorregion (*icd* oder *acn*) für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben auf einem 15 %-igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel anschließend SybrGreen I gefärbt. Für die Phosphorylierung wurde ein 2-fach molare Überschuss an PhoR_{N-His10} bzw. PhoR_{N-H} mit MalE-PhoSK und 5 mM ATP 60 min bei RT inkubiert, bevor es dem DNA-enthaltenden Reaktionsansatz zugefügt wurde.

2.6 Direkter Vergleich der Bindungsaffinitäten von PhoR_{N-H} zu den Promotorregionen von *pstS* und *nucH*

In einem weiteren Gelretardationsexperiment wurde die Bindungsaffinität von PhoR_{N-H} und PhoR_{N-H}-P zu den Promotorregionen des *pstSCAB*-Operons und des *nucH*-Gens verglichen, wobei die beiden Promotorregionen zusammen mit zwei Negativkontrollen, den Promotorregionen von *acn* und *gpmA* (NCgl0390/cg0482; Phosphoglycerat-Mutase), in einen einzigen Reaktionsansatz eingesetzt wurden (Abb. V. 12).

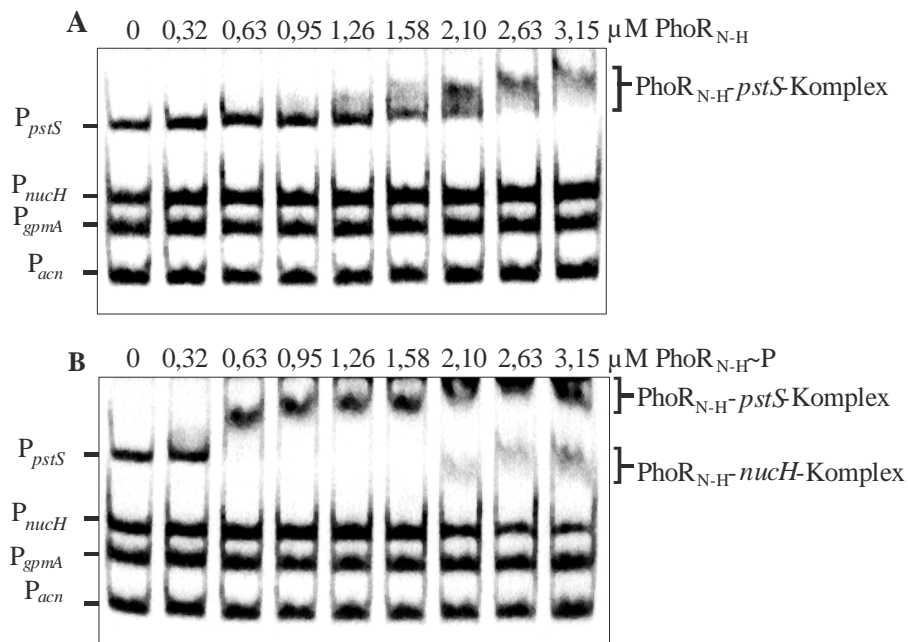


Abb. V. 12: Direkter Vergleich der DNA-Bindungsaffinität von unphosphoryliertem (A) und phosphoryliertem (B) PhoR_{N-H} zu den Promotorregionen von *pstS* und *nucH*. Unterschiedliche Konzentrationen an PhoR_{N-H} und PhoR_{N-H}-P (0 bis 3,15 μM) wurden mit 100 ng P_{nucH} (547 bp) und P_{pstS} (531 bp) für 30 min bei RT inkubiert. Als Negativkontrollen wurden jeweils 100 ng der Promotorregion von *acn* (311 bp) und *gpmA* (347 bp) dem Reaktionsansatz zugefügt. Die Proben wurden auf einem 15 %-igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend die DNA mit SybrGreen I angefärbt. Für die Phosphorylierung wurde ein 2-fach molarer Überschuss an PhoR_{N-H} mit MalE-PhoSK und 5 mM ATP 60 min bei RT inkubiert, bevor es dem DNA-enthaltenden Reaktionsansatz zugefügt wurde.

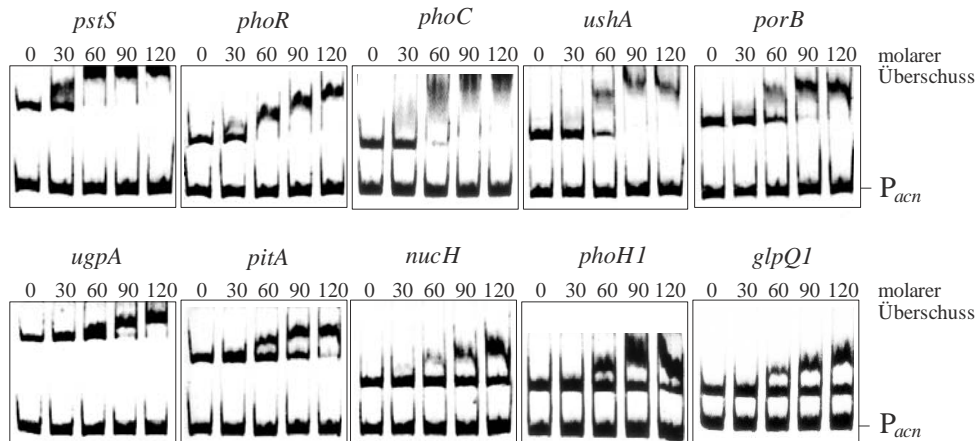
Wie in Abb. V.12A zu erkennen ist, fand eine Interaktion zwischen unphosphoryliertem PhoR_{N-H} und dem *pstS*-Promotor statt. Die Hälfte der *pstS*-Promotorfragmente wurde bei einer PhoR_{N-H}-Konzentration von 2,1 µM PhoR retardiert. Die Bildung eines Komplexes mit P_{nucH} sowie den Negativkontrollen P_{acn} und P_{gpmA} konnte dagegen selbst bei einer PhoR_{N-H} Konzentration von 3,15 µM nicht beobachtet werden (Abb. V. 12A). In einem parallelen Ansatz wurde PhoR_{N-H} 1 h bei Raumtemperatur mit MalE-PhoSK und 5 mM ATP vorinkubiert, bevor es zu den DNA-enthaltenden Ansätzen zugefügt wurde. Anhand der Abb. V. 12B kann man wieder den positiven Einfluss der Phosphorylierung auf die DNA-Bindungsaffinität von PhoR_{N-H} erkennen. Bereits bei einer PhoR_{N-H}-Konzentration von 0,63 µM liegt ein vollständiger PhoR_{N-H}-P_{pstS}-Komplex vor. Das bedeutet, dass durch Phosphorylierung von PhoR_{N-H} dessen Affinität um ca. das 5-Fache gesteigert wird. Diese Affinitätssteigerung führt dazu, dass auch eine Retardation des *nucH*-Promotors stattfindet. Eine Retardation von 50 % der *nucH*-Promotorfragmente konnte jedoch erst bei der hier maximal eingesetzten PhoR_{N-H}-P-Konzentration von 3,15 µM beobachtet werden. Demnach besitzt PhoR unterschiedlich starke Bindungsaffinitäten gegenüber den Promotorregionen von *pstS* und *nucH*. Mit den als Negativkontrollen eingesetzten Promotorregionen von *acn* und *gpmA* konnte auch unter Verwendung von PhoR_{N-H}-P keine Interaktion beobachtet werden. Somit ist die Bindung von PhoR_{N-H} bzw. PhoR_{N-H}-P an P_{pstSCAB} und P_{nucH} spezifisch.

2.7 Identifizierung weiterer Promotoren, an die PhoR direkt bindet

Nachdem erfolgreich nachgewiesen werden konnte, dass PhoR_{N-H} bzw. PhoR_{N-H}-P spezifisch an die vorhergesagten Zielpromotorregionen von *phoRS*, *pstSCAB* und *nucH* bindet, wurden Gelretardationsexperimente mit weiteren postulierten Zielpromotorregionen (Übersicht der verwendeten PCR-Fragmente siehe Tabelle VIII. 2) durchgeführt. Dabei wurde jedoch jeweils nur eine Zielpromotorregion und die Promotorregion von *acn*, verwendet als Negativkontrolle, dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Wie bei den zuvor beschriebenen Gelretardationsexperimenten wurden parallele Ansätze mit PhoR_{N-H} und PhoR_{N-H}-P durchgeführt. Anhand der Abb. V. 13A ist deutlich zu erkennen, dass PhoR_{N-H}-P an alle getesteten Promotorregionen bindet, d. h. *pstSCAB*, *phoRS*, *phoC*, *ushA*, *porB*, *ugpAEBC*, *pitA*, *nucH*, *phoHI* und *glpQI*. Auffällig dabei ist die bereits angesprochene unterschiedliche Bindungsaffinität von PhoR gegenüber den verschiedenen Promotorregionen, die jedoch für jede Promotorregion reproduzierbar ist. So zeigt sich die höchste Affinität zu der Promotorregion von *pstS* (~35x), gefolgt von *phoR* (~45x) > *phoC* (~50x) > *ushA*, *porB*

(~60x) > *ugpA* (~70x) > *pitA* (~90x) > *nucH*, *phoH1* (~120x) > *glpQ1* (>120x). Dabei geben die Werte in den Klammern den ungefähren molaren $\text{PhoR}_{\text{N-H}}\sim\text{P}$ -Überschuss an, der notwendig ist, um 50 % der DNA-Fragmente zu retardieren.

A: $\text{PhoR}_{\text{N-H}}\sim\text{P}$



B: $\text{PhoR}_{\text{N-H}}$

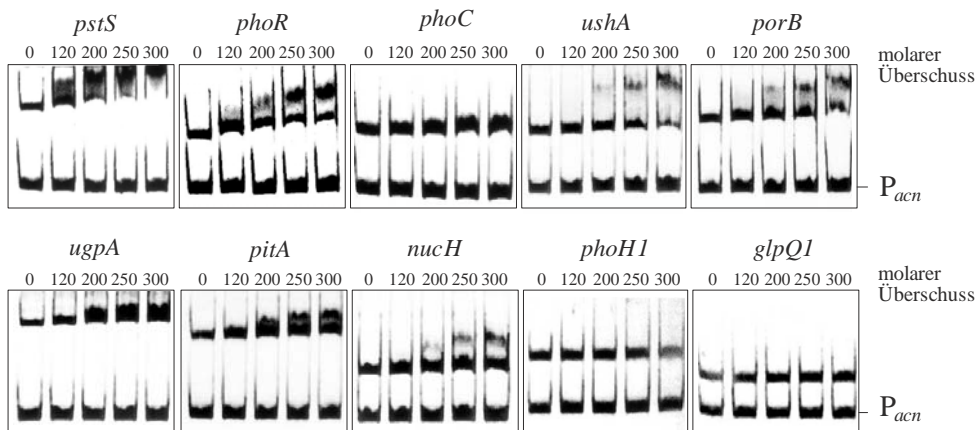


Abb. V. 13: Gelretardationsexperimente zum Nachweis der Interaktion von $\text{PhoR}_{\text{N-H}}\sim\text{P}$ und $\text{PhoR}_{\text{N-H}}$ mit den postulierten Zielpromotorregionen. A, DNA-Fragmente (14 – 38 nM) der Promotorregionen von *pstS*, *phoR*, *phoC*, *ushA*, *porB*, *ugpA*, *pitA*, *nucH*, *phoH1*, *glpQ1* und *acn* (Negativkontrolle) wurden mit einem 0- bis 120-fachen molaren $\text{PhoR}_{\text{N-H}}\sim\text{P}$ -Überschuss für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 20 μl der Reaktionsansätze mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (15 % Gel) aufgetrennt und die DNA mit SybrGreen I gefärbt. B, Gleiche Ansätze wie in A, jedoch wurden die DNA-Fragmente mit einem 0- bis 300-fachen molaren Überschuss an unphosphoryliertem $\text{PhoR}_{\text{N-H}}$ inkubiert.

Die Promotorregion von *acn*, verwendet als Negativkontrolle, wurde in keinem der Ansätze retardiert. Unphosphoryliertes PhoR_{N-H} zeigte gegenüber allen getesteten Promotorregionen eine um ca. 5-fach geringere Bindungsaffinität im Vergleich zu PhoR_{N-H}-P (Abb. V. 13B). Damit lässt sich die Aussage treffen, dass die DNA-Bindungsaffinität von PhoR durch Phosphorylierung generell erhöht wird.

2.8 Identifizierung von PhoR-Bindestellen in den Promotorregionen von *pstS* und *phoR*

Die Identifizierung eines PhoR-Bindemotivs erwies sich als schwierig. Alignments der Promotorregionen von *pstS*, *phoR*, *ushA*, *ugpA*, *pitA* und *nucH* gaben keinen Hinweis auf eine konservierte DNA-Sequenz. Um die PhoR-Bindungsstelle einzugrenzen, wurden Gelretardationsexperimente mit PhoR_{N-H}-P und Subfragmenten von P_{*pstS*} und P_{*phoR*} durchgeführt (Abb. V. 14). Diese Promotorregionen wurden gewählt, da sie gemäß den zuvor durchgeführten Experimenten die höchste Affinität zu PhoR_{N-H} bzw. PhoR_{N-H}-P besitzen.

Im Fall von *pstS* deuten die Ergebnisse auf mindestens zwei PhoR-Bindestellen hin, von denen eine im Bereich von -175 bis -201 bezogen auf den Transkriptionsstart (+1) lokalisiert ist, die andere im Bereich zwischen -99 und -136 (Abb. V. 14A). Innerhalb der Promotorregion von *phoR* kommt dagegen sehr wahrscheinlich nur eine PhoR-Bindestelle vor (Abb. V. 14B), und zwar im Bereich von -40 bis -65 bezogen auf den Transkriptionsstart (+1). Zur Ableitung eines PhoR-Bindemotivs wurden die Sequenzen der drei postulierten PhoR-Bindungsregionen miteinander verglichen, jedoch konnte auch dabei kein klares, konserviertes Motiv identifiziert werden.

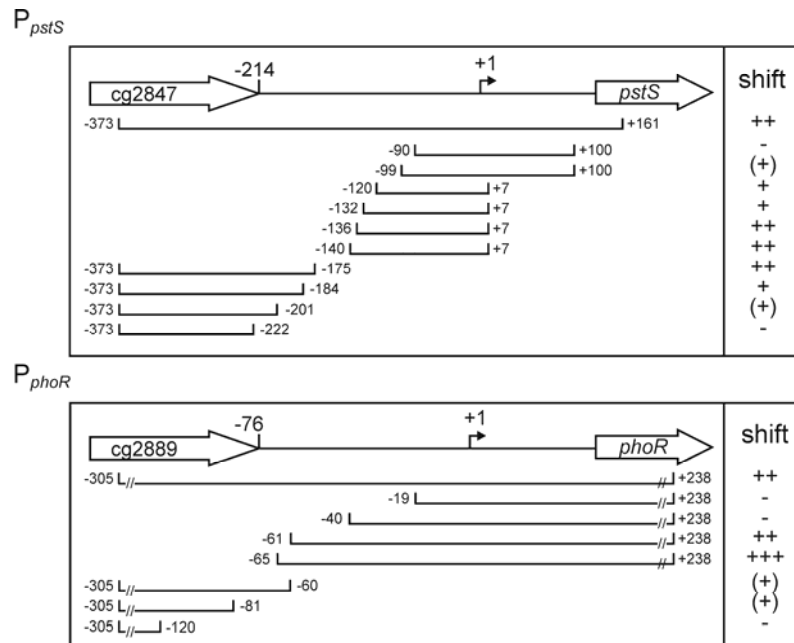


Abb. V. 14: Eingrenzung der PhoR-Bindestellen innerhalb der Promotorregionen von *pstS* und *phoR*. Es wurden Gelretardationsexperimente mit Subfragmenten (14 - 55 nM) der Promotorregionen und phosphoryliertem PhoR_{N-H} durchgeführt. Die Nummern an den Fragmenten geben die Position der Enden der Fragmente bzgl. des Transkriptionsstarts (+1) an. In der rechten Spalte sind die Ergebnisse der Gelretardationsexperimente zusammengefasst. Die Bindungsaffinität wurde in fünf Kategorien eingeteilt: “+++”, 50 % der Fragmente wurde bis zu einem 30-fachen molaren PhoR_{N-H}~P-Überschuss retardiert, “++”, 50 % der Fragmente wurde bei einem 30-fachen molaren PhoR_{N-H}~P-Überschuss retardiert, “+”, 50 % der Fragmente wurde bei einem 30- bis 60-fachen molaren PhoR_{N-H}~P-Überschuss retardiert, “(+)”, 20 – 50 % der Fragmente wurde bei einem 60- bis 90-fachen molaren PhoR_{N-H}~P-Überschuss retardiert und “-”, 0 – 20 % der Fragmente wurde bei einem 120-fachen molaren PhoR_{N-H}~P-Überschuss retardiert.

2.9 Mutationsanalysen der PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von *pstS*

Um die PhoR-Bindestelle im *pstSCAB*-Promotor weiter einzugrenzen und zu definieren, wurden jeweils 22 bp aus der Region -175 bis -201 mittels „overlap extension“-PCR (vgl. IV. 7.9) zwischen zwei Fragmente von 87 bp bzw. 234 bp aus dem *pst*-Promotor inseriert, die in vorangegangenen Experimenten keine Interaktion mit PoR gezeigt hatten. Mit den artifiziellen 343 bp Fragmenten und PhoR_{N-H}~P wurden Gelretardationsexperimente

durchgeführt. Dabei zeigte sich die beste Interaktion mit dem Fragment, das die 22 bp Region von -176 bis -194 enthielt (Daten nicht gezeigt).

Um eine Aussage über die Relevanz der einzelnen Basen für die Interaktion mit dem Antwortregulator PhoR zu erhalten, wurden Mutationsanalysen durchgeführt. Dabei wurden zunächst in dem 22 bp langen Fragment (Abb. V. 15, Fragment 1) je drei (Abb. V. 15, Fragmente 2 - 7) bzw. vier Basenaustausche (Abb. V.15, Fragment 8) gleichzeitig eingeführt. Wie zuvor beschrieben wurden die mutierten 22 bp Fragmente mittels „overlap extension“-PCR zwischen zwei nicht bindende Fragmente (87 bp und 234 bp) inseriert und die resultierenden 343 bp langen Fragmente in die Gelretardationsexperimente eingesetzt. Wie anhand von Abb. V. 15 zu erkennen ist, hatten die Mutationen in den Fragmenten 3 und 8 einen stark negativen Einfluss auf die Bindung von PhoR_{N-H}~P, während die Mutationen in den Fragmenten 2, 4, 5, 6 und 7 die DNA-PhoR_{N-H}~P-Interaktion weniger stark verminderten. In einem zweiten Ansatz wurde jede Base einzeln mutiert. Da die Mutation der ersten drei Basen zusammen jedoch keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten von PhoR_{N-H}~P zeigte (Abb. V. 15, Fragment 2), wurden nur die Basen 4 bis 22 im Folgenden analysiert (Abb. V. 15, Fragmente 9-27). Die Mutationen in den Fragmenten 9, 13, 15, 16, 19 und 25 führten dabei zu keiner verminderten Interaktion mit PhoR_{N-H}~P, während die Mutationen in den Fragmenten 10, 14, 17, 23 und 24 die Bindung von PhoR_{N-H}~P an die DNA geringfügig verschlechterten. Eine stärkere Hemmung der Interaktion konnte durch die Mutationen in den Fragmenten 18, 22, 26 und 27 erzielt werden. Die Mutationen in den Fragmenten 11 und 12 zeigten den stärksten Effekt auf die Interaktion mit PhoR_{N-H}~P. In diesen beiden Fällen war ein 60- bis 90-facher PhoR_{N-H}~P-Überschuss notwendig, um die Hälfte der Fragmente zu retardieren. Da ohne eingeführte Mutationen die Hälfte der Fragmente bereits bei einem 30-fachen PhoR_{N-H}~P-Überschuss retardiert wurden (Abb. V. 15, Fragment 1), bedeutet dies eine Verschlechterung der Interaktion um das 2 bis 3-Fache. Interessanterweise führten die Mutationen in den Fragmenten 20 und 21 zu einer erhöhten Affinität von PhoR_{N-H}, da diese Fragmente bereits bei einem 30-fachen PhoR_{N-H}~P-Überschuss fast vollständig retardiert wurden. In einer weiteren Serie von Experimenten wurden die Mutationen, die den stärksten negativen Einfluss auf die PhoR-Bindung gezeigt hatten, zusammen in einem Fragment mutiert (Abb. V. 15, Fragmente 28 bis 30). Dabei zeigte sich ein additiver Effekt, so dass die Interaktion von PhoR_{N-H}~P mit dem untersuchten 22-bp-Fragment durch Mutation von nur zwei Basen fast komplett verhindert werden konnte. Mit Hilfe der Mutationsanalysen konnte die postulierte PhoR-Bindestelle im Bereich -176 bis -194 der *pstS*-Promotorregion verifiziert

werden. Darüber hinaus konnten Basen identifiziert werden, die entscheidend für die Interaktion mit PhoR sind.

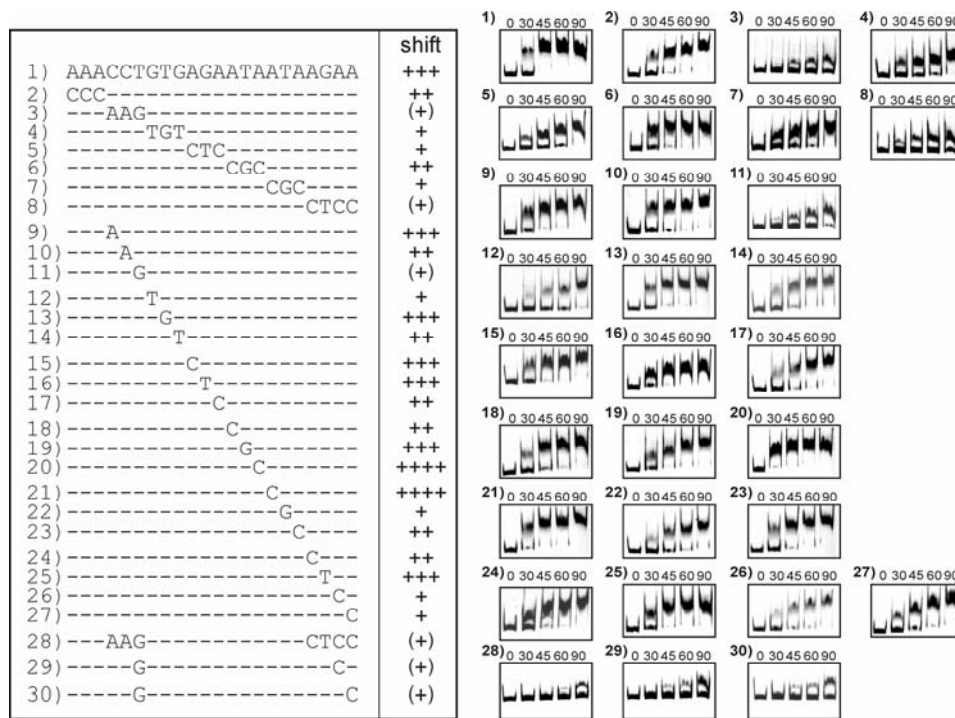


Abb. V. 15: Mutationsanalysen der PhoR-Binderegion innerhalb der Promotorregion von *pstS*.

Vorangegangene Experimente deuteten darauf hin, dass eine mögliche PhoR-Bindestelle in dem Bereich -176 bis -194, in Bezug auf den Transkriptionsstart, vorkommt. Zur Bestätigung dieser Bindestelle sowie zur Bestimmung der Relevanz der einzelnen Basen für die Interaktion wurden Gelretardationsexperimente mit Mutationen innerhalb der 22 bp durchgeführt. Die eingeführten Mutationen sind unterhalb der Wildtyp-Sequenz (Fragment 1) dargestellt (Fragmente 2-30). Die dazugehörenden Abbildungen sind auf der rechten Seite angeordnet. Die Gelretardationsexperimente wurden mit einem 0, 30, 45, 60 und 90-fachen PhoR_{N-H}~P Überschuss durchgeführt und analysiert. Die Klassifizierung der beobachteten Retardationen erfolgte anhand der beobachteten DNA-Bindungsaffinität von PhoR_{N-H}~P: “++++”, höhere Bindungsaffinität als zu Fragment 1, “+++”, gleiche Bindungsaffinität wie zu Fragment 1, “++” und “+”, niedrigere Bindungsaffinität als zu Fragment 1 und “(+)”, viel niedrigere Bindungsaffinität als zu Fragment 1.

2.10 Mutationsanalysen der PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von *phoR*

Weitere Gelretardationsexperimente zur Eingrenzung der PhoR-Bindestelle im *phoRS*-Promotor ergaben, dass die Region von -43 bis -61 die höchste Affinität zu PhoR_{N-H}~P besaß (Daten nicht gezeigt). Mit diesen 19 bp wurden, wie unter Abschnitt V. 2.9 beschrieben, Mutationsanalysen durchgeführt (Abb. V. 16).

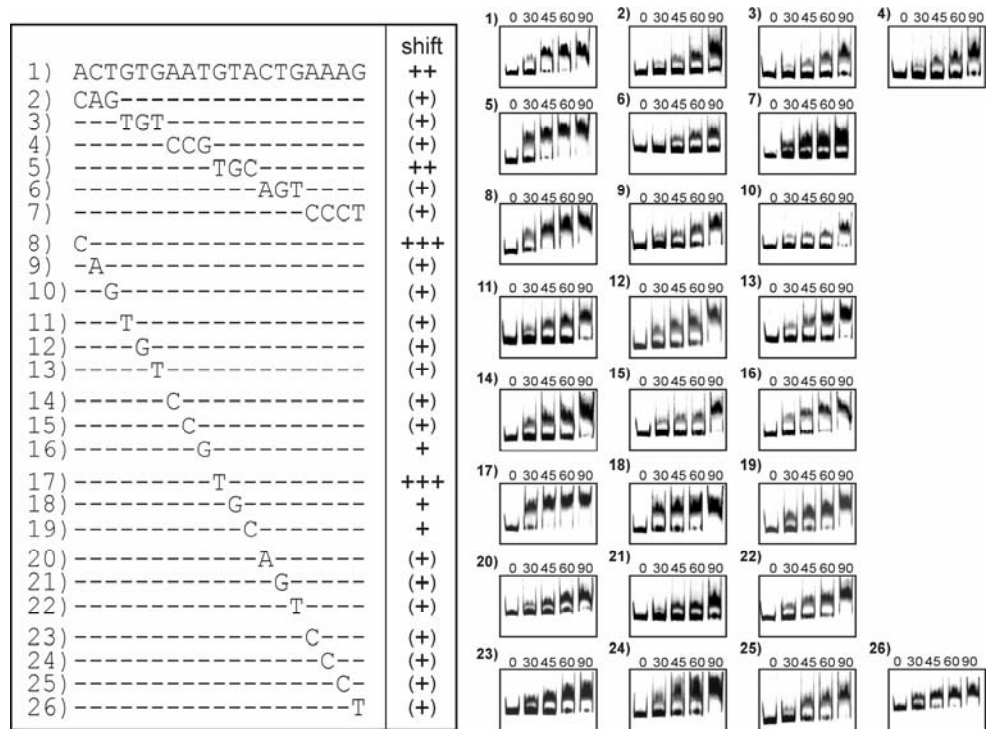


Abb. V. 16: Mutationsanalysen der PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von *phoR*. Mit Hilfe von vorangegangenen Gelretardationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass PhoR_{N-H}~P die höchste Affinität zu dem Fragment 1 (-43 bis -61) besitzt. Zur Bestätigung dieser Bindestelle sowie zur Bestimmung der Relevanz der einzelnen Basen für die Interaktion wurden Gelretardationsexperimente mit Mutationen innerhalb der 19 bp durchgeführt. Die eingeführten Mutationen sind unterhalb der Wildtyp-Sequenz (Fragment 1) dargestellt (Fragmente 2-26). Die dazugehörigen Abbildungen sind auf der rechten Seite angeordnet. Die Gelretardationsexperimente wurden mit einem 0, 30, 45, 60 und 90-fachen PhoR_{N-H}~P Überschuss, wie zuvor beschrieben, durchgeführt und analysiert. Die Klassifizierung der beobachteten Retardationen erfolgte anhand der beobachteten DNA-Bindungsaffinität von PhoR_{N-H}~P: “++++”, höhere Bindungsaffinität als zu Fragment 1, “+++”, gleiche Bindungsaffinität wie zu Fragment 1, “++” und “+”, niedrigere Bindungsaffinität als zu Fragment 1 und “(+)”, viel niedrigere Bindungsaffinität als zu Fragment 1.

Dabei zeigte sich, dass der gleichzeitige Austausch von drei oder vier Basen fast immer zu einer signifikanten Hemmung der PhoR_{N-H}~P-Bindung führte (Abb. V. 16, Fragmente 2-7). Daraufhin wurden auch hier Gelretardations-Experimente mit Einzelmutationen innerhalb der 19 bp durchgeführt (Abb. V. 16, Fragmente 8-26). Auch die Einzelmutationen führten in fast allen Fällen zu einer Hemmung der PhoR_{N-H}~P-Bindung. Nur die Mutationen in den Fragmenten 8 und 17 führten zu einer Steigerung der PhoR-Bindungsaffinität. Eine Verbesserung der Affinität wurde zuvor auch bei Mutation von zwei Basen innerhalb der PhoR-Bindestelle in der Promotorregion von *pstS* beobachtet (Abb. V. 16, Fragmente 20 und 21), worauf im Abschnitt V. 2. 11 noch näher eingegangen wird.

2.11 Herleitung und Überprüfung eines möglichen PhoR-Konsensus-Bindemotivs

In Abb. V. 17 ist ein Alignment der beiden zuvor identifizierten und mutierten 19 bp PhoR-Bindungsstellen aus dem *pstSCAB*- und dem *phoRS*-Promotor gezeigt. Dabei ist zu beachten, dass die Bindungsstelle aus dem *phoRS*-Promotor eine umgekehrte Orientierung aufweist. Während der 5'-terminale Bereich eine gute Übereinstimmung zeigt, ist der 3'-terminale Bereich schlecht konserviert.

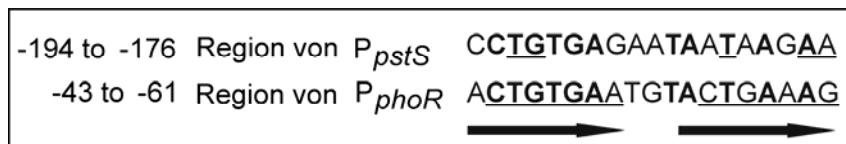


Abb. V. 17: Alignment der PhoR-Bindestellen aus den Promotorregionen von *pstS* und *phoR*. Konservierte Basen in beiden Sequenzen sind fett dargestellt, Basen, die wichtig für die Interaktion mit PhoR sind, wurden unterstrichen. Die Interpretation dieser Bindestellen als eine Wiederholung von 8 bp, die durch einen „spacer“ von 3 bp getrennt werden, ist durch die beiden Pfeile angedeutet.

Da OmpR-Typ-Regulatoren, zu denen auch PhoR zählt, oft an direkte Sequenzwiederholungen binden (He *et al.*, 2006a), könnte man die beiden identifizierten PhoR-Bindungsstellen als eine sehr schwach konservierte Wiederholung aus 8 bp interpretieren, die durch einen „spacer“ von 3 bp getrennt werden. Um diese Interpretation experimentell zu testen, wurde die Bindung von PhoR_{N-H}~P an eine 19 bp Sequenz untersucht, die eine perfekte Wiederholung der 8 bp Sequenz ACTGTGAA enthält, getrennt

durch den 3 bp langen „spacer“ AAT (Abb. V. 18, Fragment 1). Wie zuvor beschrieben wurde diese 19 bp Sequenz via “overlap extension“-PCR zwischen zwei nicht-bindende Fragmente aus dem *pstSCAB*-Promotorbereich inseriert. Die Gelretardationsexperimente wurden mit einem 26-fachen molaren PhoR_{N-H}-P-Überschuss sowie als Kontrolle ohne PhoR_{N-H} durchgeführt. Wie in Abb. V. 18 gezeigt, besaß PhoR_{N-H}-P eine höhere Affinität zu dem artifiziellen 19 bp Fragment als zu der bis dato höchstaffinen PhoR-Bindestelle, der 19 bp Region aus dem *pstSCAB*-Promotor. Bei einem 26-fachen molaren PhoR_{N-H}-P-Überschuss lag die eingesetzte DNA fast vollständig als Komplex mit PhoR_{N-H}-P vor, während bei einem 30-fachen molaren PhoR_{N-H}-P-Überschuss das *pstSCAB*-Fragment (-176 bis -194) nur zu ~50 % als Komplex vorlag (Abb. V. 15, Fragment 1). Eine weitere Steigerung der Bindungsaffinität wurde erreicht, wenn der 5'-terminale Adenin-Rest gegen einen Cytosin-Rest ausgetauscht wurde (Abb. V. 18, Fragment 3). In diesem Fall reichte ein 26-facher molarer PhoR_{N-H}-P Überschuss aus, um die gesamte DNA zu retardieren. Durch den Austausch des 3'-terminalen Adenin-Restes gegen einen Guanin-Rest wurde die Bindung an PhoR_{N-H}-P verschlechtert (Abb. V. 18, Fragmente 2 und 4). Der Austausch von 5 der 8 Basen innerhalb der „direct repeats“ führte zur fast vollständigen Hemmung der Interaktion (Abb. V. 18, Fragment 5).

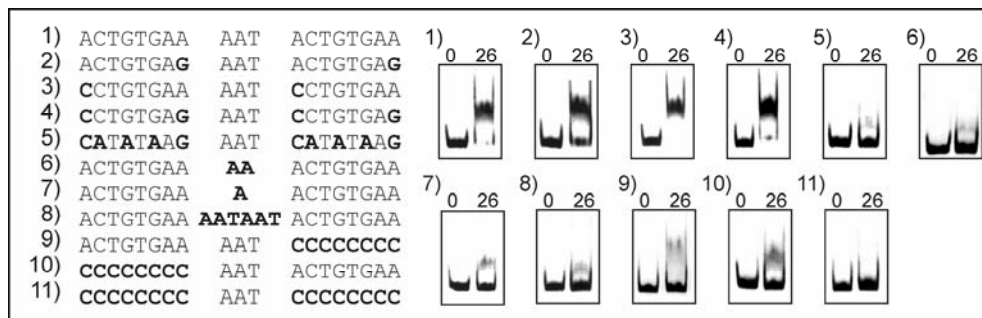


Abb. V. 18: Gelretardationsexperimente zur Verifizierung und weiteren Analyse eines möglichen PhoR-Bindemotivs. Ein putatives 19 bp PhoR-Bindemotiv aus zwei Wiederholungen der 8 bp Sequenz ACTGTGAA, die durch einen 3 bp langen „spacer“ mit der Sequenz AAT getrennt sind, wurde zwischen zwei nicht-bindende Fragmente inseriert und ohne bzw. mit einem 26-fachen molaren PhoR_{N-H}-P Überschuss inkubiert (Fragment 1). Ausgehend von diesem Motiv wurden 10 mutierte Derivate hergestellt und ebenfalls bezüglich der Interaktion mit PhoR_{N-H}-P getestet. Die Ansätze wurden auf einem nativen 15 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA mit SybrGreen I gefärbt.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss des postulierten „spacers“ auf die Interaktion mit PhoR_{N-H}-P untersucht. Die Verkürzung des „spacers“ um nur eine Base hatte zur Folge, dass bei einem 26-fachen molaren PhoR_{N-H}-P Überschuss fast keine Retardation der DNA mehr stattfand (Abb. V. 18, Fragment 6). Die Verkürzung auf eine Base zeigte einen vergleichbaren Effekt (Abb. V. 18, Fragment 7). Eine Verdopplung der „spacer“-Länge auf 6 bp führte ebenfalls zu einem fast vollständigen Verlust der PhoR_{N-H}-P-Bindung (Abb. V. 18, Fragment 8). In einer letzten Versuchsreihe wurde die Notwendigkeit der Wiederholung der 8 bp Sequenz für die PhoR-Bindung getestet. Dabei zeigte sich, dass der „direct repeat“ absolut essentiell für die Wechselwirkung ist, denn der Austausch entweder des 5'-terminalen oder des 3'-terminalen 8 bp „repeats“ gegen Cytosin-Reste führte fast zur vollständigen Inhibierung der Interaktion (Abb. V. 18, Fragmente 9 und 10). Als Kontrolle wurde sowohl der 5'-terminale als auch der 3'-terminale 8 bp „repeat“ gegen Cytosin-Reste ausgetauscht (Abb. V. 18, Fragment 11). Dieses Fragment zeigte, wie zu erwarten, keinerlei Bindung an PhoR_{N-H}-P. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die oben beschriebenen Resultate die Annahme unterstützen, dass PhoR an eine 19 bp Sequenz bindet, die aus einer Wiederholung eines 8 bp Motivs sowie einem „spacer“ von exakt 3 bp besteht.

A:		shift	B:		shift
1)	AAACCTGTGAG AAT AATAAGAA	+++	1)	ACTGTGAA TGT ACTGAAAG	++
20)	----- --- C-----	++++	8)	C----- --- -----	+++
21)	----- --- -C-----	++++	17)	----- -T- -----	+++
M)	CCTGTGAA NNN CCTGTGAA		M)	CCTGTGAA NNN CCTGTGAA	

Abb. V. 19: Vergleich der Mutationen in P_{pstS} und P_{phoR}, die einen positiven Effekt auf die DNA-Bindungsaffinität von PhoR_{N-H}-P in den Mutationsanalysen zeigten, mit dem artifiziellen Bindemotiv, das die höchste Affinität zu PhoR zeigt. Dargestellt sind Auszüge aus den Mutationsanalysen der PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von *pstS* (A; vgl. Abb. V. 15) und *phoR* (B; vgl. V. 16) sowie das artifizielle PhoR-Bindemotiv mit der höchsten Affinität (Fragment M; vgl. Abb. V. 18, Fragment 3). Ein Vergleich der eingeführten Mutationen mit der Sequenz des Fragments M zeigt, dass drei der vier Mutationen (Fragmente 20, 21 und 8) zu einer höheren Übereinstimmung mit dem artifiziellen Bindemotiv führen.

Auch die zuvor durchgeführten Mutationsanalysen (siehe V. 2.9 und V. 2.10) stehen im Einklang mit dieser Annahme. Dabei zeigten vier Einzelmutationen einen positiven Effekt auf die DNA-PhoR_{N-H}-P-Interaktion, d. h. die mutierten Fragmente besaßen eine höhere Bindungsaffinität zu PhoR_{N-H}-P als das Wildtyp-Fragment. Vergleicht man diese

Basenaustausche mit dem artifiziiellen DNA-Bindemotiv, das die höchste Affinität zu PhoR_{N-H}-P zeigte (Abb. V. 18, Fragment 3), so führte in drei der vier Fällen der Basenaustausch zu einer größeren Übereinstimmung mit dem optimalen Bindemotiv (Abb. V. 19).

2.12 Nachweis der *in vivo*-Relevanz der identifizierten PhoR-Bindestelle innerhalb der Promotorregion von *phoR*

Die PhoR-Bindungsstellen innerhalb der Promotorbereiche von *pstSCAB* und *phoRS* wurden durch *in vitro*-Studien identifiziert. Um nachzuweisen, dass diese DNA-Bereiche auch *in vivo* für die PhoR-abhängige Induktion von *pstSCAB* und *phoRS* notwendig sind, wurden transkriptionelle Fusionen der entsprechenden Promotorbereiche mit dem promotorlosen *cat*-Gen (kodierte für Chloramphenicol-Acetyltransferase) analysiert. Die Untersuchungen zum *pstSCAB*-Operon wurden von Ulrike Sorger-Herrmann im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt (Sorger-Herrmann, 2006), die zum *phoRS*-Operon im Rahmen dieser Arbeit. Dazu wurden Transkriptionsfusionsanalysen mit drei unterschiedlich langen *phoR*-Promotorfragmenten durchgeführt (Abb. V. 20), die vor das *cat*-Gen in dem Plasmid pET2 (Vasicova *et al.* 1998) kloniert wurden. Das Plasmid pET2-*phoR1* enthält die gesamte Promotorregion von *phoR* mit der identifizierten PhoR-Bindestelle sowie der -10 und -35 Region. Das Plasmid pET2-*phoR2* enthält eine verkürzte Promotorregion, in der die PhoR-Bindestelle fehlt, aber die -10- und -35-Region noch vorhanden sind. In dem Plasmid pET2-*phoR3* ist die Promotorregion von *phoR* so stark verkürzt, dass weder die postulierte PhoR-Bindestelle noch die -10- und -35-Region enthalten sind (Abb. V. 20A). Die Plasmide wurden durch Elektroporation in *C. glutamicum* ATCC 13032 transferiert und die Expression des *cat*-Gens vor und nach Auslösung des Phosphatmangels quantifiziert. Dazu wurden die drei Stämme in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glukose bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ~5) kultiviert, anschließend zweimal in phosphatfreiem CGXII-Minimalmedium gewaschen und in phosphatfreiem CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glukose resuspendiert. Direkt vor dem Transfer sowie 10, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach dem Transfer in phosphatfreies CGXII-Minimalmedium wurde die CAT-Aktivität bestimmt. Bei der Analyse der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität, die ein Maß für die Promotoraktivität darstellt, wurde deutlich, dass der Stamm *C. glutamicum* pET2-*phoR1* unter Phosphatüberschuss eine spezifische Aktivität von 300 mU/mg zeigte, die 60 Minuten nach Phosphatlimitierung ca. 1,7-fach auf ~500 mU/mg

anstieg (Abb. V. 20B). Das bedeutet, dass eine Aktivierung unter Phosphatmangelbedingungen stattfindet. In dem Stamm *C. glutamicum* pET2-*phoR2* wurde unter Phosphatüberschuss eine 3-fach niedrigere spezifische Aktivität (100 mU/mg) gemessen, die unter Phosphatmangelbedingungen unverändert blieb (Abb. V. 20C). In dem Stamm *C. glutamicum* pET2-*phoR3* konnten nur extrem geringe CAT-Aktivitäten gemessen werden (Abb. V. 20D). Unklar bleibt, warum unter Phosphatüberschuss der Stamm *C. glutamicum* pET2-*phoR2* eine 3-fach geringere CAT-Aktivität zeigte als der Stamm *C. glutamicum* pET2-*phoR1*. Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine unvollständige -35 Region vorliegen könnte, oder aber PhoR selbst unter Phosphatüberschussbedingungen die *phoRS* Expression geringfügig aktiviert. Die Beobachtung, dass in *C. glutamicum* pET2-*phoR2* keine Induktion der *phoRS*-Expression unter Phosphatmangel stattfindet, bestätigt die Relevanz der PhoR-Bindestelle an Position -43 bis -61 für die Transkriptionsaktivierung des *phoRS*-Operons.

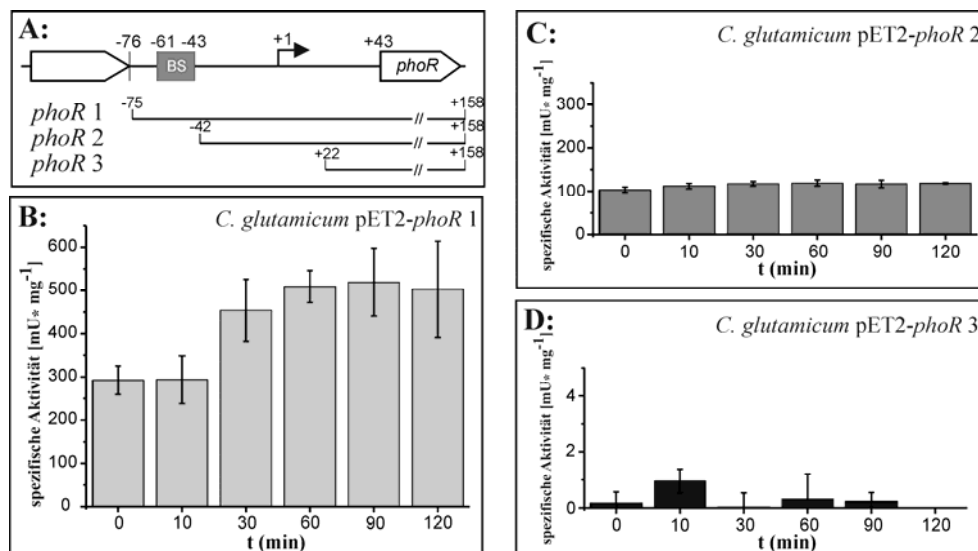


Abb. V. 20: Nachweis der *in vivo*-Relevanz der postulierten PhoR-Bindestelle in der Promotorregion von *phoR* durch Transkriptionsfusionsanalysen. (A) Schematische Darstellung der *phoR*-Promotorfragmente, die vor das promotorlose Chloramphenicolacetyltransferase-Gen in dem Plasmid pET2 kloniert wurden. Die Zahlen geben die Positionen der Fragmentenden bezüglich des Transkriptionsstartes an. (B-D) Spezifische Chloramphenicolacetyltransferase-Aktivität als Maß für die Expression der Transkriptionsfusionen in *C. glutamicum* ATCC 13032 mit pET2-*phoR* 1 (B), pET2-*phoR* 2 (C) und pET2-*phoR* 3 (D) vor sowie 10, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach dem Transfer in phosphatfreies CGXII-Minimalmedium. Alle Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Kultivierungen und die Streuung ist als Standardabweichung angegeben.

3. Einfluss von unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen und von PhoRS auf die Lysinproduktion von *Corynebacterium glutamicum* DM1730

Mit Hilfe des Lysin-Modellstammes *C. glutamicum* DM1730 der Degussa AG sollte die Beziehung zwischen der Phosphatversorgung und der Lysinproduktion untersucht werden. Um die Auswirkungen einer Deletion sowie der Überproduktion von PhoRS auf die Lysinbildung zu testen, wurden die Stämme DM1730/pEKEx2, DM1730 Δ phoRS/pEKEx2 und DM1730 Δ phoRS/pEKEx2-phoRS konstruiert. Wachstum, Glukoseverbrauch und Lysinbildung der Stämme DM1730/pEKEx2 und DM1730 Δ phoRS/pEKEx2-phoRS wurden unter Phosphatüberschuss (13 mM Phosphat) und unter phosphatlimitierenden Bedingungen (0,6 mM Phosphat) analysiert. Da die Deletionsmutante DM1730 Δ phoRS/pEKEx2 einen signifikanten Wachstumsdefekt zeigte, konnten keine Experimente mit diesem Stamm durchgeführt werden.

3.1 Konstruktion der Deletionsmutante *C. glutamicum* DM1730 Δ phoRS/pEKEx2 sowie der Komplementationsmutante *C. glutamicum* DM1730 Δ phoRS/pEKEx2-phoRS

Zur chromosomalen Deletion der *phoRS*-Gene in dem Lysinproduktionsstamm *C. glutamicum* DM1730 wurde das Plasmid pK19*mobsacB* Δ *cgtRS3* (Kocan *et al.*, 2006) verwendet. Nach Transformation von DM1730 mit pK19*mobsacB* Δ *cgtRS3* wurde die Integration des Plasmids in das Bakteriengenom durch homologe Rekombination mittels Selektion auf Kanamycinresistenz überprüft. Nach zwei erfolglosen Transformationen konnten mehrere kanamycinresistente Klone erhalten werden. Zur Selektion auf das zweite Rekombinationsereignis, aus dem entweder der Wildtyp oder die gewünschte Deletionsmutante hervorgehen kann, wurde je ein kanamycinresistenter Klon in 5 ml LB-Medium mit 4 % (w/v) Glukose über Nacht bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und jeweils 100 μ l einer 1:100- und 1:200-Verdünnung der Kulturen auf BHIS-Nährböden mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. 40 saccharoseresistente und kanamycinsensitive Klone wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern *cgtRS3-out-fw* und *cgtRS3-out-rv* überprüft. Dabei zeigte sich, dass 12 Klone die gewünschte *phoRS*-Deletion aufwiesen. Von vier dieser Klone wurden Glycerin-Kulturen angelegt. Für die folgenden

Untersuchungen wurde eine der Deletionsmutanten DM1730 Δ *phoRS* mit pEKEEx2 (Eikmanns *et al.*, 1991a) sowie parallel mit pEKEEx2-*phoRS* (Kočan *et al.*, 2006) transformiert.

3.2 Einfluss der Phosphatkonzentration im Medium auf das Wachstumsverhalten und die Lysinbildung des Stammes DM1730/pEKEEx2

Um den Einfluss von Phosphatmangel auf die Lysinproduktion des Stammes DM1730/pEKEEx2 zu analysieren, wurde der Stamm sowohl unter Phosphatüberschuss wie auch unter Phosphatmangel kultiviert. Dabei erfolgte die erste Vorkultivierung für ~9 h bei 30 °C in 5 ml LB-Medium mit 4 % (w/v) Glukose und 25 µg/ml Kanamycin und die zweite Vorkultivierung über Nacht bei 30 °C in 50 ml CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glukose und 25 µg/ml Kanamycin. Bei Kultivierung unter Phosphatmangel wurde eine dritte Vorkultivierung für 24 h bei 30 °C in 50 ml CGXII-Minimalmedium mit 8 % (w/v) Glukose, 25 µg/ml Kanamycin und 0,6 mM Phosphat (entspricht Phosphatmangel) zur Reduktion der intrazellulären Phosphatspeicher (Polyphosphat) durchgeführt. Der Stamm DM1730/pEKEEx2 wurde nach der Vorkultivierung wiederum in 50 ml CGXII-Minimalmedium mit 8 % (w/v) Glukose, 25 µg/ml Kanamycin und 13 mM Phosphat (entspricht Phosphatüberschuss) oder 0,6 mM Phosphat (entspricht Phosphatmangel) kultiviert. Bei diesen Experimenten wurde eine Phosphatkonzentration von 0,6 mM gewählt, um noch eine ausreichende Biomasse-Bildung zu ermöglichen. In vorangegangenen Experimenten hatten Zellen mit 0,065 mM Phosphat eine maximale OD₆₀₀ von ~3 erreicht, mit 0,13 mM Phosphat eine maximale OD₆₀₀ von ~6 (Daten nicht gezeigt). Dies deutete darauf hin, dass innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs ein linearer Zusammenhang zwischen der Phosphatkonzentration im Medium und der maximal erreichten OD₆₀₀ besteht. Um eine OD₆₀₀ von ~20 für die Kultivierungen zur Lysin-Bildung zu erreichen, wurde eine Phosphatkonzentration von 0,6 mM gewählt. Diese Kultivierungen wurden sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von 1 mM IPTG durchgeführt und dabei wurden das Wachstum, die Lysinbildung und der Glukoseverbrauch analysiert.

Anhand der in Abb. V. 21 dargestellten Wachstumskurven wird deutlich, dass die Kulturen des Stammes DM1730/pEKEEx2 unter Phosphatmangel eine deutlich niedrigere OD₆₀₀ am Ende der Kultivierung erreichten als unter Phosphatüberschuss. So lag die OD₆₀₀ bei Phosphatüberschuss bei 40, während unter Phosphatmangel lediglich eine halb so hohe OD₆₀₀ erreicht wurde (Abb. V. 21A und B; Tab. V. 2). Ein deutlicher Einfluss des Phosphatmangels

zeigte sich auch bei dem Glukoseverbrauch der Kulturen des Stammes DM1730/pEKEEx2 (Abb. V. 21C und D). Während unter Phosphatüberschuss die Glukose bereits nach 24 h vollständig aus dem Medium aufgenommen war, zeigte sich unter Phosphatmangel eine wesentlich langsamere Glukoseverbrauchsrate bei annähernd gleicher Wachstumsrate (Tab. V. 2). Bei Kultivierung unter Phosphatmangel lag nach 170 h noch ca. 30 mM Glukose im Medium vor. Das Vorhandensein von Glukose am Ende der Kultivierung kann durch die geringere Biomassebildung bei Phosphatmangel nach 170 h Kultivierung begründet werden.

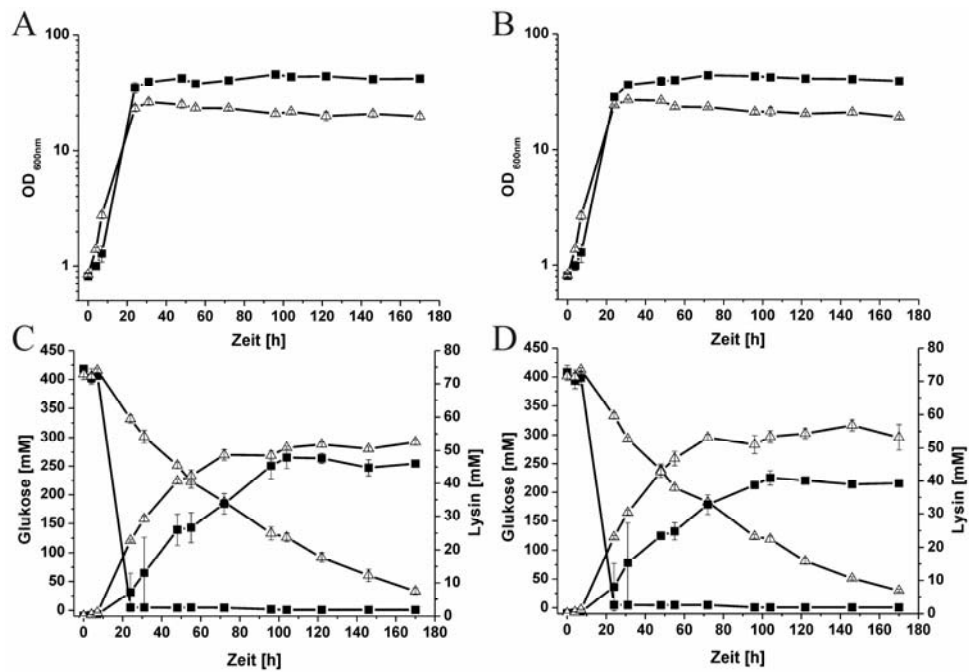


Abb. V. 21: Wachstum (A und B), Lysinbildung und Glukoseverbrauch (C und D) der Kulturen des Stammes DM1730/pEKEEx2. Die Kultivierung erfolgte in CGXII-Minimalmedium mit 8 % (w/v) Glukose, 25 µg/ml Kanamycin und 13 mM Phosphat (-■-) oder 0,6 mM Phosphat (-Δ-). Dabei wurde die Kultivierung ohne IPTG (A und C) oder mit 1 mM IPTG (B und D) durchgeführt. Alle Werte sind Mittelwerte aus zwei (Kultivierung mit 13 mM Phosphat) bzw. drei (Kultivierung mit 0,6 mM Phosphat) unabhängigen Kultivierungen und die Streuung ist als Standardabweichung angegeben.

Die Kultivierung bei Phosphatmangel hatte nicht nur einen positiven Einfluss auf die erreichte Endkonzentration an Lysin, sondern auch auf die Produktivität der Kulturen des Stammes DM1730/pEKEEx2 (Abb. V. 21C und D; Tab. V. 2). So konnte durch Kultivierung bei Phosphatmangel die Gesamt-Produktivität um 13 % gegenüber Kultivierung bei

Phosphatüberschuss gesteigert werden. Bei der Lysinbildung fiel auf, dass im Unterschied zu der Lysinbildung unter Phosphatmangelbedingungen, die parallel zum Glukoseverbrauch erfolgte, die Lysinbildung bei Phosphatüberschuss zum größten Teil erst nach der vollständigen Aufnahme der Glukose aus dem Medium stattfand. Generell konnte auch eine Steigerung der Lysin-Ausbeute (g L-Lysin/ g Glukose) um ca. 34 % durch Kultivierung bei Phosphatmangel beobachtet werden (Tab. V. 2).

3.3 Einfluss der Phosphatkonzentration im Medium auf das Wachstumsverhalten und die Lysinbildung des Stammes DM1730 Δ *phoRS*/pEKEEx2-*phoRS*

Im Wesentlichen zeigten die Kulturen des Stammes DM1730 Δ *phoRS*/pEKEEx2-*phoRS* bei Kultivierung unter Phosphatmangel ohne IPTG ein gleiches Verhalten wie der Stamm DM1730/pEKEEx2 (Abb. V. 23E und G). Auch DM1730 Δ *phoRS*/pEKEEx2-*phoRS* erreichte unter Phosphatmangel und ohne Induktion mit 1 mM IPTG eine geringere End-OD₆₀₀, zudem zeigte sich eine langsamere Glukoseverbrauchsrate sowie eine höhere Lysin-Ausbeute und Gesamt-Produktion (Abb. V. 22A und C; Abb. V. 23E und G; Tab. V. 2). Unter induzierenden Bedingungen konnte sowohl unter Phosphatüberschuss wie auch unter Phosphatmangel eine geringere Wachstumsrate der Kulturen des Stammes DM1730 Δ *phoRS*/pEKEEx2-*phoRS* beobachtet werden (Abb. V. 22B; Tab. V. 2). Darüber hinaus zeigten die Kulturen mit IPTG, die PhoS und PhoR vermutlich stark überproduzieren, eine höhere End-OD₆₀₀, eine erhöhte Lysin-Ausbeute und auch eine gesteigerte Gesamt-Produktivität im Vergleich zu den Kulturen ohne IPTG (Abb. V. 22B und D; Tab. V. 2). Nach 170 h Kultivierung konnte die höchste Gesamt-Produktivität bei Induktion mit IPTG unter Phosphatüberschuss beobachtet werden. Diese war gegenüber Kultivierung bei Phosphatüberschuss ohne IPTG um ca. 65 % gesteigert (Tab. V. 2). Die höchste Lysin-Ausbeute konnte hingegen bei Kultivierung unter Phosphatmangel und Induktion mit IPTG beobachtet werden. Vermutlich würde auch unter diesen Bedingungen die höchste Lysinkonzentration erreicht werden, denn nach 170 h war noch 160 mM Glukose im Medium vorhanden (Abb. V. 22D).

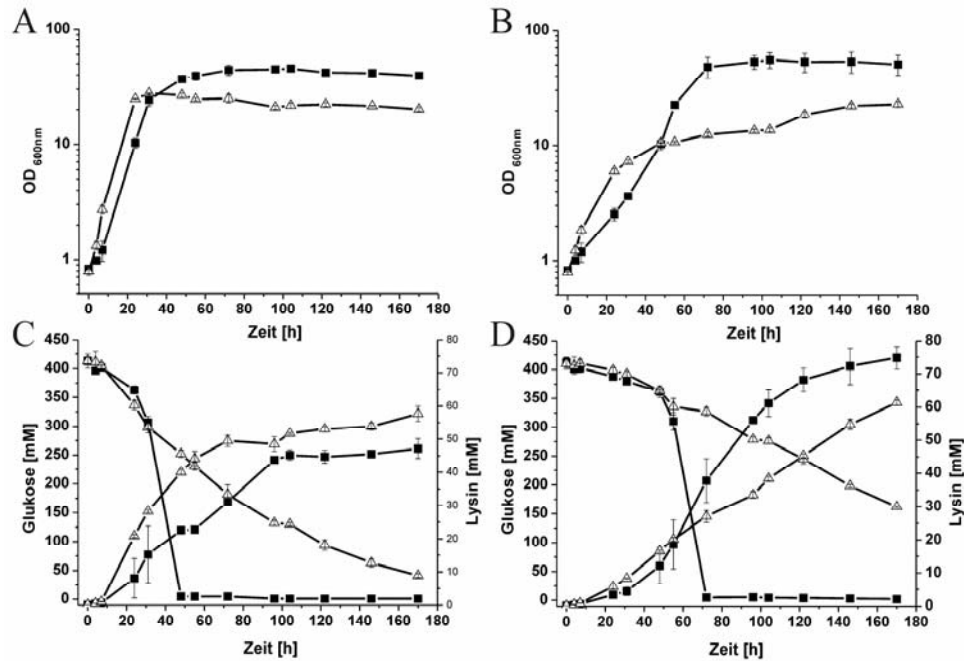


Abb. V. 22: Wachstum (A und B), Lysinbildung und Glukoseverbrauch (C und D) der Kulturen des Stammes DM1730Δ*phoRS*/pEKEx2-*phoRS*. Die Kultivierung erfolgte in CGXII-Minimalmedium mit 8 % (w/v) Glukose, 25 μg/ml Kanamycin und 13 mM Phosphat (-■-) oder 0,6 mM Phosphat (-Δ-). Dabei wurde die Kultivierung ohne IPTG (A und C) oder mit 1 mM IPTG (B und D) durchgeführt. Alle Werte sind Mittelwerte aus zwei (Kultivierung mit 13 mM Phosphat) bzw. drei (Kultivierung mit 0,6 mM Phosphat) unabhängigen Kultivierungen und die Streuung ist als Standardabweichung angegeben.

3.4 Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der PhoRS-Überproduktion und der Phosphatkonzentration im Medium auf das Wachstumsverhalten und die Lysinbildung des Stammes DM1730

Sowohl die Überproduktion von PhoRS als auch die Kultivierung unter Phosphatmangel zeigten einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten und die Lysinbildung des Stammes DM1730 (Abb. V. 23; Tab. V. 2). Die Überproduktion von PhoRS bei Phosphatüberschuss wie auch bei Phosphatmangel führte zu einer 2 bis 3-fach niedrigeren Wachstumsrate im Vergleich zu der von DM1730/pEKEx2 bei Kultivierung unter Phosphatüberschuss.

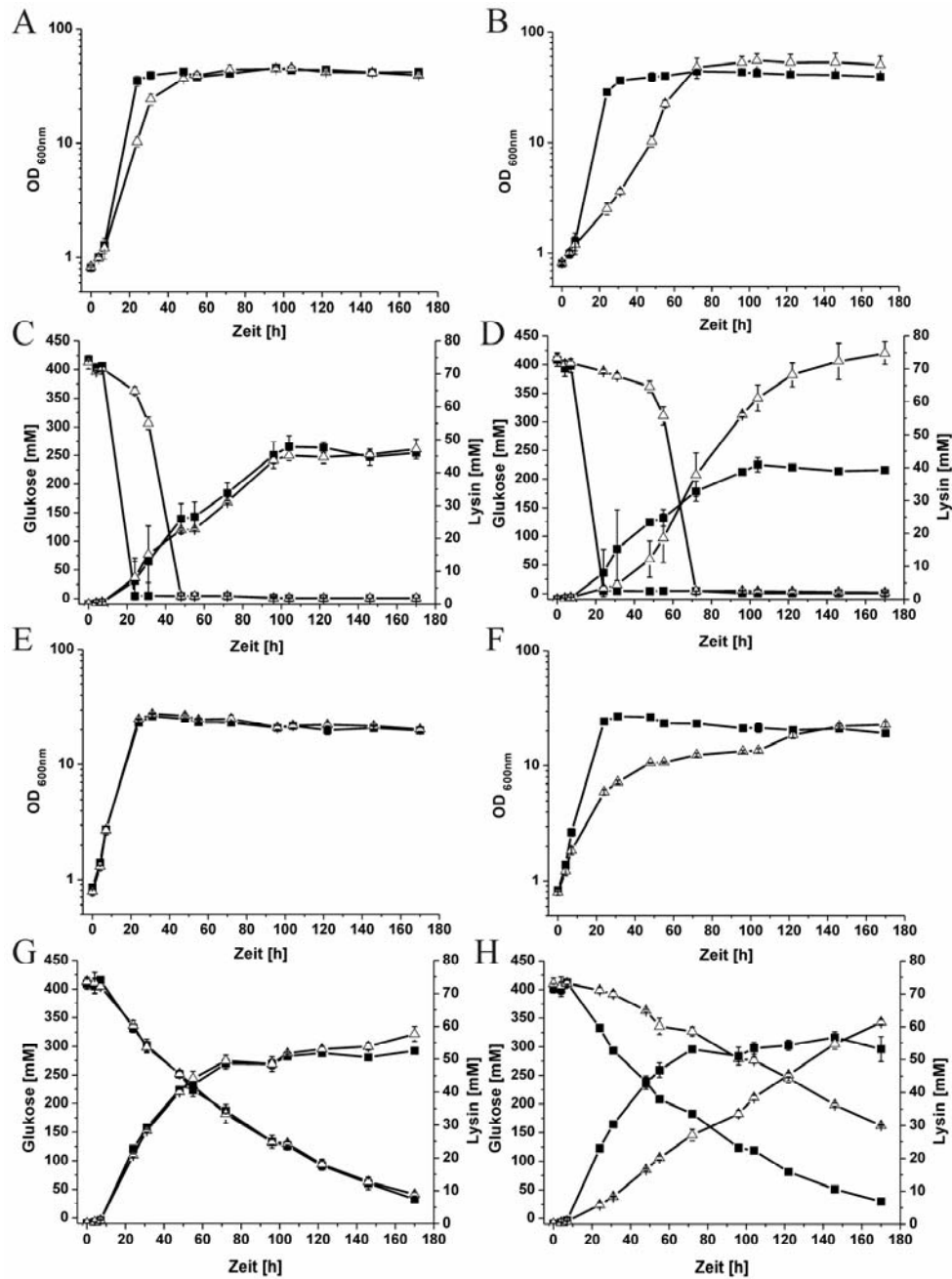


Abb. V. 23: Wachstum (A, B, E und F), Lysinbildung und Glukoseverbrauch (C, D, G und H) der Kulturen des Stammes DM1730/pEKEx2 (-■-) und des Stammes DM1730 Δ phoRS/pEKEx2-phoRS (- Δ -). Die Kultivierung erfolgte in CGXII-Minimalmedium mit 8 % (w/v) Glukose, 25 μ g/ml Kanamycin und 13 mM Phosphat (A - D) oder 0,6 mM Phosphat (E - H). Dabei wurde die Kultivierung ohne IPTG (A, C, E, G) oder mit 1 mM IPTG (B, D, F, H) durchgeführt.

Fortsetzung der Legende von Abb. V. 23:

Alle Werte sind Mittelwerte aus zwei (Kultivierung mit 13 mM Phosphat) bzw. drei (Kultivierung mit 0,6 mM Phosphat) unabhängigen Kultivierungen und die Streuung ist als Standardabweichung angegeben.

Zugleich führte die Überproduktion von PhoRS aber zu einer erhöhten End-OD₆₀₀ (Abb. V. 23B und F; Tab. V. 2). Unter Phosphatmangelbedingungen erfolgte sowohl in den Kulturen des Stammes DM1730/pEKEx2 als auch in denen des Stammes DM1730Δ*phoRS*/pEKEx2-*phoRS* eine langsame Aufnahme der Glukose, die durch Überproduktion von PhoRS nochmals verringert werden konnte (Abb. V. 23G und H). Die höchste Lysin-Ausbeute zeigte sich bei Kultivierung unter Phosphatmangel und gleichzeitiger Überproduktion von PhoRS. Diese war im Vergleich zu DM1730/pEKEx2 bei Kultivierung unter Phosphatüberschuss und ohne IPTG-Zugabe doppelt so hoch (Tab. V. 2). Durch Überproduktion von PhoRS bei Phosphatüberschuss konnte hingegen nicht nur die höchste Lysin-Endkonzentration (Abb. V. 23D), sondern auch die höchste Gesamt-Produktivität beobachtet werden. Die Gesamt-Produktivität war um ca. 60 % gesteigert gegenüber den Kulturen des Stammes DM1730/pEKEx2 ohne IPTG bei Phosphatüberschuss (Tab. V. 2).

Tabelle V. 2: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses von PhoRS und der Phosphatkonzentration auf die Parameter: Wachstumsrate (0 - 24 h, [h⁻¹]), OD₆₀₀ nach 170 h Kultivierung, Lysin-Ausbeute (g L-Lysin/ g Glukose) und der Gesamt-Produktivität nach 170 h Kultivierung (g Lysin^l·h⁻¹) von DM1730/pEKEx2 und DM1730Δ*phoRS*/pEKEx2-*phoRS* bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 8 % (w/v) Glukose, 13 mM oder 0,6 mM Phosphat (P_i), 25 µg/ml Kanamycin und wenn erforderlich 1 mM IPTG. Die Werte wurden aus den in Abb. V. 21 dargestellten Kultivierungen ermittelt und stellen Mittelwerte aus unabhängigen Kultivierungen sowie deren Standardabweichungen dar.

<i>C. glutamicum</i> - Stamm	DM1730/pEKEx2				DM1730Δ <i>phoRS</i> /pEKEx2- <i>phoRS</i>			
	13 mM P _i -IPTG	0,6 mM P _i -IPTG	13 mM P _i +IPTG	0,6 mM P _i +IPTG	13 mM P _i -IPTG	0,6 mM P _i -IPTG	13 mM P _i +IPTG	0,6 mM P _i +IPTG
Wachstumsrate 0 - 24 h [h ⁻¹]	0,166 ± 0,006	0,138 ± 0,004	0,157 ± 0,001	0,141 ± 0,002	0,110 ± 0,005	0,143 ± 0,003	0,046 ± 0,006	0,081 ± 0,001
End-OD₆₀₀ nach 170 h	42,1 ± 2,7	19,7 ± 1,2	39,3 ± 1,4	19,1 ± 0,7	39,4 ± 1,5	20,2 ± 0,9	50,5 ± 10,0	22,8 ± 1,3
Lysin-Ausbeute g L-Lysin/g Glukose	0,084 ± 0,001	0,104 ± 0,002	0,072 ± 0,000	0,104 ± 0,007	0,086 ± 0,005	0,116 ± 0,006	0,137 ± 0,007	0,177 ± 0,003
Gesamt- Produktivität g Lysin l ⁻¹ h ⁻¹	0,040 ± 0,001	0,045 ± 0,001	0,034 ± 0,000	0,046 ± 0,003	0,041 ± 0,003	0,050 ± 0,002	0,064 ± 0,003	0,053 ± 0,001

VI Diskussion

1 Regulation der Phosphatmangelgene durch das Zweikomponenten-System PhoRS

In vorangegangenen Arbeiten konnte das Phosphatmangelstimulon von *C. glutamicum* mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie identifiziert werden (Ishige *et al.*, 2003). Dieses enthält u. a. 25 *psi*-Gene (*psi* = phosphate starvation inducible), die bei der Phosphatversorgung eine Rolle spielen. Dazu gehören folgende Gene bzw. Operons: *pstSCAB* (ABC-Transporter für die Phosphataufnahme), *phoRS* (Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem), *phoC* (NCgl2959/cg3393; Zellwand-assoziierte Phosphatase (Wendisch and Bott, 2005), *ushA* (Enzym mit UDP-Zuckerhydrolase- und 5'-Nukleotidase-Aktivität (Rittmann *et al.*, 2005), *ugpABCE* (ABC-Transporter für die Aufnahme von Glycerin-3-Phosphat), *nucH* (putative extrazelluläre Nuklease), *phoH1* (ATPase unbekannter Funktion) und *glpQ1* (Glycerinphosphoryldiester-Phosphodiesterase) (Ishige *et al.*, 2003). Die Regulation der Transkription der Phosphatmangelgene, deren Genprodukte es dem Bakterium erlauben, verbliebenes Phosphat effizienter zu nutzen und alternative Phosphatquellen zugänglich zu machen, erfolgt in Bakterien üblicherweise über Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme (2-KS). Bisher am ausführlichsten untersucht ist das PhoRB-System von *E. coli* (Wanner, 1996) und das PhoRP-System von *B. subtilis* (Hulett, 2002). In *C. glutamicum* konnte ebenfalls ein 2-KS identifiziert werden, das sehr wahrscheinlich bei der Phosphatmangelantwort eine Rolle spielt. Die Gene dieses 2-KS wurden *phoS* (Sensorkinase) und *phoR* (Antwortregulator) benannt. Eine *C. glutamicum* Δ *phoRS*-Mutante zeigte im Gegensatz zum Wildtyp und einer Δ *phoRS*-Mutante mit einem *phoRS*-Expressionsplasmid einen Wachstumsdefekt bei Kultivierung unter Phosphatlimitierung, aber nicht unter Phosphatüberschuss. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die *psi*-Gene in der Δ *phoRS*-Mutante nicht mehr bzw. langsamer oder weniger stark induziert werden (Kocan *et al.*, 2006). Diese Annahme konnte mittels DNA-Microarrays bestätigt werden, die zeigten, dass die *psi* Gene, mit Ausnahme des *pstSCAB* Operons, in der Δ *phoRS* Mutante innerhalb einer Stunde nach einem dem Wechsel von Phosphatüberschuss zu Phosphatmangel nicht mehr induziert wurden (Kocan *et al.*, 2006).

Um zu untersuchen, ob die *psi* Gene direkt oder indirekt durch den Transkriptionsregulator PhoR induziert werden, wurden DNA-PhoR-Interaktionsstudien durchgeführt. In vorangegangenen Arbeiten konnte keine Bindung eines PhoR-Derivats mit C-terminalem His-„tag“ an die Promotorregionen der Gene *ugpA*, *pstS* und *phoR* nachgewiesen werden (Kocan, 2005). Dieses negative Resultat könnte durch den His-„tag“ verursacht werden, der möglicherweise eine Interaktion des PhoR-Proteins mit der DNA verhindert. Weitere Bindungsstudien wurden mit einem verkürzten PhoR-Derivat (PhoR Δ 1-125) mit einem N-terminalen His-„tag“ durchgeführt, dessen N-terminale Regulator-Domäne deletiert worden war (Kocan, 2005). Mit einem 150- bis 1000-fachen molaren Überschuss konnte eine Bindung dieses Proteins an die Promotorregionen der Gene *ugpA*, *pstS*, *phoR* und *pitA* gezeigt werden. Darüber hinaus wurde die Bindung von PhoR Δ 1-125 an die Promotorregion von *pstS* in einem DNase-I-„Footprint“-Experiment nachgewiesen (Kocan, 2005). Die Versuche, die Bindungsstudien mit PhoR Δ 1-125 in der vorliegenden Arbeit zu reproduzieren, führten zu dem Ergebnis, dass dieses Protein in Gelretardationsexperimenten einen Komplex mit allen getesteten DNA-Fragmenten bildete, also auch mit den Negativkontrollen (vgl. V. 1.1). Eine spezifische Interaktion zwischen PhoR Δ 1-125 und den Promotorregionen der Gene *ugpA*, *pstS*, *phoR* und *pitA* konnte in Gelretardationsexperimenten jedoch nicht bestätigt werden (vgl. V.1.1). Bei DNase I-„Footprint“-Analysen mit PhoR Δ 1-125 und den Promotorregionen von *pstS*, *pitA*, *ugpA* und *phoR* konnte in einem großen Bereich (147 bp bis 273 bp; siehe V.1.2) ein Wechsel von geschützten und DNase-I-hypersensitiven Basen detektiert werden. Der zuvor von Kocan (2005) gefundene geschützte Bereich von 36 bp (-170 bis -205, bezogen auf den Transkriptionsstart) innerhalb der Promotorregion von *pstS* konnte in diesen Studien nicht bestätigt werden. Es zeigten sich lediglich vier genen DNase I-Verdau geschützte Basen in dem Bereich -193 bis -196, bezogen auf den Transkriptionsstart. Ein eindeutiger Grund für die Unterschiede in den DNase-I-„Footprint“-Analysen konnte bisher nicht gefunden werden. Die Gelretardationsexperimente deuten darauf hin, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen PhoR Δ 1-125 eine unspezifische Bindung an die DNA zeigt. Daher wurden weitere Experimente mit einem PhoR-Derivat durchgeführt, das mit Ausnahme eines zusätzlichen N-terminalen Histidin-Restes keine Unterschiede zu dem aus der DNA-Sequenz abgeleiteten PhoR-Protein zeigte.

1.1 Das PhoRS-System, ein Rheostat?

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion zwischen aufgereinigtem PhoR mit N-terminalem His-„tag“ (PhoR_{N-His10}) und der Promotorregion von u. a. *phoR* mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten beobachtet werden (Abb. V. 11A). Das deutet einerseits darauf hin, dass das PhoRS-System direkt an der Regulation der Phosphatmangelantwort beteiligt ist, und unterstützt die postulierte positive Autoregulation der Expression von *phoRS* (Kocan *et al.*, 2006). Diese Art von Regulation ist weit verbreitet bei 2-KS und es werden verschiedene Funktionen postuliert (Bijlsma and Groisman, 2003). Autoregulation könnte notwendig sein bei 2-KS, die eine Vielzahl an Zielgenen regulieren. Die Menge an Antwortregulator, die durch einen konstitutiven Promotor gebildet wird, könnte in diesem Fall eventuell nicht ausreichen, um an die Promotoren aller Zielgene zu binden. Darüber hinaus könnte Autoregulation notwendig sein, um eine hierarchische Organisation des Regulons zu ermöglichen. Das würde bedeuten, dass einige Gene bereits bei einer niedrigen zellulären Konzentration des Antwortregulators durch diesen reguliert werden, während andere Gene erst bei einer erhöhten Konzentration des Antwortregulators von ihm kontrolliert werden. Diese erhöhte Konzentration kann durch positive Autoregulation des Regulatorgens erreicht werden (Bijlsma and Groisman, 2003; Cotter and DiRita, 2000). Die genannten Unterschiede zwischen den Zielgenen könnten sich in einer unterschiedlichen Kinetik der Genexpression zeigen, wie sie z.B. für das BvgAS-System von *Bordetella pertussis*, dem Erreger des Keuchhustens, beschrieben wurde (Deora *et al.*, 2001; Scarlato *et al.*, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass für die Expression von Virulenzgenen eine stark erhöhte BvgA Konzentration notwendig ist, während für die Expression einer weiteren Gruppe von Genen, darunter das Antigen kodierende Gen *bipA*, eine geringere BvgA Konzentration notwendig ist. Dies wird durch niedrig- und hochaffine phospho-BvgA-Bindestellen ermöglicht (Deora *et al.*, 2001; Mishra and Deora, 2005). Demnach könnte das BvgAS-System in *B. pertussis* eher als Rheostat als ein An/Aus-Schalter bezeichnet werden (Deora *et al.*, 2001). Im Fall des PhoRS-Systems von *C. glutamicum* könnten beide oben beschriebenen Funktionen der positiven Autoregulation eine Rolle spielen. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass PhoR mindestens 10 Zielpromotoren reguliert (*pstS*, *phoR*, *phoC*, *ushA*, *porB*, *ugpA*, *pitA*, *nucH*, *phoH1* und *glpQ1*, siehe V. 2.7), so dass die Basalkonzentration von PhoR möglicherweise nicht ausreicht, um bei Aktivierung des PhoRS-Systems unter Phosphatmangel alle Zielpromotoren parallel zu regulieren. Darüber hinaus konnte auch eine hierarchische Organisation des Regulons beobachtet werden, denn PhoR wies unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den verschiedenen Promotorregionen auf (siehe V. 2.7). Die höchste

Affinität zeigte sich zu der Promotorregion von *pstS*, gefolgt von *phoR* > *phoC* > *ushA*, *porB* > *ugpA* > *pitA* > *nucH*, *phoH1* > *glpQ1*. Es gibt eine, wenn auch nicht perfekte, Korrelation zwischen den *in-vitro*-Bindungsaffinitäten und der im Zuge der DNA-Microarray-Analysen (Ishige *et al.*, 2003) bestimmten Induktionskinetiken der verschiedenen *psi*-Gene nach einem Wechsel von Phosphatüberschuss zu Phosphatmangel. So werden Gene, deren Promotor eine hohe Affinität zu PhoR~P aufweist, innerhalb von 10 min nach dem Wechsel induziert, während Gene wie *nucH* und *phoH1*, deren Promotor eine schwächere Affinität zu PhoR~P aufweist, erst später induziert werden. Die Induktionskinetik der *psi*-Gene könnte demnach durch die DNA-Bindungsaffinität der Promotorregionen zu PhoR~P bestimmt werden. Während die Basalkonzentration an PhoR vermutlich ausreichend ist, um nach Aktivierung des PhoRS-Systems die hochaffinen Promotoren des *pstSCAB*-Operons und von *phoRS* zu induzieren, wird für die Induktion der Gene mit niedrigaffinen Promotoren, wie *pitA*, *nucH* oder *phoH1*, die durch die positive Autoregulation bereitgestellte erhöhte PhoR-Konzentration benötigt. Diese Überlegungen sprechen dafür, dass das PhoRS-System von *C. glutamicum* vermutlich als Rheostat und nicht als An/Aus-Schalter fungiert.

Die unterschiedlichen Induktionskinetiken der *psi*-Gene erlauben der Zelle vermutlich eine schnelle und effiziente Anpassung an Phosphatmangelbedingungen. Bei ausreichender Phosphatversorgung nimmt *C. glutamicum* Phosphat wahrscheinlich über den sekundären niedrigaffinen Transporter PitA auf. Unter Phosphatmangel wird als erstes das *pstSCAB*-Operon und *phoRS* induziert, deren mRNA-Konzentration innerhalb der ersten 10 Minuten nach einem Wechsel von Phosphatüberschuss zu Phosphatmangel bis zu 8-fach erhöht ist (Ishige *et al.*, 2003). Der durch das *pstSCAB*-Operon kodierte hochaffine ABC-Transporter für Phosphat erlaubt es der Zelle, die verbliebenen geringen Phosphatmengen zu nutzen, die durch das niedrigaffine PitA-System nicht mehr aufgenommen werden können. Die Autoinduktion von *phoRS* verursacht eine positive Rückkopplung und ermöglicht damit die schnelle Anpassung an Phosphatmangelbedingungen. Die Gene, deren Promotoren eine niedrigere Affinität zu PhoR haben als der *pstSCAB*- und der *phoRS*-Promotor, kodieren Transporter für die Aufnahme von Glycerin-3-phosphat oder extracytoplasmatische Enzyme wie PhoC, UshA (Rittmann *et al.*, 2005) und NucH. Die drei letztgenannten Enzyme setzen Phosphat aus Organophosphaten frei, das dann wiederum durch das Pst-System in die Zelle transportiert werden kann (Wendisch and Bott, 2005).

1.2 PhoR, ein bifunktionaler Antwortregulator?

Neben der zuvor dargestellten Funktion von PhoR als Transkriptionsaktivator gibt es auch Hinweise, dass PhoR als Transkriptionsrepressor unter Phosphatmangelbedingungen wirkt (Kocan, 2005). Transkriptomanalysen zeigten 60 Minuten nach einem Wechsel von Phosphatüberschuss zu Phosphatmangel einen 2-fach niedrigeren mRNA-Level von *pitA* im Wildtyp verglichen mit der Δ *phoRS* Mutante (Kocan, 2005). Da der *pitA*-mRNA Level in der Δ *phoRS*-Mutante nach einem Wechsel von Phosphatüberschuss zu Phosphatmangel unverändert blieb, muss der *pitA*-mRNA Level im Wildtyp vermindert sein. Eine erneute Betrachtung der Ergebnisse von Ishige *et al.* (2003) zeigte, dass im Wildtyp der *pitA*-mRNA Level 60 Minuten nach einem Wechsel von Phosphatüberschuss zu Phosphatmangel 2- bis 8-fach reduziert war. Diese Ergebnisse wurden jedoch nicht publiziert, da das gemittelte mRNA-Verhältnis unterhalb des vorgegebenen „cut-off“ von ≥ 2 oder $\leq 0,5$ lag. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion von PhoR mit der Promotorregion von *pitA* nachgewiesen werden (siehe V. 2.7), die darauf hindeutet, dass PhoR für die Repression von *pitA* unter Phosphatmangel verantwortlich ist. Demnach scheint es sich bei PhoR um einen bifunktionalen Antwortregulator zu handeln. Im Gegensatz zu *C. glutamicum* *pitA* wird das *E. coli* *pitA*-Gen konstitutiv exprimiert (Harris *et al.*, 2001). Eine doppelte Funktion des Antwortregulators als Aktivator und Repressor wurde auch für PhoP aus *B. subtilis* beschrieben (Liu and Hulett, 1998). In dieser Spezies werden unter Phosphatmangel die phosphathaltigen Teichonsäuren in der Zellwand durch phosphatfreie Teichuronsäuren ersetzt. Dieser Wechsel erfolgt durch eine Induktion des *tuaABCDEFGH*-Operons, das für die Biosynthese der Teichuronsäuren verantwortlich ist, und eine Repression der *tagAB*- und *tagDEF*-Operons, die für die Biosynthese von Teichonsäuren benötigt werden (Antelmann *et al.*, 2000; Hulett *et al.*, 1991; Pragai and Harwood, 2002; Pragai *et al.*, 2004). Erst kürzlich konnten auch für den Antwortregulator MtrA von *C. glutamicum* Hinweise auf eine bifunktionale Rolle erhalten werden (Brockner and Bott, 2006). Das MtrAB-Zweikomponentensystem spielt möglicherweise eine übergeordnete Funktion bei der Koordination von Stressantwort, Zellteilung und Wachstum (Möker *et al.*, 2004). MtrA aktiviert dabei die Transkription von Genen, die an verschiedenen Stressantworten beteiligt sind, z.B. *betP* und *proP* an hyperosmotischem Stress oder *katA* an oxidativem Stress. Gleichzeitig reprimiert MtrA Gene, die u. a. für Zellwandpeptidasen (*mepA*, *nlpC*, *mepB*) sowie für einen Wachstumsfaktor (*rpf2*) kodieren (Brockner and Bott, 2006).

1.3 Aktivierung von PhoR durch Phosphorylierung

Die Aktivität von Antwortregulatoren wird über ihren Phosphorylierungsstatus reguliert. Wie einleitend für das klassische 2-KS beschrieben, führt die Erkennung eines spezifischen externen Stimulus durch die Sensorkinase zu einer Phosphorylierungskaskade, wodurch ein Phosphorylgruppentransfer vom Histidin-Rest der Kinase-Domäne des Sensors auf einen konservierten Aspartat-Rest innerhalb der Regulator-Domäne des Antwortregulators erfolgt (siehe III. 1.1, Stock *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung löst eine Konformationsänderung des Antwortregulators aus, die zu einer Aktivierung der Effektor-Domäne führt. Eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität nach Phosphorylierung konnte z. B. für CitB aus *Klebsiella pneumoniae* (Meyer *et al.*, 1997) und NarL aus *E. coli* (Zhang *et al.*, 2003) nachgewiesen werden. Durch Röntgenstrukturanalysen konnte für das *E. coli* NarL-Protein gezeigt werden, dass es durch Phosphorylierung eine Strukturänderung erfährt, die in einer offenen Konformation resultiert. Während im nicht-phosphorylierten Zustand eine geschlossene Konformation vorliegt, d. h. N- und C-terminale Domäne von NarL liegen eng beieinander, führt die Phosphorylierung zu einer „Trennung“ der N- und C-terminalen Domäne, so dass Schlüsselemente der C-terminalen Effektor-Domäne für die Interaktion mit der DNA frei vorliegen (Zhang *et al.*, 2003).

Zum Nachweis der Regulation der *C. glutamicum* PhoR-Aktivität durch Phosphorylierung wurden *in vitro*-Phosphorylierungsstudien mit gereinigtem PhoR und der gereinigten Kinase-Domäne der Sensorkinase PhoS, als PhoSK bezeichnet, durchgeführt (siehe V. 2.4). Dabei zeigte PhoSK wie eine Reihe anderer isolierter Kinase-Domänen eine konstitutive Autophosphorylierungsaktivität (siehe Abb. V. 9). Ein Maximum an phosphoryliertem PhoSK konnte nach 5 Minuten Inkubationszeit beobachtet werden, während danach eine Dephosphorylierung zu verzeichnen war. Einige Histidin-Kinasen zeigen eine Autophosphataseaktivität gegenüber ihrer eigenen His-Phosphatgruppe (Mascher *et al.*, 2006), doch würden weitere Experimente notwendig sein, um dies für PhoS nachzuweisen. Nach Zugabe von PhoR zu dem Phosphorylierungsansatz konnte ein effizienter Phosphorylgruppentransfer auf den Antwortregulator beobachtet werden (siehe Abb. V. 10). Dabei zeigte der N-terminale His-„tag“ keinen störenden Effekt auf die Phosphorylierungsreaktion, denn sowohl PhoR_{N-His10} (Daten nicht gezeigt), als auch PhoR_{N-H} lagen bereits nach 1 Minute phosphoryliert vor (siehe Abb. V. 10).

Vergleichende Gelretardationsexperimente mit unphosphoryliertem PhoR_{N-His10} und PhoR_{N-H} sowie PhoR_{N-His10}~P und PhoR_{N-H}~P zeigten, dass PhoR durch Phosphorylierung eine erhöhte Bindungsaffinität zu seinen Zielpromotoren erlangt. Gleichzeitig konnte mit diesen Experimenten nachgewiesen werden, dass der N-terminale His-„tag“ die DNA-Bindungsaffinität von PhoR vermindert (siehe Abb. V. 11). Durch proteolytische Abspaltung des N-terminalen His-„tags“ sowie durch die anschließende Phosphorylierung konnte die DNA-Bindungsaffinität von PhoR ca. 10-fach gesteigert werden. Die Steigerung der DNA-Bindungsaffinität von PhoR durch Phosphorylierung um ca. den Faktor 5 konnte für jedes der bisher bekannten Zielgene einzeln bestätigt werden (siehe Abb. V. 12 und 13). Da man keine Aussage darüber machen kann, wieviel Prozent des eingesetzten PhoR-Proteins unter den gewählten experimentellen Bedingungen tatsächlich phosphoryliert vorlag, stellt der Faktor 5 einen Minimalwert dar. Für PhoP aus *B. subtilis* konnte durch Phosphorylierung eine ca. 10-fache Steigerung der *in vitro*-DNA-Bindungsaffinität beobachtet werden (Liu *et al.*, 1998a).

1.4 PhoR bindet an einen für OmpR-Regulatoren typischen „direct repeat“

Zur Lokalisierung der Bindestellen von PhoR in den Promotorregionen der Zielgene und zur Ableitung eines PhoR-Bindemotivs wurden Gelretardationsexperimente mit PhoR_{N-H}~P und Subfragmenten der Promotorregionen von *pstSCAB* und *phoRS* durchgeführt, zu denen PhoR_{N-H}~P in den vorangegangenen Experimenten die höchste Bindungsaffinität aufwies (Abb. V. 14). Im Fall von *pstS* konnten zwei Regionen (-176 bis -194 und -99 bis -136) und im Fall von *phoR* eine Region (-43 bis -61) identifiziert werden, innerhalb derer sich eine PhoR-Bindestelle befinden muss (siehe V. 2.8). Eine bioinformatische Analyse dieser drei DNA-Regionen gab keinen eindeutigen Hinweis auf ein konserviertes Bindemotiv, so dass davon auszugehen ist, dass die PhoR-Bindestelle eine hohe Sequenzvariabilität aufweist. Daher wurde die promotordistale Bindestelle im *pstS*-Promotor sowie die Bindestelle im *phoR*-Promotor durch Mutationsanalysen weiter charakterisiert (Abb. V. 15 und 16). Basierend auf diesen Analysen wurden zwei 19-bp-Regionen als PhoR-Bindungsstellen definiert (Abb. V. 17).

Dieses Konsensusmotiv besteht aus zwei schwach konservierten 8 bp langen „direct repeats“, die durch 3 bp getrennt werden. Die Bindung an „direct repeats“ ist für OmpR-Typ-Antwortregulatoren mit einem „winged Helix-turn-Helix-Motif“, zu denen der Transkriptionsregulator PhoR gehört, typisch (Martinez-Hackert and Stock, 1997). Dabei ist die Nukleotidsequenz, aber auch die Anzahl an Sequenzwiederholungen und die Anzahl der Basen, die die Sequenzwiederholungen trennen, variabel. Ein 8-3-8 Motiv wurde auch für den Regulator MprA aus *M. tuberculosis* (He and Zahrt, 2005; He *et al.*, 2006) und kürzlich für den Antwortregulator MtrA aus *C. glutamicum* (Brocker, 2006) beschrieben. PhoP aus *B. subtilis* bindet dagegen an eine direkte Wiederholung aus je sechs Basen, die durch fünf Basen getrennt werden (Liu *et al.*, 1998b).

Es gibt mehrere Gründe für die Vermutung, dass PhoR als Dimer an die 19 bp lange Bindestelle bindet. Zum einen konnte für ein DNA-bindendes Protein nachgewiesen werden, dass es ca. fünf Basen erkennt (Müller-Hill, 1996), zum anderen besteht das Motiv aus einer Sequenzwiederholung. Für einige Antwortregulatoren, z. B. für *E. coli* PhoB (Bachhawat *et al.*, 2005; Fiedler and Weiss, 1995; McCleary, 1996) und NtrC (Fiedler and Weiss, 1995) sowie für *B. subtilis* Spo0A (Asayama *et al.*, 1995) konnte eine Oligomerisierung durch Phosphorylierung nachgewiesen werden. *B. subtilis* PhoP dimerisiert dagegen sowohl im phosphoryliertem als auch im unphosphoryliertem Zustand (Liu and Hulett, 1997). Gelfiltrationsanalysen zeigten, dass PhoP in Lösung als Dimer vorliegt und die Dimerisierungsdomäne am N-Terminus liegt (Liu and Hulett, 1997).

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Größenausschlusschromatographie und massenspektrometrische Untersuchungen zur Bestimmung der nativen Größe von PhoR_{N-H} deuteten darauf hin, dass PhoR_{N-H} in Lösung vorwiegend als Monomer vorliegt und nur ein geringer Anteil eventuell als Dimer vorkommt (V. 2. 2). Auch Gelfiltrationsanalysen mit phosphoryliertem PhoR_{N-H} gaben keinen Hinweis auf eine vorwiegend dimere Form von PhoR_{N-H}. Eine monomere Form konnte auch für MprA aus *M. tuberculosis* sowie für OmpR aus *E. coli* nachgewiesen werden (He and Zahrt, 2005; Martinez-Hackert and Stock, 1997). Im Fall von OmpR wird die Dimerisierung sowohl durch Phosphorylierung, als auch durch Bindung an die DNA stimuliert (Maris *et al.*, 2005). Letzteres könnte man sich daher auch im Fall von PhoR aus *C. glutamicum* vorstellen.

Die Bestätigung dieses nur schwach konservierten Bindemotivs erfolgte mit Hilfe von Mutationsanalysen (Abb. V. 18). Dabei konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Länge des „spacer“ mit 3 bp notwendig für die Interaktion mit PhoR_{N-H}-P ist (Abb. V. 18; Fragmente 6 bis 8), sondern auch die direkte Sequenzwiederholung an sich (Abb. V. 18; Fragmente 9 bis

11). Ähnliche Ergebnisse wurden für den Regulator MprA aus *M. tuberculosis* publiziert (He and Zahrt, 2005). Auch hier zeigt sich, dass die Veränderung der Länge des „spacers“ sowie der Austausch von vier der acht Basen der Sequenzwiederholung zu einer kompletten Inhibierung der Interaktion führten. Der Austausch der ersten Base innerhalb der Sequenzwiederholung des abgeleiteten Bindemotivs (Abb. V. 18, Fragment 1) führte zu einer Optimierung des PhoR-Bindemotivs, d. h. ein 26-facher molarer PhoR_{N-H}-P Überschuss war ausreichend, um eine vollständige Retardation der eingesetzten DNA zu erreichen (Abb. V. 18, Fragment 3). Eine erhöhte Bindungsaffinität von PhoR_{N-H}-P konnte auch durch Austausch von einzelnen Basen innerhalb der Bindestelle in dem *pstS*- und *phoR*-Promotor beobachtet werden (Abb. V. 15 und 16). Vergleicht man diese eingeführten Mutationen mit dem optimierten PhoR-Bindemotiv (Abb. V. 18, Fragment 3), so erkennt man, dass die eingeführten Mutationen zu einer Angleichung an das optimierte PhoR-Bindemotiv führen (Abb. V. 19). Diese Ergebnisse unterstützen die postulierte, aber von den beiden experimentell bestimmten Bindungsstellen nicht eindeutig abzuleitende Struktur des postulierten PhoR-Bindemotivs als „8-bp direct repeat“ mit einem 3-bp-„spacer“. Darüber hinaus konnte die Relevanz der identifizierten PhoR-Bindestelle innerhalb der *phoR*-Promotorregion (V. 2.12) und der *pstS*-Promotorregion (Sorger-Herrmann, 2006) auch *in vivo* mittels Transkriptionsfusionsanalysen nachgewiesen werden.

Die Suche nach dem optimierten PhoR-Bindemotiv (Abb. VI. 1, Nr. 3) in den weiteren Promotorregionen, an die PhoR *in vitro* bindet (Abb. V. 13), ergab, dass in allen Regionen mindestens eine Sequenz mit Ähnlichkeit zu dem Motiv vorkommt (Abb. VI. 1, Nr. 4 bis 15). In der Region -99 bis -136 des *pstSCAB*-Promotors, die aufgrund der Bindungsexperimente eine PhoR-Bindestelle beinhaltet (Abb. V. 14), konnten zwei mögliche Sequenzen identifiziert werden (Abb. VI. 1, Nr. 4 und 5). Beide zeigten acht Übereinstimmungen in den beiden „direct repeats“, jedoch enthielt nur die erste Sequenz die gut konservierte TGTGA-Sequenz im ersten „repeat“. Um die Relevanz der vorgeschlagenen Bindestellen zu verifizieren, würde es weiterer Experimente bedürfen. Innerhalb der Promotorregion von *pitA* konnte nur eine Sequenz mit sechs Übereinstimmungen zum vorgeschlagenen Konsensus-Motiv identifiziert werden, obwohl man basierend auf der Affinität von PhoR zu diesem Promotor eine größere Identität erwartet hätte. Eine solche Proportionalität zwischen *in-vitro*-Bindungsaffinität und Übereinstimmung der potentiellen Bindungsstellen mit dem Konsensusmotiv gibt es jedoch auch nicht bei den anderen Promotoren. In der Promotorregion von *glpQ1* z. B., zu der PhoR die niedrigste DNA-Bindungsaffinität aufwies (Abb. V. 13), konnte eine Sequenz mit 10 Übereinstimmungen identifiziert werden. Wenn die

postulierten PhoR-Bindestellen (Abb. VI. 1, Nr. 4 bis 15) richtig sind, so müsste die unterschiedliche PhoR-Affinität andere Ursachen haben. Eine Möglichkeit wäre, dass auch die Struktur der DNA bei der Interaktion mit PhoR eine Rolle spielt.

Nr.	Gen	Sequenz (5' → 3')	Position			
1	<i>pstS</i>	CCTGTGAGAATAATAAGAA	-194	bis	-176	TS
2	<i>phoR</i>	ACTGTGAATGTACTGAAAG	-43	bis	-61	TS
3	Motiv	CCTGTGAANNCCCTGTGAA				
4	<i>pstS</i>	TTTGTGATTAGAGTCTCCA	-135	bis	-117	TS
5	<i>pstS</i>	CATTGGAGACTCTAATCA	-113	bis	-131	TS
6	<i>phoC</i>	AATGTGAACGCCTTAAAC	-159	bis	-141	TL
7	<i>ushA</i>	TGGGTGAACAGTACATAAA	-80	bis	-62	TS
8	<i>porB</i>	TATGTGAATGCTCTACTAA	-147	bis	-165	TL
9	<i>ugpA</i>	ACTGGGAGCAGGCTTCCAA	-148	bis	-130	TS
10	<i>pitA</i>	TTGGGGCTATAGCTATTAT	-6	bis	-24	TL
11	<i>nucH</i>	CCTATTAGCTGACCTTAT	-90	bis	-108	TS
12	<i>phoH1</i>	ACTAGCAATGGTTTGTGGG	-242	bis	-260	TL
13	<i>phoH1</i>	AGTGTGAAGCATATGAACC	-132	bis	-114	TL
14	<i>glpQ1</i>	TCACTGAATCCGCTGCGGA	-248	bis	-266	TL
15	<i>glpQ1</i>	CCGTTGAAGCAGCTGTCCG	-203	bis	-221	TL

Abb.VI.1: Sequenzvergleich der verifizierten und postulierten PhoR-Bindestellen. Die Bindestellen 1 und 2 wurden durch Gelretardationsexperimente identifiziert und daraus ein hypothetisches PhoR-Bindemotiv (Nr.3) abgeleitet, dessen Relevanz durch weitere experimentelle Daten gestützt wird. Dieses Bindemotiv wurde anschließend in den Promotorregionen der anderen Ziegene gesucht (Nr. 4 bis 15). Die Position der Sequenzen ist in Bezug auf den Transkriptionsstart (TS, +1) angegeben, oder, wenn dieser nicht bekannt ist, in Bezug auf den postulierten Translationsstart (TL, +1).

Ob ein Transkriptionsregulator aktivierend oder inhibierend wirkt, ist oft abhängig von der Lokalisation der Regulator-Bindestelle innerhalb der Promotorregion des Zielgens. So binden Antwortregulatoren, die als Transkriptionsaktivatoren agieren, meistens in dem Bereich weit stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes, Transkriptionsrepressoren dagegen meistens in der Nähe oder stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes, so dass sie die RNA-Polymerase an der Interaktion mit der DNA direkt hindern (Babu and Teichmann, 2003). In der Promotorregion von *pstSCAB* konnte eine PhoR-Bindestelle im Bereich -194 bis -176 identifiziert werden, während die PhoR-Bindestelle im *phoRS*-Promotor zwischen -43 bis -61

liegt (Abb. V. 2.14). Während die Lokalisierung der PhoR-Bindestelle in dem *phoRS*-Promotor eine direkte Interaktion mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase erlauben würde, liegt die PhoR-Bindestelle in der Promotorregion von *pstSCAB* so weit stromaufwärts, dass eine Biegung der DNA für eine Interaktion mit der RNA-Polymerase notwendig ist. Eine solche Biegung könnte, wie im Fall des H-NS-Proteins aus *E. coli*, mittels „atomic force microscopy“ nachgewiesen werden (Dame *et al.*, 2000). Die Position der identifizierten und postulierten PhoR-Bindestellen in Bezug auf den Transkriptionsstart steht im Einklang mit der vorhergesagten Funktion von PhoR als Transkriptionsaktivator bzw. Repressor. So finden sich bei Genen, deren Transkription durch PhoR aktiviert wird, Sequenzen mit den meisten Homologien in dem Bereich -43 bis -194 (bezogen auf den Transkriptionsstart), während die postulierte PhoR-Bindestelle in der Promotorregion von *pitA*, dem bislang einzigen vermuteten Gen, dessen Transkription durch PhoR bei Phosphatmangel reprimiert wird, in dem Bereich von -6 bis -24 (bezogen auf den Translationsstart) liegt (Abb. VI. 1, Nr. 10).

1.5 Zusammenfassende Darstellung der Regulation der Phosphatmangelgene durch das Zweikomponenten-System PhoRS von *C. glutamicum*

Zusammenfassend lässt sich die Regulation der Phosphatmangelgene durch das PhoRS-System in *C. glutamicum* folgendermaßen darstellen (Abb. VI. 2): Phosphatmangel wird über einen bislang unbekanntes Mechanismus erkannt, wobei Untersuchungen ausstehen, ob die Sensorkinase PhoS diesen Stimulus detektiert. Es erfolgt eine Autophosphorylierung von PhoS und ein effizienter Phosphorylgruppentransfer auf den Antwortregulator PhoR. Durch Phosphorylierung erfährt PhoR eine mindestens 5-fach erhöhte Bindungsaffinität. Phosphoryliertes PhoR bindet sehr wahrscheinlich an Variationen des Bindemotivs CCTGTGAA_{NNN}CCTGTGAA, das eine direkte Sequenzwiederholung von je 8 bp, getrennt durch 3 bp, darstellt. Vermutlich agiert PhoR~P sowohl als Transkriptionsaktivator wie auch als Transkriptionsrepressor.

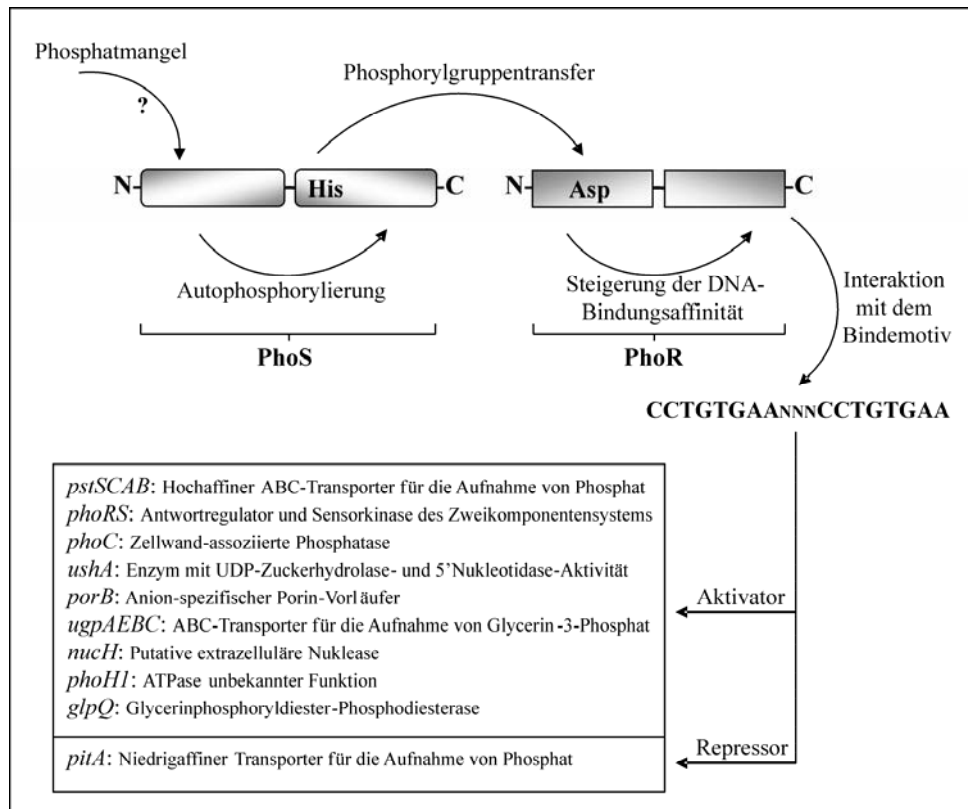


Abb. VI. 2: Modell der Regulation der Phosphatmangelgene in *C. glutamicum* durch das Zweikomponenten-System PhoRS.

2. Einfluss von PhoRS und unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen auf die Lysinproduktion von *C. glutamicum* DM1730

L-Lysin ist als essentielle Aminosäure sowie als Futtermitteladditiv von großer Bedeutung und wird biotechnologisch durch veränderte *C. glutamicum*-Stämme produziert. Der Modellstamm DM1730 (von der Degussa AG erhalten) wurde ausgehend vom Wildtyp ATCC13032 konstruiert und enthält drei gezielt eingeführte Punktmutation (*lysC*-T311I, *hom*-V59A, *pyc*-P458S) sowie eine Deletion des *pck*-Gens, das für die PEP-Carboxykinase kodiert.

Mit diesem Lysin-Modellstamm wurde sowohl der Einfluss des PhoRS-Systems wie auch die Beziehung zwischen der Phosphatversorgung und der Lysinproduktion untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Stamm DM1730/pEKEx2 unter Phosphatmangelbedingungen (0,6 mM Phosphat) eine um ca. 13 % gesteigerte Lysin-Produktivität besaß als unter Phosphatüberschuss (13 mM Phosphat). Neben der Produktivität war auch die Lysin-Ausbeute unter Phosphatmangel gesteigert, während unter diesen Bedingungen eine niedrigere End-OD₆₀₀ erreicht wurde (Abb. V. 21; Tab. V. 2). Auffallend bei der Lysinproduktion bei Phosphatüberschuss war, dass diese erst nach der vollständigen Aufnahme der Glukose aus dem Medium erfolgte (Abb. V. 21C und D). Demnach bildet DM1730 entweder Nebenprodukte, die bei Glukosemangel rekonsumiert werden und für die Lysin-Bildung verwendet werden, oder die Glukose wird in Form von Glykogen in der Zelle gespeichert. In *C. glutamicum* konnte eine schnelle Anhäufung von Glykogen (bis zu 90 mg pro g Zelltrockengewicht) in der frühen exponentialen Wachstumsphase und dessen Degradation bei Glukoselimitierung beobachtet werden (Seibold *et al.*, 2007). Zum Nachweis, ob DM1730/pEKEx2 Glukose speichert, könnte man die Glykogenkonzentration enzymatisch bestimmen (Parrou and Francois, 1997).

Die erhöhte Lysin-Ausbeute und Gesamt-Produktivität unter Phosphatmangel könnte man durch den Wachstumsdefekt von DM1730/pEKEx2 begründen. Unter Phosphatmangel erreichte DM1730/pEKEx2 lediglich eine halb so hohe End-OD₆₀₀ im Vergleich zu Kultivierung bei Phosphatüberschuss (Abb. V. 21A und B), so dass die Glukose, die nicht für die Biomassebildung verwendet wird, für die Produktion von Lysin eingesetzt werden könnte. Das würde bedeuten, dass die Steigerung der Lysin-Bildung nicht auf den Phosphatmangel an sich zurückzuführen ist, sondern auf die Wachstumslimitation. Um diese Hypothese zu

überprüfen könnten Wachstumsexperimente mit DM1730 unter einer anderen Wachstumslimitation durchgeführt und die Lysinbildung analysiert werden.

Während es keine ausführlichen Daten über den Zusammenhang der Produktion von Primärmetaboliten und der Phosphatversorgung gibt, wurde der Zusammenhang zwischen der Phosphatversorgung und der Biosynthese von Sekundärmetaboliten vielfach beschrieben (Liras *et al.*, 1990; Masuma *et al.*, 1986; Sola-Landa *et al.*, 2003). Die Biosynthese von Sekundärmetaboliten erfolgt gewöhnlich als Antwort auf Kohlenstoff- oder Stickstoff-Limitierung, aber auch im Zusammenhang mit dem Verbrauch von Phosphat (Doull and Vining, 1990; Martin and Demain, 1980; McDowall *et al.*, 1999). Dabei ist der molekulare Mechanismus der Regulation der Produktion von Sekundärmetaboliten unter phosphatlimitierenden Bedingungen weitestgehend unbekannt (Chouayekh and Virolle, 2002; Martin *et al.*, 1994). Die Kontrolle der Biosynthese der Sekundärmetabolite erfolgt auf Transkriptionsebene, dies konnte für die Biosynthese der Sekundärmetabolite Candicidin und Oxytetracycline (McDowall *et al.*, 1999) und für die Primaricin-Biosynthese in *S. natalensis* (Mendes *et al.*, 2007) gezeigt werden, sowie auf posttranskriptionaler Ebene (Liras *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1994). Die umfangreichsten Untersuchungen zwischen der Phosphatversorgung und der Biosynthese von Sekundärmetaboliten wurden für die Actinomyceten *S. coelicolor* und *S. lividans* (Doull and Vining, 1990; Hobbs *et al.*, 1992) und kürzlich für *S. natalensis* (Mendes *et al.*, 2007) beschrieben. In *S. lividans* konnte ein signifikanter Anstieg der Sekundärmetabolite Actinorhodin und Undecylprodigiosin in der Δ phoP- und Δ phoRP-Mutanten verzeichnet werden, während durch Komplementation die Repression der Transkription der Sekundärmetabolite wiederhergestellt werden konnte (Sola-Landa *et al.*, 2003). Demnach scheint das PhoRP-System bei der Regulierung der Biosynthese der Sekundärmetabolite Actinorhodin und Undecylprodigiosin involviert zu sein (Sola-Landa *et al.*, 2003). Da bislang keine PhoP-Bindestellen in den Promotorregionen der Biosynthesegene der Sekundärmetabolite Actinorhodin und Undecylprodigiosin identifiziert werden konnten, wird jedoch eher eine indirekte Regulierung durch PhoRP vermutet (Martin, 2004). Demnach könnte die Aktivierung der Biosynthesegene durch einen spezifischen Regulator des Stoffwechselweges erfolgen, dessen Aktivität wiederum durch den vorherrschenden Phosphatlevel kontrolliert wird (Martin, 2004). Eine indirekte Beteiligung von PhoRP wurde auch bei der Regulierung der Primaricin-Biosynthesegene in *S. natalensis* vorgeschlagen (Mendes *et al.*, 2007). Hier wurde die Primaricin-Produktion um bis zu 80 % in einer Δ phoP- und Δ phoRP-Mutante gesteigert (Mendes *et al.*, 2007).

Um den Einfluss des PhoRS-Systems aus *C. glutamicum* auf die Lysinproduktion zu untersuchen, wurde die Deletionsmutante DM1730 Δ phoRS/pEKEEx2 sowie die Komplementationsmutante DM1730 Δ phoRS/pEKEEx2-phoRS konstruiert (V. 3.1). Überraschenderweise zeigte die Deletionsmutante jedoch einen signifikanten Wachstumsdefekt bei der Vorkultivierung in Flüssigmedium, so dass keine Wachstumsexperimente mit diesem Stamm durchgeführt werden konnten. Wachstumsexperimente mit der Komplementationsmutante unter nicht-induzierenden Bedingungen zeigten, dass die Kulturen des Stammes DM1730 Δ phoRS/pEKEEx2-phoRS ein ähnliches Verhalten wie der Stamm DM1730/pEKEEx2 aufwiesen (Abb. V. 23A und E; Tab. V. 2). Sehr wahrscheinlich findet auch ohne IPTG-Induktion von pEKEEx2-phoRS eine basale Expression der phoRS-Gene statt, so dass dadurch die Wildtyp-Situation, d. h. die Situation von DM1730, wiederhergestellt ist. Unter induzierenden Bedingungen bei Kultivierung mit 13 mM Phosphat zeigte sich jedoch ein anderes Verhalten (Abb. V. 22B; Abb. V. 23B). So zeigten die Kulturen des Stammes DM1730 Δ phoRS/pEKEEx2-phoRS zum einen eine sehr niedrige Wachstumsrate (Tab. V. 2). Neben diesem Effekt zeigte sich eine erhöhte Lysin-Ausbeute und auch die Gesamt-Produktivität war um 60 % im Vergleich zu DM1730/pEKEEx2 kultiviert unter Phosphatüberschuss gesteigert. Ob die beobachteten Effekte spezifisch auf die Überproduktion von PhoRS zurückzuführen sind müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. Denkbar wären zum einen vergleichende Transkriptomanalysen mit den Stämmen DM1730/pEKEEx2 und DM1730 Δ phoRS/pEKEEx2-phoRS, zum anderen könnte man durch Überproduktion eines anderen 2-KS aus *C. glutamicum* nachweisen, ob der beobachtete Effekt auf PhoRS zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch Kultivierung bei Phosphatmangel die Produktivität von DM1730/pEKEEx2 um etwa 13 % gegenüber der Kultivierung bei Phosphatüberschuss gesteigert werden konnte. Darüber hinaus zeigte die Überproduktion von PhoRS unter Phosphatüberschussbedingungen einen positiven Einfluss auf die Lysinbildung, so dass eine Produktivitätssteigerung von ca. 60 % gegenüber DM1730/pEKEEx2 ohne IPTG bei Phosphatüberschuss erreicht werden konnte. Doch es bedarf weiterer Experimente um den molekularen Mechanismus, der hinter den beobachteten Effekten steht, aufzuklären.

VII Literaturverzeichnis

- Abe, S., Takayama, K., and Kinoshita, S. (1967) Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* **13**: 279-301.
- Alex, L.A., Korch, C., Selitrennikoff, C.P., and Simon, M.I. (1998) COS1, a two-component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7069-7073.
- Allen, M.P., Zumbrennen, K.B., and McCleary, W.R. (2001) Genetic evidence that the alpha5 helix of the receiver domain of PhoB is involved in interdomain interactions. *J Bacteriol* **183**: 2204-2211.
- Andersen, A.B., Ljungqvist, L., and Olsen, M. (1990) Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *J Gen Microbiol* **136**: 477-480.
- Antelmann, H., Scharf, C., and Hecker, M. (2000) Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J Bacteriol* **182**: 4478-4490.
- Arribas-Bosacoma, R., Kim, S.K., Ferrer-Orta, C., Blanco, A.G., Pereira, P.J., Gomis-Ruth, F.X., Wanner, B.L., Coll, M., and Sola, M. (2007) The X-ray crystal structures of two constitutively active mutants of the *Escherichia coli* PhoB receiver domain give insights into activation. *J Mol Biol* **366**: 626-641.
- Asayama, M., Yamamoto, A., and Kobayashi, Y. (1995) Dimer form of phosphorylated Spo0A, a transcriptional regulator, stimulates the *spo0F* transcription at the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **250**: 11-23.
- Babu, M.M., and Teichmann, S.A. (2003) Functional determinants of transcription factors in *Escherichia coli*: protein families and binding sites. *Trends in Genetics* **19**: 75-79.
- Bachhawat, P., Swapna, G.V., Montelione, G.T., and Stock, A.M. (2005) Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure* **13**: 1353-1363.
- Baek, J.H., and Lee, S.Y. (2006) Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **264**: 104-109.
- Bergmeyer, H.U., Bernt, B., Schmidt, F., and Stork, H. (1974) Glucosetest. In Methoden der enzymatischen Analysen II, Bergmeyer, H.U., ed., VCH Weinheim, pp. 1241-1246.
- Bijlsma, J.J., and Groisman, E.A. (2003) Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol* **11**: 359-366.
- Birkey, S.M., Liu, W., Zhang, X., Duggan, M.F., and Hulett, F.M. (1998) Pho signal transduction network reveals direct transcriptional regulation of one two-component system by another two-component regulator: *Bacillus subtilis* PhoP directly regulates production of ResD. *Mol Microbiol* **30**: 943-953.

- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braibant, M., Lefevre, P., de Wit, L., Ooms, J., Peirs, P., Huygen, K., Wattiez, R., and Content, J. (1996a) Identification of a second *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding proteins of an ABC phosphate transporter. *FEBS Lett* **394**: 206-212.
- Braibant, M., Lefevre, P., de Wit, L., Peirs, P., Ooms, J., Huygen, K., Andersen, A.B., and Content, J. (1996b) A *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding proteins of a phosphate transporter homologous to the *Escherichia coli* Pst system. *Gene* **176**: 171-176.
- Brocker, M. (2006) MtrA, ein bifunktionaler Antwortregulator aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Brocker, M., and Bott, M. (2006) Evidence for activator and repressor functions of the response regulator MtrA from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **264**: 205-212.
- Burbulys, D., Trach, K.A., and Hoch, J.A. (1991) Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.
- Chang, Z., Choudhary, A., Lathigra, R., and Quijcho, F.A. (1994) The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J Biol Chem* **269**: 1956-1958.
- Chauhan, N., Inglis, D., Roman, E., Pla, J., Li, D., Calera, J.A., and Calderone, R. (2003) *Candida albicans* response regulator gene SSK1 regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot Cell* **2**: 1018-1024.
- Chouayekh, H., and Virolle, M.J. (2002) The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol* **43**: 919-930.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.

- C. elegans* consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**: 2012-2018.
- Cotter, P.A., and DiRita, V.J. (2000) Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol* **54**: 519-565.
- Dame, R.T., Wyman, C., and Goosen, N. (2000) H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* **28**: 3504-3510.
- Deora, R., Bootsma, H.J., Miller, J.F., and Cotter, P.A. (2001) Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol* **40**: 669-683.
- Doull, J.L., and Vining, L.C. (1990) Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol* **32**: 449-454.
- Eggeling, L., and Sahm, H. (1999) L-Glutamate and L-Lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 146-153.
- Eggeling, L., Krumbach, K., and Sahm, H. (2001) L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: why is penicillin treatment or Tween addition doing the same? *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 67-68.
- Eggeling, L., and Bott, M. (2005) "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*." CRC Press, Boca Raton, USA.
- Eikmanns, B.J., Kleinertz, E., Liebl, W., and Sahm, H. (1991a) A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**: 93-98.
- Eikmanns, B.J., Metzger, M., Reinscheid, D., Kircher, M., and Sahm, H. (1991b) Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**: 617-622.
- Eldakak, A., and Hulett, F.M. (2007) Cys303 in the histidine kinase PhoR is crucial for the phosphotransfer reaction in the PhoPR two-component system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**: 410-421.
- Ellison, D.W., and McCleary, W.R. (2000) The unphosphorylated receiver domain of PhoB silences the activity of its output domain. *J Bacteriol* **182**: 6592-6597.
- Eymann, C., Mach, H., Harwood, C.R., and Hecker, M. (1996) Phosphate-starvation-inducible proteins in *Bacillus subtilis*: a two-dimensional gel electrophoresis study. *Microbiology* **142**: 3163-3170.
- Fabret, C., Feher, V.A., and Hoch, J.A. (1999) Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol* **181**: 1975-1983.

- Fiedler, U., and Weiss, V. (1995) A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. *Embo J* **14**: 3696-3705.
- Follettie, M.T., Shin, H.K., and Sinskey, A.J. (1988) Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* and *thrC* loci. *Mol Microbiol* **2**: 53-62.
- Galperin, M.Y. (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**: 4169-4182.
- Gerstmeir, R., Cramer, A., Dangel, P., Schaffer, S., and Eikmanns, B.J. (2004) RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **186**: 2798-2809.
- Gonzalo Asensio, J., Maia, C., Ferrer, N.L., Barilone, N., Laval, F., Soto, C.Y., Winter, N., Daffe, M., Gicquel, B., Martin, C., and Jackson, M. (2006) The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **281**: 1313-1316.
- Gupta, S., Sinha, A., and Sarkar, D. (2006) Transcriptional autoregulation by *Mycobacterium tuberculosis* PhoP involves recognition of novel direct repeat sequences in the regulatory region of the promoter. *FEBS Lett* **580**: 5328-5338.
- Han, J.S., Park, J.Y., Lee, Y.S., Thony, B., and Hwang, D.S. (1999) PhoB-dependent transcriptional activation of the *iciA* gene during starvation for phosphate in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **262**: 448-452.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA-cloning, Glover, D.M., ed., Oxford/Washington DC: IRL-Press, pp. 109-135.
- Harris, R.M., Webb, D.C., Howitt, S.M., and Cox, G.B. (2001) Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 5008-5014.
- He, H., and Zahrt, T.C. (2005) Identification and characterization of a regulatory sequence recognized by *Mycobacterium tuberculosis* persistence regulator MprA. *J Bacteriol* **187**: 202-212.
- He, H., Hovey, R., Kane, J., Singh, V., and Zahrt, T.C. (2006) MprAB is a stress-responsive two-component system that directly regulates expression of sigma factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **188**: 2134-2143.
- Hermann, T. (2003) Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol* **104**: 155-172.

- Hobbs, G., Obanye, A.I., Petty, J., Mason, J.C., Barratt, E., Gardner, D.C., Flett, F., Smith, C.P., Broda, P., and Oliver, S.G. (1992) An integrated approach to studying regulation of production of the antibiotic methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **174**: 1487-1494.
- Hove-Jensen, B. (1996) Phosphoribosyl diphosphate synthetase-independent NAD de novo synthesis in *Escherichia coli*: a new phenotype of phosphate regulon mutants. *J Bacteriol* **178**: 714-722.
- Hulett, F.M., Kim, E.E., Bookstein, C., Kapp, N.V., Edwards, C.W., and Wyckoff, H.W. (1991) *Bacillus subtilis* alkaline phosphatases III and IV. Cloning, sequencing, and comparisons of deduced amino acid sequence with *Escherichia coli* alkaline phosphatase three-dimensional structure. *J Biol Chem* **266**: 1077-1084.
- Hulett, F.M. (1996) The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 933-939.
- Hulett, F.M. (2002) The Pho regulon, p. 193-201. In J. A. Sonenshein and R. M. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. *ASM Press, Washington, D.C.*
- Ishige, T., Krause, M., Bott, M., Wendisch, V.F., and Sahm, H. (2003) The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. *J Bacteriol* **185**: 4519-4529.
- Jäger, W., Schafer, A., Puhler, A., Labes, G., and Wohlleben, W. (1992) Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **174**: 5462-5465.
- Jones, B.N., and Gilligan, J.P. (1983) *o*-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J Chromatogr* **266**: 471-482.
- Kalinowski, J., Cremer, J., Bachmann, B., Eggeling, L., Sahm, H., and Puhler, A. (1991) Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **5**: 1197-1204.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D.A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegrabe, I., and Tauch, A. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* **104**: 5-25.
- Kanamaru, K., and Mizuno, T. (1992) Signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*: a novel mutant of the positive regulator, OmpR, that functions in a phosphorylation-independent manner. *J Biochem* **111**: 425-430.

- Kapp, N.V., Edwards, C.W., Chesnut, R.S., and Hulett, F.M. (1990) The *Bacillus subtilis* *phoAIV* gene: effects of in vitro inactivation on total alkaline phosphatase production. *Gene* **96**: 95-100.
- Kelle, R., Hermann, T., and Bathe, B. (2005) L-Lysine Production. p. 467-490. In L. Eggeling and M. Bott (ed.), Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Ketela, T., Brown, J.L., Stewart, R.C., and Bussey, H. (1998) Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. *Mol Gen Genet* **259**: 372-378.
- Kim, H.J., Kim, T.H., Kim, Y., and Lee, H.S. (2004) Identification and characterization of *glxR*, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **186**: 3453-3460.
- Kinoshita, S., Udaka, S., and Shimono, M. (1957) "Studies on the amino acid fermentation. Production of L-glutamic acid by various microorganisms." *J Gen Appl Microbiol* **3**: 193-205.
- Kocan, M. (2005) Regulation of the phosphate starvation response in *Corynebacterium glutamicum* by the PhoRS two-component system. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Kocan, M., Schaffer, S., Ishige, T., Sorger-Herrmann, U., Wendisch, V.F., and Bott, M. (2006) Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J Bacteriol* **188**: 724-732.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lahooti, M., and Harwood, C.R. (1999) Transcriptional analysis of the *Bacillus subtilis* teichuronic acid operon. *Microbiology* **145**: 3409-3417.
- Lefevre, P., Braibant, M., de Wit, L., Kalai, M., Roeper, D., Grotzinger, J., Delville, J.P., Peirs, P., Ooms, J., Huygen, K., and Content, J. (1997) Three different putative phosphate transport receptors are encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* **179**: 2900-2906.
- Liebl, W. (1991) The genus *Corynebacterium*-nonmedical. In "The prokaryotes". Vol. 2. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. (eds). New York: Springer, pp. 1157-1171.
- Lindroth, P., and Mopper, K. (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by pre-column fluorescence derivatization with *o*-phthaldialdehyde. *Anal Chem* **51**: 1667-1674.

- Link, A.J., Phillips, D., and Church, G.M. (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* **179**: 6228-6237.
- Liras, P., Asturias, J.A., and Martin, J.F. (1990) Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis. *Trends Biotechnol* **8**: 184-189.
- Liu, W., and Hulett, F.M. (1997) *Bacillus subtilis* PhoP binds to the *phoB* tandem promoter exclusively within the phosphate starvation-inducible promoter. *J Bacteriol* **179**: 6302-6310.
- Liu, W., and Hulett, F.M. (1998) Comparison of PhoP binding to the *tuaA* promoter with PhoP binding to other Pho-regulon promoters establishes a *Bacillus subtilis* Pho core binding site. *Microbiology* **144**: 1443-1450.
- Liu, W., Qi, Y., and Hulett, F.M. (1998b) Sites internal to the coding regions of *phoA* and *pstS* bind PhoP and are required for full promoter activity. *Molecular Microbiology* **28**: 119-130.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**: 242-245.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M., and Nakata, A. (1989) Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol* **210**: 551-559.
- Makino, K., Amemura, M., Kawamoto, T., Kimura, S., Shinagawa, H., Nakata, A., and Suzuki, M. (1996) DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase. *J Mol Biol* **259**: 15-26.
- Marina, A., Waldburger, C.D., and Hendrickson, W.A. (2005) Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *Embo J* **24**: 4247-4259.
- Maris, A.E., Walthers, D., Mattison, K., Byers, N., and Kenney, L.J. (2005) The response regulator OmpR oligomerizes via beta-sheets to form head-to-head dimers. *J Mol Biol* **350**: 843-856.
- Martin, J.F., and Demain, A.L. (1980) Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev* **44**: 230-251.
- Martin, J.F., Marcos, A.T., Martin, A., Asturias, J.A., and Liras, P. (1994) Phosphate control of antibiotic biosynthesis at the transcriptional level, p.140-147. In A. Torriani-Gorini, E. Yagil, and S. Silver (ed.), Phosphate in microorganisms. ASM Press, Washington, D.C.
- Martin, J.F. (2004) Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol* **186**: 5197-5201.

- Martinez-Hackert, E., and Stock, A.M. (1997) Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J Mol Biol* **269**: 301-312.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Unden, G. (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 910-938.
- Masuma, R., Tanaka, Y., Tanaka, H., and Omura, S. (1986) Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. *J Antibiot* **39**: 1557-1564.
- McCleary, W.R. (1996) The activation of PhoB by acetylphosphate. *Mol Microbiol* **20**: 1155-1163.
- McDowall, K.J., Thamchaipenet, A., and Hunter, I.S. (1999) Phosphate control of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* is at the level of transcription from promoters overlapped by tandem repeats similar to those of the DNA-binding sites of the OmpR family. *J Bacteriol* **181**: 3025-3032.
- Mendes, M.V., Tunca, S., Anton, N., Recio, E., Sola-Landa, A., Aparicio, J.F., and Martin, J.F. (2007) The two-component *phoR-phoP* system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of *phoP* reduces the negative phosphate regulation of pimarinin biosynthesis. *Metab Eng* **9**: 217-227.
- Meyer, M., Dimroth, P., and Bott, M. (1997) In vitro binding of the response regulator CitB and of its carboxy-terminal domain to A + T-rich DNA target sequences in the control region of the divergent *citC* and *citS* operons of *Klebsiella pneumoniae*. *J Mol Biol* **269**: 719-731.
- Mishra, M., and Deora, R. (2005) Mode of action of the *Bordetella* BvgA protein: transcriptional activation and repression of the *Bordetella bronchiseptica* *bipA* promoter. *J Bacteriol* **187**: 6290-6299.
- Mizuno, T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**: 161-168.
- Möker, N., Brocker, M., Schaffer, S., Kramer, R., Morbach, S., and Bott, M. (2004) Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol Microbiol* **54**: 420-438.
- Müller-Hill, B. (1996) The Lac Operon: A Short History of a Genetic Paradigm. Walter de Gruyter, Berlin.
- Muller, J.P., An, Z., Merad, T., Hancock, I.C., and Harwood, C.R. (1997) Influence of *Bacillus subtilis* *phoR* on cell wall anionic polymers. *Microbiology* **143**: 947-956.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.

- Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H., and Yamada-Okabe, H. (1998) Isolation of CaSLN1 and CaNIK1, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* **144**: 425-432.
- Nakano, M.M., Zhu, Y., Lacelle, M., Zhang, X., and Hulett, F.M. (2000) Interaction of ResD with regulatory regions of anaerobically induced genes in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **37**: 1198-1207.
- Niebisch, A., and Bott, M. (2001) Molecular analysis of the cytochrome bc1-aa3 branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome c1. *Arch Microbiol* **175**: 282-294.
- Oganesyan, V., Oganesyan, N., Adams, P.D., Jancarik, J., Yokota, H.A., Kim, R., and Kim, S.H. (2005) Crystal structure of the "PhoU-like" phosphate uptake regulator from *Aquifex aeolicus*. *J Bacteriol* **187**: 4238-4244.
- Ohlsen, K.L., Grimsley, J.K., and Hoch, J.A. (1994) Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 1756-1760.
- Ota, I.M., and Varshavsky, A. (1993) A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* **262**: 566-569.
- Parkinson, J.S., and Kofoid, E.C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* **26**: 71-112.
- Parkinson, J.S. (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**: 857-871.
- Parrou, J.L., and Francois, J. (1997) A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal Biochem* **248**: 186-188.
- Paul, S., Zhang, X., and Hulett, F.M. (2001) Two ResD-controlled promoters regulate *ctaA* expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 3237-3246.
- Peirs, P., Lefevre, P., Boarbi, S., Wang, X.M., Denis, O., Braibant, M., Pethe, K., Loch, C., Huygen, K., and Content, J. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* with disruption in genes encoding the phosphate binding proteins PstS1 and PstS2 is deficient in phosphate uptake and demonstrates reduced *in vivo* virulence. *Infect Immun* **73**: 1898-1902.
- Perego, M., Hanstein, C., Welsh, K.M., Djavakhishvili, T., Glaser, P., and Hoch, J.A. (1994) Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell* **79**: 1047-1055.
- Perez, E., Samper, S., Bordas, Y., Guilhot, C., Gicquel, B., and Martin, C. (2001) An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol* **41**: 179-187.

- Peters-Wendisch, P.G., Schiel, B., Wendisch, V.F., Katsoulidis, E., Mockel, B., Sahm, H., and Eikmanns, B.J. (2001) Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 295-300.
- Pfefferle, W., Mockel, B., Bathe, B., and Marx, A. (2003) Biotechnological manufacture of lysine. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**: 59-112.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., and Saito, H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**: 865-875.
- Pragai, Z., and Harwood, C.R. (2002) Regulatory interactions between the Pho and sigma(B)-dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148**: 1593-1602.
- Pragai, Z., Allenby, N.E., O'Connor, N., Dubrac, S., Rapoport, G., Msadek, T., and Harwood, C.R. (2004) Transcriptional regulation of the *phoPR* operon in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**: 1182-1190.
- Qi, Y., Kobayashi, Y., and Hulett, F.M. (1997) The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the pho regulon. *J Bacteriol* **179**: 2534-2539.
- Riedel, C., Rittmann, D., Dangel, P., Mockel, B., Petersen, S., Sahm, H., and Eikmanns, B.J. (2001) Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 573-583.
- Rittmann, D., Sorger-Herrmann, U., and Wendisch, V.F. (2005) Phosphate starvation-inducible gene *ushA* encodes a 5' nucleotidase required for growth of *Corynebacterium glutamicum* on media with nucleotides as the phosphorus source. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4339-4344.
- Sahm, H., Eggeling, L., and de Graaf, A.A. (2000) Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biol Chem* **381**: 899-910.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Scarlatto, V., Prugnola, A., Arico, B., and Rappuoli, R. (1990) Positive transcriptional feedback at the *bvg* locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 6753-6757
- Schaaf, S. and Bott, M. (2007) Target genes and DNA-binding sites of the response regulator PhoR from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **189**: 5002-5011

- Schäfer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Puhler, 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.
- Schwarzer, A., and Pühler, A. (1991) Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnology (N Y)* **9**: 84-87.
- Seibold, G., Dempf, S., Schreiner, J., and Eikmanns, B.J. (2007) Glycogen formation in *Corynebacterium glutamicum* and role of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Microbiology* **153**: 1275-1285.
- Shiio, I., and Miyajima, R. (1969) Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*. *J Biochem* **65**: 849-859.
- Shinagawa, H., Makino, K., and Nakata, A. (1983) Regulation of the pho regulon in *Escherichia coli* K-12. Genetic and physiological regulation of the positive regulatory gene *phoB*. *J Mol Biol* **168**: 477-488.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Sola-Landa, A., Moura, R.S., and Martin, J.F. (2003) The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6133-6138.
- Sola-Landa, A., Rodriguez-Garcia, A., Franco-Dominguez, E., and Martin, J.F. (2005) Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol Microbiol* **56**: 1373-1385.
- Sola, M., Gomis-Ruth, F.X., Serrano, L., Gonzalez, A., and Coll, M. (1999) Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain. *J Mol Biol* **285**: 675-687.
- Sorger-Herrmann, U. (2006) Analyse des Mechanismus der Phosphatregulation in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward-Rainey, N. (1997) Proposal of a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 479-491.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., and Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* **53**: 450-490.
- Sun, G., Birkey, S.M., and Hulett, F.M. (1996) Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 941-948.

- van der Rest, M.E., Lange, C., and Molenaar, D. (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 541-545.
- Vasicova, P., Z, A., Nesvera J, P.M., H, S., and B, E. (1998) Integrative and autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Techniques* **12**:743-746.
- Vyas, N.K., Vyas, M.N., and Quioco, F.A. (2003) Crystal structure of *M. tuberculosis* ABC phosphate transport receptor: specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions. *Structure* **11**: 765-774.
- Wagner, R. (2000) Transcription Regulation in Prokaryotes. *Oxford University Press*.
- Walters, S.B., Dubnau, E., Kolesnikova, I., Laval, F., Daffe, M., and Smith, I. (2006) The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol Microbiol* **60**: 312-330.
- Wanner, B.L. (1993) Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* **51**: 47-54.
- Wanner, B.L. (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. p. 1357-1381. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
- Wendisch, V.F., and Bott, M. (2005) Phosphorus metabolism. p. 377-396. In L. Eggeling and M. Bott (ed.), *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Wessel, M. (2003) Funktionelle Analyse des essentiellen Zweikomponenten-Signaltransduktionssystems CgtSR4 aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- West, A.H., and Stock, A.M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**: 369-376.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J., and Klee, H.J. (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. *Science* **270**: 1807-1809.
- Wingens, M. (2004) Charakterisierung des Zweikomponenten-Signaltransduktionssystems CgtSR4 aus *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Wittmann, C., and Becker, J. (2007) The L-lysine story: from metabolic pathways to industrial production. In: Wendisch VF (ed) *Amino acid biosynthesis-pathways, regulation and metabolic engineering*. Springer, Heidelberg, Germany. DOI 10.1007/7171_2006_089.

- Yen, H.C., Lee, S., Tanksley, S.D., Lanahan, M.B., Klee, H.J., and Giovannoni, J.J. (1995) The tomato *Never-ripe* locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homolog of the *Arabidopsis ETR1* gene. *Plant Physiol* **107**: 1343-1353.
- Zhang, J.H., Xiao, G., Gunsalus, R.P., and Hubbell, W.L. (2003) Phosphorylation triggers domain separation in the DNA binding response regulator NarL. *Biochemistry* **42**: 2552-2559.

VIII Anhang

1 Oligonukleotide

Tab. VIII. 1: Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die hier aufgeführten Oligonukleotide wurden von Operon Biotechnologies oder MWG Biotech bezogen. IRD-800 markierte Oligonukleotide wurden ausschließlich von MWG Biotech bezogen.

Name	Sequence (5' → 3')
Oligonukleotide verwendet für die Konstruktion der Plasmide pET16b-PhoR and pMalE-PhoSK:	
<i>phoR-NdeI-fw</i>	CGGGCCCCATATGGACAACCAGTCTGACGGACA
<i>phoR-XhoI-rv</i>	ATATATCTCGAGTTAGCTACGTGGGGTGCGCAGAAC
<i>phoSK-EcoRI-fw</i>	TATATGAATCAATATCATGTTGGAGCAGCTCC
<i>phoSK-PstI-rv</i>	ATATACTGCAGTTAAGAAACCGCCGGCAAGGTG
Oligonukleotide verwendet für die Konstruktion der pET2-Derivate:	
<i>phoR-75 fw</i>	ATATATGTCGACTCCCAATTTCAACTCTTTCAGTACATTC
<i>phoR-42 fw</i>	ATATATGTCGACTAGTATTTCAGTGGTGTGAAGTTCC
<i>phoR+22 fw</i>	ATATATGTCGACGGACACCAATGGAAGAGATAAAAAATGG
<i>phoR+158 rv</i>	ATATATGGATCCGGCGGTCATCACTGCGAAGCCTTG
Oligonukleotide verwendet für die Konstruktion der DM1730/pEKEEx2 Derivate:	
<i>cgtRS3-out-fw</i>	GGAGGATTTTCAGAGGGCGAAAG
<i>cgtRS3-out-rv</i>	GTCGAGCCAATACAGTTTGATCAG
<i>pEKEEx2-fw</i>	GATATGACCATGATTACGCCAAGC
<i>pEKEEx2-rv</i>	CGGCGTTTCACTTGTGAGTTCGGC
Oligonukleotide verwendet für die Interaktionsstudien mit PhoRΔ1-125	
<i>P_{nucH} fw</i>	CGTCGTA CTGATTTTGCGCGAAAGC
<i>P_{nucH} rv</i>	CCGGCAGGATTAGCTGTTTGCTGC
<i>P_{pstS} fw</i>	GGAGATCCGCTTGTTCGCTCG
<i>P_{pstS} rv</i>	GTCGGAGCAAGCTACAAGAGCG
<i>P_{pitA} fw</i>	ATGAAGTTAAAAACATTTTCCGTGAAGC
<i>P_{pitA} rv</i>	CAATGGATGTGGCCATCGCATTGC

<i>P_{ugpA rv}</i>	ACCCAATGAAGGTTGATGTGGGCGA
<i>P_{pitA fw}</i>	ATGAAGTTAAAAACATTTTCCGTGAAGC
<i>P_{ushA rv}</i>	TGCGAGTGCCTGAAGCTAACTGC
<i>P_{ugpA fw}</i>	TTGAGCCCTAGGGGAGTGGTCGG
<i>P_{porB fw}</i>	GCGCCCATCCAACAAATGAGATCACC
<i>P_{porB rv}</i>	GAAGTCGGATGCGGAAGCAGGTGC
<i>P_{acn fw}</i>	ACATCACGCACGTACCCATTTTCG
<i>P_{acn rv}</i>	GCCGGCGTGAGAAAAACATCGG
<i>P_{clpC fw}</i>	CCTGAACACGGCAAGGGTACCTC
<i>P_{clpC rv}</i>	GCGTGCACGATCGGTAAACCTCTC
<i>pstS fw</i> IRD800	TCCAGAATTACAAGAGATTTACGTAGTTGG
<i>pstS rv</i> IRD800	GTAAGTGCGCCACAAGGGCGATGG
<i>pstR fw</i> IRD800	CGGTCAGTGGTACACCGTGAGTG
<i>pstR rv</i> IRD800	GAATTTAAGGCTTACGGTGAGCAGCT
<i>pitA fw</i> IRD800	ATGAAGTTAAAAACATTTTAAGTGAAGCTTTA
<i>pitA rv</i> IRD800	CCTAAAAAGCGTAGAAAACCAAATGTCGATT
<i>ugpA fw</i> IRD800	AATAAAGGGGAGTCAGTGAACATGGAG
<i>ugpA rv</i> IRD800	CCATTCTGTCCGCCTTGATCTCTTGG
Oligonukleotide verwendet für die Gelretardationsexperimente:	
<i>P_{pstS fw}</i>	GGAGATCCGCTTGTTCCGCCTCG
<i>P_{pstS rv}</i>	GTCGGAGCAAGCTACAAGAGCG
<i>P_{nucH fw}</i>	CGTCGTAAGTATTTTGCAGGAAAGC
<i>P_{nucH rv}</i>	CCGGCAGGATTAGCTGTTTGCTGC
<i>P_{acn fw}</i>	ACATCACGCACGTACCCATTTTCG
<i>P_{acn rv}</i>	GCCGGCGTGAGAAAAACATCGG
<i>P_{gpmA fw}</i>	TCTTGGACGATGACGAAACGCGC
<i>P_{gpmA rv}</i>	GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACCGACGCCTGCCTCGACGAGGAG
<i>P_{phoR fw}</i>	ATAATCCCAATTTCAACTCTTTCAGTACA
<i>P_{phoR rv}</i>	ATTCTTGGCATCATGACATCGAGGAT

<i>P_{phoC} fw</i>	TGTACGGGAAATTCTTGAAGGTTCTG
<i>P_{phoC} rv</i>	GTGGACGCAAAATGGCAAAAGCTAA
<i>P_{ushA} fw</i>	GCGATTGCCGCAAAGGAAAAGAGG
<i>P_{ushA} rv</i>	TGCGAGTGCCTGAAGCTAACTGC
<i>P_{ugpA} fw</i>	TTGAGCCCTAGGGGAGTGGTCGG
<i>P_{ugpA} rv</i>	ACCCAATGAAGGTTGATGTGGGCGA
<i>P_{pitA} fw</i>	ATGAAGTTAAAAACATTTTCCGTGAAGC
<i>P_{pitA} rv</i>	CAATGGATGTGGCCATCGCATTGC
<i>P_{phoH1} fw</i>	CTCCGCCGATCCATAGTGTGCG
<i>P_{phoH1} rv</i>	AAGTAACAGAGACTTCCTGCGCACC
<i>P_{glpQ1} fw</i>	AAAGCGCAAAATGCCCGTGGTGG
<i>P_{glpQ1} rv</i>	CGTCAGCGGGCGCGGCAGCC
<i>P_{porB} fw</i>	GCGCCCATCCAACAAATGAGATCACC
<i>P_{porB} rv</i>	GAAGTCGGATGCGGAAGCAGGTGC

Oligonukleotide verwendet für die Fragmentierung des Promotors von *pstS* und *phoR*:

<i>P_{pstS} -90 fw</i>	GTGGGTAGTGGCAGAATTTGCCG
<i>P_{pstS} -99 fw</i>	GGCAGAATTTGCCGAACGATAGC
<i>P_{pstS} -120 fw</i>	TCCAAATGTTACGAGTGAGATGTGG
<i>P_{pstS} -132 fw</i>	GTGATTAGAGTCTCCAAATGTTACGA
<i>P_{pstS} -136 fw</i>	TTTTGTGATTAGAGTCTCCAAATGTTAC
<i>P_{pstS} -140 fw</i>	CGATTTTTGTGATTAGAGTCTCCAAAT
<i>P_{pstS} -373 fw</i>	siehe <i>P_{pstS} fw</i>
<i>P_{pstS} +161 rv</i>	siehe <i>P_{pstS} fw</i>
<i>P_{pstS} +100 rv</i>	GCTTAAGAGTGAGGTTACCGGGG
<i>P_{pstS} +7 rv</i>	GCTCACGACTTAAAAACCTAAGACC
<i>P_{pstS} -175 rv</i>	TTCTTATTATTCTCACAGGTTTTTAGC
<i>P_{pstS} -184 rv</i>	ATTCTCACAGGTTTTTAGCAAGTCTC
<i>P_{pstS} -201 rv</i>	GCAAGTCTCTTTTTACTTTTCGTAAAC
<i>P_{pstS} -222 rv</i>	CGTAAACTACGTGGCTTTCCGCG

<i>P_{phoR} -19 fw</i>	CCAGGGTGTTCACTAGTGGGAAG
<i>P_{phoR} -40 fw</i>	GTATTCAGTGGTGTGAAGTTCCAG
<i>P_{phoR} -61 fw</i>	CTTTCAGTACATTCACAGTTAGTATTC
<i>P_{phoR} -65 fw</i>	AACTCTTTCAGTACATTCACAGTTAG
<i>P_{phoR} -305 fw</i>	GCATCGCGCCCGGCTCTGCAGA
<i>P_{phoR} +238 rv</i>	ATTCTTGGCATCATGACATCGAGGAT
<i>P_{phoR} -60 rv</i>	AGAGTTGAAATTGGGATTATTCCC
<i>P_{phoR} -81 rv</i>	CCCACTCCACATTCTCCAAGTC
<i>P_{phoR} -120 rv</i>	GCCAATGCTTCAATAAGTGTTAAAAAG

Oligonukleotide verwendet für die „Overlap extension“-PCR/ Mutationsanalysen:

<i>P_{pstS co- PCR 1 fw}</i>	AAACCTGTGAGAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{pstS co- PCR 1 rv}</i>	TTCTTATTATTCTCACAGGTTTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS co- PCR 2 fw}</i>	CCCCCTGTGAGAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{pstS co- PCR 2 rv}</i>	TTCTTATTATTCTCACAGGGGAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS co- PCR 3 fw}</i>	AAAAAGGTGAGAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{pstS co- PCR 3 rv}</i>	TTCTTATTATTCTCACCTTTTTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS co- PCR 4 fw}</i>	AAACCTGTGAGAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{pstS co- PCR 4 rv}</i>	TTCTTATTATTCTACAAGGTTTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS co- PCR 5 fw}</i>	AAACCTGTGCTCATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{pstS co- PCR 5 rv}</i>	TTCTTATTATGAGCACAGGTTTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS co- PCR 6 fw}</i>	AAACCTGTGAGACGCATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{pstS co- PCR 6 rv}</i>	TTCTTATGCGTCTCACAGGTTTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS co- PCR 7 fw}</i>	AAACCTGTGAGAATAACGCAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{pstS co- PCR 7 rv}</i>	TTCTGCGTATTCTCACAGGTTTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS co- PCR 8 fw}</i>	AAACCTGTGAGAATAATACTCCATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{pstS co- PCR 8 rv}</i>	GGAGTATTATTCTCACAGGTTTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS co- PCR 9 fw}</i>	AAAACCTGTGAGAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{pstS co- PCR 9 rv}</i>	TTCTTATTATTCTCACAGTTTTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS co- PCR 10 fw}</i>	AAACATGTGAGAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC

<i>P_{pstS} co-PCR 10 rv</i>	TTCTTATTATTCTCACATGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 11 fw</i>	AAACCGGTGAGAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 11 rv</i>	TTCTTATTATTCTCACCGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 12 fw</i>	AAACCTTTGAGAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 12 rv</i>	TTCTTATTATTCTCAAAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 13 fw</i>	AAACCTGGGAGAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 13 rv</i>	TTCTTATTATTCTCCCAGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 14 fw</i>	AAACCTGTTAGAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 14 rv</i>	TTCTTATTATTCTAACAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 15 fw</i>	AAACCTGTGCGAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 15 rv</i>	TTCTTATTATTCTGCACAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 16 fw</i>	AAACCTGTGATAATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 16 rv</i>	TTCTTATTATTATCACAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 17 fw</i>	AAACCTGTGAGCATAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 17 rv</i>	TTCTTATTATGCTCACAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 18 fw</i>	AAACCTGTGAGACTAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 18 rv</i>	TTCTTATTAGTCTCACAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 19 fw</i>	AAACCTGTGAGAAGAATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 19 rv</i>	TTCTTATTCTTCTCACAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 20 fw</i>	AAACCTGTGAGAATCATAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 20 rv</i>	TTCTTATGATTCTCACAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 21 fw</i>	AAACCTGTGAGAATAACTAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 21 rv</i>	TTCTTAGTATTCTCACAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 22 fw</i>	AAACCTGTGAGAATAAGAAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 22 rv</i>	TTCTTCTTATTCTCACAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 23 fw</i>	AAACCTGTGAGAATAATCAGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 23 rv</i>	TTCTGATTATTCTCACAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG
<i>P_{pstS} co-PCR 24 fw</i>	AAACCTGTGAGAATAATACGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS} co-PCR 24 rv</i>	TTCTGATTATTCTCACAGGTTTAGTGTTGCCAGCTCCACATAAAAG

<i>P_{pstS co-PCR 25 fw}</i>	AAACCTGTGAGAATAATAATAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS co-PCR 25 rv}</i>	TTATTATTATTCTCACAGGTTTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{pstS co-PCR 26 fw}</i>	AAACCTGTGAGAATAATAAGCAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS co-PCR 26 rv}</i>	TGCTTATTATTCTCACAGGTTTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{pstS co-PCR 27 fw}</i>	AAACCTGTGAGAATAATAAGACATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS co-PCR 27 rv}</i>	GTCTTATTATTCTCACAGGTTTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{pstS co-PCR 28 fw}</i>	AAAAAGGTGAGAATAATACTCCATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS co-PCR 28 rv}</i>	GGAGTATTATTCTCACCTTTTTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{pstS co-PCR 29 fw}</i>	AAACCGGTGAGAATAATAAGCAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS co-PCR 29 rv}</i>	TGCTTATTATTCTCACCGGTTTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{pstS co-PCR 30 fw}</i>	AAACCGGTGAGAATAATAAGACATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{pstS co-PCR 30 rv}</i>	GTCTTATTATTCTCACCGGTTTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{phoR co-PCR 1 fw}</i>	ACTGTGAATGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{phoR co-PCR 1 rv}</i>	CTTTCAGTACATTCACAGTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{phoR co-PCR 2 fw}</i>	CAGGTGAATGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{phoR co-PCR 2 rv}</i>	CTTTCAGTACATTCACCTGAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{phoR co-PCR 3 fw}</i>	ACTTGTAATGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{phoR co-PCR 3 rv}</i>	CTTTCAGTACATTACAAGTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{phoR co-PCR 4 fw}</i>	ACTGTGCCGGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{phoR co-PCR 4 rv}</i>	CTTTCAGTACCGGCACAGTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{phoR co-PCR 5 fw}</i>	ACTGTGAATTGCCTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{phoR co-PCR 5 rv}</i>	CTTTCAGGCAATTCACAGTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{phoR co-PCR 6 fw}</i>	ACTGTGAATGTAAGTAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{phoR co-PCR 6 rv}</i>	CTTTACTTACATTCACAGTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{phoR co-PCR 7 fw}</i>	ACTGTGAATGTACTGCCCTATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{phoR co-PCR 7 rv}</i>	AGGGCAGTACATTCACAGTAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{phoR co-PCR 8 fw}</i>	CCTGTGAATGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{phoR co-PCR 8 rv}</i>	CTTTCAGTACATTCACAGGAGTGTGTCAGCTCCACATAAAG
<i>P_{phoR co-PCR 9 fw}</i>	AATGTGAATGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC

<i>P_{phoR} co-PCR 9 rv</i>	CTTTCAGTACATTACATTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 10 fw</i>	ACGGTGAATGTAAGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 10 rv</i>	CTTTCAGTACATTACACCGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 11 fw</i>	ACTTTGAATGTAAGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 11 rv</i>	CTTTCAGTACATTCAAAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 12 fw</i>	ACTGGGAATGTAAGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 12 rv</i>	CTTTCAGTACATTCCCAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 13 fw</i>	ACTGTTAATGTAAGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 13 rv</i>	CTTTCAGTACATTAACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 14 fw</i>	ACTGTGCATGTAAGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 14 rv</i>	CTTTCAGTACATGCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 15 fw</i>	ACTGTGACTGTAAGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 15 rv</i>	CTTTCAGTACAGTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 16 fw</i>	ACTGTGAAGGTAAGTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 16 rv</i>	CTTTCAGTACCTTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 17 fw</i>	ACTGTGAATTTACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 17 rv</i>	CTTTCAGTAAATTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 18 fw</i>	ACTGTGAATGGACTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 18 rv</i>	CTTTCAGTCCATTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 19 fw</i>	ACTGTGAATGTCCTGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 19 rv</i>	CTTTCAGGACATTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 20 fw</i>	ACTGTGAATGTAATGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 20 rv</i>	CTTTCATTACATTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 21 fw</i>	ACTGTGAATGTACGAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 21 rv</i>	CTTTCCTGATTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 22 fw</i>	ACTGTGAATGTAAGTACTGCAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 22 rv</i>	CTTTCAGTACATTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG
<i>P_{phoR} co-PCR 23 fw</i>	ACTGTGAATGTAAGTACTTAAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTAAAC
<i>P_{phoR} co-PCR 23 rv</i>	CTTTAAGTACATTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAAG

<i>P_{phoR co-PCR 24 fw}</i>	ACTGTGAATGTA CTGACAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{phoR co-PCR 24 rv}</i>	CTGTCAGTACATTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>P_{phoR co-PCR 25 fw}</i>	ACTGTGAATGTA CTGAACGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{phoR co-PCR 25 rv}</i>	CGTTCAGTACATTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>P_{phoR co-PCR 26 fw}</i>	ACTGTGAATGTA CTGAAATATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>P_{phoR co-PCR 26 rv}</i>	ATTCAGTACATTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>motif 1 fw</i>	ACTGTGAAAATACTGTGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>motif 1 rv</i>	TTCACAGTATTTTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>motif 2 fw</i>	ACTGTGAGAATACTGTGAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>motif 2 rv</i>	CTCACAGTATTCTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>motif 3 fw</i>	CCTGTGAAAATCCTGTGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>motif 3 rv</i>	TTCACAGGATTTTCACAGGAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>motif 4 fw</i>	CCTGTGAGAATCCTGTGAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>motif 4 rv</i>	CTCACAGGATTCTCACAGGAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>motif 5 fw</i>	CATATAAGAATCATATAAGATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>motif 5 rv</i>	CTTATATGATTCTTATATGAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>motif 6 fw</i>	ACTGTGAAAAACTGTGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>motif 6 rv</i>	TTCACAGTTTTTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>motif 7 fw</i>	ACTGTGAAAAC TGTGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>motif 7 rv</i>	TTCACAGTTTTTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>motif 8 fw</i>	ACTGTGAAAATAACTGTGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>motif 8 rv</i>	TTCACAGTATTATTTTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>motif 9 fw</i>	ACTGTGAAAATCCCCCCCCATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>motif 9 rv</i>	GGGGGGGATTTCACAGTAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>motif 10 fw</i>	CCCCCCCCAATACTGTGAAATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>motif 10 rv</i>	TTCACAGTATTGGGGGGGAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG
<i>motif 11 fw</i>	CCCCCCCCAATCCCCCCCCATAGCCCAGAGTTCATAAGTTGTTAAC
<i>motif 11 rv</i>	GGGGGGGATTGGGGGGGAGTGTGCCAGCTTCCACATAAAG

2 PCR-Fragmente für Gelretardationsexperimente

Tab. VIII. 2: Liste der PCR-Fragmente, die für Bandshift-Experimente verwendet wurden.

Gen	Position des PCR-Fragments in Bezug auf den Transkriptionsstart (TS)/Translationsstart (TL)	Länge des PCR-Fragmentes (bp)
Abb. IV. 1:		
<i>nucH</i>	-414 bis +133 (TS)	547
Tab. IV. 1 und Abb. IV. 2:		
<i>pstS</i>	-430 bis +128 (TS)	558
<i>pitA</i>	-354 bis +96 (TL)	460
<i>ugpA</i>	-377 bis +76 (TS)	453
<i>phoR</i>	-247 bis +134	381
Abb. IV. 11:		
<i>phoR</i>	-79 bis +238 (TS)	317
<i>acn</i>	-260 bis +51 (TL)	311
Abb. IV. 12:		
<i>pstS</i>	-369 bis +162 (TS)	531
<i>nucH</i>	-414 bis +133 (TS)	547
<i>gpmA</i>	-197 bis +150 (TL)	347
<i>acn</i>	-260 bis + 51 (TL)	311
Abb. IV. 13:		
<i>pstS</i>	-369 bis +162 (TS)	531
<i>phoR</i>	-79 bis +238 (TS)	317
<i>phoC</i>	-400 bis +70 (TL)	470
<i>ushA</i>	-379 bis +129 (TS)	508
<i>porB</i>	-395 bis +90 (TL)	485
<i>ugpA</i>	-198 bis +208 (TS)	396
<i>pitA</i>	-354 bis +210 (TL)	564
<i>nucH</i>	-414 bis +133 (TS)	547
<i>glpQ1</i>	-385 bis +85 (TL)	470
<i>acn</i>	-260 bis +51 (TL)	311

3 Restriktionskarten der konstruierten Plasmide

pET2-*phoR1*

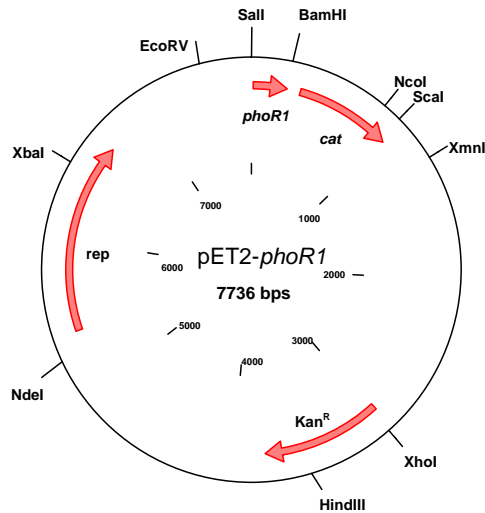


Abb. VIII. 1: Plasmidkarte pET2-*phoR1*: Promotor-Testvektor pET2 mit einem 233 bp PCR-Fragment des *phoR* Promotors (Primer *phoR*-75 fw und *phoR*+158 rv), das die gesamte Promotorregion von *phoR* mit der identifizierten PhoR-Bindestelle sowie der -10 und -35 Region kodiert. Das Fragment wurde über die Sall- und BamHI-Schnittstellen in den Vektor kloniert.

pET2-*phoR2*

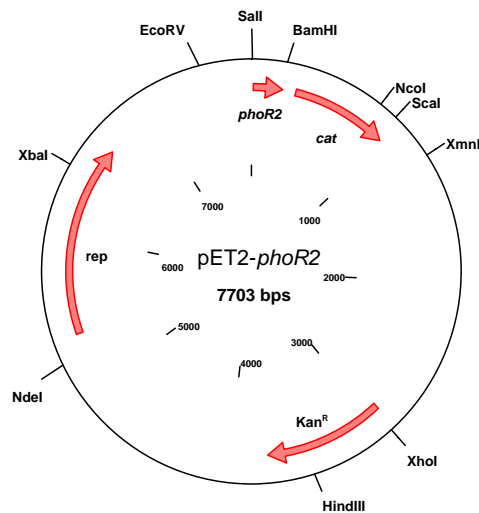


Abb. VIII. 2: Plasmidkarte pET2-*phoR2*: Promotor-Testvektor pET2 mit einem 200 bp PCR-Fragment des *phoR* Promotors (Primer *phoR*-42 fw und *phoR*+158 rv), das eine verkürzte Promotorregion von *phoR*, in der die PhoR-Bindestelle fehlt, aber die -10- und -35-Region noch vorhanden sind, kodiert. Das Fragment wurde über die Sall- und BamHI-Schnittstellen in den Vektor kloniert.

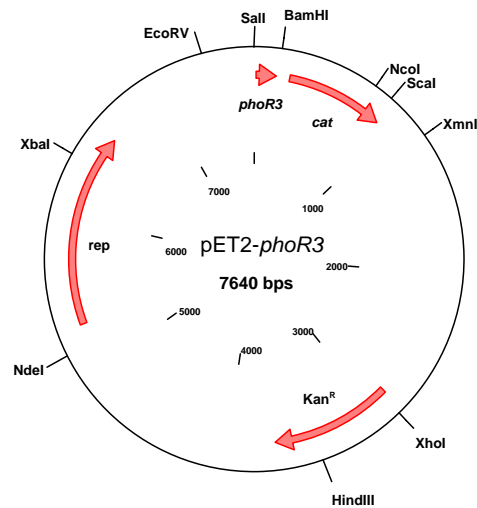
pET2-*phoR3*

Abb. VIII. 3: Plasmidkarte pET2-*phoR3*: Promotor-Testvektor pET2 mit einem 137 bp PCR-Fragment des *phoR* Promotors (Primer *phoR*+22 fw und *phoR*+158 rv), das eine stark verkürzte Promotorregion von *phoR*, in der weder die PhoR-Bindestelle noch die -10- und -35-Region vorhanden sind, kodiert. Das Fragment wurde über die Sall- und BamHI-Schnittstellen in den Vektor kloniert.

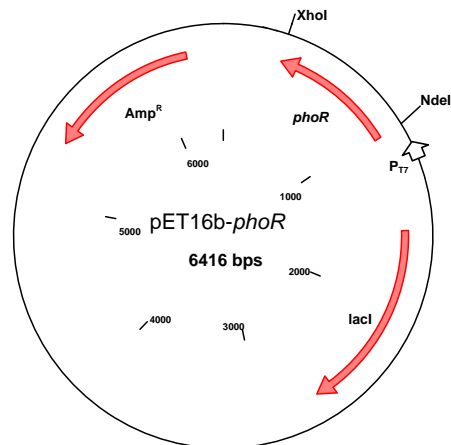
pET16b-*phoR*

Abb. VIII. 4: Plasmidkarte pET16b-*phoR*: Zur Überexpression von PhoR mit einem N-terminalen His₁₀-„tag“.

pMalE-PhoSK

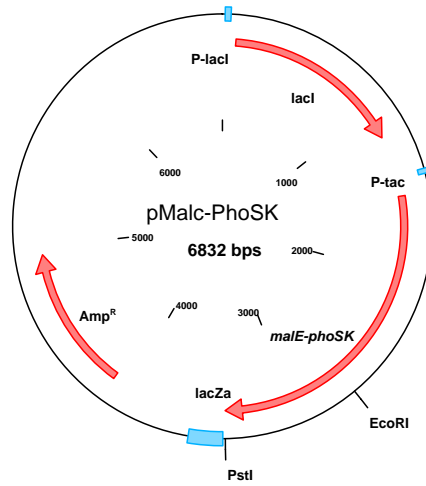


Abb. VIII. 5: Plasmidkarte pMalE-PhoSK: Zur Überexpression der Kinase-Domäne von PhoS.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Michael Bott danke ich sehr für die Vergabe des spannenden Themas, der Betreuung während der Zeit sowie der kritischen Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Wagner danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Sahn bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am IBT1 und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe möchte ich für die freundschaftliche und unterstützende Zeit im Büro und Labor danken. Ein ganz besonderer Dank gilt hier Verena und Jens.

Melanie danke ich für angenehme Atmosphäre in unserem Labor und Armin möchte ich für seine stete Hilfsbereitschaft, wenn es wieder an das Reparieren der HPLC ging, danken.

Julia, Melanie und Verena danke ich für die lustigen Frauenabende.

Allen Mitarbeitern des IBT1 danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Michael Fückner, der mich in dem letzten Jahr meiner Doktorarbeit so liebevoll unterstützt hat.

Ein ganz großer Dank gilt auch meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und unterstützt haben.

1. **Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD50) zur Einsparung von Tierversuchen**
von W. Halle (1998), 92 Seiten
ISBN: 978-3-89336-221-9
2. **Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung**
von D. Weuster-Botz (1999), II, 320 Seiten
ISBN: 978-3-89336-245-5
3. **Cell Culture Models as Alternatives to Animal Experimentation for the Testing of Neuroprotective Compounds in Stroke Research**
Practical Handbook of Methods
edited by A. J. Carter, H. Kettenmann (1999), 144 pages
ISBN: 978-3-89336-250-9
4. **Action and Visuo-Spatial Attention**
Neurobiological Bases and Disorders
Book of Abstracts
collected by P. H. Weiss (2000), XIV, 56 pages
ISBN: 978-3-89336-272-1
5. **Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli***
von T. Polen (2003), 100 Seiten
ISBN: 978-3-89336-337-7
6. **Auslegung des Detektorsystems für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen mit hoher Sensitivität**
von U. Heinrichs (2003), IV, 238 Seiten
ISBN: 978-3-89336-340-7
7. **Biological Principles Applied to Technical Asymmetric Catalysis**
by A. Liese (2003), VI, 206 pages
ISBN: 978-3-89336-344-5
8. **Designstudie eines μ CT-Zusatzes für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen: Beispiel für ein multimodales bildgebendes System**
von M. Khodaverdi (2004), III, 162 Seiten
ISBN: 978-3-89336-360-5
9. **Bioprocess Development for the Generation of Monocyte-Derived Dendritic Cells: Applicability in Breast Cancer Immunotherapy**
by H.R. Bohnenkamp (2004), XLII, 128 pages
ISBN: 978-3-89336-364-3

10. **Regulation der *clp*-Genexpression durch ClgR und Definition des ClgR-Regulons aus *Corynebacterium glutamicum***
von S. Engels (2004), V, 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-379-7
11. **Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli***
von M. Oldiges (2005), XVI, 181 Seiten
ISBN: 978-3-89336-380-3
12. **Identifizierung und Charakterisierung eines Transkriptionsregulators der Aconitase von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Krug (2005), VI, 122 Seiten
ISBN: 978-3-89336-382-7
13. **Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chloroperoxidase**
von S. Lütz (2005), XIV, 178 Seiten
ISBN: 978-3-89336-387-2
14. **Export von Proteinen mit Zwillingsarginin-Signalsequenzen über den Tat-Weg in *Escherichia coli***
von P. J. Kreutzenbeck (2005), 118 Seiten
ISBN: 978-3-89336-388-9
15. **Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese sowie zur Glutamatbildung mit *Corynebacterium glutamicum***
von E. Radmacher (2005), 130 Seiten
ISBN: 978-3-89336-389-6
16. **Monomodale und multimodale Registrierung von autoradiographischen und histologischen Bilddaten**
von A. Vieten (2005), 116 Seiten
ISBN: 978-3-89336-390-2
17. **Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494**
von S. Johnen (2005), 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-400-8
18. **Ex-vivo Generierung von neutrophilen Zellen zur Prävention und Therapie der Sepsis**
von R. Herbold (2005), 202 Seiten
ISBN: 978-3-89336-407-7

19. **Entwicklung eines Donor/Akzeptor-Konzeptes für die asymmetrische Synthese unsymmetrischer Benzoinen mit Hilfe ThDP-abhängiger Enzyme**
von P. Dünkermann (2005), 222 Seiten
ISBN: 978-3-89336-408-4
20. **Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifizieller und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3-Domänen**
von T. T. Tran (2005), 155 Seiten
ISBN: 978-3-89336-412-1
21. **Modeling Based Process Development of Fed-Batch Bioprocesses: L-Valine Production by *Corynebacterium glutamicum***
by M. Brik Ternbach (2005), 202 pages
ISBN: 978-3-89336-413-8
22. **Charakterisierung der Ausscheidung von L-Glutamat bei *Corynebacterium glutamicum***
von K. C. Stansen (2005), 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-416-9
23. **Metabolic and Bioprocess Engineering – a Fruitful Symbiosis**
by R. Takors (2005), 399 pages
ISBN: 978-3-89336-420-6
24. **Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen *de novo* Synthese von GDP- β -L-Fucose und der *in situ* Fucosylierung von Oligosacchariden**
von C. Hoh (2005), 240 Seiten
ISBN: 978-3-89336-423-7
25. **Humane Primärzellen als Feederzellen für die Kokultur mit hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut**
von A. S. Magin (2006), 206 Seiten
ISBN: 978-3-89336-424-4
26. **Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen**
von D. Meißner (2006), 140 Seiten
ISBN: 978-3-89336-427-5
27. **Energie- und Redoxstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Kabus (2006), VI, 115 Seiten
ISBN: 978-3-89336-439-8
28. **NMR-Lösungsstruktur der humanen Hck SH3-Domäne im Komplex mit einem artifiziellen, hochaffinen Peptid-Liganden**
von H. Schmidt (2006), XII, 115 Seiten
ISBN: 978-3-89336-441-1

29. **Entwicklung und Untersuchung eines Verfahrens zur integrierten Aufreinigung von Plasmid DNA mittels wässriger Zweiphasenextraktion**
von A. Frerix (2006), VII, 127 Seiten
ISBN: 978-3-89336-442-8
30. **Advanced Methods in Multiplexing Multi-Pinhole Imaging**
Design and Implementation of a High-Resolution and High-Sensitivity Small-Animal SPECT Imaging System
by C. Lackas (2006), XX, 176 pages
ISBN: 978-3-89336-451-0
31. **Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen**
Charakterisierung und reaktionstechnische Bearbeitung der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I
von T. Stillger (2006), XIV, 146 Seiten
ISBN: 978-3-89336-457-2
32. **Echtzeitsystem für Phasenrücksetzanalysen und Neuro-Rückkopplungen am MEG**
von H. Rongen (2006), 176 Seiten
ISBN: 978-3-89336-461-9
33. **Analyse des Mechanismus der Phosphatregulation in *Corynebacterium glutamicum***
von U. Sorger-Herrmann (2006), 117 Seiten
ISBN: 978-3-89336-466-4
34. **Enantioselective Reduction of Hydrophobic Keto Compounds in Multiphase Bioreactor**
by M. Villela Filho (2007), XVI, 196 pages
ISBN: 978-3-89336-470-1
35. **Untersuchung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Gram-positiven Bakterien**
von Michael Caspers (2007), 164 Seiten
ISBN: 978-3-89336-488-6
36. **Regulation der Phosphatmangelgene von *Corynebacterium glutamicum* durch das Zweikomponenten-System PhoRS**
von S. Schaaf (2007), VI, 114 Seiten
ISBN: 978-3-89336-496-1

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Band / Volume 36
ISBN 978-3-89336-496-1

Lebenswissenschaften
Life Sciences